

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej ROJKO

**VPLIV TOČKOVNIH MUTACIJ NA INTERAKCIJE
ALFA-SINUKLEINA Z MEMBRANAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej ROJKO

**VPLIV TOČKOVNIH MUTACIJ NA INTERAKCIJE
ALFA-SINUKLEINA Z MEMBRANAMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF POINT MUTATIONS ON ALPHA-SYNUCLEIN
INTERACTIONS WITH MEMBRANES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Praktično delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biokemijo in kemijo živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Physikalisch-Chemisches Institut der Fakultät für Chemie und Geowissenschaften der Universität Heidelberg.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 12. 09. 2008 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrich in na seji dne 4.06.2009 za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisam se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jernej ROJKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.352: 547.96: 616.8-092(043)=163.6
KG	biološke membrane/lipidne membrane/alfa-sinuklein/točkovne mutacije/cirkularni dihroizem/intrinzična fluorescenza/kritična micelna koncentracija/površina molekule alfa-sinukleina/površinska napetost lipidnega monosloja
AV	ROJKO, Jernej
SA	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ANDERLUH, Gregor (recenzent)
KZ	SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	VPLIV TOČKOVNIH MUTACIJ NA INTERAKCIJE ALFA-SINUKELEINA Z MEMBRANAMI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 62 str., 4 pregl., 25 sl., 147 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	<p>Sinukleinopatije so nevrodgenerativna obolenja s patološkimi intracelularnimi inkluzijskimi agregati, v katerih je eden od glavnih proteinov α-sinuklein. Funkcija α-sinukleina ni znana. Pripisujejo mu vlogo povezano s presinaptičnimi vezikli v živčnih terminalih. Spada med nativno nezvite proteine, v prisotnosti določenih lipidnih membran pride do tvorbe sekundarne strukture α-vijačnice. Dosedanje raziskave poudarjajo pomen elektrostatskih interakcij med α-sinukleinom in lipidi ter velikosti lipidnih struktur. Pri našem delu smo s pomočjo cirkularnega dihroizma in intrinzične fluorescence tirozina preučevali vezavo nativnega rekombinantnega α-sinukleina in mutant Y39A, Y125A ter Y(125, 133, 136)A na lipidne membrane. Potrdili smo nastanek α-vijačnice ob vezavi α-sinukleina na negativno nabite majhne unilamelarne vezikle. Nastanek α-vijačnice je odvisen od faznega ravnotežja lipidov, kar nakazuje, da je za vezavo α-sinukleina pomemben obstoj lipidov v dveh fazah. Predvidevamo, da se v negativno nabito membrano vstavi N-terminalni del z amfipatsko α-vijačno strukturo, medtem ko ostane C-terminalni del nestrukturiran. Z merjenjem površinske napetosti smo določili kritično micelno koncentracijo in površino molekule α-sinukleina. Pri študiju interakcij α-sinukleina z lipidi v fazi tekočega kristala, sestavljenimi iz nenasičenih maščobnih kislin, je prišlo do močnejše vgradnje nativnega proteina v neutralno nabito monosloj kot v negativno nabitega. Ti rezultati nakazujejo, da so za vezavo α-sinukleina poleg elektrostatskih interakcij pomembne tudi hidrofobne interakcije.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DD UDC 577.352: 547.96: 616.8-092(043)=163.6
CX biological membranes/ lipid bilayers/alpha-synuclein/point mutations/circular dichroism/intrinsic fluorescence/critical micellar concentration/alpha-synuclein/ /area per molecule/surface tension of lipid monolayer
AU ROJKO, Jernej
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/ANDERLUH, Gregor (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2009
TI IMPACT OF POINT MUTATIONS ON ALPHA-SYNUCLEIN INTERACTIONS WITH MEMBRANES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 62 p., 4 tab., 25 fig., 147 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Synucleinopathies form a group of neurodegenerative disorders that share a common pathologic intracellular deposits containing aggregated α -synuclein. Although the native function of α -synuclein is yet unknown, it is believed to be involved in the regulation of presynaptical vesicle reserve pool in nerve terminals. α -Synuclein is natively unfolded in buffer solution. However, after binding to particular membranes it forms α -helical structure. It is assumed that binding depends on electrostatic interaction and the size of lipid structures. The present study investigates the lipid binding of recombinant α -synuclein and mutants Y39A, Y125A and Y(125, 133, 136)A using circular dichroism and intrinsic tyrosine fluorescence. α -synuclein undergoes a transition into α -helical structure after binding to negatively charged small unilamellar vesicles. We have observed the increased formation of α -helix near lipid phase transition, suggesting a role of phase separation within the membrane. After binding to negatively charged vesicles amfipatic α -helix penetrates into lipid bilayer, but C-terminus remains unstructured. We have determined the critical micellar concentration of α -synuclein and its area per molecule on air-water interface. Penetration into lipid monolayer composed of unsaturated lipids in liquid crystalline phase is stronger in the case of neutrally charged lipids compared to negatively charged ones. These results indicate that in addition to electrostatic interaction, hydrofobic interaction is also important in the association of α -synuclein with membranes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
SPLOŠNE OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
OKRAJŠAVE LIPIDOV	XII
OKRAJŠAVE AMINOKISLIN	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 INTRINZIČNO NEUREJENI PROTEINI	3
2.1.1 Definicija in vloga intrinzično neurejenih proteinov	3
2.1.2 Intrinzično neurejeni proteini in amiloidne bolezni	4
2.2 α – SINUKLEIN	4
2.2.1 Proteinska družina sinukleinov	4
2.2.1.1 Zgodovina	4
2.2.1.2 β -sinuklein	4
2.2.1.3 γ -sinuklein	5
2.2.2 Primarno zaporedje monomernega α-sinukleina	6
2.2.3 Lokalizacija α-sinukleina	6
2.2.4 Struktura α-sinukleina v fizioloških razmerah	7
2.2.5 Interakcije α-sinukleina z membranami	9
2.2.5.1 Lipidni dvosloj	9
2.2.5.2 Lipidne vezavne domene α -sinukleina	10
2.2.5.3 Vezava α -sinukleina na lipidne membrane	10
2.2.5.4 Analiza sekundarne strukture α -sinukleina s CD spektroskopijo	13
2.2.5.5 Analiza sekundarne strukture α -sinukleina z drugimi metodami	14
2.2.6 Funkcija α-sinukleina	15
2.2.7 Patologija povezana z α-sinukleinom	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIAL	20
3.2 PRIPRAVA REKOMBINANTIH PROTEINOV	21
3.3 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV	21
3.4 CIRKULARNI DIHROIZEM	22

3.4.1 Teoretično ozadje	22
3.4.2 Razmere pri merjenju	23
3.5 INTRINZIČNA FLUORESCENCA	23
3.5.1 Teoretično ozadje	23
3.5.2 Razmere pri merjenju	24
3.6 MERJENJE POVRŠINSKIH POJAVOV	24
3.6.1 Površinska napetost	24
3.6.2 Kritična micelna koncentracija in površina molekule α-sinukleina	25
3.6.2.1 Teoretično ozadje	25
3.6.2.2 Razmere pri merjenju	26
3.6.3 Lipidni monosloj	27
3.6.3.1 Teoretično ozadje	27
3.6.3.2 Razmere pri merjenju	28
4 REZULTATI	29
4.1 CIRKULARNI DIHROIZEM	29
4.2 INTRINZIČNA FLUORESCENCA	35
4.3 KRITIČNA MICELNA KONCENTRACIJA IN POVRŠINA MOLEKULE α -SINUKEINA	38
4.4 LIPIDNI MONOSLOJ	39
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1 RAZPRAVA	41
5.1.1 Cirkularni dihroizem	41
5.1.2 Intrinzična fluorescenza	43
5.1.3 Kritična micelna koncentracija	45
5.1.4 Površina molekule α-sinukleina	46
5.1.5 Lipidni monosloj	47
5.2 SKLEPI	48
6 POVZETEK	49
7 VIRI	50
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Relativna ekspresija sinukleinskih genov določena s prenosom northern	5
Preglednica 2: Relativna ekspresija sinukleinskih genov v možganih določena s prenosom northern	5
Preglednica 3: Delež sekundarne strukture α -sinukleina v prisotnosti SUV različne lipidne sestave	13
Preglednica 4: Najvišji dosežen površinski tlak π_{\max} in absolutna razlika med začetnim in končnim površinskim tlakom $\Delta\pi$ po dodatku α -sinukleina ali pufra	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Organizacija človeških sinukleinskih genov	5
Slika 2: Lastnosti α -sinukleina v povezavi s primarnim zaporedjem	6
Slika 3: Koronalna rezina mišjih možganov analizirana z <i>in situ</i> hibridizacijo	7
Slika 4: Različna stanja lipidov v membrani	9
Slika 5: Vijačno kolo α -sinukleina in apolipoproteina	10
Slika 6: Sekundarna struktura α -sinukleina ob vezavi na micle	15
Slika 7: Eliptično polarizirana svetloba, ki se po prehodu skozi vzorec približuje opazovalcu	22
Slika 8: Obešena Wilhelmy ploščica	25
Slika 9: Znižanje površinske napetosti vode (γ) po dodatku amfifilnih molekul	25
Slika 10: Senzor površinske napetosti s platinasto žičko	26
Slika 11: Razširjen in stisnjen monosloj na vodni površini	27
Slika 12: Langmuirjeva tehtnica z dvema pomičnima barierama	27
Slika 13: Shematski prikaz injiciranja v pufer in vgradnje molekul proteina v lipidni monosloj	28
Slika 14: CD spektri proteinov pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPG	29
Slika 15: CD spektri proteinov pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC	30
Slika 16: CD spektri proteinov pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz sfingomielina	30
Slika 17: CD spektri nativnega proteina brez veziklov in v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina ($T = 40^\circ\text{C}$)	31
Slika 18: Povprečna molarna eliptičnost AK ostanka proteinov pri 220 nm ($[\theta]_{220}$) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina	32
Slika 19: Delež sekundarne strukture α -vijačnice nativnega α -sinukleina in mutant pri različnih temperaturah (T) v prisotnosti veziklov iz DPPC, DPPG ali sfingomielina	34
Slika 20: Delež sekundarne strukture α -vijačnice nativnega α -sinukleina in mutant pri različnih temperaturah (T) brez prisotnosti veziklov	34

Slika 21: Popravljeni fluorescenčni emisijski spektri nativnega proteina pri različnih razmerjih DPPG/protein ($T = 25^\circ\text{C}$)	35
Slika 22: Normalizirana fluorescenca (F/F_0) v odvisnosti od množinskega razmerja lipidi/protein (R) za proteine v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina	37
Slika 23: Normalizirana fluorescenca (F/F_0) v odvisnosti od množinskega razmerja lipidi/protein (R)	38
Slika 24: Odvisnost površinske napetosti (γ) od koncentracije α -sinukleina ($\ln(c/c_0)$) pri treh različnih poskusih	39
Slika 25: Sprememba površinske napetosti (γ) v odvisnosti od časa (t) po vbrizganju proteina pod lipidni monosloj	40

SPLOŠNE OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFM	mikroskopija na atomsko silo (ang. atomic force microscopy)
AK	aminokislina
bp	bazni par
<i>c</i>	množinska koncentracija
CD	circularni dihroizem
cDNA	komplementarna DNA
CMC	kritična micelna koncentracija (ang. critical micellar concentration)
CSP α	ang. cysteine-string protein- α
DT	divji tip
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
ER	endoplazemski retikulum
ERK	ang. extracellular signal-regulated kinase
GABA	γ -aminomaslena kislina
grp	ang. glucose-regulated protein homolog
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperaziniletansulfonska kislina
LT	Lewyjeva telesca
LUV	veliki unilamelarni vezikli (ang. large unilamellar vesicles)
MAP	ang. mitogen-activated protein kinase
MLV	multilamelarni vezikli (ang. multilamellar vesicles)
mRNA	informacijska RNA
MTSL	1-oksi-2,2,5,5-tetrametilpirolin-3-metil-metanetiosulfonat
NAC	ne- β -amiloidna komponenta Alzheimerjeve bolezni (ang. non- β -amyloid component of Alzheimer's disease)
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang. nuclear magnetic resonance)
NSF	ang. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
<i>R</i>	množinsko razmerje lipidi/protein
Rab3	ang. Ras-related protein Rab-3
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulfate)
SNARE	ang. soluble NSF attachment protein receptors
SUV	majhni unilamelarni vezikli (ang. small unilamellar vesicles)
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin layer chromatography)

T_m	temperatura faznega prehoda
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
γ	površinska napetost
π	površinski tlak
[PI(4,5)P2]	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
$[\theta]_\lambda$	povprečna molarna eliptičnost AK ostanka pri valovni dolžini λ
3X	mutanta z zamenjavo Tyr z Ala na mestih 125, 133 in 136

OKRAJŠAVE LIPIDOV

DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonijev propan
DPPA	1,2-dipalmitoil fosfatidna kislina
DPPC	1,2-dipalmitoil fosfatidilholin
DPPG	1,2-dipalmitoil fosfatidilglicerol
DPPS	1,2-dipalmitoil fosfatidilserin
PA	fosfatidna kislina
PC	fosfatidilholin
PE	fosfatidiletanolamin
PG	fosfatidilglicerol
PI	fosfatidilinozitol
POPA	1-palmitoil-2-oleoil fosfatidna kislina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilholin
POPE	1-palmitoil-2-oleoil fosfatidiletanolamin
POPG	1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilglicerol
POPS	1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilserin
PS	fosfatidilserin
SOPC	1-stearoil-2-oleoil fosfatidilholin
SOPG	1-stearoil-2-oleoil fosfatidilglicerol

OKRAJŠAVE AMINOKISLIN

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

1 UVOD

Sinukleinopatije so nevrodegenerativne bolezni, med katerimi je najbolj znana Parkinsonova bolezen. Njihova skupna značilnost so intracelularni inkluzijski agregati, v katerih je glavna komponenta protein α -sinuklein. Glavni simptomi Parkinsonove bolezni so tresenje, težave z gibanjem in fino motoriko, ki nastanejo zaradi odmiranja dopaminergičnih nevronov v možganih. Zanimanje za α -sinuklein je naraslo, ko so odkrili mutantne oblike tega proteina v redkih primerih zgodnjega pojava Parkinsonove bolezni pri nekaterih družinah. Na osrednjo vlogo α -sinukleina pri tej bolezni in drugih sinukleinopatijah kaže tudi povečana ekspresija mRNA tega proteina tako v naključnih kot dednih oblikah.

Nevrotoksičnost agregatov α -sinukleina še ni povsem raziskana. Najverjetnejso so toksični nefibrilarni oligomeri, za katere je značilna β -struktura, medtem ko proteinske fibrile predstavljajo slepo ulico v razvoju bolezni in niso odgovorne za citotoksičnost. Trenutno je najpogosteji predmet raziskav prav oligomerizacija α -sinukleina, številni avtorji poročajo o možnih vzrokih, ki so največkrat naključne narave.

Prav tako ni povsem razjasnjena funkcija α -sinukleina. Protein je sestavljen iz 140 aminokislinskih (AK) ostankov. Spada v skupino pri fizioloških pogojih nativno nezvitih proteinov. Prav ta značilnost α -sinukleina je vzrok, da je težko določiti njegovo nativno funkcijo in razloge za fibrilacijo. Struktura α -sinukleina je zelo občutljiva na okolje, v katerem se protein nahaja. Gen za ta protein se izraža predvsem v centralnem živčnem sistemu, natančnejše raziskave so pokazale, da se nahaja v presinaptičnih delih nevronov. Je citosolni protein, vendar se pod določenimi pogoji veže na membrano. Za razliko od oligomerov in fibril, za katere je značilna β -struktura, se na delu α -sinukleina pri interakcijah z nekaterimi lipidnimi membranami inducira struktura α -vijačnice.

Usmerjena mutageneza je ena od možnosti preučevanja proteinov. Opazovanje vpliva AK zamenjav nam lahko veliko pove o strukturi in funkciji preučevanega proteina. Za namen preučevanja interakcij α -sinukleina z lipidnimi membranami smo uporabili mutantne oblike proteina, ki imajo na različnih mestih tirozinski AK ostanek zamenjan z alaninskim AK ostankom. Dodatno smo v okviru študijske izmenjave dobili možnost preučevanja interakcij α -sinukleina z lipidnimi monosloji, kar v raziskavah tega zanimivega proteina predstavlja nov pristop.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen dela:

- določiti vpliv zamenjav tirozinskih AK ostankov z alaninskimi na interakcije rekombinantnega α -sinukleina z modelnimi lipidnimi membranami,
- poskušati razjasniti mehanizem vezave α -sinukleina na modelne lipidne membrane,
- vpeljati tehnike, ki do sedaj še niso bile uporabljeni za preučevanje interakcij med α -sinukleinom in lipidi.

Hipoteze:

- vgradnja nativnega α -sinukleina in mutant v lipidne vezikle je odvisna od naboja polarnih lipidnih glav,
- različna stanja membrane vplivajo na interakcijo α -sinukleina z vezikli,
- N-terminalni del α -sinukleina se po vezavi na negativno nabite vezikle vstavi v membrano, inducira se struktura α -vijačnice,
- C-terminalni del α -sinukleina ni pomemben za vstavitev v membrano,
- vgradnja α -sinukleina v lipidni monosloj je šibka in odvisna od naboja lipidov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 INTRINZIČNO NEUREJENI PROTEINI

2.1.1 Definicija in vloga intrinzično neurejenih proteinov

Centralna dogma strukturne biologije govori o tem, da je biološka funkcija proteina pogojena z njegovo 3D strukturo. Ta ideja je zelo stara, kot model ključa in ključavnice je bila predstavljena že leta 1894 (Fischer, 1894). Vsekakor sta struktura in funkcija tesno povezani, vendar nekateri biološko funkcionalni proteini spontano ne zavzamejo globularne strukture (Wright in Dyson, 1999). Ocenjuje se, da ima več kot 30 % vseh proteinov v evkariotskih celicah neurejeno strukturo, ki se razteza na najmanj 50 AK ostankih (Dunker in sod., 2001).

Intrinzično neurejene proteine definiramo kot proteine, ki v očiščeni obliki pri nevtralnem pH na celotnem ali samo delu AK zaporedja ne zavzamejo nobene urejene strukture, ampak veliko število naključnih konformacij. Neurejene so lahko tudi samo določene regije proteinov. Za ta pojav je odgovorno AK zaporedje proteina. Delimo jih v dve skupini, v prvi so nativno nezviti proteini, ki ne zavzamejo nobene urejene strukture, v drugi pa proteini, ki imajo nezvite samo določene regije (30-40 AK ostankov). Prve nadalje razdelimo na proteine, ki nimajo nobene sekundarne strukture in proteine, ki zavzamejo stanje podobno razrahljanemu klobčiču, torej da imajo določeno stopnjo sekundarne strukture, vendar so brez terciarne strukture (Uversky, 2002; Fink, 2005).

Kot odgovor na vprašanje, zakaj so intrinzično neurejeni蛋白 tako pogosti, obstaja več teorij. Prva govori o tem, da imajo ti proteini veliko površino, ki lahko interagira z drugimi molekulami v celici. Da bi zvit monomerni protein dosegel enako površino za interakcije kot nativno nezvit, bi AK zaporedje prvega moralo biti 2-3 krat daljše. To bi povečalo gnečo v celici, ali pa bi morala biti velikost celice do 30 % večja. Nezviti proteini torej pripomorejo k večji površini proteinov, ki je na voljo za interakcije, zmanjša se velikost proteinov, s tem pa tudi genoma in celice (Gunasekaran in sod., 2003). Druge teorije izpostavljajo funkcionalnost nezvitega stanja proteinov. Interakcije z različnimi ligandi povzročijo, da se protein zvije. To so lahko nukleinske kisline, proteini ali membrane (Wright in Dyson, 1999). O morebitnih prednostih nezvitih proteinov so razmišljali Wright in Dyson (1999) ter Dunker in sod. (1998, 2001): (1) velika specifičnost in majhna afiniteta, (2) vezava na različne tarče, (3) večja površina za interakcije, (4) natančna kontrola in enostavna regulacija termodinamike vezave, (5) pospešena asociacija makromolekul. Nezviti proteini so tarča celičnih mehanizmov razgradnje proteinov, zato zadnja možnost (6) govori o prednosti teh proteinov zaradi hitre razgradnje in s tem hitrega odziva celičnega regulatornega mehanizma. Zadnji možnosti v prid govori tudi podatek, da je veliko nezvitih proteinov vpletenih v zelo pomembne funkcije evkariotske celice, kot so celični cikel in regulacija transkripcije ter translacije (Wright in Dyson, 1999).

2.1.2 Intrinzično neurejeni proteini in amiloidne bolezni

Med proteini, ki tvorijo fibrile pri amiloidnih boleznih, je veliko takih, ki so nativno nezviti. Za razliko od kompaktnih globularnih proteinov so ti veliko bolj nagnjeni k fibrilaciji. Vzrok leži v dejstvu, da nezviti proteini ne zavzamejo neke značilne konformacije, struktura je bolj ali manj naključna. Številni dokazi kažejo, da v začetni fazi fibrilacije ti proteini zavzamejo delno zvito strukturo. Tak primer sta amiloidni β -protein in tau protein pri Alzheimerjevi bolezni, prionski protein, α -sinuklein pri Parkinsonovi bolezni in ekson 1 huntingtina pri Huntingtonovi bolezni (Fink, 2005; Uversky in Fink, 2006).

2.2 α – SINUKLEIN

2.2.1 Proteinska družina sinukleinov

2.2.1.1 Zgodovina

Leta 1988 so Maroteaux in sod. (1988) izolirali nov protein iz električnega organa skata *Torpedo californica*, ko so ekspresijsko knjižnico pregledali z antiserumom proti holinskim veziklom. S pomočjo pridobljene cDNA so izolirali klon podgane, ki je kodiral protein, dolg 140 AK ostankov. Ker so protein našli v jedrni ovojnici in v presinaptičnih živčnih terminalih, so ga poimenovali sinuklein. Ueda in sod. (1993) so iz amiloidnih plakov bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo izolirali peptid, ki so ga poimenovali ne- β -amiloidna komponenta Alzheimerjeve bolezni (NAC). Prekurzor tega peptida je pokazal na veliko homologijo s podganjem sinukleinom. Kasneje so v podghanah in govedu odkrili še 14-kD fosfonevroprotein, ki spada v družino sinukleinov (Tobe in sod., 1992). Ker sta prekurzor NAC in 14-kD fosfonevroprotein različna proteina, so ju poimenovali α -sinuklein in β -sinuklein (Jakes in sod., 1994). Leta 1997 je bil iz tumorja na prsih izoliran še γ -sinuklein (Ji in sod., 1997). Proteini iz družine sinukleinov so bili do sedaj odkriti samo pri vretenčarjih (George, 2001).

2.2.1.2 β -sinuklein

Med različnimi vrstami je zaporedje β -sinukleina najbolj ohranljeno v družini sinukleinov. Sestavlja ga 134 AK ostankov. Vsebujejo regijo s petimi značilnimi 11 AK ponovitvami. C-terminalni del je manj ohranjen, vsebuje številne kisle AK ostanke. Pri človeku se gen za β -sinuklein nahaja na petem kromosому (5q35, slika 1) (Nakajo in sod., 1993; Spillantini in sod., 1995; Perrin in sod., 2000). Pri fizioloških pogojih je nezvit protein, ob vezavi na lipidne vezikle ali micle detergentov zavzame N-terminalna regija z nepopolnimi 11-AK ponovitvami strukturo α -vijačnice (Sung in Eliezer, 2007).

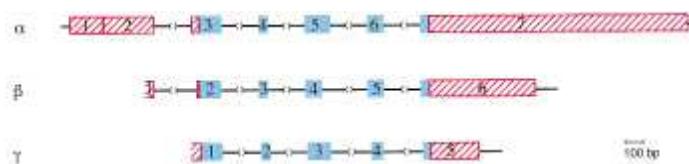
Prenos northern je pokazal, da je β -sinuklein zelo pogost v možganih, manj pa v drugih tkivih (preglednica 1). Za razliko od α - in γ -sinukleina ni prisoten v vseh možganskih predelih (preglednica 2). V celici se nahaja v živčnih terminalih v bližini sinaptičnih veziklov. Pri odraslem človeku je pogost predvsem v sivini (Shibayama-Imazu in sod., 1993; Jakes in sod., 1994, Iwai in sod., 1995). β -sinuklein je inhibitor fosfolipaze D2, ki katalizira hidrolizo fosfatidilholina v fosfatidno kislino, igra pa tudi vlogo v citoskeletni

reorganizaciji in endocitozi na plazemski membrani (Jenco in sod., 1998; Colley in sod., 1997).

2.2.1.3 γ -sinuklein

Za razliko od β -sinukleina je γ -sinuklein najmanj ohranjen med vrstami. Človeška varianta je dolga 127 AK ostankov (Lavedan, 1998). Vsebuje 11 AK ostankov dolge nepopolne ponovitve na N-terminalnem koncu in s kislimi AK ostanki bogat C-terminalni konec. Gen se nahaja na desetem kromosomu (10q23.2-q23.3, slika 1) (George, 2001). Prav tako kot β -sinuklein je nativno nezvit, ob stiku z membranami ali miceli pa tvori strukturo α -vijačnice (Sung in Eliezer, 2007).

Prenos northern kaže na precejšnjo razširjenost ekspresije v možganih, največ v subtalamičnem jedru (preglednica 1, preglednica 2). Za razliko od α - in β -sinukleina je pogost v periferneh živčnem sistemu (Ji in sod., 1997). Igra pomembno vlogo pri raku na prsih, kjer eksogena ekspresija poveča invazivnost tumorskih celic (Jia in sod., 1999). Surguchov in sod. (2001) so pokazali, da se v celicah med mitozo γ -sinuklein nahaja na polih delitvenega vretena, v interfaznih celicah pa v bližini centrosomov, kar kaže na njegovo vlogo v signalni transdukciji.



Slika 1: Organizacija človeških sinukleinskih genov. Rdeča (neprevedena regija) in modra barva (kodirajoča regija) predstavlja eksone. Introni so prikazani kot prekinjene črte, pri čemer niso izrisani v merilu (Lavedan, 1998).

Preglednica 1: Relativna ekspresija sinukleinskih genov določena s prenosom northern. Rezultati niso primerni za primerjavo med posameznimi geni (Lavedan, 1998).

	Trebušna slinavka	Ledvice	Skeletne mišice	Jetra	Pljuča	Placenta	Možgani	Srce
α	+	+	++	-	+	+	++++	++
β	-	-	+	-	-	-	++++	-
γ	+	+	++	+	-	-	++++	++

Preglednica 2: Relativna ekspresija sinukleinskih genov v možganih določena s prenosom northern. Rezultati niso primerni za primerjavo med posameznimi geni (Lavedan, 1998).

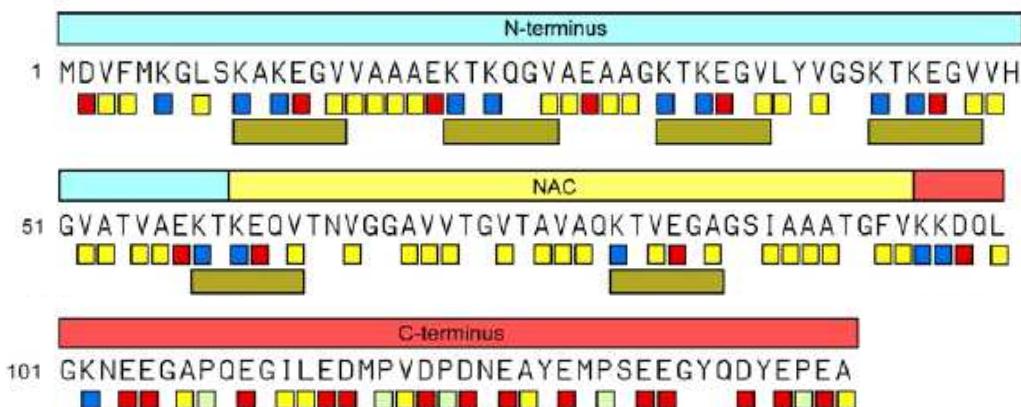
	Talamus	Subtalamično jedro	Substantia nigra	Hipokampus	Corpus callosum	Kavdatno jedro	Amigdala
α	++	+	+++	+++	++	+++	+++
β	++	-	++	++	-	+	++
γ	+++	+++	+++	++	+	++	+++

2.2.2 Primarno zaporedje monomernega α -sinukleina

Gen za α -sinuklein se pri ljudeh nahaja na četrtem kromosomu (4q21.3-q22, slika 1) (Chen in sod., 1995), protein je dolg 140 AK ostankov. Prvih 42 AK ostankov je pri vseh vrstah enakih (Lavedan, 1998). Primerjava človeškega, podganjega in govejega α -sinukleina ter α -sinukleina iz skata vrste *Torpedo californica* pokaže, da imajo visoko razmerje lizina proti argininu, ne vsebujejo cisteinskih ali triptofanskih AK ostankov, C-terminalna domena pa vsebuje veliko kislih AK ostankov. Med vrstami dolžina proteina varira med 134 in 143 AK ostanki. Za prvih 89 AK ostankov so značilne ponovitve različic degeneriranega zaporedja 11 AK ostankov (ohranjeno zaporedje KTKEGV), z nekaj izjemami se ta ponovi šestkrat. Vsaka ponovitev ima nekatere značilnosti, ki jo ločujejo od drugih ponovitev v zaporedju proteina, te so ohranjene med vrstami. Primer sta tirozinski AK ostanek v tretji enoti ponovitev na mestu 39 in glutaminski AK ostanek v drugi enoti na mestu 23. V šesti enoti ni prisotnih nabitih AK ostankov, zato je ta del zelo hidrofoben (NAC domena). Zaporedje 11-mernih ponovitev je pri vseh vrstah prekinjeno med četrtto in peto ponovitvijo, kjer so vrinjeni širje nabiti AK ostanki. Za preostanek proteina je značilna hidrofilnost in pogostost kislih AK ostankov, pri čemer je glutaminska kislina pogostejsa od asparaginske (George in sod., 1995).

Glede na AK sestavo človeškega α -sinukleina lahko tega razdelimo na tri različne regije (slika 2):

- N-terminalna domena je pozitivno nabita in vsebuje 5 nepopolnih ponovitev visoko ohranjenega KTKEGV motiva. Zajema AK ostanke na mestih 1-60.
- Centralna NAC domena je hidrofobna, nahaja se na mestih 61-95.
- C-terminalna regija na mestih 96-140 vsebuje številne kisle AK ostanke.



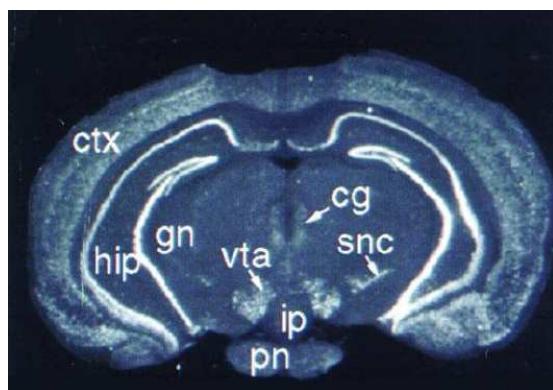
Slika 2: Lastnosti α -sinukleina v povezavi s primarnim zaporedjem. Pozitivno nabiti AK ostanki so označeni z modro barvo, negativni z rdečo, hidrofobni z rumeno in prolin s svetlo modro. Ohranjeno zaporedje je označeno z rjavim okvirčkom (Bertoničini, 2006).

2.2.3 Lokalizacija α -sinukleina

Ueda in sod. (1993, 1994) so s pomočjo prenosa northern pokazali, da je daleč največ mRNA α -sinukleina prisotne v možganih, vendar so jo zaznali tudi v vseh drugih preiskanih tkivih (trebušna slinavka, ledvice, skeletne mišice, pljuča, placenta in srce),

razen v jetrih (preglednica 1). V krvi je največ proteina v rdečih krvničkah, prisoten je tudi v plazmi, mononuklearnih celicah in krvnih ploščicah (Barbour in sod., 2008).

V možganih je α -sinuklein široko zastopan. mRNA je bila zaznana v številnih možganskih predelih (slika 3, preglednica 2). Solano in sod. (2000) so še posebej močno izražanje α -sinukleinskega gena zaznali v predelu *substantia nigra pars compacta*, kjer se nahajajo dopaminski nevroni. α -sinuklein je prisoten v sinapsah v različnih možganskih predelih, za katere so značilni različni nevrotransmiterji: dopamin, glutamin in GABA (Totterdell in Meredith, 2005).



Slika 3: Koronalna rezina mišjih možganov analizirana z *in situ* hibridizacijo kaže na visoko ekspresijo v predelih cerebralnega korteksa (ctx), hipokampa (hip), *substantia nigra pars compacta* (snc) in ventralnega dela srednjih možganov (vta) (Abeliovich in sod., 2000).

V možganskem homogenatu predstavlja α -sinuklein 0,5 do 1 % vseh proteinov (Iwai in sod., 1995). Po frakcionaciji mišjih možganov je bil α -sinuklein s pomočjo protiteles zaznan v sinaptosomih, kar kaže na prisotnost v sinapsah. Po lizi sinaptosomov se je nahajal v topni frakciji, vezava je torej reverzibilna. Aplikacija protiteles na možgansko tkivo je pokazala, da je del α -sinukleina v celici prisotnega v presinaptičnem delu nevronov, delno pa je raztopljen v citosolu teles nevronov. Dodatna aplikacija protiteles proti β -sinukleinu kaže na kolokalizacijo α - in β -sinukleina (Kahle in sod., 2000). Prisotnost α -sinukleina tako v sinaptosomih kot v citosolu presinaptičnih terminalov so pred tem ugotovili tudi George in sod. (1995). Lee in sod. (2002) poročajo, da je približno 15 % α -sinukleina vezanega na membrano. Čeprav so Maroteoux in sod. leta 1988 poročali o prisotnosti α -sinukleina v bližini celičnega jedra, nadaljnje raziskave tega niso potrdile.

2.2.4 Struktura α -sinukleina v fizioloških razmerah

Sekundarno strukturo α -sinukleina so prvi poskušali določiti Weinreb in sod. (1996). Sedimentacija proteina pri fizioloških pogojih je precej počasnejša kot je to običajno pri globularnih proteinih, kar kaže na podaljšano strukturo nativnega proteina. Cirkularni dihroizem (CD) je pokazal na pomanjkanje sekundarne strukture α -sinukleina v raztopini: manj kot 2 % α -vijačnice in 68 % naključno zvitega proteina. Preostanek je β -struktura, čeprav CD ni najbolj primeren za določanje le-te. Skladni s temi rezultati so bili tudi rezultati z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FTIR). Takšno pomanjkanje urejene strukture je neodvisno od koncentracije proteina, soli, kemičnih denaturantov in pH. Zaradi teh značilnosti avtorji zaključujejo, da protein v fizioloških

razmerah zavzame številne raztegnjene konformacije s kratko življenjsko dobo, zaradi česar ga lahko uvrstimo med intrinzično neurejene proteine. Z nekoliko spremenjenim protokolom izolacije je CD pokazal 9 % α -vijačnice, 35 % β -strukture in 56 % naključno zvitega proteina v raztopini (Narayanan in Scarlata, 2001).

Jedrska magnetna resonanca (NMR) je primerna metoda za študij nativno nezvitih proteinov. Dedmon in sod. so leta 2005 pokazali na prisotnost interakcij med različnimi deli molekule α -sinukleina. Za ta namen so pripravili mutante α -sinukleina, vstavljeni cisteinski AK ostanki so bili označeni z nitroksidom, kar omogoča opazovanje interakcij s kratko življenjsko dobo. Te so bile še posebej značilne med AK ostanki na mestih 30-100 in 120-140, kar približno ustrezta hidrofobni centralni regiji in C-terminalnemu delu. Avtorji predlagajo, da ta delna kondenzacija pripomore k zakritju hidrofobne domene in s tem zavira agregacijo proteina, ki je značilna za sinukleinopatije.

Podobno metodologijo kot Dedmon in sod. so uporabili tudi Bertoncini in sod. (2005). Najpomembnejša interakcija je med hidrofobno skupino AK ostankov na C-terminalnem delu NAC domene (AK ostanki na mestih 85-95) in C-terminalno domeno (AK ostanki na mestih 110-130). Predpostavljajo, da imajo pri tem pomembno vlogo Met116, Val118, Tyr125 in Met127. Znotraj C-terminalne domene AK ostanki na mestih 120-130 interagirajo z AK ostanki na mestih 105-115, regija okoli AK ostanka 120 pa interagira z N-terminalnim delom molekule okoli mesta 20. Te interakcije so dinamične, vendar vodijo k bolj kompaktnim konformacijam α -sinukleina. C-terminalna domena prekrije centralno regijo in s tem preprečuje agregacijo proteina. Skladen z rezultati te raziskave je podatek, da hidrodinamski radij α -sinukleina ob dodatku 8 M uree ustrezta radiju popolnoma nezvitega proteina, medtem ko je v nativnem stanju ta precej manjši (Uversky in sod., 2002).

Poklar Ulrich in sod. (2008) so preučevali vpliv zamenjav tirozinskih AK ostankov z alaninskimi. Posledica zamenjave na mestu 39 ali 133 je popolna inhibicija fibrilacije. Avtorji predlagajo model hidrofobne interakcije Tyr39 in Tyr133, ki je pomembna za proces fibrilacije. Zamenjava tirozina z alaninom na teh mestih vodi v zaščito hidrofobne domene molekule pred fibrilacijo. Pri dinamičnih konformacijah α -sinukleina igrajo pomembno vlogo elektrostatske interakcije in interakcije topila, vendar moramo upoštevati tudi obsežnost AK ostankov (razmerje volumna in dolžine AK ostanka) v polipeptidni verigi α -sinukleina, ki narekuje strukturo lokalnih dinamičnih konformacij (Cho in sod., 2007). Alaninski AK ostanek ima večjo preferenco k tvorbi α -vijačnice kot velika nepolarna stranska veriga tirozina, ki teži k tvorbi β -strukture (Poklar Ulrich in sod., 2008).

S pomočjo mikroskopije na atomsko silo (AFM) so Sandal in sod. (2008) preučevali populacije konformacij α -sinukleina pri različnih pogojih. S to metodo je mogoče izmeriti silo, ki je potrebna za razvitje ene molekule proteina. Zaznati je mogoče konformacije z življenjsko dobo, daljšo od 10^{-3} s, ki so zaradi dolgoživosti verjetno biološko najbolj pomembne. V TRIS pufru lahko konformacije α -sinukleina razdelimo v tri razrede: naključno zvitje (38,2 %), β -struktura (7,3 %) in konformacije, stabilizirane s šibkimi interakcijami (54,5 %).

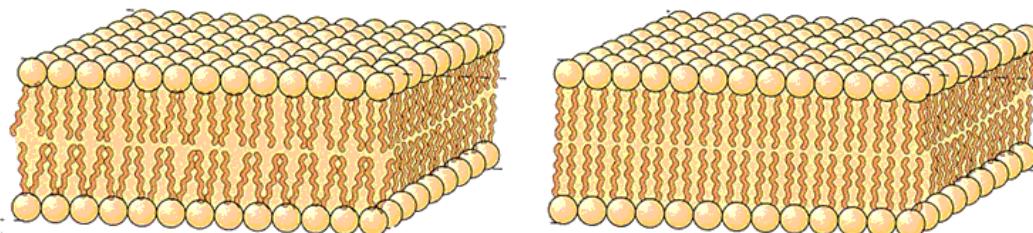
2.2.5 Interakcije α -sinukleina z membranami

2.2.5.1 Lipidni dvosloj

Osnovna enota lipidnega dvosloja oz. membrane so fosfolipidi. Ti so sestavljeni iz dolgih verig maščobnih kislin in polarne glave. Veriga maščobnih kislin je dolga med 14 in 24 ogljikovih atomov. Hidrofobne nepolarne verige tvorijo lipidni dvosloj, pri čemer ostanejo polarne glave orientirane proti vodnemu okolju na obeh straneh membrane. Debelina biološke membrane je približno 5 nm (Atkins in de Paula, 2006).

Fosfolipidi v vodni fazi tvorijo heterogeno disperzijo vezikularnih struktur. Večino predstavljajo strukture sferične oblike, sestavljene iz večih lipidnih dvoslojev – multilamelarni vezikli (MLV). Če disperzijo izpostavimo ultrazvoku, MLV razpadajo na veliko manjše strukture velikosti 25-50 nm, ki jih imenujemo majhni unilamelarni vezikli (SUV), ker jih sestavlja samo ena plast dvosloja. Z različnimi metodami lahko pripravimo tudi velike unilamelarne vezikle velikosti 100-500 nm (Ostro, 1983).

Za lipidni dvosloj, sestavljen iz ene vrste lipida, je značilen fazni prehod med stanjem visoke in nizke mobilnosti lipidov. V stanju visoke mobilnosti lipidov je dovolj proste energije za rotacijo atomov okoli kemijske vezi in s tem večje število prostostnih stopenj nepolarnih verig. Vendar pa sistem še vedno kaže določeno stopnjo organizacije, saj membrana ne razpade. Tako stanje imenujemo tekoči kristal. Pri nižjih temperaturah število prostostnih stopenj pada, dokler pri določeni temperaturi nepolarne verige večinoma ne obmirujejo, tako stanje imenujemo stanje gela (slika 4). Temperatura faznega prehoda (T_m) je odvisna od kemijske narave lipida. Ta narašča z daljšanjem nepolarne verige, saj močnejše hidrofobne interakcije preprečujejo mobilnost. Obratno vlogo imajo dvojne vezi v nepolarni verigi, te preprečujejo poravnavo verig in s tem znižajo temperaturo faznega prehoda (Atkins in de Paula, 2006).

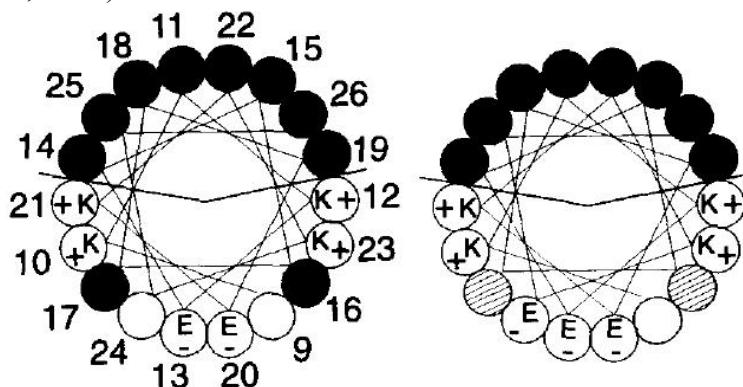


Slika 4: Različna stanja lipidov v membrani. Levo je prikazano stanje tekočega kristala, desno stanje gela (Farfield Scientific, 2006).

Pomembna komponenta sesalskih bioloških membran je holesterol, ki lahko sproži nastanek mikrodomen bogatih s holesterolom in sfingomielinom. Imenujemo jih lipidni rafti, glede na zadnja spoznanja imajo ti pomembno vlogo pri signalni transdukciji, razmeščanju lipidov v celici in aktivnosti proteinov v membrani. Nepolarne nasičene verige fosfolipidov so v lipidnih raftih tesno skupaj. Stanje je podobno fazi gela, vendar so fosfolipidi v lipidnih raftih bolj lateralno mobilni, to stanje imenujemo tekoča urejena faza. Lipidni rafti »plujejo« v nenasicienih glicerofosfolipidih v tekoči neurejeni fazi, ki je v bistvu faza tekočega kristala s holesterolom (M'Baye in sod., 2008).

2.2.5.2 Lipidne vezavne domene α -sinukleina

Značilnost primarnega zaporedja α -sinukleina so ohranjena ponavljanjoča se zaporedja enajstih AK ostankov. Podobne motive so našli še pri dveh razredih proteinov in sicer apolipoproteinih (A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III) in rastlinskih proteinih, ki se akumulirajo med tvorbo semen in sušo. Za oboje velja, da tvorijo strukturo α -vijačnice, pri čemer imajo 11-merne ponovitve pomembno vlogo. Pri apolipoproteinih so vijačnice amfipatske narave in služijo predvsem namenu vezave fosfolipidov. Če upoštevamo, da zavoj vijačnice tvori približno 3,6 AK ostankov, potem se vsaki enajsti AK ostanek nahaja na isti strani α -vijačnice znotraj 20° (slika 5). Pri α -sinukleinu to privede do ločitve polarnih in nepolarnih AK ostankov, vijačnica α -sinukleina postane amfipatske narave (George in sod., 1995).



Slika 5: Vijačno kolo α -sinukleina, prikazani AK ostanki na mestih 9-26 (levo). Apolipoprotein, α -vijačnica razreda A₂ (desno). Nepolarni AK ostanki so označeni s črno barvo, nabiti s + ali - znakom (George in sod., 1995).

Amfipatske α -vijačnice apolipoproteínov so Segrest in sod. (1992) razdelili glede na porazdelitev polarnih in nepolarnih AK ostankov v strukturi vijačnice. Razred A veže lipide, njihova značilnost so bazični AK ostanki na meji med polarnim in nepolarnim delom α -vijačnice, v centru polarnega dela so negativno nabiti AK ostanki. Vijačnice razreda G so vpletene v interakcije z drugimi proteini, za njih je značilna naključna razporeditev nabitih AK ostankov v polarnem delu α -vijačnice. Teoretične vijačnice na prvih štirih 11-mernih ponovitvah α -sinukleina spadajo v razred A₂ α -vijačnic, bazični AK ostanki se nahajajo ±100° glede na center nepolarnega dela. α -vijačnica na peti 11-merni ponovitvi spada v razred G in je torej kandidat za interakcijo s proteini. Posebnost α -sinukleina glede na apolipoproteíne so treoninski AK ostanki, ki so sicer polarni, vendar so lahko zaradi dolge alifatske verige prisotni v nepolarnem okolju. Treonini so ohranjeni med vrstami, kar kaže na njihovo pomembno funkcijo. Druga posebnost prvih štirih α -vijačnic α -sinukleina so prekinitev z nepolarnimi AK ostanki, ki naj bi zmotile njihovo amfipatsko naravo (Davidson in sod., 1998).

2.2.5.3 Vezava α -sinukleina na lipidne membrane

Davidson in sod. (1998) so SUV in MLV, pripravljene z možganskimi fosfolipidi in sintetičnim nevtralno nabitim POPC, inkubirali z rekombinantim α -sinukleinom iz kanarčka. 70 % α -sinukleina je ostalo vezanega na SUV, 30 % pa v raztopini, pri čemer so bili vezikli izključno iz možganskih fosfolipidov. α -sinuklein se ni vezal na MLV in na vezikle iz sintetičnega POPC. Sestava možganskih lipidov je bila naslednja: 50-55 % PS,

10-12 % PI, 10 % PE in 23-30% neznanih fosfolipidov. PS in PI sta negativno nabita, PE je neto nevtralen. Nadaljnji poskusi s SUV iz sintetičnih lipidov so pokazali, da se α -sinuklein veže na SUV, v katerih vsaj 30 do 50 % mase predstavljajo negativno nabiti lipidi. Ob zmanjšanju deleža negativno nabitih lipidov na manj kot 20 % mase SUV ostane veliko proteina nevezanega. Primerjali so tudi vezavno sposobnost α -sinukleina na vezikle različnih velikosti: SUV velikosti 20-25 nm in LUV velikosti 125 ± 30 nm. Na vezikle izključno iz POPC se α -sinuklein ni vezal, na LUV iz POPC/POPA (POPA je negativno nabit) pa slabše kot na SUV enake sestave.

Vezavo na negativno nabite SUV so potrdili Perrin in sod. (2000). α -sinuklein so inkubirali skupaj s SUV, nato pa raztopino ločili z gelsko kromatografijo. α -sinuklein se je eluiral skupaj z vezikli sestavljenimi iz sintetičnih POPC/POPA in POPC/POPS v masnem razmerju 1:1, medtem ko vezave na vezikle samo iz POPC niso zaznali.

Jo in sod. (2000) so uporabili nekoliko drugačno metodologijo, nekatere sintetične lipide in lipide iz možganskega ekstrakta so ločili s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) in dodali α -sinuklein. Veliko α -sinuklina je bilo vezanega na PE, lizo-PE in PI. Interakcija POPS in PS je bila sicer zaznana, vendar šibka, medtem ko se protein na POPC, POPA, sfingomielin in holesterol ni vezal. Zanimivo je, da se ni vezal na PA, vendar avtorji poudarjajo, da TLC ni idealna tehnika za študij vezave α -sinukleina. Pomembno je poudariti, da molekule PE, ki zaradi svoje geometrije tvorijo negativno ukrivljenost membrane, pospešujejo interakcijo nekaterih citosolnih proteinov z membranami.

V obeh primerih, kjer so dokazali vezavo α -sinukleina na SUV, so protein predhodno inkubirali s SUV najmanj eno uro. Narayanan in Scarlata (2001) sta za analizo vezave uporabila fluorescenčne tehnike (intrinzična fluorescencija tirozinskih AK ostankov in fluorescencija laurdan barvila), pri čemer nista predhodno inkubirala proteina in veziklov. α -sinuklein se je vezal na LUV iz negativnih POPS in, nekoliko prenenetljivo, nevtralno nabitih POPC s skoraj povsem enako afiniteto, vendar v nobenem primeru ni prišlo do spremembe v sekundarni strukturi proteina. Pomembno vlogo za vezavo na vezikle ima negativno nabiti C-terminalni konec. Ob znižanju pH raztopine, kar zmanjša negativni naboje C-terminalnega konca, se afiniteta α -sinukleina do veziklov močno poveča, ne vpliva pa na sekundarno strukturo.

Kvantitativna analiza vezave α -sinukleina na lipidne membrane je mogoča s fluorescenčno koreacijsko spektroskopijo. Potrdila je pomembnost negativno nabitih lipidov (PA in PS) za vezavo α -sinukleina na LUV velikosti ~ 120 nm, pri čemer niso uporabili predhodne inkubacije proteina in veziklov. Protein ima večjo afiniteto za vezikle, delno sestavljene iz POPA, kot za vezikle iz ekvivalentne količine POPS. Razlog bi se lahko skrival v polarni glavi POPA, ki je v primerjavi s POPS manjša, kar omogoča večjo gostoto negativnih nabojev. Afiniteta vezave z zmanjševanjem deleža negativno nabitih lipidov in povečevanjem deleža nevtralnih lipidov pada, pri čemer je opazna rahlo večja afiniteta vezave α -sinukleina na POPE v primerjavi s POPC. S pomočjo te in nekaterih drugih raziskav lahko zaključimo, da potrebuje ena molekula α -sinukleina za vezavo na vezikel najmanj 85 negativno nabitih lipidnih molekul, kar v grobem ustrezza masnemu razmerju lipid/protein 5:1. Zanimivo je, da ob veliki koncentraciji proteina količina vezanega proteina začne padati, kar nakazuje na destabilizacijo membrane. Vezavna sposobnost

proteina s povečevanjem ionske jakosti raztopine pada. Močnejše vezave na vezikle s premerom ~60 nm niso uspeli pokazati, vendar avtorji poudarjajo, da bi bilo vezavo na SUV potrebno dodatno ovrednotiti (Rhoades in sod., 2006).

α -sinuklein vsebuje štiri tirozinske AK ostanke, ki lahko delujejo kot fluorofori. Intrinzična fluorescencija se je zmanjšala ob dodajanju proteina k SUV iz DPPA/DPPC, DPPG/DPPC in DPPC, po predvidevanjih je to posledica interakcije tirozinskih AK ostankov s polarnimi glavami lipidov, ki vodi v dušenje intrinzične fluorescence tirozinov. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da se α -sinuklein veže tako na negativno kot tudi električno nevtralne SUV, vendar na slednje nekoliko slabše. Vezavna afiniteta pada v tem vrstnem redu: PA, PG, PC. Pri vezavi na električno nevtralne vezikle gre verjetno za elektrostatsko interakcijo med negativno nabitim C-terminalnim delom in pozitivno nabitim holinom. Vezavo na različne vrste veziklov so zaznali tudi ob močni ionski jakosti raztopine. Ti rezultati nakazujejo, da za vezavo α -sinukleina na lipide niso pomembne samo elektrostatske interakcije, ampak tudi hidrofobne (Zhu in sod., 2003). Isti avtorji so preverili še vpliv vezave α -sinukleina na membrano. Laurdan je amfifilni fluorofor, ki ga lahko uporabimo za te namene. Zaradi svojega hidrofobnega repa se vgradi v membrano, tako da se nahaja 5 Å pod mejo med lipidi in vodo. Občutljiv je na spremembo polarnosti okolja, zaznamo lahko vdor vode v globlje plasti lipidnega dvosloja (Bagatolli in sod., 1999). Zaradi vpliva na eksitacijski spekter in polarizacijo Laurdan barvila po inkubaciji DPPA/DPPC in DPPG/DPPC SUV z α -sinukleinom sklepajo, da se je slednji vgradil globlje v membrano in ni ostal vezan le na površini. α -sinukelin nima vpliva na fluorescenčni spekter barvila vgrajenega v SUV iz DPPC lipidov, iz česar je razvidno, da se protein veže le na površino SUV, ne prodre pa v globino lipidnega dvosloja (Zhu in sod., 2003).

Prehod SUV iz faze tekočega kristala v bolj rigidno fazo gela povzroči lateralni stres v notranji in zunanjih plasti dvosloja. To se zgodi zaradi ekstremne ukrivljenosti veziklov. Za tak sistem je značilno razširjeno temperaturno območje faznega prehoda, primer je DPPC, kar lahko pokažemo z direferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). T_m SUV iz DPPC je 36 °C, medtem ko je T_m za LUV enake sestave 41 °C. Takšni vezikli so zaradi nepravilnosti v strukturi dvosloja nagnjeni k fuziji z drugimi vezikli. α -sinuklein se veže na nevtralno nabite SUV iz DPPC pod T_m (faza gela), pri čemer spremeni sekundarno strukturo. Ne veže se na enake vezikle nad to temperaturo. Vezava α -sinukleina na SUV iz DPPC poveča kooperativnost faznega prehoda (ožje temperaturno območje faznega prehoda) in zviša T_m , kar kaže na večjo urejenost ozira zmanjšan strukturni stres močno ukrivljene membrane SUV (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006).

Z *in vivo* testi so ugotovili, da se α -sinuklein veže na lipidne rafte HeLa celic v bližini sinaptosomnih membran. V lipidnih raftih je značilna večja zastopanost holesterola, sfingomielinov in fosfolipidov z nasičenimi verigami ter nekaterih proteinov (Fortin in sod., 2004). S pomočjo sprememb v mobilnosti α -sinukleina na gelski elektroforezi so potrdili vezavo le tega na lipidne rafte izolirane iz celic, pri čemer domnevamo, da se mobilnost spremeni zaradi spremembe sekundarne strukture α -sinukleina. Dodatek proteinaze K k lipidnim raftom kasneje ni vplival na afiniteto vezanja α -sinukleina, kar pomeni, da za vezavo tega niso potrebni drugi proteini. To trditev potrjuje dejstvo, da je močna vezava opazna tudi s sintetičnimi vezikli, ki imajo podobno sestavo kot izolirani

rafti. Holesterol ni pomemben za vezavo, ampak za vzdrževanje integritete lipidnih raftov. Prav tako niso ključni sfingolipidi (Kubo in sod., 2005). V lipidnih raftih je prisotnega veliko ganglioza GM1, pokazali so vezavo α -sinukleina na SUV iz teh sfingolipidov, ne pa tudi iz drugih (Martinez in sod., 2007).

Za vezavo α -sinukleina na rafte so pomembni negativno nabiti lipidi. Močno vezavo in spremembo sekundarne strukture so opazili pri kombinaciji 18:1 PS in PS s polinenasičenimi verigami (skupaj s holesterolom in sfingomielinom). Dodatek 18:1 PC k 20:4 PS prav tako povzroči vezavo α -sinukleina. Če so uporabili samo eno vrsto PS s simetričnima verigama, je bila vezava zelo šibka ali pa je ni bilo. Ti rezultati kažejo na pomembnost obstoja dveh faz membrane hkrati za vezavo α -sinukleina: lipidni rafti v tekočem urejenem stanju in preostali del membrane v tekoči neurejeni fazi. α -sinuklein se močneje veže na membrano, če so polinenasičene verige vezane na negativno nabito PS glavo. Predvideva se, da α -sinuklein prepozna tako glavo kot tudi rep lipidov (Kubo in sod., 2005).

V nasprotju z modelnimi membranami je vezava na biološke membrane reverzibilna, namesto elektrostatskih interakcij so bistvene hidrofobne. Če k modelnim membranam dodamo citosolne komponente, mehanizem vezave postane podoben kot v primeru bioloških membran. Katere citosolne komponente so ključne, ni znano, verjetno pa to niso ne proteini ne lipidi (Kim in sod., 2006). Kmalu po dodatku α -sinukleina v gojišče so ga zaznali v citoplazmi celic. Tega transporta niso preprečili niti inhibitorji endocitoze, kar nakazuje, da ima α -sinuklein mogoče tudi sposobnost translokacije biološke membrane (Ahn in sod., 2006).

2.2.5.4 Analiza sekundarne strukture α -sinukleina s CD spektroskopijo

V določenih razmerah se v α -sinukleinu ob vezavi na membrane inducira α -vijačna struktura. V puferski raztopini je protein večinoma nezvit, α -vijačnica predstavlja največ 4 % strukture. Inkubacija α -sinukleina s POPC/POPA ali POPC/POPS SUV dramatično poveča delež α -vijačnice, v obeh primerih pa zmanjša delež neurejene in β -strukture. V prisotnosti SUV pripravljenih le iz POPC se sekundarna struktura α -sinukleina bistveno ne spremeni (preglednica 3) (Davidson in sod., 1998).

Preglednica 3: Delež sekundarne strukture α -sinukleina v prisotnosti SUV različne lipidne sestave. Izračuni na podlagi CD meritev so bili opravljeni s programom K2D (Davidson in sod., 1998).

Vzorec	Sekundarna struktura (%)		
	α -vijačnica	β -struktura	Naključni klobčič
α -sinuklein	3	23 ± 8	74 ± 10
α -sinuklein + POPC/POPA	82 ± 1	0 ± 0	18 ± 2
α -sinuklein + POPC/POPS	77 ± 3	1 ± 1	22 ± 3
α -sinuklein + POPC	5 ± 3	35 ± 13	53 ± 15

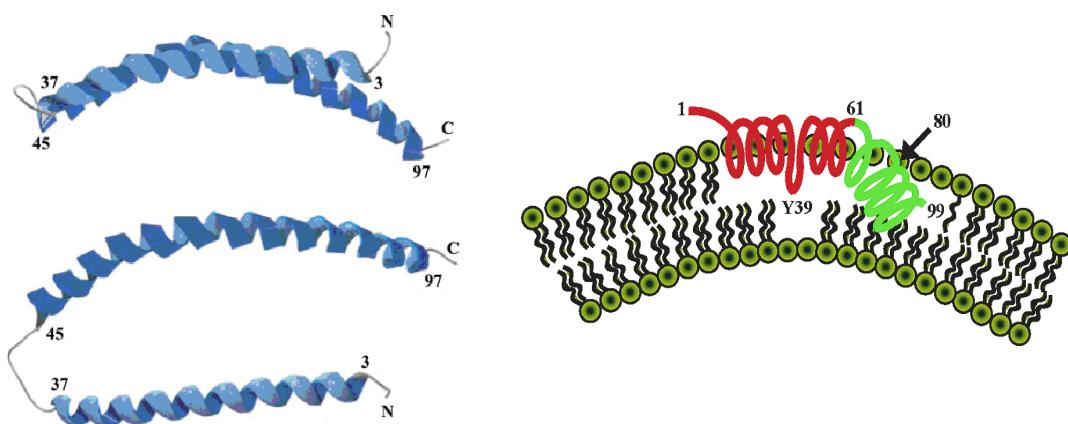
SUV kot tudi MLV iz POPC/POPS (množinsko razmerje 1:1) inducirajo sekundarno strukturo α -vijačnice, velikost veziklov na sekundarno strukturo α -sinukleina naj torej ne bi imela vpliva (Jo in sod., 2000). Narayanan in sod. (2001) so opazili minimalne spremembe v sekundarni strukturi ob dodatku LUV iz POPS. Nevtralno nabit PE skupaj z negativno nabitimi lipidi (množinsko razmerje 1:1) močno poveča delež α -vijačnice. Pri tem je potrebno poudariti, da so spremembe v sekundarni strukturi α -sinukleina precej manjše pri nevtralnih PC v kombinaciji z negativno nabitimi lipidi, afiniteta proteina za PE je kot omenjajo avtorji velika (Jo in sod., 2000).

Največji vpliv na prehod iz nezvite strukture v α -vijačnico imajo SUV iz negativnih DPPG ali DPPS, to velja tudi za kombinacijo teh negativnih lipidov z nevtralnimi DPPC ali DPPE. Nekoliko manjšo spremembo v sekundarni strukturi povzročijo majhni vezikli iz DPPA/DPPC. Samo SUV iz DPPC ne sprožijo tvorbe α -vijačnice, verjetno se α -sinuklein veže na površino teh veziklov zaradi elektrostatskih interakcij, vendar brez spremembe sekundarne strukture (Zhu in sod., 2003).

SUV iz POPC/POPG v množinskem razmerju 1:1 in 2:1 povzročijo tvorbo α -vijačnice v strukturi α -sinukleina, pri čemer je to bolj izrazito pri razmerju 1:1. Vijačne strukture ni opaziti pri LUV enake sestave. Oboje ponovno izpostavlja pomembnost negativnega naboja lipidov in velikosti veziklov za tvorbo α -vijačnice. Bolj pomembna ugotovitev je tvorba vijačne strukture ob vezavi na SUV iz nevtralno nabitih DPPC lipidov pod T_m in ne nad to temperaturo (Nuscher in sod., 2004).

2.2.5.5 Analiza sekundarne strukture α -sinukleina z drugimi metodami

Analiza strukture s pomočjo NMR je omejena z velikostjo molekul, zato študija vezave α -sinukleina na SUV ni mogoča. Primernejši so miceli, ki imajo približno 10 krat manjši premer (5 nm) kot sinaptični vezikli. Kljub veliki razlike v velikosti to ne vpliva na lokalno razporeditev AK ostankov in na število zavojev v strukturi α -vijačnice. Ob vezavi na micele iz natrijevega dodecil sulfata (SDS) in zmesi SDS z dodecilfosfholinom (DPC) α -sinuklein tvori dve α -vijačnici: Val3-Val37 in Lys45-Thr92, ki sta ukrivljeni in antiparalelni (slika 6). Med njima je zanka z urejeno strukturo, drugi α -vijačnici pa sledi kratka podaljšana regija: Gly93-Lys97. Zadnja regija ustreza motivu, ki ga povezujejo z od šeperonov odvisno avtofagijo. C-terminalni konec je nestrukturiran (Asp98-Ala140), majhne spremembe so zaznali po vezavi na micele, kar dopušča vlogo tega dela pri preprečevanju agregacije. Prekinitev vijačne strukture na mestih 38-44 bi lahko nastala zaradi zelo majhne ukrivljenosti micelov. Dopušča se možnost, da ob vezavi na sinaptične vezikle α -sinuklein tvori eno neprekinjeno α -vijačnico. Ukrivljenost α -vijačnice je manjša kot predpostavljena ukrivljenost micelov, kar nakazuje na preferenčno vezavo na SUV (Ulmer in sod., 2005). Bisaglia in sod. (2005) so s pomočjo NMR in označenih lipidov pokazali, da se α -sinuklein delno vstavi v micele SDS.



Slika 6: Sekundarna struktura α -sinukleina ob vezavi na micle. Regiji α -vijačnice sta povezani s kratko zanko. C-terminalni del na sliki ni prikazan (levo) (Bisaglia in sod., 2009). α -vijačnica med AK ostanki na mestih 61-95 se popolnoma vgradi v membrano (desno) (Bisaglia in sod., 2005).

Ker miceli zaradi majhnega premera niso najprimernejši za študij vezave α -sinukleina na sinaptične vezikle, nam dodatni vpogled v sekundarno strukturo ponuja elektronska paramagnetna resonanca (EPR), ki jo lahko uporabimo v kombinaciji s SUV. V ta namen so pripravili štiri mutante α -sinukleina, pri čemer so bili vstavljeni cisteinski AK ostanki označeni z MTSL. Med označenimi cisteinskimi AK ostanki znotraj molekule je mogoče z dvojno frekvenčno pulzirajočo EPR (metoda DEER- Double Electron Electron Resonance) izmeriti razdaljo ob vezavi na membrano. α -sinuklein ob vezavi na vezikle tvori dve antiparalelni α -vijačnici, čeprav so ti dovolj veliki, da bi bila možna tudi struktura z eno samo neprekinjeno α -vijačnico (Drescher in sod., 2008).

Prav tako s pomočjo EPR in MTSL so Georgieva in sod. (2008) prišli do nekoliko drugačnih rezultatov. Uporabili so vezikle z drugačno lipidno sestavo, protein je bil označen na drugih mestih. Glede na rezultate predlagajo, da je za α -sinuklein ob vezavi na SUV značilna struktura ene α -vijačnice, brez vmesne regije prekinitve. Dopuščajo možnost občasne prekinitve ene vijačne strukture v dva dela. Možno je, da α -sinuklein *in vivo* lahko zavzame eno ali drugo obliko, odvisno od pogojev.

Ob vezavi na micle SDS in prisotnosti Ca^{2+} je C-terminalni konec presenetljivo odporen na proteolizo. Sklepamo lahko, da ob vezavi Ca^{2+} zavzame bolj rigidno strukturo (de Laureto in sod., 2006).

2.2.6 Funkcija α -sinukleina

Vloga α -sinukleina pri nekaterih nevrodegenerativnih boleznih je znana že nekaj časa. Čeprav je vzrok večinoma naključne narave, določene mutacije ali triplikacija gena povzročajo sinukleinopatije. Normalna fiziološka funkcija proteina pa ostaja še vedno neznana. V nadaljevanju so predstavljene nekatere možne funkcije α -sinukleina.

Pri ptičih ščinkavcih ima α -sinuklein pomembno vlogo pri učenju pesmi. Na začetku obdobja učenja petja (faza poslušanja) nivo α -sinukleina precej naraste v predelu možganov, ki je za to učenje odgovoren, nato pa pade pod nivo ekspresije okoliškega tkiva, kjer se enakomerno izraža vso življensko obdobje (George in sod., 1995). Miši z

onesposobljenim genom za ta protein ne kažejo izrazitega patološkega fenotipa, so viabilne in fertilne. V centralnem živčnem sistemu ni opaziti spremenjene morfologije, dopaminski nevroni so povsem normalni. Spremembe pa so opazne pri obnašanju in na nevrokemičnem ter elektrofiziološkem nivoju. Značilno je večje sproščanje dopamina pri zaporednih dražljajih, nivo dopamina v striatumu je nižji, odziv na amfetamine pa manjši. Glede na te rezultate se predvideva, da ima α -sinuklein regulatorno funkcijo pri od dopamina odvisnem prenosu živčnega signala (Abeliovich in sod., 2000). Miši z onesposobljenim genom so uporabili tudi Cabin in sod. (2002). Bazalni sinaptični prenos je pri kratkih impulzih povsem normalen. Spremembe v delovanju nevronov so vidne pri impulzih, ki trajajo dalj časa. V tem primeru se zaloge na membrani zasidranih veziklov porabijo, v prenos bi se morala vključiti rezervna zaloge veziklov. Ker se to ne zgodi, se predvideva, da je fiziološka funkcija α -sinukleina povezana z nastanjem ali vzdrževanjem rezervne zaloge veziklov.

Kolokalizacija s sinaptičnimi vezikli in preferenčna vezava na SUV dajeta slutiti, da α -sinuklein morda uravnava sproščanje veziklov ali druge sinaptične funkcije (Davidson in sod., 1998; Lavedan, 1998). Analiza genoma kvasovk je pokazala, da je skoraj ena tretjina genov, ki povečajo toksičnost α -sinukleina, povezana z metabolizmom lipidov in vezikularnim transportom (Willingham in sod., 2003). Pri transgenih muhah je ekspresija α -sinukleina povezana z ekspresijo genov vpletenih v membranski in lipidni transport (Scherzer in sod., 2003). Ob izražanju α -sinukleina v kvasnem modelnem sistemu je prišlo do inhibicije vezikularnega transporta med endoplazemskim retikulumom (ER) in Golgijevim aparatom (Cooper in sod., 2006). V nekaterih nevronskih celičnih linijah prekomerna ekspresija α -sinukleina zavira sproščanje kateholamina iz sinaptičnih veziklov. Pri tem naj ne bi bil oviran transport veziklov do membrane, prav tako tudi ne fuzija s presinaptično membrano, ampak prileganje veziklov na membrano (Larsen in sod., 2006). Če α -sinuklein tvori samo eno α -vijačnico na celotnem N-terminalnem delu, potem je afiniteta za membrane precej majhna. Ta bi naj bila večja za majhne micele, interakcija z njimi povzroči tvorbo dveh krajših antiparalelnih α -vijačnic. Iz tega izhaja možna funkcija povezovanja dveh membran, kar bi lahko imelo vlogo pri zasidranju veziklov na sinaptično membrano (Georgieva in sod., 2008). Po aplikaciji nasprotnosmiselnih oligonukleotidov v celični kulturi nevronov se je zmanjšala velikost zaloge presinaptičnih veziklov. Zmanjšano je bilo število distalnih veziklov, medtem ko je bilo število veziklov zasidranih na membrano nespremenjeno. α -sinuklein bi lahko bil regulator zaloge sinaptičnih veziklov, ki so na voljo za sprostitev nevrotransmiterja (Murphy in sod., 2000).

Asociacija α -sinukleina z membranami je močnejša ob prisotnosti fosfatidilinozitol-4,5-bifosfata [PI(4,5)P₂] in Ca²⁺. Z veliko afiniteto se veže na fosfolipazo C β 2, ki je odvisna od G proteina in katalizira hidrolizo [PI(4,5)P₂], s tem pa zmanjša njeno aktivnost. Posledica hidrolize je tudi večja intracelularna koncentracija Ca²⁺. Vemo pa, da je Ca²⁺ med drugim vpletен v vezikularni transport, privzemanje dopamina in aktivnost receptorjev (Narayanan in sod., 2005). Ca²⁺ se veže na C-terminalni del α -sinukleina, ki pri tem spremeni strukturo (de Laureto in sod., 2006). α -sinuklein se veže na Rab3 molekulo, ta je modulator faktorja NSF, ki vpliva na eksocitozo granul v krvnih ploščicah. To nakazuje vlogo α -sinukleina pri eksocitozi (Srivastava in sod., 2007).

Delecija α -sinukleinskega gena v nevralni celični liniji je vplivala na fluidnost membrane in metabolizem maščobnih kislin (Sharon in sod., 2003). Vezava α -sinukleina na negativno nabite MLV povzroči nastanek manjših vezikularnih struktur in struktur brez značilnega lipidnega dvosloja. To bi se naj zgodilo zaradi ločitve negativno in nevralno nabitih lipidov v ločene domene po vezavi proteina, kar povzroči neugodne napetosti v membrani in njen razpad na manjše dele. Izследki izpostavljajo funkcijo α -sinukleina pri strukturi in organizaciji lipidov v membrani (Madine in sod., 2006).

α -sinuklein se veže na SUV iz nevralno nabitih lipidov samo pod T_m . Zaradi visoke ukrivljenosti je membrana pod strukturnim stresom. Dodatno k temu pripomorejo lipidi v stanju gela, saj je membrana takrat bolj rigidna. Ti lipidi formirajo domene, ki težijo k planarni strukturi, med domenami pa se nahajajo lipidi v neurejenem stanju, kar lahko označimo kot strukturne nepravilnosti. Podobno velja za membrano sinaptičnih veziklov. Zaradi prisotnosti sfingomielina in holesterola pride do neidealnega mešanja lipidov, pojavijo se mikrodomene z urejenim stanjem lipidov, ki plavajo v lipidih v neurejenem stanju. V obeh primerih α -sinuklein stabilizira membrano, odpravi strukturne nepravilnosti in tako morda prepreči prehitro fuzijo veziklov s sinaptično membrano (Nuscher in sod., 2004; Kamp in Beyer, 2006). V prid tej teoriji je spoznanje, da α -sinuklein za vezavo potrebuje prisotnost dveh lipidnih faz (Kubo in sod., 2005). Dodatni stres v strukturi membrane predstavlja PE, ki v monosloju povzroči negativno ukrivljenost. V sinaptičnih veziklih predstavlja PE 15-24 % vseh lipidov. Strukturni stres membran odpravi vezava amfipatske vijačnice apolipoproteinov tipa A₂, enak tip α -vijačnice tvori tudi α -sinuklein (Jo in sod., 2000).

Predlagana je tudi zaščitna vloga α -sinukleina. Za miši z onesposobljenim genom za protein CSP α je značilna hitra nevrodegeneracija. Protein CSP α je prisoten v sinaptičnih veziklih, delecija tega gena inhibira sestavljanje kompleksa SNARE. Ekspresija α -sinukleina v veliki meri izniči negativni efekt delecije CSP α , pri čemer je potrebna vezava tega proteina na fosfolipide (Chandra in sod., 2005). Nevronske membrane vsebujejo veliko lipidov iz nenasičenih maščobnih kislin, njihovo oksidacijo povezujemo s citotoksičnim efektom. Vezava α -sinukleina na membrane prepreči njihovo oksidacijo, mehanizem verjetno vključuje oksidacijo štirih metioninskih AK ostankov (Zhu in sod., 2006).

Raziskave poročajo tudi o interakcijah α -sinukleina z drugimi proteini. Chen in sod. (1997) ter Jenco in sod. (1998) so pokazali, da je α -sinuklein inhibitor fosfolipaze D2, ki hidrolizira PC v PA, čeprav Rappley in sod. (2009) to zavračajo. Veže se na MAP kinazo ERK-2, ki je pomembna v različnih signalnih transdukcijskih poteh (Iwata in sod., 2000). V proteomskej analizi hibridne linije med celicami iz predela *substantia nigra* in nevroblastomskih celic so našli 587 proteinov, ki tvorijo komplekse z α -sinukleinom. Identificirati so jih uspeli 5: mortalin je mitohondrijski stresni protein, vpletten v mitohondrijsko in proteasomsko funkcijo, pomembno vlogo ima pri oksidativnem stresu. Nukleolin vpliva na formacijo fibril pri Alzheimerjevi bolezni, kalneksin je šeperon, povezan z ER, grp94 ER stresni protein, klatrin pa ima znano funkcijo pri vezikularnem transportu in proteinskih interakcijah z lipidnimi rafti (Jin in sod., 2007). Sicer je številka 587 verjetno nekoliko precenjena zaradi visoke koncentracije SDS, na katerega se ti proteini vežejo (Uversky, 2007). α -sinuklein se veže na tirozin hidroksilazo, ki je eden

pomembnejših encimov v sintezi dopamina, pri čemer se aktivnost encima zmanjša (Perez in sod., 2002). Funkcija α -sinukleina je morda regulacija aktivnosti transporterjev dopamina, ekspresija mutantne oblike proteina v humani nevronski celični liniji povzroči redistribucijo dopamina iz veziklov v citoplazmo, posledično se zviša nivo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki so za celico toksične (Lotharius in sod., 2002). Disociacija α -sinukleina od membran je odvisna od citosolnih proteinov, ki so specifični za možganske celice, ni pa odvisna od Ca^{2+} ali metabolne energije (Gendebien in sod., 2005). Čeprav so do sedaj pokazali precej interakcij α -sinukleina z različnimi proteini, še nihče ni opisal s tem povezanih sprememb v sekundarni strukturi (Bisaglia in sod., 2009).

2.2.7 Patologija povezana z α -sinukleinom

V skupino sinukleinopatij uvrščamo številne nevrodegenerativne bolezni, med katerimi je najbolj znana in najpogostejsa Parkinsonova bolezen, mednje prištevamo še demenco z Lewyjevimi telesci, multiplo sistemsko atrofijo, nevrodegeneracijo s kopičenjem železa (tip I), difuzno bolezen z Lewyjevimi telesci (LT) in LT varianto Alzheimerjeve bolezni. To so amiloidne bolezni, njihova skupna lastnost pa so patološka intracelularna inkluzijska telesca, v katerih je glavna komponenta protein α -sinuklein. Mesta nastanka in morfologija inkluzijskih telesc so lahko različna, npr. v telesih nevronov se imenujejo Lewyjeva telesca (LT), v aksonih pa Lewyjevi nevriti (LN). Najdemo jih lahko tudi v glia celicah (Lundvig, 2005).

Za Parkinsonovo bolezen je značilno odmiranje nevronov, ki proizvajajo dopamin in se nahajajo v možganskem predelu *substantia nigra pars compacta*. Bolezen spremlja pojav LT in LN (Galvin in sod., 1999), prizadene več kot 1 % ljudi po 65 letu starosti (Goedert, 2001). Poleg α -sinukleina, ki je v obliki amiloidnih fibril, v LT najdemo še ubikvitin, proteine temperaturnega šoka, nevrofilamente, tau protein, sinilfin-1 in tubulin, če naštejemo pomembnejše (Forno, 1996; Spillantini in sod., 1997; Shults, 2006). Značilni simptomi so tresenje, počasni gibi, težave s fino motoriko in izguba posturalnih refleksov (Jankovic, 2008).

Dokaz za pomembno vlogo α -sinukleina pri nastanku Parkinsonove in sorodnih bolezni je bilo odkritje nekaterih mutacij. Z zgodnjim pojavom so povezane tri mutantne oblike proteina: A30P, E46K in A53T, pa tudi duplikacija ali triplikacija lokusa, ki vpliva na povečano količino divjega tipa proteina v celici (Polymeropoulos in sod., 1997; Krüger in sod., 1998; Singleton in sod., 2003; Zaranz in sod., 2004; Chartier-Harlin in sod., 2004).

V prvi fazи nastanka LT naj bi se monomeri α -sinukleina združili v topne oligomere (ki jih včasih enačijo s prototibrilami), sestavljene iz 20-25 monomernih enot. Ti se združujejo med sabo in tvorijo netopne fibrile, ki nato skupaj z drugimi proteini agregirajo v LT. Za oligomere in fibrile je značilna β -struktura (Conway in sod., 1998; Wood in sod., 1999; Lashuel in sod., 2002). Zakaj celice odmrejo, še ni popolnoma jasno. Nekateri citotoksičnost pripisujejo LT (Giasson in Lee, 2001), medtem ko so Lashuel in sod. (2002) pokazali, da oligomeri delujejo podobno kot nekateri bakterijski toksini, ki tvorijo membranske pore. Mutanta A30P kaže povečano stopnjo tvorbe oligomerov, E46K pa hitreje fibrilira. Za A53T je značilno oboje, tako povečana oligomerizacija kot tudi

fibrilacija. A30P ima slabšo sposobnost vezave na vezikle, E46K pa se na negativno nabite vezikle veže močneje (Conway in sod., 2000; Choi in sod., 2004).

Čeprav so našli številne mutacije, ki jih povezujejo z zgodnjim nastankom Parkinsonove bolezni, je vzrok v večini primerov naključne narave. Predvidevajo, da je za začetek oligomerizacije potrebna strukturalna sprememba α -sinukleina, ki povzroči prehod iz nativne topne oblike v netopno. Poznamo več kot 20 različnih proteinov, za katere je značilna podobna patologija, vendar med njimi ni podobnosti v AK zaporedju, pa kljub temu tvorijo fibrile, za katere je značilna β -struktura. Rigidna nativna struktura se destabilizira, kar lahko vključuje delno razvitje proteina, ki je še posebej dovetno za oligomerizacijo (Uversky in Fink, 2004; Makin in Serpell, 2005).

Ker v večini primerov sinukleinopatij pride do fibrilacije nativnega α -sinukleina, je večina raziskav usmerjenih v preučevanje mehanizmov, ki ta proces sprožijo. Ostrerova-Golts in sod. (2000) poročajo, da oksidativni stres (železo, vodikov peroksid) v celicah povzroči nastanek inkluzijskih teles, ki vsebujejo α -sinuklein in ubikvitin. Podoben učinek povzročijo nekateri pesticidi, ki inhibirajo mitohondrijski kompleks I (Betarbet in sod., 2001). Giasson in sod. (2000) so v večini primerov inkluzijskih teles pri sinukleinopatijah našli nitriran α -sinuklein, medtem ko Fujiwara in sod. (2002) poročajo o neobičajni fosforilaciji Ser129. α -sinuklein brez C-terminalnega konca fibrilira veliko hitreje kot nativni protein, takšno obliko lahko najdemo tudi v LT. Izražanje skrajšanega proteina je pri miših izzvalo podobne morfološke in nevrokemične simptome kot pri Parkinsonovi bolezni. Žal je težko določiti, ali so takšne posttranslacijske modifikacije vzrok ali posledica bolezenskega stanja (Tofaris in Spillantini, 2007).

Povečano količino oligomerov v *in vivo* ter *in vitro* pogojih so opazili še ob dodatku polinenasičenih maščobnih kislin (Perrin in sod., 2001; Sharon in sod., 2003), nekaterih kovinskih ionov (Uversky in sod., 2001) in polikationov (Hoyer in sod., 2002).

Več raziskav je nakazalo na motnje ubikvitin-proteasomskega sistema pri sinukleinopatijah. Aktivnost razgradnih encimov v 20S proteasomih pri Parkinsonovi bolezni je manjša. Manjša je tudi količina nekaterih proteasomskih podenot, ki so jih prepoznali kot del LT. Filamentozni agregati in oligomeri vplivajo na zmanjšanje aktivnosti 26S proteasomov. Inhibicija je verjetno posledica struktturnih značilnosti aggregatov α -sinukleina (Lundvig, 2005). Proses razgradnje proteina s proteasomi je upočasnjen pri nitroziliranem monomernem α -sinukleinu, ki v določenih razmerah lahko vodi v nastanek proteina brez C-terminalnega konca (Hodara in sod., 2004; Liu in sod., 2003).

V povezavi s Parkinsonovo boleznijo je pomembno razmisli, zakaj so še posebej prizadeti nevroni, ki proizvajajo dopamin. Povečana ekspresija nativnega α -sinukleina in njegovih mutantnih oblik vpliva na pH veziklov, kar vodi v povišan nivo kateholnih zvrsti v citoplazmi. Te lahko povzročijo oksidativni stres v celici. Dopamin prav tako stabilizira oligomerne intermediate, ki nadalje destabilizirajo sinaptične vezikle. Ta cikel na koncu vodi v celično smrt (Conway in sod., 2001; Mazzulli in sod., 2006; Mosharov in sod., 2006). Kortikalni nevroni so veliko manj občutljivi na povečano ekspresijo α -sinukleina kot nevroni, ki proizvajajo dopamin (Xu in sod., 2002).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIAL

Material	Proizvajalec
L- α -fosfatidil-DL-glicerol, dipalmitoil (DPPG)	Sigma-Aldrich, ZDA
L- α -fosfatidilholin, dipalmitoil (DPPC)	Sigma-Aldrich, ZDA
Sfingomielin, izolat govejih možganov	Sigma-Aldrich, ZDA
1-stearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholin (SOPC)	Avanti Polar Lipids, ZDA
1-steroil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo (1'-rac-glicerol) (SOPG)	Avanti Polar Lipids, ZDA
1,2-dioleoil-3-trimetilamonijev-propan (DOTAP)	Avanti Polar Lipids, ZDA
HEPES	Sigma-Aldrich, ZDA
Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
Kloroform	Merck, Nemčija; VWR, ZDA
Metanol	Merck, Nemčija
Natrijev klorid	Merck, Nemčija

Oprema	Proizvajalec
CD spektrometer 62A DS	AVIV, ZDA
Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer	Varian, Avstralija
Spektrofotometer Cary 100, 300 Series II Series	Varian, Avstralija
N-DSC, series 3	CSC, ZDA
Langmuirjeva tehnica	NIMA, Velika Britanija
MicroTrough-S system	KIBRON, Finska
Tehnica Discovery DV214C	DHAUS, Švica
Tehnica AT201	Mettler Toledo, ZDA
pH meter Geaesys10 UV	Thermo Scientific, ZDA
pH meter HI221	Hanna instruments, Italija
Ultrazvočni razbijalec VCX750	Sonics & Materials, ZDA

3.2 PRIPRAVA REKOMBINANTNIH PROTEINOV

Nativni α -sinuklein (DT) in mutante Y39A, Y125A ter trojno mutanto Y(125, 133, 136)A ali krajše 3X so predhodno izolirali na Oddelku za kemijo in biokemijo Univerze v Kaliforniji, Santa Cruz, ZDA. Uporabljen je bil bakterijski ekspresijski sistem, mutirane variante proteina so naredili z vstavljanjem ustreznih kodonov s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Po čiščenju so ustreznost produktov preverili z masno spektroskopijo z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI-MS) in denaturirajočo poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE). Končni produkt so liofilizirali (Poklar Ulrich in sod., 2008).

Raztopino proteina smo pripravili s tehtanjem liofiliziranega proteina, ki smo ga nato raztopili v pufru in 10 minut ultra centrifugirali pri 16000 g, da smo odstranili morebitne partikulate. Natančno koncentracijo nativnega proteina, Y39A in Y125A smo določili z uporabo spektrofotometra. Tirozin absorbira svetlobo pri valovni dolžini 275 nm, ekstincijski koeficient nativnega proteina znaša 0,404 mL/(cm·mg), za Y39A in Y125A pa 0,303 mL/(cm·mg). Trojna mutanta vsebuje samo en tirozin, zato ni primerna za spektroskopsko preverjanje koncentracije. Da smo zmanjšali morebitno napako pri koncentraciji, smo trojno mutanto pred tehtanjem 24 ur sušili v eksikatorju ob prisotnosti fosforjevega pentoksida.

3.3 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV

Za pripravo SUV smo izbrali nevtralno nabite DPPC in negativno nabite DPPG fosfolipide ter nevtralno nabit sfingomielin. DPPC in DPPG vsebujeta nasičene maščobne kisline iz 16 ogljikovih atomov. Membrane, ki jih tvorita, so pri sobni temperaturi v fazi gela. Sfingomielin je bil izoliran iz govejih možganov, polarno glavo sestavlja fosfoholin ali fosfoetanolamin, na katerega je vezan sfingozin, ki z maščobnimi kislinami tvori amidno vez. Ker je izoliran iz možganov, je zmes različnih vrst sfingomielina (različne maščobne kisline). Sfingomielin je pomembna komponenta živalskih celic (Nelson in Cox, 2005).

Zatehtali smo ustrezeno količino liofiliziranih lipidov in dodali mešanico kloroform ter metanola v volumskem razmerju 3:1. Po premešanju smo raztopino prenesli v steklene bučko in topilo počasi odparili na rotavaporju. Bučko smo vmes prepihovali z dušikom in vzdrževali temperaturo 35 °C, za popolno odstranitev vseh sledi topila smo proces pustili teči minimalno dve uri. Nato smo dodali steklene kroglice in ustrezni volumen 20 mM HEPES pufra (pH = 7), segretega na 50 °C, da smo dosegli koncentracijo lipidov 5 mg/mL. S pomočjo vibracijskega stresalnika smo lipidni film na steni steklene bučke raztopili v pufru. S tem postopkom smo pridobili MLV. Ker smo potrebovali SUV, smo vezikle izpostavili ultrazvoku, ki velike vezikle razbije na manjše. Raztopina je bila izpostavljena ultrazvoku pol ure pri amplitudi 30 %. Da se raztopina ne segreje preveč, je postopek tekel na ledeni kopeli z delovnimi intervali 10 s in vmesnimi 10 sekundnimi prekinjavami. Po končanju smo raztopino lipidov za pol ure prenesli v vodno kopel s temperaturo 50 °C. Za shranjevanje v hladilniku smo vezikle prepihalo z dušikom, da bi preprečili morebitno oksidacijo. Meritve s tako pripravljenimi vezikli smo opravili najkasneje v nekaj dneh, saj se SUV zaradi zelo majhnega premera spontano združujejo.

3.4 CIRKULARNI DIHROIZEM

3.4.1 Teoretično ozadje

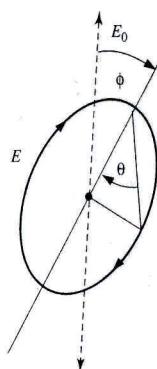
Lastnost večine bioloških molekul je molarna asimetrija oz. kiralnost. Najenostavnejši primer je asimetričen ogljikov atom, ki tvori vezi s štirimi različnimi atomi ali stranskih skupinami. Kiralnost ni lastnost le nekaterih atomov, ampak tudi nekaterih polimerov, kot so nukleinske kisline in proteini. Oboji lahko tvorijo vijačnico, ki je levo ali desno sučna. Tudi terciarna struktura proteinov je lahko vir kiralnosti.

Kiralne strukture lahko okarakteriziramo s polarizirano svetlobo. S cirkularnim dihroizmom spremljamo različno absorbcojo levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe. Pri linearne polarizirani svetlobi električni vektor oscilira v eni ravnini, medtem ko ta pri cirkularno polarizirani svetlobi med širjenjem po prostoru izriše vijačnico. Linearne polarizirana svetloba je ekvivalentna vsoti levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe, ki se v prostor širita v isti smeri, z enako valovno dolžino in amplitudo.

Optično aktivne (kiralne) snovi različno absorbirajo levo in desno cirkularno polarizirano svetlobo:

$$\Delta A = A_L - A_D \quad \dots(1)$$

kjer sta A_L in A_D absorbanci vzorca za levo oz. desno cirkularno polarizirano svetlobo. Ob prehodu linearne polarizirane svetlobe E_0 (kot vsote levo in desno polarizirane svetlobe) skozi vzorec pride do faznega zamika in diferencialnega zmanjšanja amplitude levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe. Izhodni žarek E je zato eliptično polariziran (slika 7) (Tinoco in sod., 2002).



Slika 7: Eliptično polarizirana svetloba, ki se po prehodu skozi vzorec približuje opazovalcu. E_0 je linearne polarizirana svetloba pred prehodom skozi vzorec, E je izhodni žarek, Φ je kot rotacije in θ eliptičnost (Tinoco in sod., 2002: 573).

Eliptičnost θ definiramo kot arctg razmerja krajše in daljše osi elipse:

$$\theta = 2,303(A_L - A_D) \frac{180^\circ}{4\pi} \quad \dots(2)$$

Za predstavitev meritev je primernejša povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$):

$$[\theta]_{(\lambda)} = \frac{\theta_{(\lambda)} M_0}{100\gamma l} \quad \dots(3)$$

kjer je $\theta_{(\lambda)}$ eliptičnost pri valovni dolžini λ (mdeg), M_0 povprečna molska masa aminokislinskega ostanka proteina (g/mol), γ masna koncentracija proteina (g/mL) in l dolžina optične poti (dm) (Fritz, 1998).

Optična aktivnost proteinov je vsota doprinosa optične aktivnosti AK ostankov in strukture proteina, vendar je slednji veliko močnejši. CD meritve v dalnjem UV območju (190-250 nm) lahko uporabimo za določitev sekundarne strukture proteinov. V tem območju prevladuje prispevek peptidnih vezi, ki se nahajajo v asimetričnem okolju, zaradi česar imajo proteini kompleksne in izrazite CD spektre. V bližnjem UV območju (250-320 nm) absorbirajo aromatske AK in disulfidne vezi, kar nam da informacijo o tertiarni strukturi proteina. Pri tem moramo izmerjene spektre primerjati s spektri proteinov z znano strukturo (Rabzelj, 2006; Tinoco in sod., 2002).

3.4.2 Razmere pri merjenju

CD meritve so bile opravljene na CD spektrometru, opremljenim s termoelektrično enoto za temperaturno regulacijo. Za spektre v dalnjem UV območju (200-260 nm) je bil interval merjenja 0,5 nm in čas integriranja 5 s. Za vzorce smo uporabili 1-mm kvarčno kivetno. Spektri pufra, proteina in proteina s SUV so bili posneti v temperaturnem območju od 25 do 90 °C, vzorci so bili raztopljeni v 20 mM HEPES pufru (pH = 7). Koncentracija proteina je bila 1 mg/mL, SUV so bili dodani, da je bilo doseženo množinsko razmerje lipidi/protein 10:1.

3.5 INTRINZIČNA FLUORESCENCA

3.5.1 Teoretično ozadje

Svetloba je elektromagnetno valovanje, energija fotonov je večja pri nižjih valovnih dolžinah. Ko molekula absorbira foton, se elektron premakne na višji energijski nivo, molekula je v vzbujenem stanju, ki je v splošnem nestabilno. Elektron na višjem energijskem nivoju se ponavadi takoj vrne na osnovni nivo, pri čemer odda energijo v obliki svetlobe, topote ali kemičnega dela. Če je energija vzbujenih molekul oddana v obliki svetlobe, se pojav imenuje fluorescencija. Oddana svetloba je vedno daljše valovne dolžine kot absorbirana (Nelson in Cox, 2005).

Intrinzična fluorescencija proteinov izvira iz lastnosti aromatskih AK: triptofan, tirozin in fenilalanin. Nativni α -sinuklein vsebuje štiri tirozinske AK ostanke. Za tirozin je značilen

emisijski maksimum okoli valovne dolžine 300 nm. Emisijski spekter te AK je sicer precej neodvisen od polarnosti okolja, vendar lahko kljub vsemu pripomore k razumevanju interakcij med proteinom in membrano. Nekatere majhne molekule in ioni dušijo fluorescenco. Če so molekule fluorofora in dušilci prostorsko skupaj, potem do fluorescence ne pride. Ločimo dinamično in statično dušenje fluorescence. Pri dinamičnem dušenju pride do trkov molekul fluorofora in dušilca. Če molekula dušilca trči v fluorofor med vzbujenim stanjem, ne pride do fluorescence. O statičnem dušenju govorimo takrat, ko fluorofor in dušilec tvorita nefluorescenčni kompleks (Lakowicz, 1999). Kot dušilci lahko delujejo polarne nabite glave lipidov (Zhu in sod., 2003).

3.5.2 Razmere pri merjenju

Eksitacijska valovna dolžina je bila 275 nm, emisijski spekter smo posneli med 280 in 600 nm. S pomočjo termoelektrične enote smo vzdrževali temperaturo 25 °C. Meritve smo opravili v kvarčni kivetih z optično potjo 10 mm. Začetna koncentracija proteina je bila 0,05 mg/mL (20 mM HEPES pufer, pH = 7), postopoma smo dodajali vezikle iz DPPG, DPPC ali sfingomielina, dokler nismo dosegli množinskega razmerja 100:1 med lipidi in proteinom.

3.6 MERJENJE POVRŠINSKIH POJAVOV

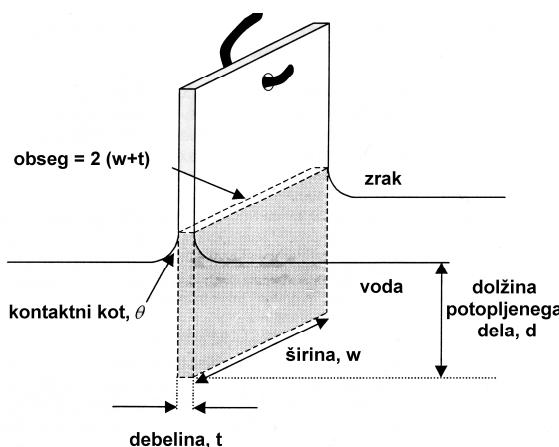
3.6.1 Površinska napetost

Površinsko napetost definiramo kot delo, ki ga moramo opraviti, da izotermno povečamo površino tekočine za površinsko enoto (Martin in Szablewski, 2001). Molekule v notranjosti raztopine so enakomerno obdane z drugimi molekulami, medsebojne sile so izenačene. Drugače je z molekulami na površini, ki tvorijo vezi samo z molekulami pod njimi in zraven njih. V primeru površine tekočina-plin lahko interakcije z molekulami plina zanemarimo. Na molekule na površini deluje torej sila, ki jih vleče v notranjost raztopine. Površina se skrči, kar privede do površinske napetosti (Sinko, 2005).

Navzven se to kaže kot sila v površini, ki vleče površino skupaj, oziroma se upira njenemu povečanju. Sila v površini med tekočo in plinsko fazo, ki deluje pravokotno na dolžinsko enoto površinskega roba, se imenuje površinska napetost. Je torej sila F na enoto dolžine l (Bratko in sod., 2000):

$$\gamma = \frac{F}{l} \quad \dots(4)$$

Ponavadi jo merimo z Wilhelmy ploščico (lahko tudi s kovinskim obročkom ali paličico), ki je v bistvu trak iz kromatografskega papirja (slika 8). Če jo pomočimo v stik med plinom in tekočino, jo zaradi površinske napetosti povleče v notranjost tekočine (Martin in Szablewski, 2001).



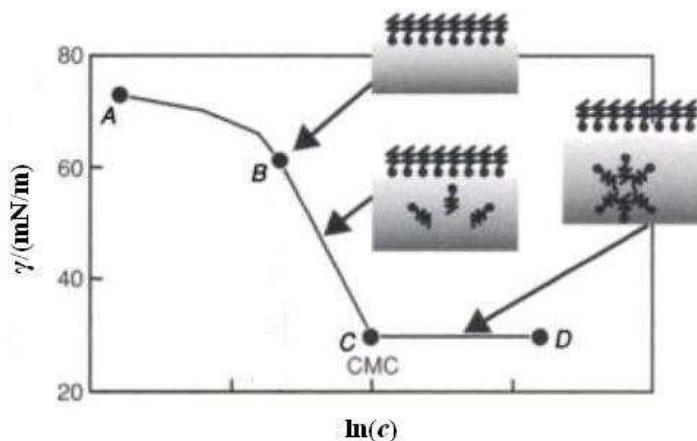
Slika 8: Obešena Wilhelmy ploščica, potemnjeni del ploščice je potopljen v tekočino (Devetak, 2007: 7).

Poleg površinske napetosti na ploščico delujeta tudi vzgon in teža. Vzgona v enačbi ni potrebno upoštevati, ker potopimo ploščico vedno do enake globine. Ker umerimo senzor na vrednost 0 v zraku, iz enačbe odstranimo tudi prispevek teže. Ostane nam samo še vpliv površinske napetosti, ki se v splošnem izračuna s pomočjo enačbe 4, pri čemer je *F* sila, ki jo izmeri senzor, *l* pa obseg ploščice (Martin in Szablewski, 2001).

3.6.2 Kritična micelna koncentracija in površina molekule α -sinukleina

3.6.2.1 Teoretično ozadje

Ena od aplikacij meritev površinske napetosti je določitev kritične micelne koncentracije (CMC). Surfaktanti so snovi, ki so aktivne na meji med dvema fazama, npr. med zrakom in vodo, sestavljene so iz hidrofilnega in hidrofobnega dela. Surfaktanti so lahko tudi molekule proteina (Atkins in de Paula, 2006; Martin in Szablewski, 2001). Površinsko aktivne molekule se nakopičijo na površini tekočine, s tem prekinejo ali zmotijo vodikove vezi, van der Waalsove vezi in druge kohezivne sile med molekulami vode, površinska napetost se zniža. Če izrišemo graf površinske napetosti v odvisnosti od logaritma koncentracije surfaktanta, dobimo krivuljo oblike, kot je vidna na sliki 9.



Slika 9: Znižanje površinske napetosti vode (γ) po dodatku amfifilnih molekul. CMC = kritična micelna koncentracija (Sinko, 2005: 451).

Vidimo, da na segmentu B-C površinska napetost močno pade. Točka C ustreza CMC, to je koncentracija surfaktanta, kjer ta začne v notranjosti raztopine tvoriti micele. Ob nadalnjem povečevanju koncentracije se površinska napetost ne spreminja več, saj je površina zasičena s surfaktantom, zato prične ta v notranjosti raztopine tvoriti micele.

S pomočjo naklona na linearinem segmentu B-C lahko izračunamo vrednost (Γ), kar nam omogoča Gibbsova adsorpcijska enačba:

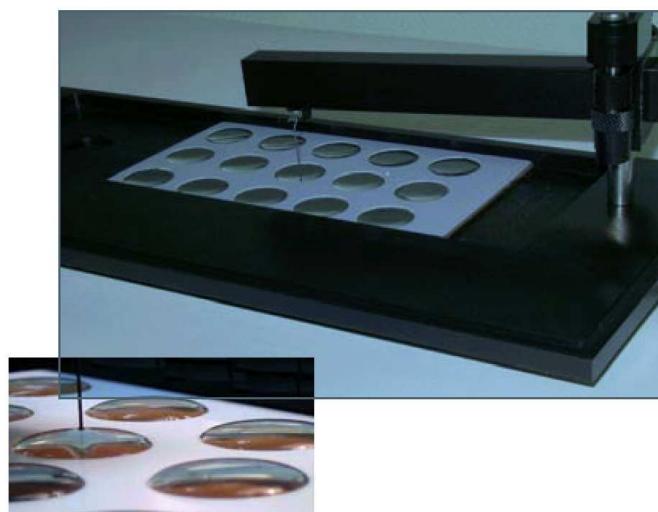
$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln c} \right)_T \quad \dots(5)$$

pri čemer je R splošna plinska konstanta, T absolutna temperatura, γ površinska napetost in c množinska koncentracija proteina v notranjosti raztopine.

Vrednost Γ predstavlja množino amfifilne snovi na enoto površine (mol/m^2), ki je v presežku glede na to snov v notranjosti raztopine. Na intervalu B-C so molekule surfaktanta močno stisnjene, površina, ki jo zavzema ena molekula, se ne spreminja z naraščanjem koncentracije v notranjosti topila. Če Γ pomnožimo z Avogadrovo številom, je recipročna vrednost dobljenega rezultata površina ene molekule na meji med fazama (v našem primeru voda-zrak) (Sinko, 2005).

3.6.2.2 Razmere pri merjenju

Pripravili smo redčitveno vrsto nativnega proteina v 10 mM fosfatnem pufru (100 mM NaCl, pH = 7). 400 µL posamezne redčitve smo dodali na dobro očiščeno stekleno ploščico z luknjicami za vzorce. V preostale luknjice smo dodali vodo in pufer za umeritev senzorja površinske napetosti (KIBRON), ki namesto Wilhelmy ploščice uporablja platinasto žičko (slika 10). Platinasto žičko smo pred uporabo prežarili v plamenu z namenom odstranitve nečistoč in povečanja omočljivosti. Senzor z žičko smo previdno spuščali do površine kapljice vzorca, dokler se je žička ni dotaknila. Po umiritvi signala smo odčitali vrednost površinske napetosti.

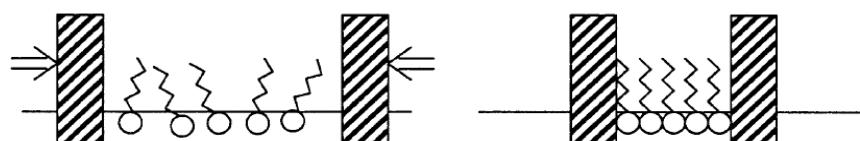


Slika 10: Senzor površinske napetosti s platinasto žičko. Vzorci so v posamezni luknjici na stekleni ploščici (Rabzelj, 2006: 26).

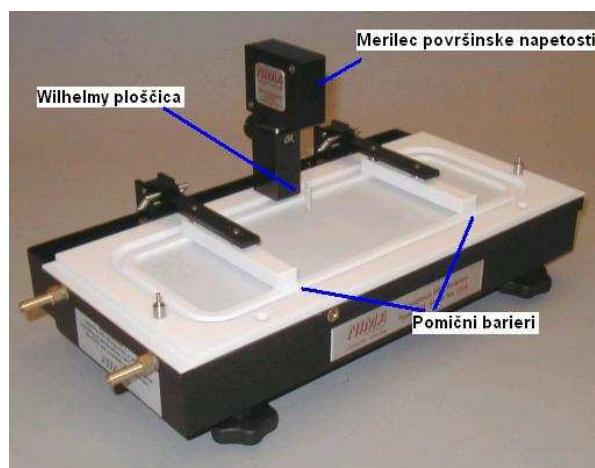
3.6.3 Lipidni monosloj

3.6.3.1 Teoretično ozadje

Lipidne molekule, raztopljene v nepolarnem topilu, razporedimo na čisto površino (ponavadi voda ali pufer). Ko topilo izhlapi, ostanejo samo lipidne molekule, katerih polarna glava je potopljena v vodi, medtem ko hidrofobne verige molijo v zrak. Tako pridobljen film imenujemo Langmuirjev film. Poskus poteka na Langmuirjevi tehnični (slika 12), ki je sestavljena iz teflonskega korita in premičnih barier (Martin in Szablewski, 1999). Bariere lahko premikamo, s tem pa vplivamo na urejenost lipidnih molekul (slika 11).



Slika 11: Razširjen in stisnjen monosloj na vodni površini (Martin in Szablewski, 2001: 16).



Slika 12: Langmuirjeva tehnična z dvema pomičnima barierama, ki ju poganja elektromotor, in z merilcem površinske napetosti z Wilhelmy ploščico. Elektromotor in merilec površinske napetosti sta krmiljena prek računalnika (NIMA Technology, 2009).

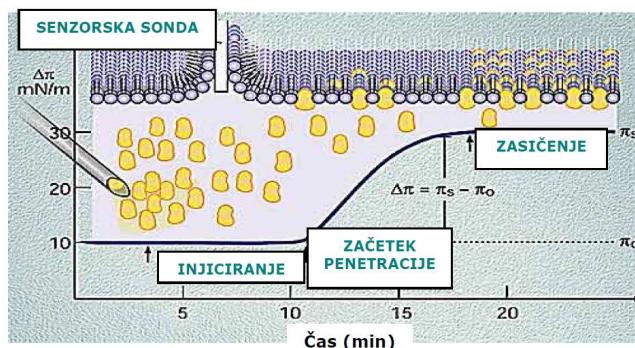
Zaradi nazornejšega prikaza površinsko napetost velikokrat pretvorimo v površinski tlak π :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \dots(6)$$

pri čemer je γ_0 površinska napetost čistega topila, γ pa izmerjena površinska napetost po dodatku amfifilnih molekul. Ko so molekule lipidov na površini zelo razmagnjene, to nima velikega vpliva na površinsko napetost. Šele pomik barier bližje skupaj zmanjša površino, ki jo imajo na voljo molekule, kar vodi v zmanjšanje površinske napetosti. Če površinski tlak še povečujemo, pride na določeni stopnji do deformacije monosloja, molekule se pričnejo narivati ena na drugo (Sinko, 2005).

Lipidni monosloji predstavljajo uporabno orodje za preučevanje interakcij med lipidi in proteini. Preučevani protein vbrizgamo pod lipidni monosloj. Če pride do vgradnje dela proteina med lipidne molekule, površinski tlak naraste. Iz velikosti spremembe

površinskega tlaka lahko neposredno sklepamo na jakost interakcije protein-lipidi (Brockman, 1999) (slika 13).



Slika 13: Shematski prikaz injiciranja v pufer in vgradnje molekul proteina v lipidni monosloj (Rabzelj, 2006: 27).

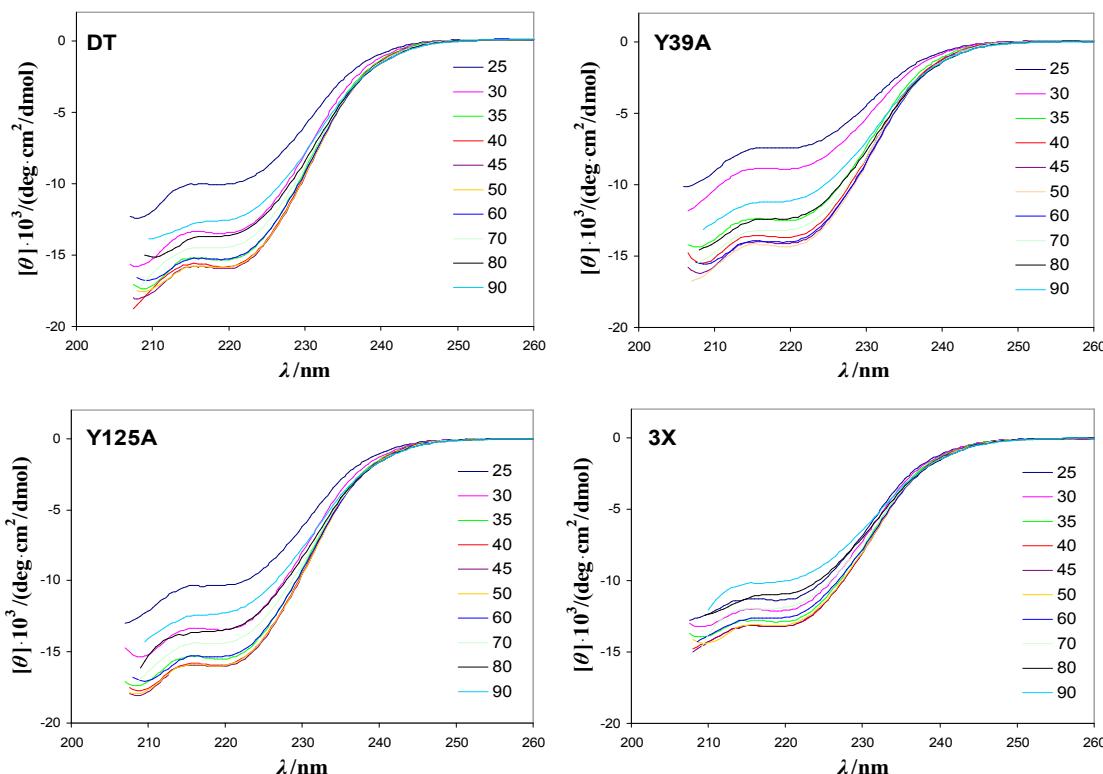
3.6.3.2 Razmere pri merjenju

Preučevali smo interakcije nativnega α -sinukleina z nevtralno nabitimi SOPC, negativno nabitimi SOPG in pozitivno nabitimi DOTAP lipidi. Za kontrolo smo izmerili spremembo površinske napetosti po vbrizganju pufra pod monosloj iz SOPC lipidov. Meritve so potekale na Langmuirjevi tehnicici z volumnom korita 55 mL, maksimalno površino med barierama 80 cm^2 in senzorjem z Wilhelmy ploščico (NIMA). Merili smo pri sobni temperaturi, kjer so našteti lipidi v fazi tekočega kristala. Uporaba lipidov v fazi gela ni primerena, saj lahko pride do njihove agregacije. Lipide raztopljene v kloroformu smo z injekcijsko brizgalko previdno razporedili po površini pufra v koritu tehnice (10 mM fosfatni pufer, 100 mM NaCl, pH = 7). Počakali smo nekaj minut, da je ves kloroform izhlapel. Nato smo pričeli pomikati bariere skupaj s hitrostjo 1 cm^2/min , dokler nismo dosegli površinskega tlaka okoli 25 mN/m. Ko se je tlak stabiliziral, smo vbrizgali 1 mL proteina do končne koncentracije 10^{-4} mg/mL v 55 mL pufra na tehnicici. Ta koncentracija je nižja od CMC, da se izognemo tvorbi micelov proteina. Enakomerno razporejenost proteina v pufru smo dosegli z mešanjem z brizgalko. Naraščanje površinskega tlaka smo spremljali tako dolgo, dokler se vrednost ni ustalila, kar pomeni nasičenje monosloja s proteinom.

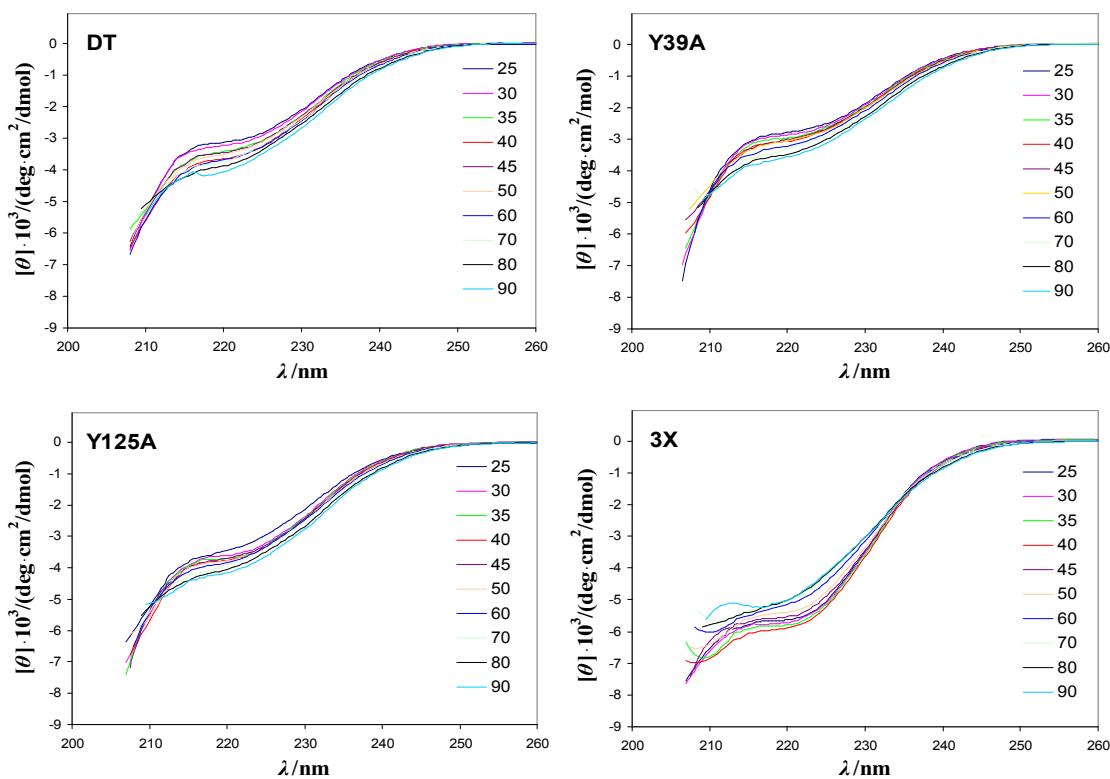
4 REZULTATI

4.1 CIRKULARNI DIHROIZEM

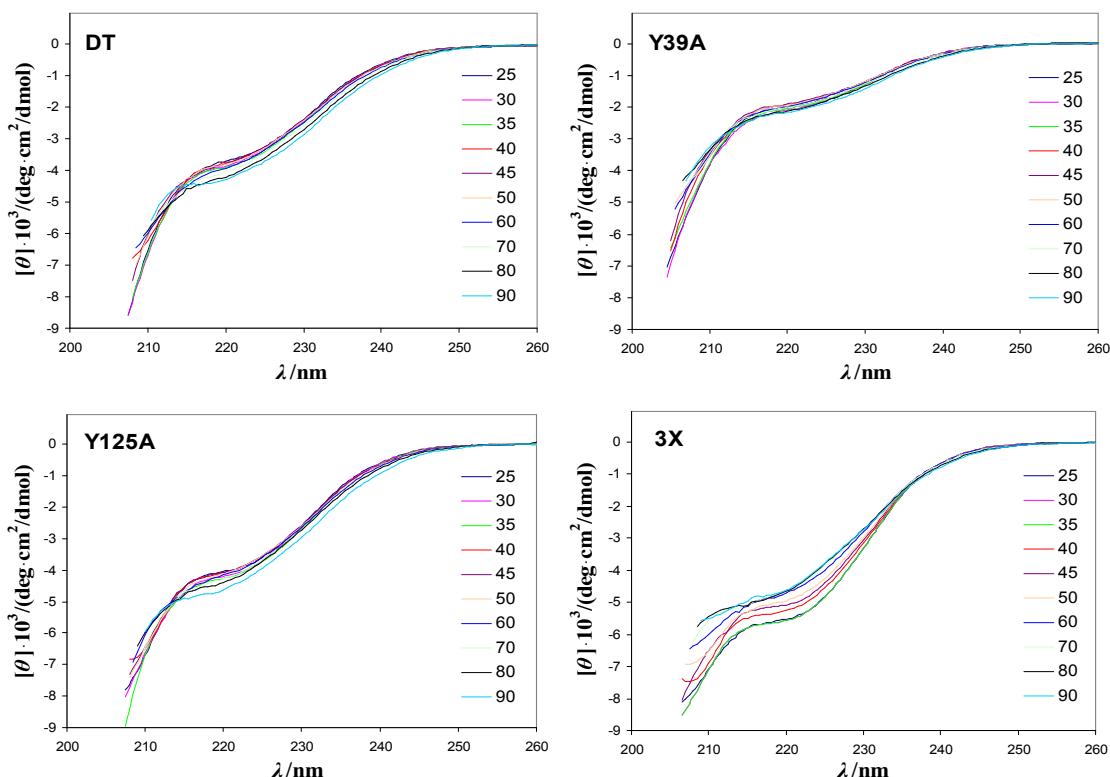
S pomočjo CD spektrov lahko sklepamo o sekundarni strukturi proteinov. Od spektrov proteina in proteina z vezikli smo odšteli spekter pufra. Minimum povprečne molarne eliptičnosti AK ostanka $[\theta]$ pri valovni dolžini okrog 220 nm je značilen za proteine s sekundarno strukturo α -vijačnice (Cheng in sod., 1972). Nižja je $[\theta]_{220}$, večji delež predstavlja α -vijačnica. Temperaturna odvisnost $[\theta]$ α -sinukleina in mutant z različnimi lipidi je prikazana na slikah 14, 15 in 16. Razmerje lipidi/protein je bilo v vseh primerih 10:1. Najnižja $[\theta]$ pri valovni dolžini okoli 220 nm je pri proteinih, ki smo jim dodali DPPG vezikle (slika 14), medtem ko je učinek veziklov iz DPPC in sfingomielina precej manjši (slika 15 in 16). Za nazornejši prikaz so na sliki 17 prikazani spektri DT brez in v prisotnosti različnih veziklov pri temperaturi 40 °C. Temperatura ima največji vpliv na sekundarno strukturo proteinov v prisotnosti DPPG veziklov, kjer minimum okrog 220 nm pada do temperaturnega območja 40-50 °C, nato se trend obrne. Vpliv temperature na sekundarno strukturo proteinov v prisotnosti veziklov iz DPPC ali sfingomielina je majhen.



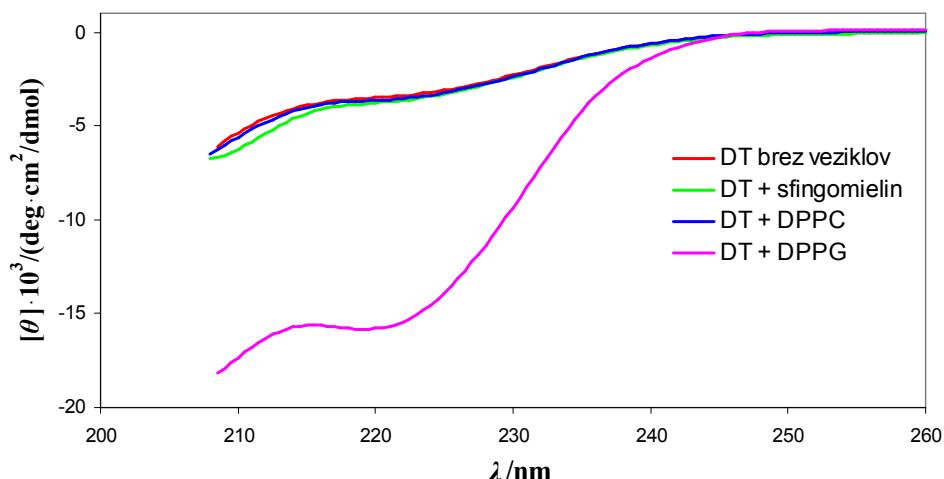
Slika 14: CD spektri proteinov pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPG.



Slika 15: CD spektri proteinov pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz DPPC.

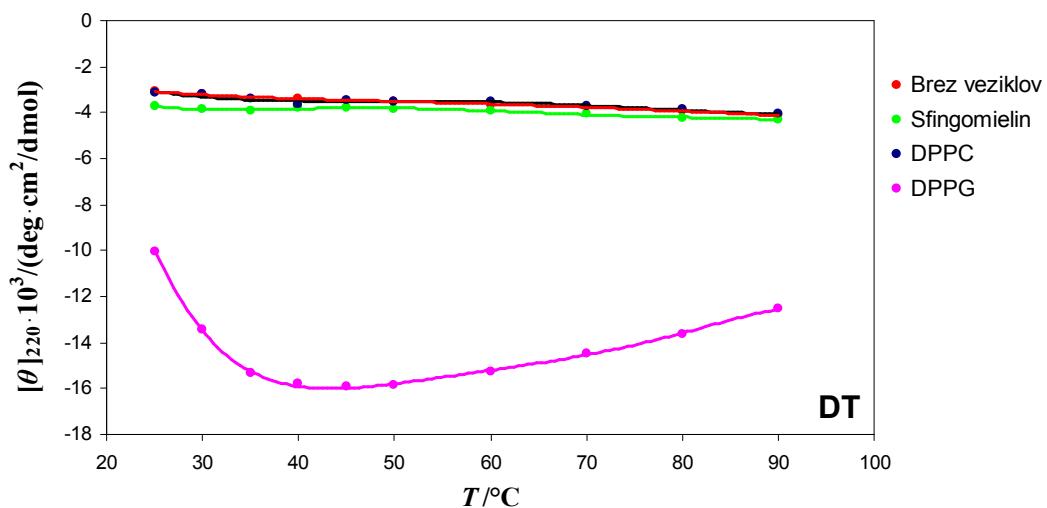


Slika 16: CD spektri proteinov pri različnih temperaturah v prisotnosti veziklov iz sfingomielina.

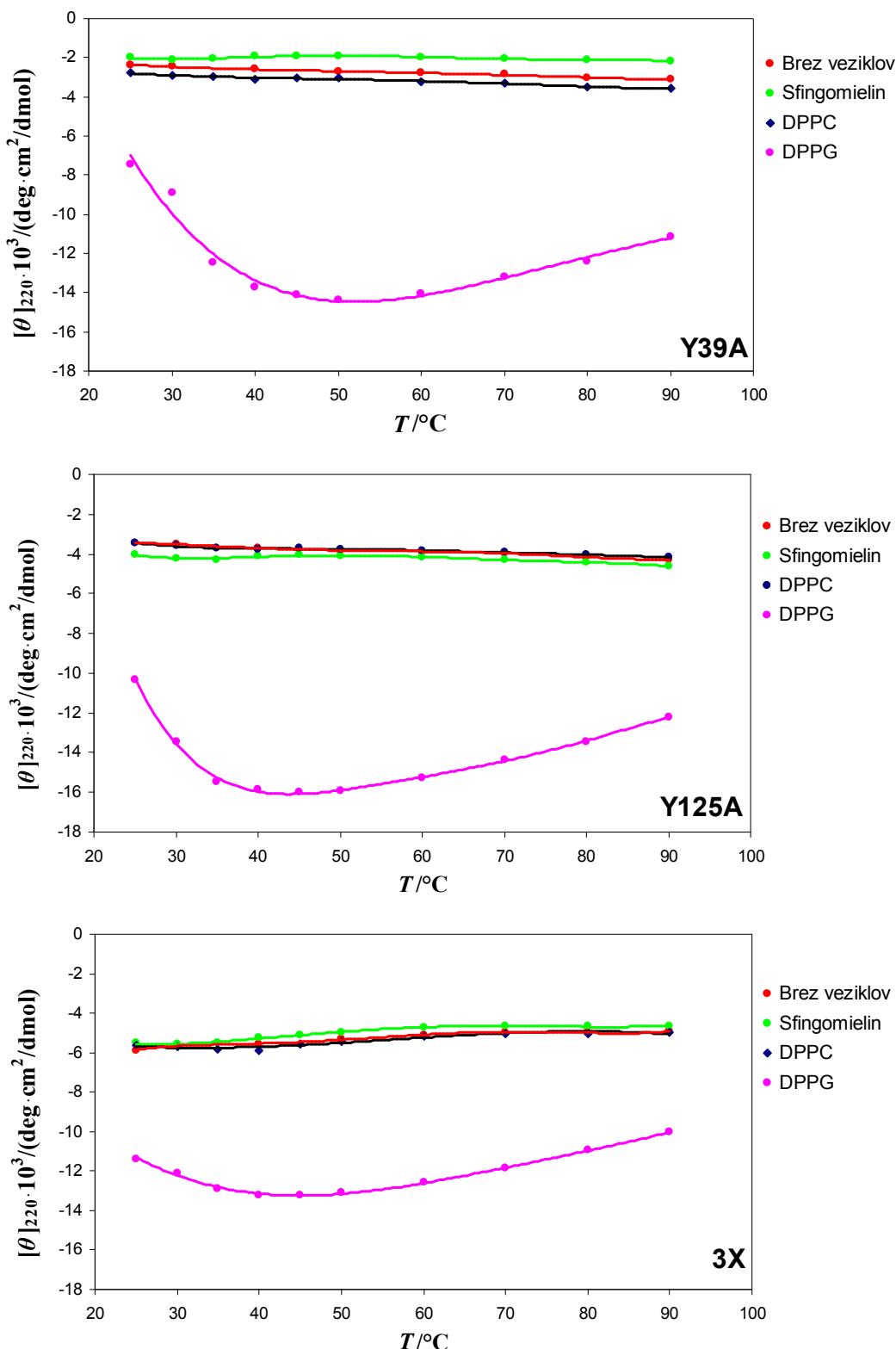


Slika 17: CD spektri nativnega proteina brez veziklov in v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina ($T = 40 \text{ } ^\circ\text{C}$).

Kot že rečeno, lahko informacijo o deležu α -vijačnice v sekundarni strukturi proteina pridobimo iz povprečne molarne eliptičnosti AK ostanka pri 220 nm. Zaradi večje informativnosti so vrednosti $[\theta]_{220}$ pri različnih temperaturah dodatno predstavljene na sliki 18. $[\theta]_{220}$ v prisotnosti DPPG veziklov pri vseh proteinih pada do območja 40-50 °C, nato prične ponovno naraščati. Najnižje vrednosti doseže v primeru DT in Y125A. $[\theta]_{220}$ v primeru DPPC in sfingomielina z naraščanjem temperature rahlo pada, razen pri trojni mutanti, kjer z naraščanjem temperature rahlo raste. Vpliv temperature na sekundarno strukturo proteinov brez veziklov je majhen. Enako velja v prisotnosti DPPC in sfingomielina, $[\theta]_{220}$ je v primerjavi s samim proteinom v pufru na celotnem temperaturnem območju praktično enaka.

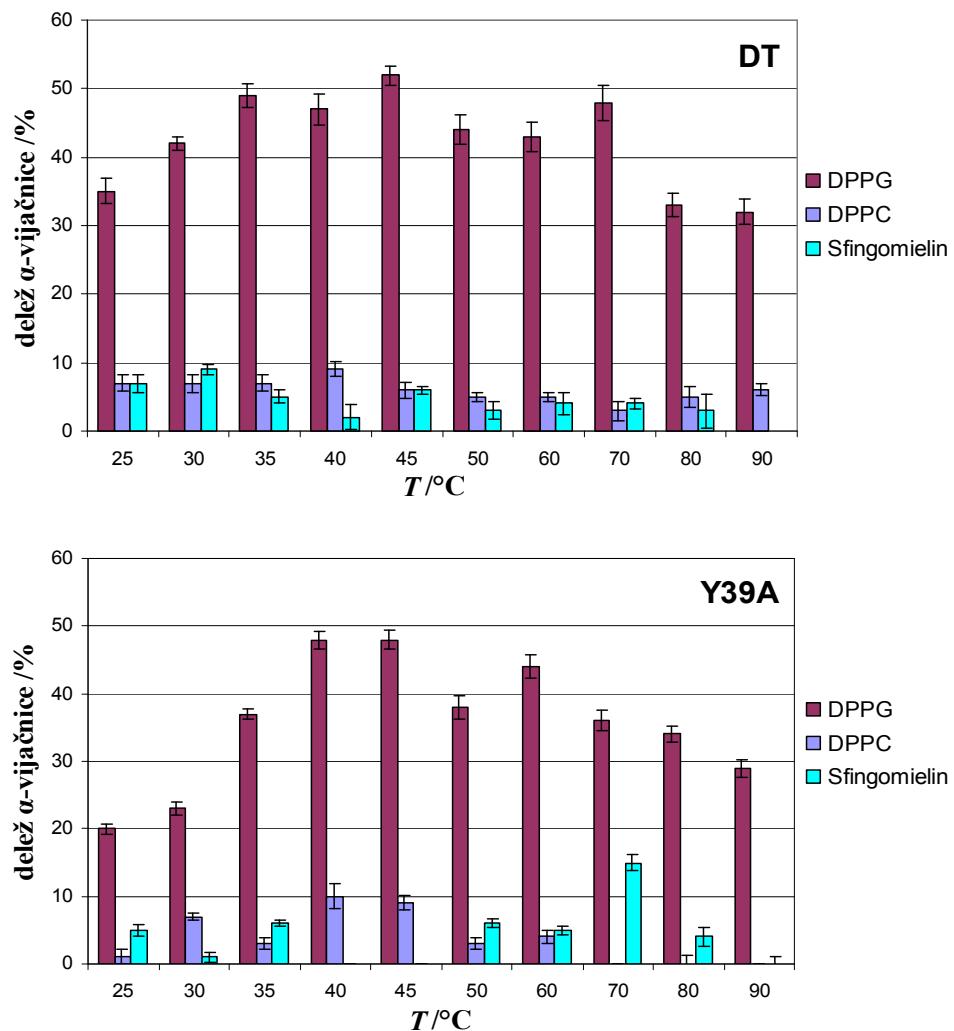


Slika 18: Povprečna molarna eliptičnost AK ostanka proteinov pri 220 nm ($[\theta]_{220}$) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina. Se nadaljuje.

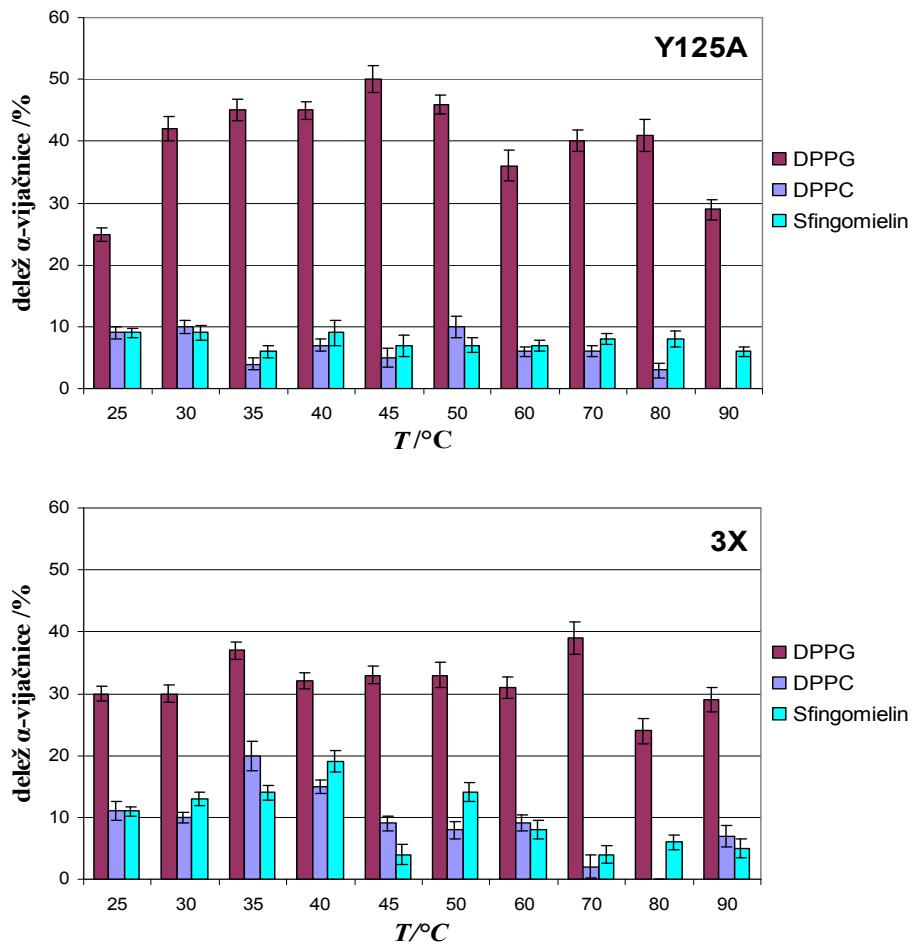


Nadaljevanje. Slika 18: Povprečna molarna eliptičnost AK ostanka proteinov pri 220 nm ($[\theta]_{220}$) pri različnih temperaturah (T) brez veziklov in v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina.

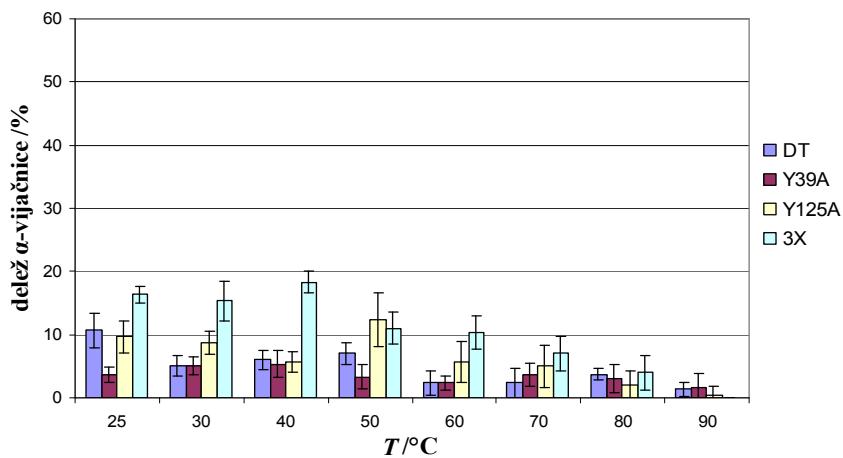
Za izračun deleža α -vijačnice v sekundarni strukturi proteinov smo uporabili program Contin. Program primerja spekter preučevanega proteina s spektri 16 proteinov, ki jim je bila določena sekundarna struktura s pomočjo rentgenske kristalografije, pri čemer določi tudi interval napake (Provencher in Gloeckner, 1981). Za vse proteine je največ α -vijačnice značilne v prisotnosti DPPG veziklov. Pri DT, Y39A in Y125A je največ α -vijačnice na temperaturnem območju med 40 in 50 °C, medtem ko je temperaturni vpliv na 3X mutanto po dodatku DPPG veziklov manj izrazit. Delež α -vijačnice pri 3X mutantni nikoli ne preseže 40 % sekundarne strukture. V prisotnosti DPPC ali sfingomielina delež α -vijačnice z redkimi izjemami preseže 10 %, razen pri 3X mutantni (slika 19). Primerjava teh rezultatov z deležem α -vijačnice v primeru proteinov brez veziklov (slika 20) pokaže, da prisotnost DPPC ali sfingomielina ne povzroči sprememb v deležu α -vijačnice. Ker smo pri vsaki CD meritvi proteina z vezikli posneli tudi spekter proteina brez veziklov, je končni rezultat deleža α -vijačnice proteina brez veziklov izračunano povprečje štirih meritev. Pri nižjih temperaturah izstopa visok delež α -vijačnice 3X mutante brez prisotnosti veziklov.



Slika 19: Delež sekundarne strukture α -vijačnice nativnega α -sinukleina in mutant pri različnih temperaturah (T) v prisotnosti veziklov iz DPPC, DPPG ali sfingomielina. Izračuni so bili opravljeni s programom Contin. Se nadaljuje.



Nadaljevanje. Slika 19: Delež sekundarne strukture α -vijačnice nativnega α -sinukleina in mutant pri različnih temperaturah (T) v prisotnosti veziklov iz DPPC, DPPG ali sfingomielina. Izračuni so bili opravljeni s programom Contin.



Slika 20: Delež sekundarne strukture α -vijačnice nativnega α -sinukleina in mutant pri različnih temperaturah (T) brez prisotnosti veziklov (povprečje štirih meritev). Izračuni so bili opravljeni s programom Contin.

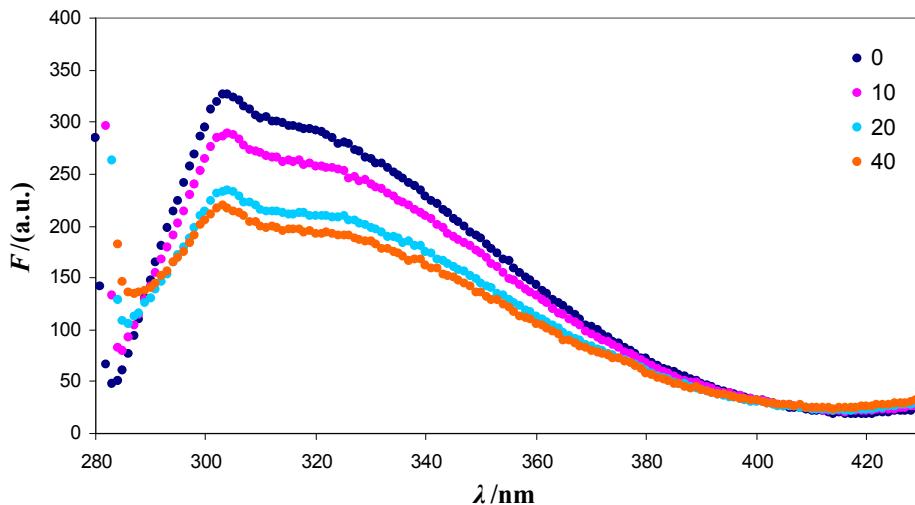
4.2 INTRINZIČNA FLUORESCENCA

Emisijske spektre α -sinukleina smo popravili s faktorjem redčitve V/V_0 :

$$F_{pop(\lambda)} = F_{(\lambda)} \times \frac{V}{V_0} \quad \dots(7)$$

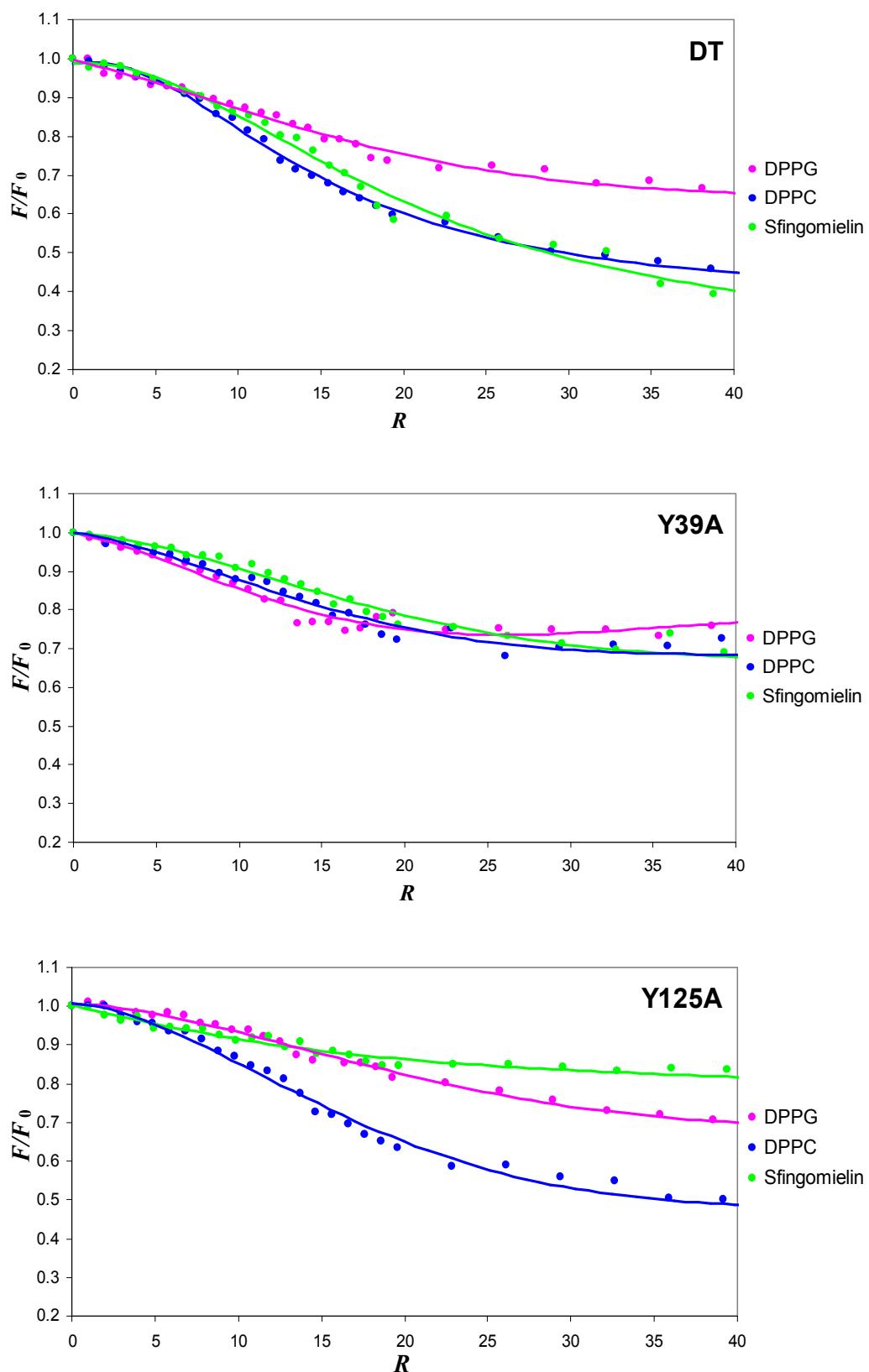
pri čemer je $F_{pop(\lambda)}$ popravljena vrednost fluorescence, F je izmerjena vrednost fluorescence pri valovni dolžini λ , V je volumen merjenega vzorca, V_0 pa začetni volumen vzorca v kiveti. V nadaljevanju je vrednost F vedno že popravljena vrednost fluorescence. Tirozin ima emisijski maksimum pri valovni dolžini približno 300 nm, za lažjo primerjavo rezultatov smo izmerjene vrednosti $F_{(304)}$ normalizirali z začetno vrednostjo $F_{0(304)}$.

Iz posameznih emisijskih spektrov proteinov je razvidno, da intrinzična fluorescence tirozina (F) v okolini emisijskega maksimuma (300 nm) ob dodajanju veziklov pada (slika 21, prikazani le rezultati nativnega proteina v prisotnosti DPPG).

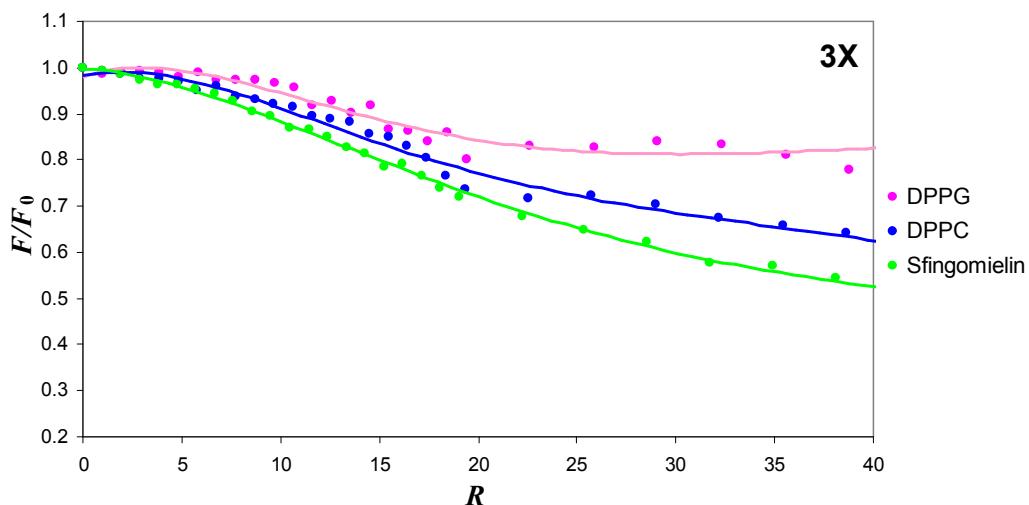


Slika 21: Popravljeni fluorescenčni emisijski spektri nativnega proteina pri različnih razmerjih DPPG/protein ($T = 25^\circ\text{C}$).

Rezultati odvisnosti normalizirane fluorescence F/F_0 v odvisnosti od razmerja R so predstavljeni na sliki 22. F/F_0 pri nativnem proteinu do $R = 40$ pada. F/F_0 najmanj pade ob dodajanju DPPG veziklov, medtem ko je ta efekt pri DPPC in sfingomielinu precej večji. Podobne rezultate smo dobili z analizo spektrov mutantnih proteinov, F/F_0 do $R = 40$ pada. F/F_0 se najmanj zmanjša v primeru DPPG, medtem ko je efekt padanja F/F_0 precej večji pri DPPC in sfingomielinu. Izjema je Y125A pri dodajanju sfingomielina, kjer se je F/F_0 najmanj zmanjšala v primerjavi z DPPC in DPPG. Izpostaviti velja Y39A, saj v tem primeru različni lipidi povzročijo podoben efekt, F/F_0 se glede na druge proteine ne zniža veliko.

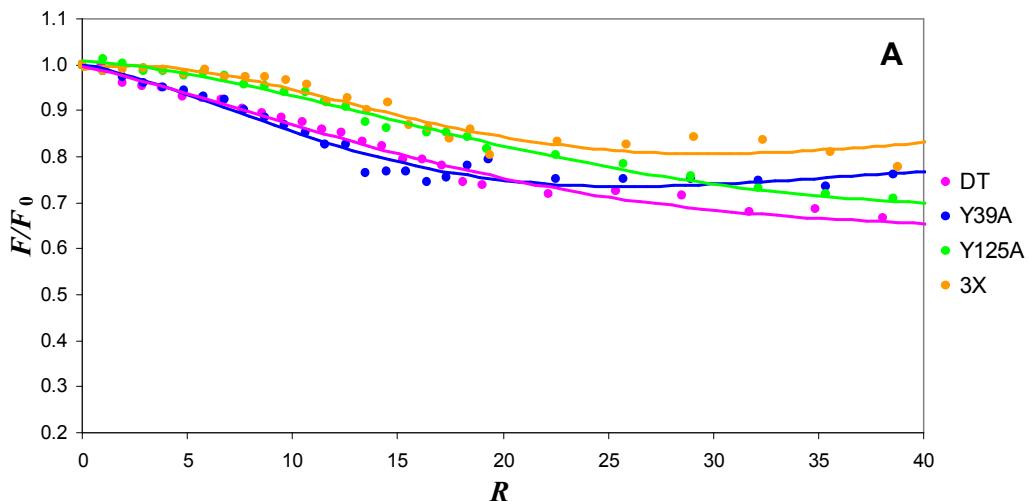


Slika 22: Normalizirana fluorescenza (F/F_0) v odvisnosti od množinskega razmerja lipidi/protein (R) za proteine v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina. Se nadaljuje.

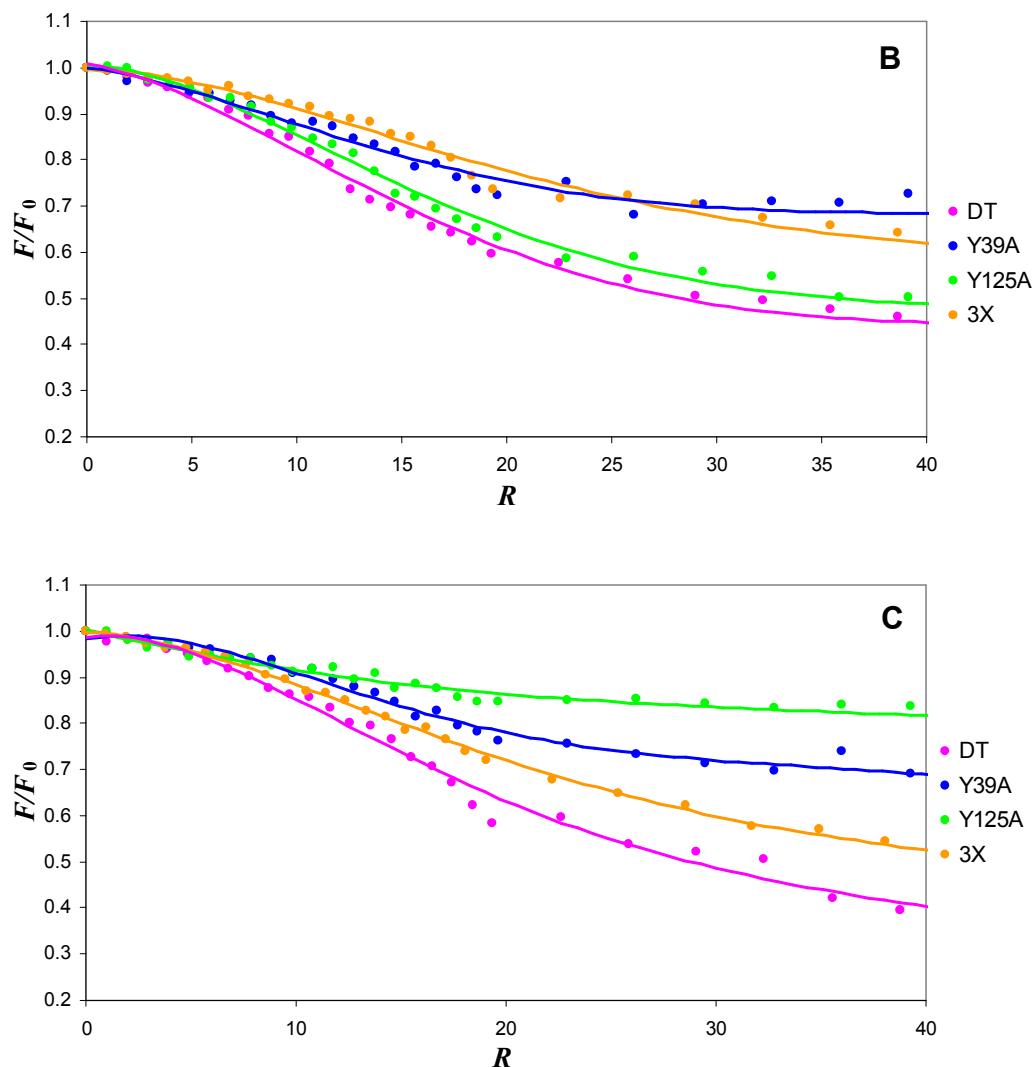


Nadaljevanje. Slika 22: Normalizirana fluorescenza (F/F_0) v odvisnosti od množinskega razmerja lipidi/protein (R) za proteine v prisotnosti veziklov iz DPPG, DPPC ali sfingomielina.

Primerjamo lahko tudi fluorescenco α -sinukleina in mutant, ki smo jim dodajali določeno vrsto lipidov. Pri vseh lipidih se je najbolj zmanjšala F/F_0 nativnega α -sinukleina. Najmanjšo spremembo z DPPG vezikli vidimo pri 3X, z DPPC vezikli pri Y39A in 3X ter s sfingomielinom pri mutantni Y125A (slika 23).



Slika 23: Normalizirana fluorescenza (F/F_0) v odvisnosti od množinskega razmerja lipidi/protein (R). Graf A predstavlja titracije vseh proteinov z DPPG vezikli, graf B titracije z DPPC in graf C s sfingomielinom. Se nadaljuje.

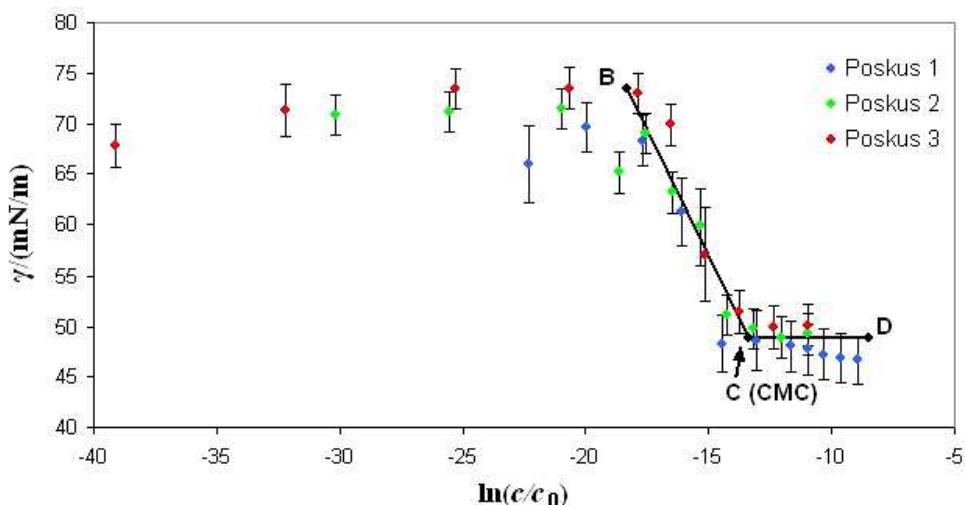


Nadaljevanje. Slika 23: Normalizirana fluorescensa (F/F_0) v odvisnosti od množinskega razmerja lipidi/protein (R). Graf A predstavlja titracije vseh proteinov z DPPG vezikli, graf B titracije z DPPC in graf C s sfingomielinom.

4.3 KRITIČNA MICELNA KONCENTRACIJA IN POVRŠINA MOLEKULE α -SINUKEINA

Pripravili smo tri različne redčitvene vrste proteina za pokritje širšega območja koncentracij. Meritev smo na določeni redčitveni vrsti večkrat ponovili. To nam je omogočilo izračun enačbe premice segmenta B-C ($y = ax + b$) in C-D ($y = b$) (slika 24) ter njune napake. Poleg statistične napake smo upoštevali še sistematično napako 2 mN/m, ki smo jo določili na podlagi predhodnih izkušenj pri podobnih meritvah. Prileganje premice je bilo opravljeno s programom Origin 6.1. CMC je tista koncentracija, kjer se sekata premici B-C in C-D (slika 9, slika 24).

Na sliki 24 so predstavljene meritve površinske napetosti γ v odvisnosti od koncentracije proteina v pufru $\ln(c/c_0)$, pri čemer je c_0 koncentracija 1 mol/L. Nizka koncentracija α -sinukleina zelo malo vpliva na površinsko napetost (približno do območja $\ln(c/c_0) = -20$). Nato se γ hitro zniža, dokler ponovno ne doseže relativno konstantne vrednosti, kljub povečevanju koncentracije proteina.



Slika 24: Odvisnost površinske napetosti (γ) od koncentracije α -sinukleina ($\ln(c/c_0)$) pri treh različnih poskusih. Prileganje premice točkom je bilo opravljeno s programom Origin 6.1. Točka C predstavlja kritično micelno koncentracijo (CMC).

Presečišče premic B-C in C-D je na podlagi naših meritev pri $\ln(c/c_0) = -13,4 \pm 1,99$ (slika 24), iz česar sledi: $CMC = 1,5 \mu\text{mol/L}$. Naklon premice na segmentu B-C znaša $-5,03 \pm 0,475 \text{ mmol/L}$. Ta vrednost nam s pomočjo Gibbsove adsorpcijske enačbe (enačba 5) omogoča izračun vrednosti Γ . Recipročna vrednost zmnožka Γ in Avogadrovega števila nam da površino, ki jo zavzame ena molekula α -sinukleina na površini pufra in znaša $80,5 \pm 7,6 \text{ \AA}^2$.

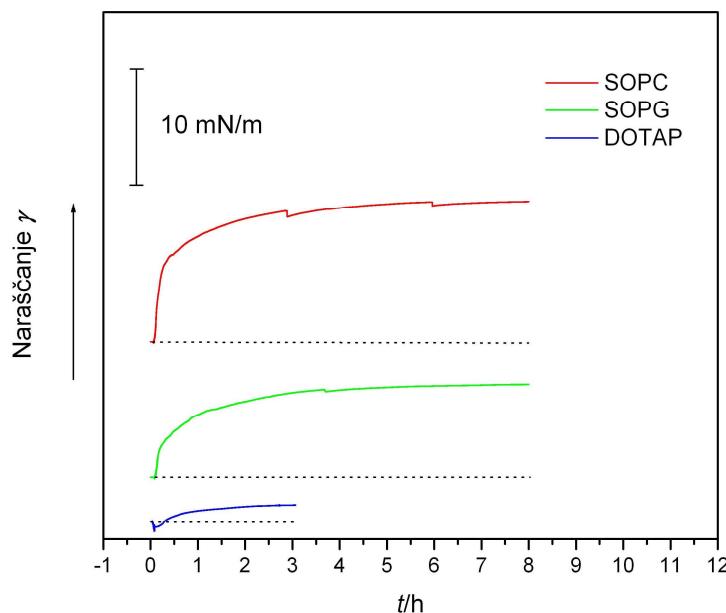
4.4 LIPIDNI MONOSLOJ

α -sinuklein smo pod lipidni monosloj vbrizgali pri površinskem tlaku π_0 približno 25 mN/m. Počakali smo tako dolgo, dokler se vrednost površinske napetosti ni umirila. Izračunali smo absolutno razliko med začetnim in končnim površinskim tlakom $\Delta\pi$. Upoštevali smo prispevek sistematične napake (1 mN/m), ki smo jo določili na podlagi izkušenj iz predhodnih meritev. Kjer smo opravili več meritev z eno vrsto lipidov smo upoštevali tudi statistično napako. π je največ narašel v primeru monosloja iz nevtralno nabitih SOPC lipidov. Nekoliko manjši efekt smo izmerili z negativno nabitimi SOPG lipidmi. Sprememba s pozitivno nabitimi DOTAP lipidmi in po vbrizganju pufra brez α -sinukleina pod SOPC monosloj minimalno vpliva na spremembo π . Rezultati so prikazani v preglednici 4 in na sliki 25.

Preglednica 4: Najvišji dosežen površinski tlak π_{\max} in absolutna razlika med začetnim in končnim površinskim tlakom $\Delta\pi$ po dodatku α -sinukleina ali pufra (n predstavlja število meritev).

Lipidi	π_{\max} (mN/m)	$\Delta\pi$ (mN/m)
SOPC ($n = 2$)	$38,6 \pm 1,1$	$11,9 \pm 1,1$
SOPG ($n = 2$)	$34,5 \pm 1,1$	$7,7 \pm 1,1$
DOTAP ($n = 1$)	$27,0 \pm 1,0$	$1,4 \pm 1,0$
*SOPC ($n = 1$)	$27,3 \pm 1,0$	$1,1 \pm 1,0$

*Vbrizganje pufra brez proteina pod monosloj



Slika 25: Sprememba površinske napetosti (γ) v odvisnosti od časa (t) po vbrizganju proteina pod lipidni monosloj. Vse meritve niso prikazane.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Cirkularni dihroizem

Številni avtorji so pokazali, da je α -sinuklein v pufrski raztopini nativno nezvit protein. S pomočjo CD so določili 2 % α -vijačnice in 68 % neurejene strukture (Weinreb in sod., 1996), Narayanan in Scarlata poročata o 9 % α -vijačnice, 35 % β -strukture in 56 % neurejene strukture. Z AFM metodo niso zaznali α -vijačnice, ampak 38,2 % naključnega zvitja, 7,3 % β -strukture in 54,5 % konformacij, stabiliziranih s šibkimi interakcijami (Sandal in sod., 2008). Tudi drugi avtorji poročajo o prisotnosti interakcij med različnimi deli α -sinukleina v raztopini (Dedmon in sod., 2005; Bertoncini in sod., 2005). V splošnem gre za interakcije med N-terminalnim in C-terminalnim delom. Uversky in sod. (2002) so ugotovili, da ima α -sinuklein manjši hidrodinamski radij, kot bi pričakovali za popolnoma nezvit protein. V našem delu smo uporabili štiri variante α -sinukleina: nativni protein in tri mutante (Y39A, Y125A in 3X). Sekundarno strukturo teh proteinov so preučevali že prej: za DT v raztopini je značilno $19 \pm 1\%$ α -vijačnice, za Y39A $12 \pm 2\%$, za Y125A $25 \pm 2\%$ in za 3X $26 \pm 2\%$ pri sobni temperaturi (Poklar Ulrich in sod., 2008). O sekundarni strukturi proteinov v raztopini lahko sklepamo na podlagi $[\theta]_{220}$ (slika 18). Vrednost $[\theta]_{220}$ za vse proteine razen 3X z naraščanjem temperature rahlo pada, sicer pa temperatura nima veliko vpliva na $[\theta]_{220}$. Sklepamo lahko, da je delež α -vijačnice pri proteinih brez prisotnosti veziklov majhen. Na podlagi analize s programom Contin je za DT pri $T = 25^\circ\text{C}$ značilno $11 \pm 3\%$ α -vijačnice, Y39A $4 \pm 1\%$, Y125A $10 \pm 3\%$ in za 3X $16 \pm 1\%$ α -vijačnice (slika 20). Rezultat za DT je primerljiv z drugimi objavami (Narayanan in Scarlata, 2001). Deleži α -vijačnice pri mutantah so nižji glede na objavo Poklar Ulrich in sod. (2008), vendar avtorji poročajo tudi o večjem deležu α -vijačnice pri DT glede na druge objave. Razlog so lahko različni protokoli izolacije (Narayanan in Scarlata, 2001). Protein v našem delu je bil raztopljen v drugačnem pufrskem sistemu brez soli ($\text{pH} = 7,0$), meritve so potekale pri koncentraciji 1 mg/mL, medtem ko so Poklar Ulrich in sod. (2008) uporabili koncentracijo proteina 2 mg/mL ($\text{pH} = 7,4$), meritve so potekale pri sobni temperaturi. Weinreb in sod. (1996) sicer poročajo, da sekundarna struktura α -sinukleina v citosolu ni odvisna ne od pH, ne od koncentracije soli, pri čemer za določanje sekundarne strukture niso uporabili računalniške analize spektrov. Kljub razlikam lahko sklepamo, da je najmanjši delež α -vijačnice pri $T = 25^\circ\text{C}$ značilen za Y39A, največji pa za 3X. Pri tej temperaturi lahko vse proteine še vedno označimo za nativno nezvite. Delež α -vijačnice je majhen čez vso temperaturno območje za vse proteine. Trend kaže, da pri zelo visokih temperaturah (80 in 90°C) delež α -vijačnice še dodatno upade (slika 20). Izpostavimo lahko visok delež α -vijačnice glede na druge proteine do $T = 50^\circ\text{C}$ za 3X. Znano je, da je C-terminalni del v dinamičnih interakcijah z drugimi deli proteina, ki jih večinoma povezujejo z inhibicijo fibrilacije (Dedmon in sod., 2005; Bertoncini in sod., 2005). Zamenjava tirozinov na treh mestih na C-terminalnem delu bi lahko vplivala na te interakcije, kar izpostavlja pomembnost teh AK ostankov za lastnosti α -sinukleina v raztopini. Znano je, da mutacija Y133A inducira α -vijačnico v raztopini ($88 \pm 6\%$). Razlog za takšna opazovanja je lahko tudi sama geometrija tirozinskega AK ostanka, ki teži k indukciji β -strukture, medtem ko manjši alanin teži k indukciji α -vijačnice. Po drugi strani je za 3X mutanto značilen manjši delež α -vijačnice ($26 \pm 6\%$) kot za Y133A (Poklar

Ulrich in sod., 2008). Tako kot Poklar Ulrich in sod. (2008) smo tudi mi potrdili najmanjši delež α -vijačnice pri Y39A, vendar samo pri $T = 25$ °C, pri višjih temperaturah razlike v primerjavi z drugimi proteini niso značilne.

Ker nativno funkcijo α -sinukleina povezujejo z vezavo na sinaptične vezikle, nas je zanimal predvsem vpliv mutacij na interakcije vezikli-protein. Obenem smo preučevali tudi vpliv različnih faz lipidov za vezavo α -sinukleina. Sekundarna struktura se spremeni ob vezavi na negativno nabite SUV, ne pa tudi na nevtralno nabite, pri čemer so bili uporabljeni lipidi tako v fazi tekočega kristala kot tudi v fazi gela (Davidson in sod., 1998; Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003). V nasprotju s temi ugotovitvami poročajo, da se α -vijačnica inducira tudi ob vezavi na nevtralno nabite DPPC, če so ti v stanju gela (Nuscher in sod., 2004). α -sinuklein se veže na lipidne rafte, ki so v tekočem urejenem stanju (Martinez in sod., 2007). Pomembnost stanja lipidov izpostavljajo tudi Kubo in sod. (2005), za vezavo α -sinukleina je pomembna prisotnost dveh faz membrane. Za preučevanje interakcij smo zato izbrali DPPC s $T_m = 41,5$ °C, DPPG s $T_m = 40$ °C (Goñi in Alonso, 2006) in sfingomielin, ki je zaradi nepolarnih verig različne sestave v stanju tekočega kristala na širokem temperaturnem območju.

$[\theta]_{220}$ za DT je odvisna od temperature in od tipa lipidov, iz katerega so pripravljeni vezikli (slika 18). $[\theta]_{220}$ za protein brez veziklov, z DPPC ali sfingomielinom se malo razlikuje na celotnem temperaturnem območju, $[\theta]_{220}$ je visoka glede na protein v prisotnosti DPPG. Razlik nismo opazili niti ob primerjavi celotnih spektrov $[\theta]$ (slika 17, prikazani so rezultati za $T = 40$ °C). Vemo, da je α -sinuklein brez dodatka veziklov nezvit. Zato lahko zaključimo, da tudi v prisotnosti DPPC in sfingomielina ni prišlo do indukcije α -vijačnice v sekundarni strukturi α -sinukleina. Spremembo sekundarne strukture smo zaznali v prisotnosti DPPG veziklov. To je vidno ob primerjavi spektrov (slika 14 in 17), vrednosti $[\theta]$ so nižje, minimum pri 220 nm je značilen za strukturo α -vijačnice. $[\theta]_{220}$ je močno odvisna od temperature, najnižje vrednosti doseže na območju 40-50 °C (slika 18). Delež α -vijačnice na podlagi analize s programom Contin raste do $T = 45$ °C, nato pa ponovno upade. Za α -sinuklein, kot kažejo rezultati, ni pomemben le nabolj lipidov, ampak tudi njihova mobilnost. Fazni prehod za DPPG je pri 40 °C, v tem območju se inducira največ α -vijačnice. Predvidevamo, da indukcijo α -vijačnice pospeši obstoj dveh faz lipidov, kar je v skladu s prejšnjimi ugotovitvami (Kubo in sod., 2005). Možno je tudi, da se α -sinuklein preferenčno veže samo na membrane v fazi tekočega kristala. Da delež α -vijačnice pri višjih temperaturah ponovno upada, je lahko kriva tudi denaturacija urejene sekundarne strukture proteina.

Do podobnih ugotovitev kot pri DT pridemo pri Y39A in Y125A. $[\theta]_{220}$ z naraščanjem temperature rahlo pada, velikih razlik med proteinoma brez veziklov in v prisotnosti DPPC ali sfingomielina ni. $[\theta]_{220}$ je najnižja na območju med 40-50 °C v prisotnosti DPPG veziklov (slika 18). DPPG podobno kot pri DT inducira spremembo sekundarne strukture pri Y39A in Y125A, delež α -vijačnice pri $T = 45$ °C doseže približno 50 % pri vseh treh proteinih (slika 19). Nekoliko izstopajo nizki deleži α -vijačnice pri Y39A do $T = 35$ °C. Vemo, da je tirozin na mestu 39 na N-terminalnem delu, ki ob vezavi na negativno nabite vezikle tvori značilno amfipatsko α -vijačno strukturo. Morda ima zato mutacija Y39A večji vpliv na strukturo α -sinukleina kot Y125A, saj je Tyr125 na C-terminalnem delu, ki naj bi ob vezavi na vezikle ostal nestrukturiran (Ulmer in sod., 2005; Drescher in sod.,

2008; Georgieva in sod., 2008). Tirozinski AK ostanek je nepolaren in je zaradi aromatske stranske skupine lahko prisoten v nepolarnem jedru membrane.

Pozornost velja nameniti 3X mutanti. Glede na to, da vse tri AK zamenjave ležijo na C-terminalnem delu, in da je za mutanto Y125A značilen primerljiv delež α -vijačnice kot pri DT, smo pričakovali, da bomo podobne rezultate dobili tudi pri 3X mutanti. Ponovno ni bilo razlik pri $[\theta]_{220}$ med proteinom brez veziklov in z DPPC ali sfingomielinom (slika 18). Za razliko od drugih proteinov $[\theta]_{220}$ rahlo narašča z višanjem temperature. Največ α -vijačnice je v prisotnosti DPPG veziklov, vendar je temperaturna odvisnost $[\theta]_{220}$ v tem primeru precej manjša kot pri DT in drugih mutantah. To je potrdila analiza s programom Contin (slika 19). Delež α -vijačnice se giblje med 30 in 40 %, kar je manj kot pri drugih proteinih. Morda je stanje membrane za sekundarno strukturo 3X manj pomembno ali pa imajo Tyr na položajih 125, 133 in 136 pomembno vlogo pri interakcijah z membranami. Drugače je pri DPPC in sfingomielinu pri temperaturah 35 in 40 °C, kjer je za 3X značilen največji delež α -vijačnice v primerjavi z drugimi proteini. Seveda moramo upoštevati še predhodno ugotovitev, da je za 3X mutanto do $T = 50$ °C značilen večji delež α -vijačnice kot pri drugih proteinih že v raztopini brez veziklov (slika 20). Če upoštevamo oba podatka pridemo do sklepa, da DPPG inducira precej manjše spremembe v sekundarni strukturi 3X, kot je to značilno za DT, Y39A in Y125A. Znano je, da α -sinuklein brez C-terminalnega dela hitreje fibrilira (Crowther in sod., 1998), vloga pri vezavi na lipide je manj raziskana. Ob znižanju pH, ki zmanjša negativni naboj C-terminalnega konca, se α -sinuklein močneje veže na vezikle, medtem ko sprememba pH ne vpliva na sekundarno strukturo (Narayanan in Scarlata, 2001). Naša hipoteza je, da intramolekulske interakcije med C- in N-terminalnim delom ne vplivajo samo na fibrilacijo α -sinukleina, ampak tudi na sposobnost indukcije α -vijačnice v prisotnosti negativno nabitih lipidov. Obenem smo opazili še manjši vpliv faznega prehoda lipidov na indukcijo α -vijačnice.

5.1.2 Intrinzična fluorescencija

Na sliki 21 vidimo emisijske spektre nativnega proteina pri različni razmerjih DPPG/protein. V analizah smo uporabili rezultate do razmerja $R = 40$, ker pri višjih koncentracijah veziklov pride do sisanja svetlobe. Na sliki 22 je predstavljena odvisnost fluorescence od koncentracije lipidov za DT in mutante. V primeru DT vidimo, da F v prisotnosti DPPC in sfingomielina pade bolj kot v primeru DPPG. Pri razmerju $R = 35$ (DPPG) normalizirana fluorescence F/F_0 pade nekoliko pod vrednost 0,7. Davidson in sod. (1998) ter Perrin in sod. (2000) sicer niso opazili vezave α -sinukleina na nevtralno nabite vezikle, sta pa z drugačno metodologijo to pokazala Narayanan in Scarlata (2001). Zhu in sod. (2003) so pokazali, da se α -sinuklein veže na negativno in nevtralno nabite SUV, vendar na slednje nekoliko slabše, intrinzična fluorescencija tirozina je padala z naraščanjem koncentracije lipidov, po predvidevanjih zaradi interakcije tirozinskih AK ostankov z nabitim glavami lipidov. Naši rezultati to potrjujejo, fluorescencija z naraščanjem R pada v vseh primerih. Do dušenja fluorescence bi lahko prišlo tudi zaradi oligomerizacije α -sinukleina, vendar Narayanan in Scarlata (2001) poročata o inhibiciji zgodnje oligomerizacije ob vezavi na negativno in nevtralno nabite vezikle. V primeru vezave na negativno nabite vezikle pride do indukcije α -vijačnice in vgradnje v membrano, česar pa niso potrdili za DPPC. Kateri del α -sinukleina je vezan na membrano takrat, ko ne pride do indukcije α -vijačnice, ni znano. Morda gre za interakcijo med negativno nabitim C-

terminalnim delom in pozitivno nabitim holinom (Zhu in sod., 2003). Tandemske 11-merne ponovitve v zaporedju α -sinukleina zelo spominjajo na ponovitve pri apolipoproteinih, ki tvorijo amfipatsko α -vijačnico. Po vezavi na membrano se ta vanjo tudi vstavi (Benjwal in sod., 2007). Ob indukciji α -vijačnice ostane C-terminalni del nestrukturiran (Ulmer in sod., 2005; Drescher in sod., 2008; Georgieva in sod., 2008). Po modelu Bisaglia in sod. (2005) je tirozinski AK ostanek na mestu 39 vstavljen v nepolarni del membrane. Tudi s pomočjo naših CD rezultatov sklepamo, da DT v prisotnosti DPPG veziklov spremeni sekundarno strukturo (slika 19) in se vstavi v membrano. C-terminalni del ostane nestrukturiran in ne pride do vgradnje. Malo je verjetno, da bi bil C-terminalni del adsorbiran na površini DPPG, saj so tako C-terminalni del kot tudi DPPG vezikli negativno nabiti. Če predpostavimo, da je tirozin na mestu 39 v prisotnosti DPPG vstavljen v nepolarni del membrane, njegova fluorescenza ni dušena. Drugače je pri DPPC in sfingomielinu. Ker ne pride do vgradnje, je del proteina morda samo adsorbiran na površini. V direktnem stiku z negativno nabitimimi glavami lipidov je N-terminalni del, ki je neto pozitivno nabit. Na tem delu je tudi Tyr39, njegova fluorescenza je zaradi stika z nabitimimi glavami lipidov dušena, rezultat je manjša F/F_0 pri višji koncentraciji lipidov. Ker je stranska veriga Tyr nepolarna, se ob stiku z membrano morda vrine v lipidni dvosloj med polarne glave.

Pri zasnovi modela interakcije α -sinukleina z lipidnimi vezikli nam lahko dodatne odgovore ponudijo preiskovane mutante. Fluorescensa Y39A je prikazana na sliki 22. Vidimo, da so rezultati precej podobni v prisotnosti vseh treh vrst veziklov, F/F_0 pade približno do vrednosti 0,7; enako kot v primeru DT z DPPG. Tudi Y39A spremeni strukturo samo v prisotnosti DPPG, a nekoliko manj kot v primeru DT (slika 19). Glede na to, da je fluorescensa Y39A podobna pri vseh tipih veziklov, čeprav je sekundarna struktura drugačna, je nizka F/F_0 v primeru DT z DPPC in sfingomielinom prispevek dušenja tirozina na mestu 39 v DT. To potrjuje domnevo, da tirozini na C-terminalnem delu niso v tesnejšem stiku z nabitimimi lipidnimi glavami. V stiku je samo Tyr39, ko je protein adsorbiran na površini membrane.

Glede na model bi morali biti rezultati za mutantno Y125A zelo podobni tistim za DT. To smo potrdili v prisotnosti DPPG in DPPC veziklov (slika 22). Z DPPG vezikli F/F_0 pade do 0,7 in z DPPC do 0,5; podobno kot v primeru DT z enakima tipoma veziklov. To je bilo glede na model pričakovano, saj Y125A tako kot DT ob interakciji z DPPG vezikli spremeni sekundarno strukturo, Tyr39 je ob tem vgrajen v notranjost membrane. Presenetljive rezultate so dali vezikli iz sfingomielina, F/F_0 je pri večji koncentraciji lipidov višja od F/F_0 v primeru DPPG. To pomeni, da je dušenja še manj kot pri DPPG veziklih. Možnost, da se protein Y125A vgradi v membrano, sestavljeno iz sfingomielina, je malo verjetna, saj ni prišlo do indukcije α -vijačnice (slika 19). Mogoče je, da se Y125A sploh ne adsorbira na vezikle iz sfingomielina. Ob tej domnevi se moramo vrniti na rezultate DT. Iz tega nujno sledi, da tudi ob vgradnji DT v membrano iz DPPG pride do določene stopnje dušenja, saj je fluorescensa Y125A višja. Ker so rezultati Y39A z vsemi lipidi podobni kot DT z DPPG, je C-terminalni del morda ob vseh načinih vezave α -sinukleina v interakciji z nabitimimi lipidnimi glavami, kar vodi v rahlo dinamično dušenje fluorescence.

Največji vpliv na $[\theta]_{220}$ ima zamenjava vseh tirozinov na C-terminalnem delu (slika 18). Te mutacije imajo torej večji vpliv na mehanizem vezave α -sinukleina, zato je pri interpretaciji rezultatov meritev F potrebno biti previden. Pri 25 °C je delež α -vijačnice z DPPG vezikli $30 \pm 1\%$, kar je največja vrednost takoj za DT. Predpostavimo, da je pri tej temperaturi mehanizem vezave enak kot pri DT. F/F_0 pri DPPG veziklih pada do vrednosti okoli 0,8; kar pomeni manjše dušenje kot pri DT z DPPG. Tirozin na mestu 39 je vstavljen v membrano, dušenja F ni. Dinamičnega dušenja tirozinskih AK ostankov ob stiku z lipidi prav tako ni, zato je padec F/F_0 majhen. F/F_0 bolj pada v primeru DPPC in sfingomielina, saj je fluorescenza Tyr39 dušena, protein je adsorbiran na površini ali vrinjen med polarne glave lipidov.

Ob primerjavi fluorescence različnih proteinov z določenim tipom veziklov moramo upoštevati, da je število tirozinskih AK ostankov različno in da je fluorescenza F normalizirana z začetno intenziteto F_0 . Če primerjamo F/F_0 vseh proteinov v prisotnosti DPPG veziklov (slika 23, graf A), ugotovimo, da najnižjo vrednost doseže DT, najvišjo pa 3X. Razlog za razliko med DT in 3X je najverjetneje v številu Tyr ostankov in okolju, v katerem se ti Tyr nahajajo. Fluorescensa Tyr39 ni dušena, za Tyr125, Tyr133 in Tyr136 pa je značilno dinamično dušenje. Po drugi strani imamo pri 3X samo prispevek nedušenega Tyr39, zato je normalizirana fluorescensa 3X višja. Med sabo lahko primerjamo tudi DT, Y125A in Y39A. Predvidevamo, da fluorescensa Tyr39 ob vgradnji v membrano ni dušena, ker se Tyr nahaja v nepolarnem okolju lipidnega dvošloja. Pričakovali bi, da bo F/F_0 za Y125A nekoliko višja, saj imamo sedaj le dva tirozina na C-terminalnem delu in je njun prispevek k celotni F manjši. Te predpostavke smo z meritvami fluorescence tudi potrdili.

Ob prisotnosti DPPC in sfingomielina najnižje vrednosti F/F_0 doseže DT. Iz objav sklepamo, da je α -sinuklein na površino veziklov adsorbiran, ne pride pa do indukcije α -vijačnice in vgradnje v membrano. Predpostavljamo enak mehanizem vezave na sfingomielin, saj je tako kot DPPC nevtralno nabit. Tyr39 je v stiku s polarnimi glavami, fluorescensa tirozinov na C-terminalnem delu je tudi rahlo dušena. Upoštevajoč takšen model vezave, bi morale biti vrednosti F/F_0 trojne mutante nižje od DT, saj bi bil edini tirozinski AK ostanek v stiku z membrano, s tem pa podvržen dušenju fluorescence. Tega naši rezultati ne potrjujejo, podobna težava se pojavi pri Y39A in Y125A. Iz literature je znano, da 30 % α -sinukleina v prisotnosti SUV iz možganskih lipidov ostane nevezanega (Davidson in sod., 1998). Pri DPPG smo imeli oporo v CD meritvah, glede na delež α -vijačnice smo sklepali na stopnjo vgradnje proteina v membrano. V primeru DPPC in sfingomielina pa vemo le, da ne pride do indukcije α -vijačnice, ne vemo pa, kje se protein dejansko nahaja.

5.1.3 Kritična micelna koncentracija

S pomočjo meritev površinske napetosti α -sinukleina pri različnih koncentracijah (slika 24) smo izračunali njegovo kritično micelno koncentracijo. Ta znaša $1,50 \mu\text{mol/L}$. Pri tej koncentraciji pričnejo molekule α -sinukleina v raztopini tvoriti micle. Pri koncentracijah višjih od CMC se površinska napetost ob dodajanju proteina ne spreminja več. Vrednost lahko primerjamo s CMC amiloidnega β -proteina, ki tvori amiloidne fibrile pri Alzheimerjevi bolezni. Ta znaša $100 \mu\text{mol/L}$ (Kusumoto in sod., 1998), medtem ko je

kritična koncentracija tvorbe fibril okoli 30 $\mu\text{mol/L}$ (Harper in sod., 1997). Kritična koncentracija tvorbe fibril za α -sinuklein znaša 28 $\mu\text{mol/L}$ (Wood in sod., 1999). Iz tega sledi, da za razliko od β -amiloida α -sinuklein ne tvori fibril pod CMC. To bi lahko nakazovalo na različne mehanizme agregacije, čeprav oba tvorita fibrile z značilno β -strukturo. Pri α -sinukleinu in β -peptidu se predvideva, da so toksični prefibrilarni oligomeri, za oboje je značilna β -struktura (Haass in Selkoe, 2007). Različni pogoji vodijo do različne morfologije agregatov. α -sinuklein in β -amiloid lahko tvorita fibrilarne ali amorfne aggregate (Hoyer in sod., 2002). Agregacija α -sinukleina je kompleksen proces, v prvem koraku pride do transformacije iz neurejenega v delno zvito stanje. Ker je takšno stanje nestabilno, pride do združevanja v topne oligomere, ki mu sledi tvorba amorfnih ali fibrilarnih agregatov (Li in sod., 2002). Ta proces je morda odvisen tudi od lokalne koncentracije proteina v celici. Dopusčamo možnost, da se pod CMC monomeri združujejo v oligomere, nad to koncentracijo pa v amorfne aggregate (micele). Če protein preseže kritično koncentracijo tvorbe fibril, se ravnotežje od tvorbe amorfnih agregatov premakne v korist tvorbe fibril. Seveda tukaj ne upoštevamo vpliva pH, temperature in koncentracije soli, ki imajo velik vpliv na potek agregacije (Hoyer in sod., 2002). K temu lahko dodamo še vpliv mutacij, posttranslacijskih sprememb in interakcij z drugimi snovmi v celici.

5.1.4 Površina molekule α -sinukleina

Izračunana površina ene molekule α -sinukleina znaša $80,5 \pm 7,6 \text{ \AA}^2$. Glede na to, da je α -sinuklein dolg 140 AK ostankov, je ta vrednost zelo majhna. Vemo namreč, da minimalna površina, ki jo na fazni meji zavzame pravokotno orientirana α -vijačnica v stisnjенem monosloju, znaša 150 \AA^2 (Brasseur in sod., 1986). Povprečna površina AK ostanka nezvitrega proteina na površini znaša približno 15 \AA^2 (Gevod in Birdi, 1984). Razlogov za majhno površino α -sinukleina na vodni površini je lahko več. V primeru melitina so ugotovili, da bi bila površina molekule približno 400 \AA^2 , če bi bila celotna veriga melitina na fazni meji nezvita. Pri visokem površinskem tlaku (30mN/m) se površina zmanjša na okoli 90 \AA^2 . Takrat je melitin orientiran vertikalno, hidrofilen del peptida je usmerjen stran od površine vode, na fazni meji med vodo in zrakom je samo hidrofobni del molekule. Taka strukturna ureditev je najbolj energijsko ugodna (Gevod in Birdi, 1984). Enak mehanizem je morda odgovoren tudi za majhno površino α -sinukleina. Drugi razlog za zmanjšanje površine α -sinukleina je lahko proces oligomerizacije. V agregacijskih intermediatih je združenih med 20 in 25 monomerov z značilno β -strukturo. Imajo obročasto obliko z zunanjim premerom 10-12 nm in notranjim premerom 2-2,5 nm (Lashuel in sod., 2002). Iz teh podatkov sledi groba ocena, da monomer α -sinukleina v oligomeru zavzame površino 400 \AA^2 . Površina bi bila veliko manjša, če bi bil agregat orientiran pravokotno na fazno mejo. Peptidi z β -strukturo na fazni meji zavzamejo manjšo površino kot α -vijačnica (Dana, 1999), kar dodatno vodi v manjšo površino oligomerov. Pri protokolu izolacije agregacijskih intermediatov je po 30 min do 10 % proteina v obliki protofibril (Lashuel in Bosch, 2005). V našem delu smo pokazali, da je površina molekule α -sinukleina zelo majhna, za potrditev te trditve in odgovore na postavljenna vprašanja pa je seveda potrebno dodatno raziskovalno delo.

5.1.5 Lipidni monosloj

Lipidni monosloj je glede na lastnosti dober približek membrane in je primeren način preučevanja interakcij med proteini in lipidi. Če protein vbrizgamo pod lipidni monosloj in pri tem opazimo naraščanje površinskega tlaka π , je to znak vgradnje proteina v monosloj (Brockman, 1999). Ob adsorbciji proteina pride le do majhnih sprememb π (Dana, 1999). Protein smo vbrizgali pri π_0 okoli 25 mN/m, natančno začetno vrednost π_0 je zaradi narave poskusa težko doseči. Iz preglednice 4 je razvidno, da je največji π_{\max} posledica vbrizganja α -sinukleina pod monosloj iz nevtralno nabitega SOPC, medtem ko je π_{\max} v primeru negativno nabitih SOPG manjši. Sklepamo lahko, da se več proteina vstavi v monosloj iz SOPC, saj je bila vbrizgana enaka množina proteina. Porast π opazimo tudi pri pozitivno nabitih DOTAP. Težko je reči, ali je prišlo do vgradnje, saj tudi v primeru vbrizganja pufra brez proteina π nekoliko naraste. Bistvenih razlik med SOPC brez proteina in DOTAP ni, zato domnevamo, da do vgradnje v monosloj ne pride. Z nadaljnjam delom bo potrebno določiti, ali π_{\max} v primeru SOPC in SOPG ne doseže višjih vrednosti zaradi tega, ker se je ves protein iz raztopine vstavljal v monosloj, ali zaradi samega površinskega tlaka, ki preprečuje nadaljnjo vgradnjo molekul α -sinukleina. Za ta odgovor bi bilo treba določiti količino proteina, ki je vstavljen v membrano. Če je afiniteta α -sinukleina do negativno nabitih SUV nedvoumna, redki poročajo o vgradnji v večje ali planarne negativno nabite lipidne strukture (Jo in sod., 2000; Zhu in sod., 2003). V našem primeru pa je presenetljivo predvsem to, da do vgradnje v monosloj pride takrat, ko je ta sestavljen iz SOPC, ki je nevtralno nabit. O vgradnji v nevtralno nabite SUV poročajo samo Nuscher in sod. (2004), kjer pa so uporabili lipide v fazi gela. Naši rezultati dodatno kažejo na to, da za interakcije α -sinukleina z membranami nista pomembna samo naboj in geometrija lipidnih membran. Pri meritvah smo uporabili lipide v fazi tekočega kristala, katerih nepolarni repi so iz nenasičenih maščobnih kislin. Verjetno α -sinuklein prepozna tudi fosfolipidne verige (Kubo in sod., 2005). Redko se pozornost namenja geometriji polarnih glav, glava PC je manjša od glave PG (Kodama in Miyata, 1996), kar bi lahko olajšalo vgradnjo α -sinukleina v monosloj. α -sinuklein povzroči naraščanje π do $38,6 \pm 1,1$ mN/m (SOPC) oziroma $34,5 \pm 1,1$ mN/m (SOPG). Iz dobljenih vrednosti lahko ocenimo, da se protein vstavi v biološko membrano, za katero je značilen π okoli vrednosti 35 mN/m. Če je π_{\max} veliko manjši od 35 mN/m, do vgradnje v biološko membrano verjetno ne pride (Brockman, 1999). Smiselna je primerjava vgradnje v lipidni monosloj α -sinukleina in apolipoproteinov, ki imajo podobne lipidne vezavne domene. Apolipoprotein A-II se v PC monosloj ne vstavlja pri višjem površinskem tlaku od 35 mN/m, za apolipoprotein C (mešanica C-I, C-II in C-III razreda) je ta meja 36 mN/m. Za vse druge razrede apolipoproteinov je meja nižja (Gillotte in sod., 1999). Zaključimo lahko, da α -sinuklein kaže veliko afiniteto do monosloja iz SOPC ali SOPG, ne pride pa do vgradnje v pozitivno nabit monosloj.

5.2 SKLEPI

- α -sinuklein in mutante spremenijo sekundarno strukturo iz nativno nezvitega stanja v α -vijačnico ob vezavi na negativno nabite vezikle, nevtralno nabiti vezikli na sekundarno strukturo nimajo vpliva.
- Do največje indukcije α -vijačnice pri α -sinukleinu in mutantah pride v bližini faznega prehoda negativno nabitih veziklov.
- C-terminalni del je bolj pomemben za interakcije z lipidnimi membranami, kot smo predvidevali do sedaj. Zamenjave vseh Tyr na C-terminalnem delu zmanjšajo delež α -vijačnice v prisotnosti negativno nabitih veziklov v primerjavi z α -sinukleinom in drugimi mutantami. Tudi vpliv faznega prehoda na sekundarno strukturo je pri 3X najmanjši.
- α -sinuklein se adsorbira na nevtralno nabite lipidne vezikle z N-terminalnim delom, do spremembe sekundarne strukture ne pride.
- Amfipatska α -vijačnica na N-terminalnem delu se vgradi v membrano negativno nabitih veziklov, C-terminalni del ostane nestrukturiran in se ne vgradi.
- Kot prvi smo poskušali določili kritično micelno koncentracijo α -sinukleina. Dopolnimo možnost, da je končna morfologija agregatov α -sinukleina odvisna tudi od začetne koncentracije tega proteina v celici.
- α -sinuklein zavzame na fazni meji med zrakom in vodo zelo majhno površino. Do tega lahko pride zaradi agregacije monomerov ali pa je α -sinuklein v stiku s fazno mejo z zelo kratkim hidrofobnim delom zaporedja.
- V nasprotju s pričakovanji se je več α -sinukleina vgradilo v lipidni monosloj sestavljen iz nevtralno nabitih lipidov kot iz negativno nabitih. Do vgradnje v pozitivno nabiti monosloj ni prišlo.
- Presenetljivo vgradnja v monosloj iz negativno in nevtralno nabitih lipidov poteka tudi pri visokem površinskem tlaku, kar kaže na veliko afiniteto vezave α -sinukleina na lipidni monosloj.
- Mehanizem vezave α -sinukleina v membrano je prvenstveno odvisen od geometrije membrane in nadalje od sestave polarnih glav, njihovega neto naboja ter faznega stanja, v katerem se nahajajo lipidji. Dopolnimo tudi možnost, da α -sinuklein prepozna nepolarne repe lipidnih molekul.

6 POVZETEK

α -sinuklein je nativno nezvit protein, ki se nahaja predvsem v nevronih. Je glavna komponenta v patoloških inkluzijskih agregatih, ki jih najdemo pri številnih nevrodegenerativnih boleznih. Najbolj znana je Parkinsonova bolezen, ki prizadene več kot 1 % ljudi po 60 letu starosti. Predvideva se, da je za bolezensko stanje ključen α -sinuklein, saj nekatere mutacije v sinukleinskem genu povezujejo z zgodnjim pojavom Parkinsonove bolezni. Večino vzrokov za bolezen se kljub temu pripisuje naključnim dejavnikom.

Od odkritja leta 1988 pa do danes so s številnimi raziskavami poskušali določiti funkcijo in mehanizme delovanja α -sinukleina, vendar jasnega odgovora do danes še nismo dobili. Značilnost tega proteina je nativno nezvito stanje, stabilizirano z intramolekulskimi interakcijami. Nahaja se v presinaptičnih živčnih terminalih. V *in vitro* pogojih se α -sinuklein preferenčno veže na negativno nabite lipidne vezikle z majhnim premerom, zato mu pripisujejo vlogo pri vzdrževanju sinaptičnega bazena veziklov.

Pri našem delu smo raziskovali interakcije α -sinukleina in mutant Y39A, Y125A ter Y(125, 133, 136)A z lipidnimi membranami. S cirkularnim dihroizmom smo potrdili spremembo sekundarne strukture iz nativno nezvitega stanja v α -vijačnico v prisotnosti negativno nabitih majhnih veziklov. Največ razlik v sekundarni strukturi v primerjavi z nativnim proteinom smo opazili pri trojni mutantu. Sklepamo, da so tirozinski AK ostanki na C-terminalnem delu pomembni za nativno funkcijo α -sinukleina. S pomočjo meritev intrinzične fluorescence tirozina smo oblikovali model vezave α -sinukleina na membrano. Protein se z N-terminalnim delom adsorbira na površino negativno in nevtralno nabitih veziklov. V primeru negativno nabitih veziklov pride do indukcije amfipatske α -vijačnice, ki se vstavi v membrano. C-terminalni del je pri tem nestrukturiran, prav tako ne pride do vgradnje.

V okviru preučevanja površinskih pojavov smo izmerili kritično micelno koncentracijo α -sinukleina. Ugotovili smo tudi, da je površina molekule α -sinukleina na fazni meji med vodo in zrakom zelo majhna, razloga za to zaenkrat ne poznamo. Potrdili smo predvidevanje, da za vezavo α -sinukleina na lipidne strukture niso pomembne samo elektrostatske interakcije in majhen premer veziklov. α -sinuklein se je močneje vezal na nevtralno nabiti lipidni monosloj kot na negativno nabitega, pri čemer je v obeh primerih prišlo do vgradnje.

Veliko vprašanj glede α -sinukleina ostaja še vedno neodgovorenih, vzrok se verjetno skriva v sami strukturi α -sinukleina, ki je pri fizioloških pogojih v raztopini nativno nezvit protein. Predvideva se, da ta lastnost omogoča hitre odzive na spremenljajoče se razmere v celici in vpletene v številne procese. Žal je zaradi tega težko določiti način delovanja α -sinukleina v celici, saj raziskave večinoma potekajo *in vitro*, kjer je skoraj nemogoče doseči popolnoma enake razmere kot v živih celicah. Kljub temu se nadejamo, da bo podrobnejše poznavanje delovanja α -sinukleina v prihodnosti omogočilo uporabo farmacevtskih sredstev, ki bi zmanjšala pojav sinukleinopatiij pri vse večjem deležu starejšega prebivalstva.

7 VIRI

- Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., Lundberg D.C., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M.G., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. 2000. Mice lacking α -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25, 1: 239-252.
- Ahn K.J., Paik S.R., Chung K.C., Kim J. 2006. Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of [alpha]-synuclein. *Journal of Neurochemistry*, 97, 1: 265-279.
- Atkins P., de Paula J. 2006. Physical chemistry for the life sciences. New York, W. H. Freeman and Company: 699 str.
- Bagatolli L.A., Parasassi T., Fidelio G.D., Gratton E. 1999. A model for the interaction of 6-lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: implications for spectral properties. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 4: 557-564.
- Barbour R., Kling K., Anderson J.P., Banducci K., Cole T., Diep L., Fox M., Goldstein M., Soriano F., Seubert P., Chilcote T.J. 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegenerative Diseases*, 5, 2: 55-59.
- Benjwal S., Jayarama S., Gursky O. 2007. Role of secondary structure in protein-phospholipid surface interactions: Reconstitution and denaturation of apoC-I: DMPC complexes. *Biochemistry*, 46, 13: 4184-4194.
- Bertонcini C.W., Jung Y.-S., Fernandez C.O., Hoyer W., Griesinger C., Jovin T.M., Zweckstetter M. 2005. Release of long-range structure triggers aggregation of natively unfolded α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5: 1430-1435.
- Bertонcini C.W. 2006. Structure and dynamics of the aggregation mechanism of the Parkinson's disease-associated protein α -synuclein. Dissertation. Göttingen, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten: 225 str.
- Betarbet R., Sherer T.B., McKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J. T. 2001. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 4, 3: 1301-1306.
- Bisaglia M., Mammi S., Bubacco L. 2009. Structural insights on physiological functions and pathological effects of α -synuclein. *FASEB Journal*, 23, 2: 329-340.
- Bisaglia M., Tessari I., Pinato L., Bellanda M., Giraudo S., Fasano M., Bergantino E., Bubacco L., Mammi S. 2005. A topological model of the interaction between α -synuclein and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, 44, 1: 329-339.

- Brasseur R., Cabiaux V., Killian J.A., Dekruijff B., Ruysschaert J.M. 1986. Orientation of gramicidin A at the lysophosphatidylcholine/water interface: a semi-empirical conformational analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 855, 3: 317-324.
- Bratko D., Dolar D., Doleček V., Kozak D., Lapanje S., Leskovšek D., Oman S., Pohar C., Škerjanc J., Špan J., Vesnaver G., Vlachy V. 2000. Laboratorijske vaje iz fizikalne kemije. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 149 str.
- Brockman H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 4: 438-443.
- Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., Cole N.B., Gottschalk W., McIlwain K.L., Orrison B., Chen A., Ellis C.E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R.L. 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein. *Journal of Neuroscience*, 22, 20: 8797-8807.
- Chandra S., Gallardo G., Chacon R.F., Schlüter O.M., Südhof T.S. 2005. α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration. *Cell*, 3, 4: 383-396.
- Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. 2004. α -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364, 9440: 1167-1169.
- Chen X., de Silva H.A., Pettenati M.J., Rao P.N., St. George-Hyslop P., Roses A.D., Xia Y., Horsburgh K., Ueda K., Saitoh T. 1995. The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics*, 26, 2: 425-427.
- Chen Y.H., Yang J.T., Martinez H.M. 1972. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, 11, 22: 4120-4131.
- Chen Y.G., Siddhanta A., Austin C.D., Hammond S.M., Sung T.C., Frohman M.A., Morris A.J., Shields D. 1997. Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Journal of Cell Biology*, 138, 3: 495-504.
- Cho M.K., Kim H.Y., Bernado P., Fernandez C.O., Blackledge M., Zweckstetter M. 2007. Amino acid bulkiness defines the local conformations and dynamics of natively unfolded α -synuclein and tau. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 11: 3032-3033.
- Choi W., Zibanee S., Jakes R., Serpell L.C., Davletov B., Crowther R.A., Goedert M. 2004. Mutation E46K increases phospholipids binding and assembly into filaments of human α -synuclein. *FEBS Letters*, 576, 3: 363 -368.

- Colley W.C., Sung T.C., Roll R., Jenco J., Hammond S.M., Altshuller Y., Bar-Sagi D., Morris A.J., Frohman M.A. 1997. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Current Biology*, 7: 191-201.
- Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. 1998. Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine*, 4: 1318-1320.
- Conway K.A., Lee S.L., Rochet J.C., Ding T.T., Williamson R.E., Lansbury, P.T. 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -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, 2: 571-576.
- Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. 2001. Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct. *Science*, 294, 5545: 1346-1349.
- Cooper, A.A., Gitler A.D., Cashikar A., Haynes C.M., Hill K.J., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Marsischky G., Kolodner R.D., LaBaer J., Rochet J.C., Bonini N.M., Lindquist S. 2006. α -Synuclein blocks ER-golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 313, 5785: 324-328.
- Crowther R.A., Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. 1998. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated α -synuclein. *FEBS Letters*, 436, 3: 309-312.
- Dana R.M. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 1-2: 109-140.
- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., Georges J.M. 1998. Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 15: 9443-9449.
- De Laureto P.P., Tosatto L., Frare E., Marin O., Uversky V.N., Fontana A. 2006. Conformational properties of the SDS-bound state of alpha-synuclein probed by limited proteolysis: unexpected rigidity of the acidic C-terminal tail. *Biochemistry*, 26, 45: 11523-11531.
- Dedmon M.M., Lindorf-Larsen K., Christodoulou J., Vendruscolo M., Dobson C.M. 2005. Mapping long-range interactions in α -synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 2: 476-477.

- Devetak M. 2007. Langmuir – Blodgett filmi. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko (3. maj 2007)
http://www-f9.ijs.si/~krizan/sola/sempod/0607/devetak_seminar.pdf (6. jul. 2009): 17 str.
- Drescher M., Veldhuis G., van Rooijen B.D., Milikisyants S., Subramaniam V., Huber M. 2008. Antiparallel arrangement of the helices of vesicle-bound α -synuclein. *Journal of American Chemical Society*, 130, 25: 7796-7797.
- Dunker A.K., Garner E., Guilliot S., Romero P., Albrecht K., Hart J., Obradovic Z., Kissinger C., Villafranca J.E. 1998. Protein disorder an the evolution of molecular recognition: Theory, predictions and observations. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 3: 473-484.
- Dunker A.K., Lawson J.D., Brown C.J., Williams R.M., Romero P., Oh, J.S., Oldfield C.J., Campen A.M., Ratliff C.M., Hipps K.W., Ausio J., Nissen M.S., Reeves R., Kang C.H., Kissinger C.R., Bailey R.W., Griswold M.D., Chiu W., Garber E.C., Obradovic Z. 2001. Intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, 19, 1: 26-59.
- Farfield Scientific. 2006. Real time quantitative analysis of liposome absorbtion at the solid-liquid interface using dual polarisation inferometry (DPI) by Farfield Scientific. Cheshire, Farfield Group Limited (13. maj 2006)
<http://wwwazonano.com/Details.asp?ArticleID=1535> (14. jul. 2009): 6 str.
- Fink A.L. 2005. Natively unfolded proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 1: 35-41.
- Fischer E. 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung den Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27, 3: 2985-2993.
- Forno L.S. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55, 3: 259-272.
- Fortin D.L., Troyer M.D., Nakamura K., Kubo S., Anthony M.D., Edwards R.H. 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of α -synuclein. *Journal of Neuroscience*, 24, 30: 6715-6723.
- Fritz J. 1998. Termodinamika vezanja ekvinatoksina II z modelnimi lipidnimi membranami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 58 str.
- Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N., Kawashima A., Masliah E., Goldberg M.S., Shen J., Takio K., Iwatsubo T. 2002. α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology*, 4: 160-164.

- Galvin J.E., Uryu K., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q. 1999. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains α -, β -, and γ -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 23: 13450-13455.
- Gendebien S.W., D'Souza C., Kawarai T., Hyslop P. St G., Westaway D., Fraser P., Tandon A. 2005. Cytosolic proteins regulate α -synuclein dissociation from presynaptic membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 43: 32148-32155.
- George J. M., Jin H., Woods W. S., Clayton D.F. 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*, 15, 2: 361-372.
- George J.M. 2001. The synucleins. *Genome Biology*, 3, 1: reviews3002.1-reviews 3002.6 <http://genomebiology.com/2001/3/1/reviews/3002> (17. 5. 2009): 8 str.
- Georgieva E.R., Ramlall T.F., Borbat P.P., Freed J.H., Eliezer D. 2008. Membrane-bound α -synuclein forms an extended helix: long-distance pulsed ESR measurements using vesicles, bicelles, and rodlike micelles. *Journal of American Chemical Society*, 130, 39: 12856-12857.
- Gevod V.S., Birdi K.S. 1984. Melittin and the 8-26 fragment. Differences in ionophoric properties as measured by monolayer method. *Biophysical Journal*, 45, 6: 1079-1083.
- Giasson B.I., Duda J.E., Quinn S.M., Zhang B., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. 2002. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. *Neuron*, 34, 4: 521-533.
- Giasson B.I., Duda J.E., Murray I.V.J., Chen Q., Souza J.M., Hurting H.I., Ischiropoulos H., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290, 5493: 985-989.
- Giasson B.I., Lee V.M.Y. 2001. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron*, 31, 6: 885-888.
- Gillotte K.L., Zaiou M., Katz S.L., Anantharamaiah G.M., Holvoet P., Dhoest A., Palgunachari M.N., Segrest J.P., Weisgraber K.H., Rothblat G.H., Phillips M.C. 1999. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 4: 2021-2028.
- Goedert M. 2001. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2: 492-501.

- Goñi F.M., Alonso A. 2006. Differential scanning calorimetry in the study of lipid structures. V: Chemical biology: Techniques and applications. Larijani B., Rosser C.A., Woscholski R. (eds.). Chichester, John Wiley&Sons: 47-66.
- Gunasekaran K., Tsai C.J. Sandep K., Zanuy D., Nussinov R. 2003. Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. Trends in Biochemical Sciences, 28, 2: 81-85.
- Haass C., Selkoe D.J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8: 101-112.
- Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T. Jr. 1997. Observation of metastable $\text{A}\beta$ amyloid protofibrils by atomic force microscopy. Chemistry&Biology, 4, 2: 119-125.
- Hodara R., Norris E.H., Giasson, B.I., Mishizen-Eberz A.J., Lynch D.R., Lee V.M., Ischiropoulos H. 2004. Functional consequences of α -synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. Journal of Biological Chemistry, 279, 46: 47746-47753.
- Hoyer W., Antony T., Cherny D., Heim G., Jovin T.M., Subramaniam V. 2002. Dependence of α -synuclein aggregate morphology on solution conditions. Journal of Molecular Biology, 322, 2: 383-393.
- Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M, Ge N., Flanagan L., de Silva H.A., Kittel A., Saitoh T., 1995. The precursor protein of non- $\text{A}\beta$ component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. Neuron, 14: 467-475.
- Iwata A., Muira S., Kanazawa I., Sawada M., Nukina N. 2000. α -Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. Journal of Neurochemistry, 77, 1: 239-252.
- Jakes R., Spillantini M.G., Geodert M. 1994. Identification of two distinct synucleins from human brain. FEBS Letters, 345, 1: 27-32.
- Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 79: 368-376.
- Jenco J.M., Rawlingson A., Daniels B., Morris A.J. 1998. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. Biochemistry, 37, 14: 4901–4909.
- Ji H., Liu Y.E., Jia T., Wang J., Liu J., Xiao G., Joseph B.K., Rosen C., Shi Y.E. 1997. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. Cancer Research, 57: 759-764.

- Jia T., Liu Y.E., Liu J., Shi Y.E. 1999. Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma. *Cancer Research*, 59: 742-747.
- Jin J., Li G.J., Davis J., Zhu D., Wang Y., Pan C., Zhang J. 2007. Identification of novel proteins associated with both α -synuclein and DJ-1. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6: 845-859.
- Jo E., McLaurin J., Yip C.M., George-Hyslop P., Fraser P.E. 2000. α -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 44: 34328-34334.
- Kahle P.J., Neuman M., Ozmen L., Muller V., Jacobsen H., Schindzielorz A., Okochi M., Leimer U., van Der Putten H., Probst A., Kremmer E., Kretzschmar H.A., Haass C. 2000. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *Journal of Neuroscience*, 20, 17: 6365-6373.
- Kamp F., Beyer K. 2006. Binding of α -synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 14: 9251-9259.
- Kim Y.S., Laurine E., Woods W., Lee S.J. 2006. A novel mechanism of interaction between α -synuclein and biological membranes. *Journal of Molecular Biology*, 360, 2: 386-397.
- Kodama M., Miyata T. 1996. Effect of the head group of phospholipids on the acyl-chain packing and structure of their assemblies as revealed by microcalorimetry and electron microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 109: 283-289.
- Krüger R., Kuhn W., Müller T., Woitalla D., Graeber M., Kösel S., Przuntek H., Epplen J. T., Schöls L., Riess O. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 18, 2: 106-108.
- Kubo S., Nemanic V.M., Chalkley R.J., Anthony M.D., Hattori N., Mizuno Y., Edwards R.H., Fortin D.L. 2005. A combinatorial code for the interaction of α -synuclein with membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 36: 31664-31672.
- Kusumoto Y., Lomakin A., Teplow D.B., Benedek G.B. 1998. Temperature dependance of amyloid β -protein fibrillization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 21: 12277-12282.
- Lakowicz J.R. 1999. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. New York, Kluwer Academic/Plenum: 698 str.

- Larsen K.E., Schmitz Y., Troyer M.D., Mosharov E., Dietrich P., Quazi A.Z., Savalle M., Nemani V., Chaudry F.A., Edwards R.H., Stefanis L., Sulzer D. 2006. α -Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *Journal of Neuroscience*, 26, 46: 11915-11922.
- Lashuel H.A., Bosch D.G. 2005. *In vitro* preparation of prefibrillar intermediates of amyloid- β and α -synuclein. V: Amyloid proteins. Methods and protocols. Sigurdsson E.M. (ed.). Totowa, Humana Press: 19-33.
- Lashuel H.A., Hartley D., Petre B.M., Walz T., Lansbury P.T. Jr. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418: 291-291.
- Lavedan C. 1998. The synuclein family. *Genome Research*, 8: 871-880.
- Lee H.J., Choi C., Lee S. J. 2002. Membrane-bound α -synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 1: 671-678.
- Li J., Uversky V.N., Fink A.L. 2002. Conformational behavior of human α -synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T. *Neuro Toxicology*, 23, 4-5: 553-567.
- Liu C.W., Corboy M.J., DeMartino G.N., Thomas, P.J. 2003. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science*, 299, 5605: 408-411.
- Lotharius J., Barg S., Wiekop P., Lundberg C., Raymon H.K., Brundin P. 2002. Effect of mutant α -synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 41: 38884-38894.
- Lundvig D., Lindersson E., Jensen P.H. 2005. Pathogenic effects of α -synuclein aggregation. *Molecular Brain Research*, 134, 1: 3-17.
- Madine J., Doig A.J., Middleton D.A. 2006. A study of the regional effects of α -synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 45, 18: 5783-5792.
- Makin O.S., Serpell L.C. 2005. Structures for amyloid fibrils. *FEBS Journal*, 272, 23: 5950-5961.
- Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. 1988. Synuclein:a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience*, 8: 2804-2815.
- Martin P., Szablewski M. 2001. Langmuir-Blodgett troughs. Operating manual. 6th ed. Coventry, NIMA Technology: 146 str.

- Martinez Z., Zhu M., Han S., Fink A.L. 2007. GM1 specifically interacts with α -synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemistry*, 46, 7: 1868-1877.
- Mazzulli J.R., Mishizen A.J., Giasson B.I., Lynch D.R., Thomas S.A., Nakashima A., Nagatsu T., Ota A., Ischiropoulos H. 2006. Cytosolic catechols inhibit α -synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates. *Journal of Neuroscience*, 26, 39: 10068-10078.
- M'Baye G., Mely Y., Duportail G., Klymchenko A.S. 2008. Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration. *Biophysical Journal*, 95, 3: 1217-1225.
- Mosharov E.V., Staal R.G., Bove J., Prou D., Hananiya A., Markov D., Poulsen N., Larsen K.E., Moore C.M., Troyer M.D., Edwards R.H., Przedborski S., Sulzer D. 2006. α -Synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *Journal of Neuroscience* 26, 36: 9304-9311.
- Murphy D.D., Reuter S.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. 2000. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 20, 9: 3214-3220.
- Nakajo S., Tsukada K., Omata K., Nakamura Y., Nakaya K. 1993. A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, 217, 3:1057-1063.
- Narayanan V., Guo Y., Scarlata S. 2005. Fluorescence studies suggest a role for α -synuclein in the phosphatidylinositol lipid signaling pathway. *Biochemistry*, 44, 2: 462-470.
- Narayanan V., Scarlata S. 2001. Membrane binding and self-association of α -synucleins. *Biochemistry*, 40, 33: 9927-9934.
- Nelson D.L., Cox M.M. 2005. Lehninger principles of biochemistry. 4th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 1117 str.
- NIMA Technology. 2009. Langmuir Troughs. Coventry, Nima Technology Limited <http://www.nima.co.uk/langmuir-troughs.aspx> (23. jul. 2009): 4 str.
- Nuscher B., Kamp F., Mehnert T., Odoy S., Haass C., Kahle P.J., Beyer K. 2004. α -Synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 21: 21966-21975.
- Ostrerova-Golts N., Petrucelli L., Hardy J., Lee J.N., Farer M., Wolozin B. 2000. The A53T α -synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *Journal of Neuroscience*, 20, 16: 6048-6054.

Ostro M.J. 1983. Liposomes. New York, Marcel Dekker: 397 str.

Perez R.G., Waymire J.C., Lin E., Liu J.J., Guo F., Zigmond M.J. 2002. A role of α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *Journal of Neuroscience*, 22, 8: 3090-3099.

Perrin R.J., Woods W.S., Clayton D.F., George J.M. 2000. Interaction of human α -synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 44: 34393-34398.

Perrin R.J., Woods W.S., Clayton D.F., George J.M. 2001. Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 45: 41958-41962.

Poklar Ulrich N., Barry C.H., Fink A.L. 2008. Impact of Tyr to Ala mutations on α -synuclein fibrillation and structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, 1782, 10: 581-585.

Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. 1997. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 5321: 2045-2047.

Provencher S.W., Gloeckner J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20, 1: 33-37.

Rabzelj S. 2006. Amiloidna fibrilacija in interakcija z lipidnimi membranami človeškega stefína B in izbranih mutant *in vitro*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 76 str.

Rappley I., Gitler A.D., Selvy P.E., LaVoie M.J., Levy B.D., Brown H.A., Lindquist S., Selkoe D.J. 2009. Evidence that alpha-synuclein does not inhibit phospholipase D. *Biochemistry*, 48, 5: 1077-1083.

Rhoades E., Ramlall T.F., Webb W.W., Eliezer D. 2006. Quantification of α -synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 90, 12: 4692-4700.

Sandal M., Valle F., Tessari I., Mammi S., Bergantino E., Musiani F., Brucale M., Bubacco L., Samori B. 2008. Conformation equilibria in monomeric α -synuclein at the single-molecule level. *PLOS Biology*, 6, 1: 99-108.

Scherzer C.R., Jensen R.V., Gullans S.R., Feany M.B. 2003. Gene expression changes presage neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 12, 19: 2457-2466.

- Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.V., Anantharamaiah G.M. 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *Journal of Lipid Research*, 33: 141-166.
- Sharon R., Joseph I.B., Mirick G.E., Serhan C.N., Selkoe D.J. 2003. Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing α -synuclein and human brains with α -synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 50: 49874-49881.
- Shibayama-Imazu T., Okahashi I., Omata K., Nakajo S., Ochiai H., Nakai Y., Hama T., Nakamura Y., Nakaya K. 1993. Cell and tissue distribution and developmental change of neuron specific 14 kDa protein (phosphoneuroprotein 14). *Brain Research*, 622, 1-2: 17-25.
- Shults C.W. 2006. Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6: 1661-1668.
- Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muenter M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Hardy K.G. 2003. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302, 5646: 841.
- Sinko P.J. 2005. Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical, chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences. 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 795 str.
- Solano S.M., Miller D.W., Augood S.J., Young A.B., Penney J.B. 2000. Expression of alpha-synuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 47, 2: 201-210.
- Spillantini M.G., Divane A., Goedert, M. 1995. Assignment of human α -synuclein (SNCA) and β -synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*, 27, 2: 379-381.
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. 1997. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388: 839-840.
- Srivastava K., Lee M., Morrell C. 2007. Mechanism of alpha-synuclein inhibition of platelet granule exocytosis. *Circulation*, 116, 16, Suppl. S: 76-76.
- Sung Y., Eliezer D. 2007. Residual structure, backbone dynamics, and interactions within the synuclein family. *Journal of Molecular Biology*, 372, 3: 689-707.

- Surguchov A., McMahan B., Masliah E., Surgucheva I. 2001. Synucleins in ocular tissues. *Journal of Neuroscience Research*, 65, 1:68-77.
- Tinoco I. Jr., Sauer K., Wang J.C., Puglisi J.D. Physical chemistry: principles and applications in biological sciences. 4th ed. New Jersey, Prentice Hall: 740 str.
- Tobe T., Nakajo S., Tanaka A., Mitoya A., Omata K., Nakaya K., Tomita M., Nakamura Y. 1992. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel brain-specific 14-kDa protein. *Journal of Neurochemistry*, 59, 5: 1624-1629.
- Tofaris G.K., Spillantini M.G. 2007. Physiological and pathological properties of α -synuclein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 17: 2194-2201.
- Totterdell S., Meredith G.E. 2005. Localization of alpha-synuclein to identified fibers and synapses in the normal mouse brain. *Neuroscience*, 135, 3: 907-913.
- Ueda K., Fukoschima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D.A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 23: 11282-11286.
- Ueda K., Saitoh T., Mori H. 1994. Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 105, 2:1366-1372.
- Ulmer T.S., Bax A., Cole N.B., Nussbaum R.L. 2005. Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 10: 9595-9603.
- Uversky V.N., Fink A.L. 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1698, 2: 131-153.
- Uversky V.N., Fink A.L. 2006. Protein misfolding, aggregation, and conformational diseases. Part A: Protein aggregation and conformational diseases. New York, Springer: 419 str.
- Uversky V.N., Li J., Fink A.L. 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 47: 44284-44296.
- Uversky V.N., Li J., Souillac P., Millet I.S., Doniach S., Jakes R., Goedert M., Fink A.L. 2002. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of α -sinuclein assembly by β - and γ -synucleins. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 14:11970-11978.
- Uversky V.N. 2002. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science*, 11, 4: 739-756.

- Uversky V.N. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103, 1: 17-37.
- Weinreb P.H., Zhen W., Poon A.W., Conway K.A., Lansbury P.T. Jr. 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, 35, 43: 13709-13715.
- Willingham S., Outeiro T.F., DeVit M.J., Lindquist S.L., Muchowski P.J. 2003. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or α -synuclein. *Science*, 302, 5651: 1769-1772.
- Wood S.J., Wypych J., Steavenson S., Louis J.C., Citron M., Biere A.L. 1999. α -Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 28: 19509-19512.
- Wright P.E., Dyson H.J. 1999. Intrinsically unstructured proteins: re-assesing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology*, 293, 2: 321-331.
- Xu J., Kao S.Y., Lee F.J.S., Song W., Jin L.W., Yanker B.A. 2002. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 8: 600-606.
- Zarranz J.J., Alegre J., Esteban J.C.G., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atarés B., Llorens V., Tortosa E.G., del Ser T., Muñoz D.G., de Yebenes J.G. 2004. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, 55, 2: 164-173.
- Zhu M., Li J., Fink A.L. 2003. The association of α -synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 41: 40186-40197.
- Zhu M., Qin Z.J., Hu D., Munishkina L.A., Fink A.L. 2006. α -Synuclein can function as an antioxidant preventing oxidation of unsaturated lipid in vesicles. *Biochemistry*, 45, 26: 8135-8142.

ZAHVALA

Iskreno bi se rad zahvalil mentorici izr. prof. dr. Nataši Poklar Ulrich, ki me je prijazno uvedla v zanimivo raziskovalno področje in me spremljala ves čas nastajanja te diplomske naloge. Brez koristnih nasvetov tako pri praktičnem delu kot tudi izdelavi pisnega izdelka bi mi bilo veliko težje. Na tem mestu se moram še posebej zahvaliti za vložen trud in čas namenjen izvedbi študijske izmenjave.

Ves čas dela na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo so mi s svojim znanjem in izkušnjami velikodušno pomagali Dejan Gmajner, Miha Črnigoj, Marko Šnajder, Petra Terpinc in Ajda Ota.

Za tehnično pomoč bi se rad zahvalil še Andreji Habjan, Mateji Vidmar in Jani Martinuč.

Zahvaljujem se osebju na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo za pomoč pri pripravi lipidnih membran in osebju Instituta Jožef Stefan za možnost uporabe opreme v njihovem laboratoriju.

S študijsko izmenjavo sem dobil priložnost za odlično raziskovalno delo, pridobljene izkušnje in znanje so neprecenljivi. Za to gre zahvala prof. dr. Jasni Štrus, ki je omogočila vzpostaviti prvi kontakt z raziskovalci na Univerzi v Heidelbergu.

Posebna zahvala je namenjena prof. dr. Michaelu Winku na Univerzi v Heidelbergu, ki mi je vedno namenil prijazno besedo in bil pripravljen priskočiti na pomoč.

Hvala prof. dr. Motomu Tanaku za možnost sodelovanja pri odličnem raziskovalnem delu na Univerzi v Heidelbergu.

Zahvaljujem se osebju v laboratorijih Inštituta za fizikalno kemijo Univerze v Heidelbergu, ker so me z veseljem sprejeli medse in bili ves čas dela pripravljeni priskočiti na pomoč. Še posebej to velja za Emanuela Schnecka, brez njegovih nasvetov bi bilo delo veliko težje.

Za strokovni pregled in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem izr. prof. dr. Gregorju Anderluhu.

Iskreno zahvalo dolgujem še očetu Božidarju in mami Bredi, ker sta mi omogočila študij ter dekletu Petri, ki mi je ves čas izdelave diplomskega dela stala ob strani.