PRISPEVEK K RAZUMEVANJU MEHANIZMA AMILOIDNE AGREGACIJE PROTEINOV TER NJENIH CELIČNIH UČINKOV

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija, marec 2011

Mentor: *doc. dr. Eva Žerovnik*

Somentor: *doc. dr. Uroš Petrovič*

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Dušan Turk, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

doc. dr. Andrej Vilfan, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

prof. dr. Damjana Rozman, članica, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

Katja Škerget

Prispevek k razumevanju mehanizma amiloidne agregacije proteinov ter njenih celičnih učinkov

Doktorska disertacija

Contribution to understanding of the mechanism of amyloid fibril formation and its effects on the cell

Doctoral Dissertation

Mentor: doc. dr. Eva Žerovnik

Somentor: doc. dr. Uroš Petrovič

Marec, 2011

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL
Ljubljana, Slovenija

Kazalo

Povzetek ..... **IX**

Abstract ..... **XI**

Seznam kratic ..... **XIII**

1 Uvod **1**
1.1 Amiloidoze in nevrodegenerativne bolezni 1
1.2 Amiloidni fibrili 1
1.3 Modeli nastanka amiloidnih fibril 2
1.4 Vodilne hipoteze s področja amiloidnih fibril 3
1.5 Stefin B kot modelni sistem za študij fibrilacije 3
1.5.1 Uvrstitev steina B – družina cistatinov 3
1.5.2 Funkcija stefina B 4
1.5.2.1 Stefin B in bolezen EPM1 4
1.5.3. Struktura stefina B 4
1.5.4 Stabilnost, zvijanje in amiloidogenost stefina B 5
1.6 Vplivi (mikro)okolja 6
1.6.1 Vpliv oksidativnega stresa in kovinskih ionov na razvoj nevrodegenerativnih bolezni 6
1.6.1.1 Vpliv bakra na razvoj nevrodegenerativnih bolezni 7
1.6.2 Interakcije protein – protein 8
1.6.2.1 Peptid amiloid-beta 8
1.7. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* kot modelni organizem 9
1.7.1 Kvasovka *S. cerevisea* in nevrodegeneracija 10

2 Namen dela **13**

3 Materiali in metode **15**
3.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril 15
3.1.1 Materiali 15
3.1.1.1 Kemikalije 15
3.1.1.2 Raztopine 15
3.1.1.3 Laboratorijska oprema 16
3.1.2 Metode 16
3.1.2.1 Proteinska izolacija 16
3.1.2.2 Reakcija fibrilacije 16
3.1.2.3 Merjenje ThT fluorescence 17
3.1.2.4 Cirkularni dikroizem (merjenje CD spektrov) 17
3.1.2.5 Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) 17
3.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije 17
3.2.1. Materiali 17
3.2.2 Metode 17
3.2.2.1 Proteinska izolacija 17
3.2.2.2 Reakcija fibrilacije 18
3.2.2.3 Merjenje ThT fluorescence 18
3.2.2.4 Cirkularni dikroizem (CD spektroskopija) 18

3.2.2.5 Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) 18
3.3 *In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta 19
3.3.1 Materiali 19
3.3.2 Metode 19
3.3.2.1 Proteinska izolacija 19
3.3.2.2 Reakcija fibrilacije 19
3.3.2.3 Merjenje ThT fluorescence 19
3.3.2.4 Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) 19
3.3.2.5 Površinska plazmonska resonanca (ang. »Surface Plasmon Resonance« - SPR) 19
3.4 Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* 20
3.4.1 Materiali 20
3.4.1.1 Kemikalije 20
3.4.1.2 Encimi in drugi proteini 22
3.4.1.3 Začetni oligonukleotidi 22
3.4.1.4 Protitelesa 22
3.4.1.5 Gojišča 23
3.4.1.6 Gostiteljske kulture 24
3.4.1.7 Vektorji in plazmidi 24
3.4.1.8 Kompleti reagentov 25
3.4.1.9 Raztopine 25
3.4.1.10 Laboratorijska oprema 27
3.4.2 Metode 28
3.4.2.1 Priprava konstrukta E31 z restrikcijskimi mesti za *Hind III* in *Bam HI*: 28
3.4.2.1.1 Transformacija celic DH5α 28
3.4.2.2 Priprava vektorja pGEM:E31 28
3.4.2.2.1 Modro – beli test 28
3.4.2.3 Priprava vektorja pRD53:E31 28
3.4.2.4 Priprava vektorja pAG25:E31 28
3.4.2.5 Transformacija seva BY4742 *S. cerevisiae* z vektorjem pRD53:E31 29
3.4.2.6 Transformacija *S. cerevisiae* seva AJY217 z vektorjem pAG25:E31 29
3.4.2.6.1 Izolacija genomske DNA transformiranih celic AJY217 s precipitacijo v etanolu 29
3.4.2.6.2 Ugotavljanje uspešnosti homologne rekombinacije na genomu celic AJY217 29
3.4.2.7 Določitev morfologije celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31 z mikroskopom Olympus IX81 29
3.4.2.8 Določitev rastnih krivulj celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31 30
3.4.2.9 Določitev rastnih krivulj celic seva AJY217 z vstavljenim vektorjem pAG25:E31 30
3.4.2.10 Potrditev prisotnosti stefina B v treh bioloških ponovitvah seva BY4742 z vektorjem pRD53:E31 s prenosom »Western« 30
3.4.2.10.1 Priprava celičnih lizatov celic seva BY4742 z vektorjem pRD53:E31 30
3.4.2.10.2 Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS 30
3.4.2.10.3 Detekcija proteinov s prenosom »Western« 30
3.4.2.11 Časovno spremljanje izražanja stefina B E31 pri sevu D22 (celice BY4742 z vektorjem pRD53:E31) s prenosom »Western« 31
3.4.2.12 Potrditev prisotnosti stefina B E31 v sevu 3 (celice AJY217 z vektorjem pAG25:E31) s prenosom »Western« 31
3.4.2.13 Tehnika za sistematično določanje sintetičnih genetskih interakcij v kvasovki *S. cerevisiae* ob indukciji prekomernega izražanja stefina B (ang. »synthetic dosage lethality« - SDL) 31
3.4.2.14 DNA mikromreže 32
3.4.2.15 Imunofluorescenca - potrditev prisotnosti agregatov stefina B E31 v transformiranih kvasnih celicah BY4742 33
3.4.2.16 Inhibicija razgradnje proteinov 34

4 Rezultati 35
4.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril 35
4.1.1 Temperaturna odvisnost hitrosti fibrilacije prve faze (sprememba CD signala) 36
4.1.2 Temperaturna odvisnost hitrosti fibrilacije druge faze (sprememba signala ThT fluorescence) 37

4.1.3 Odvisnost konstante hitrosti fibrilacije druge faze od proteinske koncentracije (sprememba signala ThT fluorescence) 37
4.1.4 Odvisnost konstante hitrosti fibrilacije prve faze od proteinske koncentracije (sprememba CD signala) 39
4.1.5 Izbira primernega kinetičnega modela 40
4.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije 41
4.3. In vitro interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta 44
4.3.1 Rast fibril peptida amiloid-beta inhibirajo le določena oligomerna stanja stefina B 44
4.3.2 S peptidom amiloid-beta interagirajo le določena oligomerna stanja stefina B 46
4.4. Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* 47
4.4.1 Določanje morfologije celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31 47
4.4.2 Določitev rastnih krivulj celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31 47
4.4.3 Določitev rastnih krivulj celic seva AJY217 z vstavljenim vektorjem pAG25:E31 48
4.4.4 Potrditev prisotnosti stefina B v treh bioloških ponovitvah seva BY4742 z vektorjem pRD53:E31 s prenosom »Western« 49
4.4.5 Časovno spremljanje izražanja stefina B E31 pri sevu D22 (celice BY4742 z vektorjem pRD53:E31) s prenosom »Western« 50
4.4.6 Potrditev prisotnosti stefina B E31 v sevu 3 (celice AJY217 z vektorjem pAG25:E31) s prenosom »Western« 50
4.4.7 Določanje sintetičnih genetskih interakcij v kvasovki *S. cerevisiae* ob indukciji prekomernega izražanja stefina B (ang. »synthetic dosage lethality« - SDL) 51
4.4.8 Določanje sprememb v izražanju genov kvasovke kot posledica izražanja stefina B z metodo mikromrež 53
4.4.9 Potrditev prisotnosti agregatov stefina B E31 v transformiranih kvasnih celicah BY4742 z imunofluorescenco 55
4.4.10 Poskus povečanja števila agregatov stefina B v kvasnih celicah z inhibicijo razgradnje proteinov 55

5 Razprava 57
5.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril 57
5.1.1 Primerjava fibrilacije stefina B z drugimi modelnimi proteini 57
5.1.2 Vloga prepletanja domen pri amiloidni fibrilaciji 57
5.1.3 Določitev energetskih barier za začetek fibrilacije, nukleacijo in podaljševanje fibril 58
5.1.4 Smernice za nadaljnje študije 59
5.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije 59
5.2.1 Stefin B kot vezavni protein za bakrove ione 59
5.2.2 Inhibicjia amiloidne fibrilacije stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov 60
5.2.3 Vpliv vezave bakrovih ionov na amiloidno fibrilacijo drugih amiloidogenih proteinov 60
5.3. *In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta 61
5.3.1 Dognanja *in vitro* študij 61
5.3.2 Dognanja *in vivo* študij 62
5.3.3 »Amaterska« šaperonska aktivnost stefina B 62
5.4. Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* 62
5.4.1 Odziv kvasnih celic *S. cerevisiae* na prisotnost agregatov stefina B E31 62
5.4.2 Odziv »humaniziranih« kvasnih modelov na druge nevrotoksične proteine 64
5.4.3 Umestitev rezultatov kvasnega modela prekomernega izražanja amiloidogenega stefina B 65

6 Zaključki 67
6.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril 67
6.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije 67
6.3. *In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta 67
6.4. Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* 68

7 Zahvala **69**

8 Literatura in viri **71**

Kazalo slik **81**

Kazalo tabel **85**

Priloge **87**

Povzetek

Tvorba netopnih proteinskih agregatov v različnih tkivih in celicah je značilen pojav za številna človeška obolenja, imenovana amiloidoze. Prisotnost napačno zvitih in agregiranih proteinov v možganih spada med glavne karakteristike nevrodegenerativnih obolenj, med katere spadajo Alzheimerjeva, Parkinsonova, Huntingtonova bolezen, prionske bolezni ter mnoge druge. Vzroki za nastanek proteinskih agregatov, njihov celostni učinek na celice in biokemijski procesi, ki se ob njihovem nastanku sprožijo, še niso dobro pojasnjeni. Ravno zaradi slabega poznavanja mehanizmov nevrodegenerativnih obolenj je za njihovo zdravljenje na razpolago zgolj malo učinkovitih zdravil, pa še ta ne odpravljajo vzrokov bolezni, pač pa le lajšajo njihove simptome.

Napačno zviti proteini se pogosto združujejo v strukturno urejene amiloidne fibrile. Amiloidni fibrili so sestavljeni iz vzporednih, vzdolžno prepletenih β trakov, ki so postavljeni pravokotno na os fibrila in se povezujejo v dolge, nitaste strukture. So zelo stabilni, odporni na delovanje proteaz in jih lahko specifično obarvamo z barviloma ThT ali Kongo Rdeče. Amiloidni fibrili lahko tvorijo različni proteini brez nekih skupnih strukturnih lastnosti, niti na nivoju primarne, sekundarne ali terciarne strukture.

Namen našega dela je bil preučevanje mehanizma tvorjenja proteinskih agregatov človeškega stefina B in ugotoviti učinek prisotnih agregatov stefina B na delovanje evkariontske celice.

Na področju preučevanja napačno zvitih proteinov so se uveljavile tri pomembnejše hipoteze. Prva zagovarja teorijo, da lahko tvori amiloidne fibrile prav vsak protein, če le izberemo zanj primerne pogoje. Druga hipoteza predpostavlja, da imajo agregati proteinov, ki niso udeleženi v nobeni (do sedaj) znani bolezni, enak citotoksičen učinek kot agregati proteinov, ki so bili identificirani pri patogenih stanjih. Tretja hipoteza pa izpostavlja dejstvo, da so najbolj citotoksični prefibrilarni oligomerni agregati, ki vodijo do nastanka zrelih fibril in ne sami fibrili, kot so raziskovalci sprva mislili.

Za preučevanje amiloidne fibrilacije smo kot modelni protein izbrali človeški stefin B. Glede na tri postavljene hipoteze izpolnjuje stefin B vse pogoje za vlogo modelnega proteina, poleg tega so bili zvijanje, stabilnost in proces amiloidne fibrilacije stefina B tekom zadnjih let že temeljito preučeni.

Eksperimente smo razdelili na dva dela. *In vitro* študije so zajemale postavitev osnovnega modela mehanizma amiloidne fibrilacije stefina B ter opazovanje vplivov mikro-okolja, natančneje vpliva prisotnosti bakrovih ionov ter medsebojni vpliv dveh amiloidogenih proteinov, peptida amiloid-beta ter stefina B. Pri *in vivo* študijah pa smo sledili celičnemu odzivu kvasnih celic *Saccharomyces cerevisiae* na ravni celotnega genoma ob povečanem izražanju stefina B znotraj celic.

Na osnovi kinetičnih, strukturnih in morfoloških podatkov smo predlagali osnoven model mehanizma amiloidne fibrilacije stefina B. Pri študijah kinetike smo merili temperaturno in koncentracijsko odvisnost hitrosti rasti fibril. Model vključuje tvorbo prepletenih dimer iz monomer, ki se združijo bodisi v oligomerno »stransko pot« bodisi v agregacijsko jedro, kjer mora priti do zaporednih N_i = 64 konformacijskih sprememb, preden lahko pride do rasti protofibril v fibrile. Globalno prileganje matematičnih enačb kinetični shemi ter uporaba Arrheniusove zakonitosti sta nam razkrila tri energetske bariere. Najvišja energija aktivacije (95 ± 5 kcal mol^{-1}) odraža delno razvitje monomer pri tvorbi prepletenih dimer, nukleacijski korak s konformacijsko pretvorbo N_i =64 ireverzibilnih prehodov naj bi zahteval energijo aktivacije 55 ± 4 kcal mol^{-1}, medtem ko smo tretjo energijsko bariero 27 ± 5 kcal mol^{-1}, značilno za rast in podaljševanje fibril (glajenje fibril), pripisali konformacijskih spremembam prolinske izomerizacije iz trans v cis obliko.

Pri študiju vpliva bakrovih ionov na amiloidno fibrilacijo stefina B smo se oprli na dve dejstvi. Izkazalo se je, da je stefin B vezal bakrove ione z visoko afiniteto, kar ni veljalo za stefin A, ki je sicer njegov homolog s primerljivo strukturo. Do vezave ni prišlo niti pri tetramerni obliki stefina B, moč vezave pa je z nižanjem pH vrednosti padala. Glede na to, da so količine kovinski ionov (med njimi tudi bakrovih) v možganih pri nevrodegenerativnih obolenjih zelo povečane, nas je zanimal vpliv bakrovih ionov na patogen proces nevrodegenerativnih obolenj - amiloidno fibrilacijo. Pri ugotavljanju vpliva prisotnosti bakrovih ionov na proces amiloidne fibrilacije stefina B smo pokazali, da so bakrovi ioni popolnoma inhibirali rast fibril dimerne oblike stefina B, nastanek fibril stefina B divjega tipa so inhibirali z nižjo jakostjo, do inhibicije pa je prišlo celo pri tetramerni obliki stefina B, ki sicer afinitete do bakrovih ionov ni

kazala. Interakcija bakrovi ionov s stefinom B je na novo odprla vprašanje njegove celične funkcije, saj bi lahko bil stefin B eden od proteinov, ki *in vivo* vežejo baker in tako vzdržujejo izjemno pomembno in občutljivo homeostazo bakra v možganih.

Peptid amiloid-beta je glavni patološki protein pri Alzheimerjevi bolezni. Značilnost Alzheimerjeve bolezni so zunajcelični plaki agregiranih proteinov. Znotraj teh senilnih plakov so (med drugim) odkrili tudi prisotnost stefinov. Glede na to, da je bila že prikazana vloga cistatina C pri Alzheimerjevi bolezni, smo želeli podrobneje preučiti vlogo cistatinov (tudi stefina B) pri tej bolezni in vzeli pod drobnogled interakcijo stefina B s peptidom amiloid-beta. Uspeli smo pokazati koncentracijsko odvisno vezavo stefina B in peptida amiloid-beta, do katere pa je prišlo samo pri določenih oligomernih stanjih stefina B. Tako sta le stefin B Y31, ki je večinoma v dimerni obliki, in tetramerna oblika stefina B E31 (divji tip) vezala peptid amiloid-beta in posledično inhibirala njegovo fibrilacijo. S tem se je stefin B uvrstil med vezavne proteine, ki vežejo peptid amiloid-beta *in vitro* ter, sodeč po začetnih eksperimentih, tudi *in vivo*. Predlagali smo, da bi stefin B lahko imel funkcijo "amaterskega" šaperona, kot je že bilo predlagano za npr. gelsolin, apolipoproteine in heparin-sulfat-proteoglikane.

Delovanje amiloidogenega proteina stefina B smo, poleg preučevanj v *in vitro* pogojih, želeli opazovati tudi v *in vivo* sistemu. Gen za izražanje stefina B smo pod inducibilnim promotorjem vstavili v genom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ter ob sproženi ekspresiji stefina B opazovali celični odziv kvasnih celic na ravni celotnega genoma. Osredotočili smo se na spremljanje vzorcev genskega izražanja s pomočjo tehnike mikromrež in določitev genskih interakcij med vstavljenim amiloidogenim stefinom B in posamičnim genom kvasovke *S. cerevisiae* (z izjemo esencialnih genov). Prisotnost stefina B E31 v kvasnih celicah smo dokazali s pomočjo imunodetekcije. Opazili smo, da je med celicami prišlo do različne stopnje izražanja stefina B E31. Protein je bil pri 40 % vseh celic prisoten v velikih količinah, pri 60 % celic pa je bil signal izraženega stefina B komaj zaznaven. Imunofluorescenca je potrdila prisotnost tvorjenih agregatov znotraj kvasnih celic, vendar pri manjšem številu celic. Pri določitvi genskih interakcij med stefinom B E31 in posameznimi geni kvasovke *S. cerevisiae* smo ugotovili, da stefin B ni sprožil značilno pomembnih procesov znotraj celic, niti nismo pri analizi transkriptoma odkrili značilno pomembnih metabolnih poti. Očitno integriran stefin B E31, kljub prisotnim agregatom, kvasnim celic ni povzročil izrazite škode, pa tudi ne koristi. Tako bi v prihodnjih študijah lahko preverili vpliv bolj agresivne mutante (z bolj izraženo nagnjenostjo k agregaciji) stefina B na delovanje celic kvasovk S. *cerevisiae*.

Abstract

The presence of insoluble amyloid aggregates in various human tissues correlates with the development of many human disorders (amyloidoses), including neurodegenerative diseases. Deposition of the aggregated misfolded proteins in the brain, where aggregates can be localized extracellularly or intracellularly, is the main characteristic of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, prion diseases and many others. Since the mechanisms behind the neurodegenerative diseases are far from understood, no efficient therapy is available for their treatment.

Misfolded proteins frequently aggregate into ordered structures, named amyloid fibrils. Despite a lack of sequence and structure similarities of the proteins involved in amyloid fibril formation, the amyloid fibrils share common properties. They are very stable, elongated constructs, consisting of intertwined β strands (β strands are running perpendicularly to the fibril axes) that are resistant to protease degradation. Amyloid fibrils specifically bind certain dye molecules, such as ThT and Congo red.

The goal of our study was to contribute to understanding of the mechanism of amyloid fibril formation by studying amyloid formation in *in vitro* as well as *in vivo* systems.

In the field of amyloid fibrils three leading hypotheses have been launched. Namely, the first hypothesis states that the ability to form amyloid structures is a generic property of all polypeptides, second hypothesis states that proteins not connected with any known disease share common features of amyloid-induced toxicity compared to pathological proteins and third one argues that species influencing cell viability (causing cytotoxicity) are not the fibrils themselves but rather the prefibrilar oligomers and that. According to these hypotheses stefin B is very suitable model to study the phenomenon of amyloid fibril formation.

Human stefin B is a cysteine proteases inhibitor. Because of its broad distribution, a general protective role was suggested. Deficiency of stefin B was found associated with development of the progressive myoclonus epilepsy of type 1, EPM1. Stefin B forms amyloid fibrils rather easily and represents a well studied system as its stability, folding and amyloid-fibril formation have been studied thoroughly.

In vitro studies included modelling the mechanism of amyloid fibril formation process of stefin B from the kinetical, morphological and structural data and estimating the effect of microenvironment on stefin B fibrillation, capturing copper influence and the interaction with amyloid beta peptide.

The model of stefin B amyloid fibril formation predicts formation of domain-swapped dimers that can evolve to “closed” form, characteristic for off-pathway, or can proceed further in a propagated manner to nucleate the fibrillation reaction. According to temperature and protein concentration dependence measurements, the nucleation step was found to be a first-order reaction, followed by the fibril growth step a second-order reaction. The prediction of the off-pathway from the oligomeric intermediates stems from the observed anomaly of a reverse protein concentration dependence of the rates of fibrillation at higher temperatures. Three energies of activation were derived from global fitting to the kinetic scheme. The highest enthalpy of activation (95 ± 5 kcal mol^{-1}) is characteristic for initial domain-swapping reaction, nucleation with N_i irreversible transitions (global fitting insinuated N_i=64) corresponds to enthalpy of activation 55 ± 4 kcal mol^{-1} and the enthalpy of activation 27 ± 5 kcal mol^{-1} obtained for the process of fibril growth, is characteristic for conformational changes due to proline trans to cis isomerization.

It was shown that stefin B is, unlike its structural homolog stefin A, a high affinity copper binding protein. Further, presence of copper inhibited amyloid fibril formation of stefin B. Since elevated concentrations of metals, including Cu, Al, Zn**,** Fe have been located in the brain of patients with neurodegenerative diseases, a role of copper binding could be related to specific function(s) of stefin B, which remains to be confirmed by *in vivo* studies.

Stefins were found co-aggregated in senile plaques samples from patients with various neurodegenerative disorders. Amyloid beta peptide is the main component of extracellular plaques specific for Alzheimer's disease. To contribute to understanding of the role of cystatins in Alzheimer's disease, we studied the interaction between different forms of stefin B and amyloid beta peptide. We were able to demonstrate direct binding of the two monitored proteins that was oligomer specific, which is a new feature differing from cystatin C. Hence, only tetramers of the wild type stefin B E31 and the variant stefin B Y31 (which is predominantly dimeric) showed concentration dependent interaction with amyloid beta peptide

and consequently inhibition of amyloid fibril growth of the latter. Thus, stefin B is another amyloid-binding protein *in vitro* and, as preliminary experiments have shown, likely in cells. Possible »amateur« chaperon activity of stefin B (similarly as was proposed for gelsolin, apolipoproteins and heparin-sulfate-proteoglycans) is discussed.

In the *in vivo* studies we decided to introduce stefin B into yeast cells. The amyloidogenic protein stefin B was expressed in yeast *Saccharomyces cerevisiae* to acquire information on pathways affected in eukaryotic cell by the presence of amyloid aggregates and amyloid-induced toxicity. We decided to monitor gene expression pattern after inducing expression of stefin B in yeast cells using DNA microarray technology. The construct of stefin B was also introduced into collection of all yeast strains from single knock out gene library. Systematic construction of double mutants enabled a global analysis of synthetic lethal genetic interactions, where mutants with significantly decreased growth rate were identified and thus revealed genetic interactions of stefin B with the whole yeast genome. Unfortunately, the wild type stefin B E31 was not aggressive enough to cause substantial effect on yeast strains, therefore, the next step of yeast studies would be to introduce a highly aggregate-prone mutant of stefin B into S. *cerevisiae* cells.

Seznam kratic

Aβ	=	peptid amiloid-beta
AD	=	Alzheimerjeva bolezen
AFM	=	mikroskop na atomsko silo
ALS	=	amiotropna lateralna skleroza
APP	=	prekurzorski protein peptida amiloid-beta
BSA	=	goveji serumski albumin
CD	=	cirkularni dikroizem
cDNA	=	komplementarna DNA
CSTB	=	oznaka gena za protein stefin B
DLS	=	dinamično sipanje svetlobe
DNA	=	deoksiribonukleinska kislina
ESI-MS	=	masna spektrometrija z elektrosprej ionizacijo
EPM1	=	Unverricht-Lundborgova bolezen
FPLC	=	tekočinska kromatorgrafija z ločevanjem po proteinski velikosti
FRDA	=	Friedreichova ataksija
FTDL	=	frontotemporalna degeneracija
GO	=	genska ontologija
HD	=	Huntingtonova bolezen
IAPP	=	amilin
m.sp.	=	moški spol
mRNA	=	informacijska RNA
NMR	=	nuklearna magnetna resonanca
NNC	=	model konformacijske pretvorbe, pogojene z nukleacijo
PCR	=	verižna reakcija s polimerazo
PD	=	Parkinsonova bolezen
PrP^C	=	topna oblika priona
RNA	=	ribonukleinska kislina
ROS	=	reaktivne kisikove spojine
SDL	=	tehnika za sistematično določanje genetskih interaktorjev prekomerno izraženega preiskovanega gena
SGA	=	tehnika za sistematično določanje genetskih interakcij delecije preiskovanega gena
SKO	=	zbirka delecijskih mutant
SOD1	=	superoksid dismutaza
SPR	=	površinska plazmonska resonanca
TEM	=	transmisijski elektronski mikroskop
ThT	=	tioflavin T
TFE	=	trifluoroetanol
TTR	=	trantiretin
UPS	=	ubikvitin-proteasomski sistem
UV	=	ultravijolično območje
ž.sp.	=	ženski spol

Oznake aminokislin

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

1 Uvod

1.1 Amiloidoze in nevrodegenerativne bolezni

Prisotnost netopnih proteinskih skupkov/agregatov v človeškem telesu sovpada z razvojem več kot sto bolezenskih stanj, imenovanih amiloidoze (Rojas Quijano in sod., 2006). Amiloidoze so bolezni, povezane z nalaganjem proteinskih agregatov v različnih vrstah celic in tkiv. Agregate pogosto najdemo v srcu, ledvicah, jetrih, vranici, živčnem sistemu in prebavnem traktu (Kyle in Bayrd, 1975).

Prisotnost proteinskih agregatov v možganih je glavna karakteristika bolnikov, obolelih za nevrodegenerativnimi bolezmi. Najbolj pogoste nevrodegenerativne bolezni so Alzheimerjeva bolezen (AD), Parkinsova bolezen (PD), Huntingtonova bolezen (HD), prenosne spongioformne encefalopatije (spongioformna encefalopatija govedi– BSE, Creutzfeldt - Jakobova bolezen…) ter amiotropna lateralna skleroza (ALS) (Rojas Quijano in sod., 2006).

V grobem delimo bolezenske amiloidoze v dve skupini, na sistemsko obliko, kjer se proteinski depoziti (cistatin C, transtiretin, mikroglobulin itd.) pojavijo v več tkivih in organih ter na lokalizirano obliko, kjer se proteinski depoziti (A-protein, prionski protein itd.) pojavijo samo v posameznem tkivu ali organu. Zanimivo je, da pri sistemski obliki možgani v večini primerov niso prizadeti (Westermark, 2005).

Zaradi nezadostnega poznavanja dejavnikov in mehanizmov, ki vodijo do nastanka proteinskih agregatov in njihove posledične toksičnosti, učinkovitih zdravil za zdravljenje amiloidoz (ter s tem nevrodegenerativih bolezni) še vedno ni na voljo. Trenutne terapije bodisi podaljšujejo razvoj bolezni bodisi lajšajo posamezne simptome (Žerovnik, 2010).

Trenutno se veliko pozornosti namenja študiju proteinske agregacije, tako da je področje deležno podobnega poudarka, kot ga je bil deležen problem proteinskega zvijanja v prejšnjih desetletjih. Proteinsko (napačno) zvijanje ter dejavniki, ki vplivajo na agregacijo proteinov, so pridobili na pomembnosti, saj so povezani z dejansko patologijo bolezenskih stanj in niso zgolj teoretični problem. Bolezni, ki nastanejo kot posledica napačnega zvitja oz. spremembe konformacije in sledeče agregacije proteina, so v splošnem poimenovane »konformacijske bolezni« (Papaleo in Invernizzi, 2010). Znanstveniki z različnih področij se povezujejo z namenom pojasniti fenomen agregacije proteinov, molekularne osnove nastanka le-teh in njihove posledične toksičnosti pa spadajo med najbolj aktualne problematike s področja nevroznanosti.

1.2 Amiloidni fibrili

Glede na strukturo delimo proteinske agregate na dve osnovni skupini. Napačno zviti proteini se lahko združujejo v neurejene, heterogene skupke, t.i. amorfne agregate, lahko pa tvorijo strukturno urejene amiloidne fibrile. Amiloidni fibrili so paličaste strukture, ki so, ne glede na kodirajoče aminokislinsko zaporedje, sestavljene iz β trakov, le-ti pa so med seboj vzporedno povezani in po dolgem prepleteni.

Ime *amiloid* izhaja iz prvotno napačne identifikacije novoodkritih proteinskih tvorb, ki so bile zaradi grobe tehnike pozitivnega obarvanja z jodom uvrščene med škrobne substance (škrob: lat. *amylum*). Kasneje se je po vroči debati, ali spadajo amiloidi med maščobe ali ogljikove hidrate, izkazalo, da imajo proteinsko sestavo (Kyle, 2001).

Kljub pomanjkanju podobnosti aminokislinske sekvence med amiloidogenimi proteini oziroma pomanjkljivih vzporednic med njihovimi nativnimi oblikami, imajo amiloidni fibrili skupne morfološke in strukturne lastnosti (Calamai in sod., 2005). Difrakcija rentgenskih žarkov je razkrila strukturo iz vzporednih β plošč, ki so pravokotne na fibrilno os (Jimenez in sod., 1999). Amiloidni fibrili so, kot so pokazala opazovanja z elektronsko mikroskopijo (EM) ter mikroskopijo na atomsko silo (AFM), sestavljeni iz več dolgih, ravnih, gladkih in nerazvejanih filamentov - niti (Sunde in Blake, 1997). Značilen vzorec »navzkrižne-β-strukture« so določili tudi z infrardečo spektroskopijo ter cirkularnim dikroizmom (Rojas Quijano in sod., 2006). Zaradi odpornosti na proteazno aktivnost so amiloidni fibrili nenavadno stabilni.

Amiloidni fibrili specifično vežejo nekatera barvila. Kongo rdeče se pogosto uporablja v klinični praksi

za dokazovanje prisotnosti amiloidnih fibril v tkivih, za *in vitro* študije pa se pogosto uporabljajo tioflavinska barvila.

Proteinski agregati v obliki amiloidnih fibril se nahajajo tako v ekstracelularnem prostoru (amiloidni plaki), kot tudi znotraj celic - intracelularne tvorbe (Wirths in sod., 2004). Slednje so podobne inkluzijskim telescom, značilnih za bakterije. Čeprav naj bi bila sposobnost tvorbe amioidnih fibril v razmerah *in vitro* splošna lastnost vseh polipeptidnih verig (Calamai in sod., 2005), pa je ta sposobnost *in vivo* omejena samo na nekaj polipeptidov, ki jih je trenutno znanih nekaj več kot dvajset.

1.3 Modeli nastanka amiloidnih fibril

Osnovni mehanizmi, ki pojasnjujejo reakcijo nastanka amiloidnih fibril iz osnovnih enot, še vedno niso v celoti pojasnjeni. Problem predstavlja dejstvo, da glede na zadnje raziskave ne gre za enovit postopek, ki bi veljal za vse proteine, pač pa se procesi združevanja monomer (opomba: alternativna možnost besede *monomera, ž.sp.* je beseda *monomer, m.sp.*) preko oligomer (opomba: alternativna možnost besede *oligomera, ž.sp.* je beseda *oligomer, m.sp.*) do fibril, vsaj v podrobnostih, razlikujejo od proteina do proteina. Glede na to, da je agregacija polipeptidnih verig (združevanja aminokislinskih molekul) odvisna od hidrofobnosti, sposobnosti tvorbe vodikovih vezi, nagnjenosti k lokalni sekundarni strukturi, nagnjenosti k specifičnem združevanju (tvorbi prepletenih domen…) ter drugih dejavnikov, je mehanizem nastanka amiloidnih fibril poleg tega podvržen tudi lastnostim topila ter morebitnih dodatkov - soli, organskih molekul…(DuBay in sod., 2004; Tartaglia in sod., 2004; Sánchez de Groot in sod., 2005).

Na agregacijo torej vplivajo lastnosti proteina, ki izhajajo iz njegove sekvence, in sestava topila, tako da prihaja do različnih načinov združevanja osnovnih gradnikov v zrele fibrile. Računalniška simulacija z modelom na osnovi **grobega osnovnega zrnja** (Coarse-grained model), ki sta ga vpeljala Pellarin in Caflisch (Pellarin in Caflisch, 2006), pojasnjuje tako direktno polimerizacijo kot postopno polimerizacijo s podaljšano fazo zakasnitve. Način polimerizacije naj bi bil odvisen od notranje stabilnosti prehodne konformacije monomere, bogate z β trakovi (gradbena enota fibril). β-stabilen model predideva prehodne konformere s stabilno β strukturo, ki se z direktno polimerizacijo brez prisotnosti intermediatov povežejo v fibrile (npr. transtiretin, β_2-mikroglobulin), pri β-nestabilnem modelu pa se β-nestabilne prehodne konformere združijo v fibrile preko kinetično nestabilnih intermediatov, obogatenih z α strukturo, kjer pride do konformacijske preureditve iz α v β strukturo. To se odraža v prisotnosti značilne faze zakasnitve (npr. amyloid-beta, islet amyloid polypeptide – IAPP, prioni, acilfosfataza…).

V primeru proteinov, kjer se fibrilacija začne s fazo zakasnitve, sta pogosto prisotni dve fazi rasti fibril, začetna tvorba nukleacijskega skupka ter nadaljnji proces rasti fibril. Mehanizem je Serio s sodelavci (Serio in sod., 2000) poimenoval **model konformacijske pretvorbe, pogojene z nukleacijo** (nucleated conformational conversion – NCC). Skupina je opisala začetno fazo reakcije fibrilacije kvasnega priona Sup35 od začetne monomerne oblike do oligomernih oblik kot reverzibilno reakcijo. Oligomere naj bi bile do te točke še nestrukturirane, v nekakšnem tekočini podobnem stanju. Nato pride na kooperativen način do konformacijskega prehoda v oligomere, bogate z β trakovi. Od tod ime konformacijska pretvorba, pogojena z nukleacijo. Skupina je tudi predlagala rast oligomer z dodajanjem monomernih enot, tako kot naj bi to veljalo za podaljševanje zrelih fibril. Reverzibilnost reakcije, ki jo opiše NCC model, odraža posebno molekularno biologijo kvasnih prionov, ki omogoči kvasnim celica preklop med [PSI^-] in [psi^-] stanjem.

S študijem istega proteinskega konstrukta (kvasni prion Sup35) je Xu s sodelavci (Xu in sod., 2001) prišel do podobnega koncepta združevanja tako imenovanih nukleacijskih enot. Postavili so hipotezo, da je način združevanja teh nukleacijskih enot podoben linearni koloidni agregaciji. **Model dipolnega združevanja** zagovarja začetni nastanek nukleacijskih enot s prevladujočimi hidrofobnimi interakcijami. Nastale nukleacijske enote pa imajo svoj notranji dipolni moment, ki s privlačno silo povzroči linearno agregacijo ter s tem nastanek granularnih protofibril, podobnih verižici iz biserov.

V nasprotju z drugimi modeli polimerizacij, pogojenih z nukleacijo, pa **model tvorbe kritičnih oligomer** (Modler in sod., 2003) predvideva, da je nukleacijski skupek na celotni poti polimerizacije, pogojene z nukleacijo, najmanj stabilna zvrst. Ravno zaradi svoje nestabilnosti je ta stopnja ozko grlo reakcije, ki se stabilizira ob prisotnosti novo nastalih oligomer. Pri predlaganemu modelu se med prvi fazo manjše podenote združujejo v kritične oligomere, iz katerih se v drugi fazi tvorijo protofibrili. Kinetika obeh faz naj bi bila ireverzibilna, kjer se hkrati odvijata proces konformacijske pretvorbe sekundarne strukture v β trakove in rast fibril.

Le podrobne raziskave molekularnih mehanizmov fibrilacije različnih proteinov bodo omogočile celosten vpogled v termodinamiko in kinetiko nastanka fibril, saj lahko le s primerjavo različnih modelov amiloidne fibrilacije postavimo zakonitosti povezovanja molekul v fibrilne tvorbe.

1.4 Vodilne hipoteze s področja amiloidnih fibril

Raziskave s področja amiloidnih fibril sledijo nekaj osnovnim hipotezam, med drugim:

- Dobson je s sodelavci postavil hipotezo, da je zmožnost tvorbe fibril splošna lastnost vseh proteinov (polipeptidnih verig) in da ni omejena zgolj na amiloidne proteine, povezane s patološkimi spremembami v živih celicah. Tako naj bi bil nek osnoven prehod iz nativne v fibrilarno obliko skupen vsem polipeptidnim verigam v temu prilagojenih reakcijskih pogojih (Calamai in sod., 2005).

- Walsh je s sodelavci predstavil dokaze, da so prefibrilarne (topne) oligomerne oblike veliko bolj škodljive za celice kot pa njihova končna forma - netopni fibrili (Walsh in Selkoe, 2004).

- Stefani je s sodelavci pokazal, da se amiloidna toksičnost patoloških proteinov v principu ne razlikuje od amiloidne toksičnosti nepatoloških proteinov (Stefani in Dobson, 2003; Bucciantini in sod., 2002). Z drugimi besedami, amiloidne oblike proteinov, ki jih sicer ne povezujejo z nobeno do sedaj odkrito amiloidozo, imajo primerljiv citotoksičen učinek s tistimi amiloidnimi polipeptidi, ki so povezani s poznanimi patološkimi stanji (Buccantini in sod., 2004, Baglioni in sod., 2006).

1.5 Stefin B kot modelni sistem za študij fibrilacije

Človeški protein stefin B, glede na zgoraj naštete vodilne hipoteze s področja amilodnih fibril, izpolnjuje vse pogoje za vlogo modelnega proteina za študij amiloidne fibrilacije. Rezultati raziskav na stefinu B lahko tako pripomorejo k splošnemu poznavanju amiloidnega področja, saj ugotovitve potencialno veljajo tudi za druge amiloidogene proteine.

1.5.1 Uvrstitev steina B – družina cistatinov

Stefin B (ang. »cystatin B«) spada med inhibitorje cisteinskih proteaz, med cistatine. Podatkovna baza MEROPS uporablja hierarhično, na strukturi temelječo klasifikacijo peptidaz in njihovih inhibitorjev. Vsaki peptidazi (inhibitorju) ustreza določena družina, ki ima statistično značilne podobnosti v aminokislinskem zaporedju, homologne družine pa so združene v klane.

Klan peptidaznih inhibitorjev zajema vse do današnjega dne odkrite inhibitorje, ki imajo skupen evolucijski izvor (Kordiš in Turk, 2009). Skupina inhibitorjev, združenih v eni ali več družin, je dokazano evolucijsko sorodna preko podobne terciarne strukture. Ime vsakega klana je sestavljeno iz dvočrkovne oznake, pri čemer je prva črka I.

Cistatini spadajo v družino I25, ki se uvršča v klan IH, in ima tri poddružine:

- I25A: stefin A, stefin B, sarkocistatin,
- I25B: cistatini C, D, E/M, F, S, SA, SN, cistatin jajčnega beljaka, kininogen inhibitorni enoti 2 in 3, cistatin kačjega strupa, rastlinski cistatini…,
- I25C: inhibitor metalopeptidaz, kininogen inhibitorna enota 1, s histidini bogat glikoproteinski inhibitor…

Inhibitorji cisteinskih proteaz so vključeni v poddružini I25A in I24B, medtem ko so v poddružini I25C predvsem inhibitorji serinskih proteaz (subtilizina in njegovih homologov) ter inhibitorji metaloproteaz kačjega strupa (Rawlings in sod., 2004a,b).

1.5.2 Funkcija stefina B

Stefin B je bil do nedavnega poznan predvsem kot inhibitor cisteinskih proteaz. Proteaze se encimi, ki razkrajajo polipeptidne verige. Njihovo nenadzorovano delovanje v živi celici bi povzročilo nepopravljivo škodo, zato je proteazna aktivnost pogosto uravnavana z ustreznimi inhibitorji. Razmerje med proteazami in njihovimi inhibitorji je torej izredno pomembno.

Stefin B je reverzibilen, kompetitiven inhibitor lizosomalnih cisteinskih proteaz, ki je široko zastopan v različnih celicah in tkivih. Zaradi njegove prisotnosti v citosolu večine celic so mu pripisali splošno varovalno vlogo (Turk in Bode, 1991; Turk in sod., 2008).

V zadnjem času pa se pojavljajo dokazi, da bi stefin B poleg inhibicije cisteinskih proteaz lahko imel še dodatne funkcije. Protein so namreč Di Giamo in sodelavci našli kot del multiproteinskega kompleksa, specifičnega za cerebelum (male možgane). Kompleks je vključeval proteine citoskeleta in noben izmed njih ni imel proteazne aktivnosti (Di Giamo in sod., 2002). Potencialno pomembnejšo vlogo stefina B pri nevrodegeneraciji in regeneraciji nakazujejo tudi sledeče ugotovitve: (I) povečana ekspresija stefina B pri amiotropni lateralni sklerozi – ALS (Malaspina in sod., 2001), (II) povečana ekspresija pri epileptičnih napadih (D'Amato in sod., 2000) ter dejstvo, da je (III) pomanjkanje stefina B tesno povezano z znaki progresivne mioklonske epilepsije – EPM1 (Pennacchio in sod., 1996) in oksidacijskega stresa (Lehtinen in sod., 2009). Pri miših z izbitim genom za stefin B je prišlo do cerebralne apoptoze, kar nakazuje na pomembnost stefina B pri regulaciji specifičnih celičnih dogodkov. Zanimivo je tudi odkritje, da lokalizacija stefina B ni omejena zgolj na citosol, kot so prvotno mislili (kolokalizacija s katepsini – lizosomalnimi proteazami), ampak so ga odkrili tudi v jedru z do sedaj še nepojasnjenim delovanjem (Riccio in sod., 2001).

1.5.2.1 Stefin B in bolezen EPM1

Progresivne mioklonske epilepsije predstavljajo obsežno skupino dednih nevrodegenerativnih obolenj, katerih molekularne osnove ostajajo še vedno slabo pojasnjene. Med značilne simptome spadajo tonično-klonični krči, mioklonski krči in progresivna nevrološka disfunkcija, skupaj z demenco in ataksijo. Pri eni najbolj pogostih oblik progresivnih mioklonskih epilepsij, Unverricht-Lundborgovi bolezni (EPM1), prihaja do mutacij gena stefina B. Gen, ki kodira stefin B, se nahaja na 21. človeškem kromosomu. Sestavlja ga 2500 baznih parov, od tega trije majhni eksoni, ki kodirajo protein z 98 aminokislinami.

Pri več kot 90 odstotkih bolnikov, obolelih za obliko epilepsije EPM1, je bila ugotovljena mutacija v promotorski regiji CSTB gena, kjer prihaja do ekspanzije dodekamerne ponovitve. Normalni aleli vsebujejo 2 ali 3 kopije teh ponovitev, medtem ko jih mutirani aleli vsebujejo več kot 30. S pomočjo prenosa northeren (Pennacchio in sod., 1996), kasneje pa tudi z kvantitativnim PCR-jem v realnem času (Joensuu in sod., 2007a) so ugotovili, da samo podaljšanje promotorske regije zaradi dodekamernega vključka vodi do manjšega izražanja mRNA stefina B. To je združljivo tudi z izsledki, da prihaja pri pacientih, obolelih za to boleznijo, do zmanjšanega izražanja proteina (Alakurtti in sod., 2005; Joensuu in sod., 2007) in zmanjšane inhibitorne aktivnosti (Rinne in sod., 2002) stefina B (Čeru, 2008).

Po objavi hipoteze, da bi lahko bila prekomerna proteinska agregacija stefina B sprožilen dejavnik za razvoj EPM1 (Čeru in sod., 2005), ter izdatnih študijah različnih mutant stefina B *in vitro* (Rabzelj in sod., 2005), je skupina Melli s sod. pokazala, da je stefin B *in vivo* prisoten v polimerni obliki, občutljivi na redoks potencial okolice in da prekomerna ekspresija proteina v celicah sproži tvorbo agregatov (Cipollini in sod., 2008). Nato je skupina Lehesjoki s sod. poročala, da naj bi pomanjkanje stefina B sprožilo nevrodegeneracijo preko okvare homeostaze redoks potenciala (Lehtinen in sod., 2009), medtem pa je skupina Žerovnik s sod. pokazala, da so v celici prisotni agregati endogenega stefina B, katerih količina se poveča ob inhibiciji proteasomskega delovanja ali pri povečani ekspresiji proteina, kar zmanjša stopnjo preživetja celic (Čeru in sod., 2010). Agresomi stefina B, ki so bili dokazani znotraj celic, bi se lahko izločali iz celic s pomočjo avtofagije, kar je nakazovala prisotnost značilnih avtofagnih markerjev.

1.5.3. Struktura stefina B

Stefin B je globularni protein z molekulsko maso približno 11kD. Prva kristalna struktura stefina B je bila določena v kompleksu s papainom (Stubbs in sod., 1990), medtem ko je bila tridimenzionalna struktura homolognega proteina, stefina A, določena v raztopini s heteronuklearnim NMR (Martin in sod., 1995). Po tridimezionalni strukturi sta si stefin B in stefin A zelo podobna, čeprav je njuno ujemanje v aminokislinskem zaporedju le 54-odstotno. Stefin B je sestavljen iz 98 aminokislin, ki se povežejo med seboj v pet antiparalelnih β trakov ter eno α-vijačnico s petimi zavoji, kar ga uvršča med proteine tipa α/β.

Tako stefin B kot stefin A nimata disulfidnih mostičkov, kar pa ne velja za njun homolog, cistatin C. Evolucijsko ohranjeno zaporedje QVVAG, ki je skupno vsem cistatinom, se nahaja v drugi lasnični zanki. Aktivno mesto stefina sestavljajo začetni N-teminalni del in prvi dve lasnični zanki (Martin in sod., 1994), pomembno vlogo pri vezavi inhibitorja z nekaterimi cisteinskimi proteazami imata tudi Cys3 in evolucijsko ohranjen Gly4. Mutacija Cys3 v Ser3 vodi do nižje afinitete inhibitorja do papaina, katepsina B in H (Pol in Björk, 2001), afiniteta Gly4 mutantov stefina A do cisteinskih proteaz pa se zmanjšuje z večanjem stranske skupine aminokislinskega ostanka. Največje razlike v afiniteti stefina A do papaina, katepsina B in L so opazili pri menjavi Gly4 v Arg4 oz. Glu4 (Estrada in sod., 1998). Zanimivo je dejstvo, da je G4R mutanta stefina B, ki je sicer ena od EPM1 mutant (Rabzelj in sod., 2005), prav tako neaktivna.

Stefin B ima inhibitorno aktivnost zgolj v monomerni obliki. Pod določenimi pogoji tvori prepletene dimere (opomba: alternativna možnost besede *dimera, ž.sp.* je beseda *dimer, m.sp.*), struktura tetramerne oblike je bila določena pred kratkim (Jenko Kokalj in sod., 2007). Prepletena dimera je bila sicer opažena pri stefinu A v raztopini (Jerala in Žerovnik, 1999; Staniforth in sod., 2001) in pri cistatinu C v kristalni obliki (Janowski in sod., 2001). Zaradi prisotnosti prepletenih dimer pri vseh treh cistatinih je moč sklepati, da gre pri tej skupini proteinov za tvorbo fibril ravno preko prepletenih domen.

1.5.4 Stabilnost, zvijanje in amiloidogenost stefina B

Stefin B je primeren modelni protein za študij amiloidne fibrilacije tudi zato, ker so Žerovnik in sod. temeljito preučili procese zvijanja, njegovo stabilnost in amiloidogenost (Žerovnik in sod., 2002a,b,c; Žerovnik, 2002).

Pred približno dvajsetimi leti so Žerovnik in sod. odkrili prisotnost stabilnih intermediatov pri denaturaciji stefina B, ki so pri različnih pogojih soobstajali v ravnotežnem stanju (Žerovnik in sod., 1992). Kmalu so potrdili prisotnost štirih prehodnih stanj stefina B: nativne oblike, intermediata zelo podobnega nativni obliki, prisotnost razrahljanega klobčiča in denaturirano obliko (Žerovnik in sod., 1997). Študije zvijanja proteina so pokazale, da sta pri stefinu B prisotni dve kinetični fazi (opaženi s spektroskopskimi metodami), počasnejša in hitrejša. Kljub strukturnim podobnostim s homolognim proteinom stefinom A, je bilo pri stefinu A moč zapaziti zgolj eno kinetično fazo, kar je nakazovalo na razlike med obema proteinoma pri procesu zvijanja. Presenetljivo, manj stabilen stefin B se je v nativno obliko zvil hitreje od stefina A (Žerovnik in sod., 1998a). Za dve vmesni stanji sta bili predvideni dve različni energiji aktivacije in za prehode med vmesnimi stanji je bila izmerjena odvisnost od pH vrednosti (Žerovnik in sod., 1998b). Ko je bil ugotovljen ugoden vpliv topila TFE na hitrost ponovnega zvitja stefina B, so Žerovnik s sod. določili optimalno »standardno« koncetracijo tega organskega topila v reakcijskih raztopinah za zvitje, ki je znašala 10 % (v/v) (Žerovnik in sod., 1999).

Da bi določili vpliv sekundarne strukture na hitrost zvijanja, so Kenig s sod. pripravili himerne mutante, sestavljene iz različnih delov stefina A in B (Kenig in sod., 2006). Izkazalo se je, da se najhitreje zvije stefin B in nato himere z α vijačnico stefina B, torej je na hitrost zvijanja močno vplivala α vijačnica stefina B. Proces odvijanja je sovpadal s stabilnostjo mutant, najpočasneje se je odvijal stefin A (najbolj stabilen) in nato mutante z α vijačnico stefina A. Pri amiloidni fibrilaciji homolognih proteinov in njunih himernih mutant pa hitrost ni sovpadala niti s stabilnostjo niti s hitrostjo zvijanja/odvijanja. Izkazalo se je, da je nagnjenost k fibrilaciji povezana z določenimi strukturnimi deli, kot je β struktura stefina B, in jo je mogoče precej natančno predvideti z izračunavanjem nagnjenosti delno odvitega proteina k tvorbi β trakov. Predlagano je bilo, da agregacijo v amiloidne fibrile sprožijo tisti predeli v aminokislinskem zaporedju, ki lahko tvorijo delno formirane β trakove v denaturiranem stanju (Avbelj in Grdadolnik, 2007). Po tem modelu delno formirani β trakovi ustvarijo nukleacijsko jedro, ki služi za podlago nespecifičnemu združevanju preostalega dela polipeptidne verige v večje strukture β trakov.

Za preučevanje amiloidne fibrilacije stefinov so bile pripravljene številne mutantne oblike (Rabzelj in sod., 2005; Kenig in sod., 2004). Izkazalo se je, da je stefin B, v primerjavi s homolognim stefinom A, tvoril amiloidne fibrile *in vitro* s presenetljivo lahkoto (Žerovnik in sod., 2002a,b,c; Žerovnik, 2002). Stefin B je že pri pH 5 dosegel ugodne pogoje za nastanek oligomer in fibril, dimere stefina B so bile bogato zastopane celo pri sobni temperaturi (Žerovnik in sod., 1994). Po drugi strani pa je stefin A zaradi visoke kinetične bariere prešel v pred–denaturacijsko stanje šele pri temperaturah višjih od 80˚C (Jerala in Žerovnik, 1999).

Za agregacijo stefina B je bilo predlagano, da bi lahko bila možen vzrok nekaterih simptomov dedne Unverricht-Lundborg bolezni – progresivne mioklonske epilepsije tipa I (Čeru in sod., 2005). Študij interakcij prefibrilarnih oligomer stefina B z modelnimi lipidnimi membranami je razkril, da so oligomere, v odvisnosti od proteinske koncentracije, povzročile poškodbe membrane (Anderluh in sod., 2005; Čeru in sod., 2008). Tvorbo por v membranah so opazili tudi pri drugih amiloidnih proteinih (amiloid-beta,

huntingtin, α-sinuklein…), tako da bi fenomen lahko bil sprožilec patoloških kaskad (Murphy, 2007). In ne nazadnje, višje oligomere in prefibrilarni agregati stefina B so se izkazali za toksične pri nevroblastomskih celicah (Čeru in Žerovnik, 2008; Čeru in sod., 2008).

1.6 Vplivi (mikro)okolja

Notranjost žive celice je izjemno kompleksno okolje, saj so proteini in makromolekule zgoščeni na koncentracijo 300–400 mg/ml (Hlodan in Hartl, 1994). Zvijanje novo nastalih proteinov je s tem oteženo, saj prostorsko nabito okolje zaradi številnih medmolekulskih interakcij pospešuje nepravilno proteinsko zvitje in agregacijo proteinov, kar vodi do patoloških stanj. Študij vpliva (mikro)okolja na pravilno oz. nepravilno proteinsko zvitje je tako izjemnega pomena za razumevanje biofizikalnih lastnosti proteinov.

1.6.1 Vpliv oksidativnega stresa in kovinskih ionov na razvoj nevrodegenerativnih bolezni

Nevrodegenerativne bolezni vključujejo številne patološke spremembe različnih metabolnih procesov, med katerimi sta tudi proteinska agregacija in oksidativen stres, oba pa sta povezana z vpletenostjo kovinskih ionov (Molina-Holgado in sod., 2007). Pri bolnikih z nevrodegenerativnimi boleznimi so v možganih odkrili visoke koncentracije Cu^{2+}, Al^{3+}, Zn^{2+} and $Fe^{2+/3+}$ ionov (Uversky in sod., 2001).

Eden glavnih faktorjev tveganja pri večini nevrodegenerativnih boleznih je starost, ta pa je neposredno povezana s povečanim oksidativnim stresom (peroksidacija lipidov, proteinska oksidacije, DNA in RNA oksidacija). Oksidativni stres se v možganih z leti povečuje in igra osrednjo vlogo pri patogenih mehanizmih nevrodegeneracije (Liu in sod., 2003).

Oksidativni stres lahko definiramo kot neravnovesje med produkcijo prostih radikalov in zmožnostjo obrambe celice pred njimi s pomočjo različnih antioksidantov in detoksifikacijskih encimov (superoksid dismutaze, katalaze in glutationa). Ko se pojavi omenjeno neravnovesje, se oksidativno modificirane molekule (lipidi, proteini, nukleotidi) nakopičijo v različnih predelih celic ter s tem onemogočajo njihovo delovanje (Floyd in Hensley, 2002). V primeru zelo občutljivih celic, kot so nevroni, lahko zmanjšano delovanje obrambnega sistema sčasoma privede do celične smrti. Pri fizioloških pogojih so prosti radikali stranski produkt celičnega oksidativnega metabolizma, s prevladujočimi spojinami superoksidom ($O_2^{\bullet -}$), hidroksilom ($OH^{\bullet}$) in dušikovim oksidom ($NO^{\bullet}$), medtem ko vodikov peroksid (H_2O_2) in peroksinitrit ($ONOO^-$) sama po sebi nista radikala, a prispevata k celičnemu redoks stanju in tvorita proste radikale pri kasnejših reakcijah. Vse zgoraj omenjene spojine spadajo pod reaktivne kisikove zvrsti (ROS – reactive oxygen species). Potencialni znotrajcelični viri ROS so mitohondrijski oksidativni metabolizem (veriga prenosa elektronov), dušikov oksid, metabolizem fosfolipidov, proteolizne poti in kovinski ioni. Kemijske reakcije, ki vodijo do nastanka ROS, se v celicah odvijajo neprestano. Pri izrednih pogojih, npr. pri kapi, pa nastanejo v zelo velikih količinah (Molina-Holgado in sod., 2007).

Možgani so še posebej podvrženi poškodbam, nastalih zaradi oksidativnega stresa, predvsem zaradi sledečih specifičnih karakteristik:

- visoka poraba kisika (20 % celotne porabe kisika telesa),
- kritično visok nivo tako železa kot askorbata (pomembno pri lipidni peroksidaciji membran),
- relativno nizek nivo prisotnih antioksidantov,
- težnja h kopičenju kovin.

Poškodbe zaradi oksidativnega stresa, ki nastanejo pri interakciji tarčnih proteinov s prostimi radikali in kovinskimi ioni, so značilni znaki večine nevrodegenerativnih bolezni, med njimi tudi Alzheimerjeve, Parkinsonove in prionskih bolezni. Sam pojav bi lahko bil bodisi primaren vzrok bolezni bodisi posledica bolezenskega napredovanja (Molina-Holgado in sod., 2007).

1.6.1.1 Vpliv bakra na razvoj nevrodegenerativnih bolezni

Baker je redoks aktivni kovinski ion, neposredno povezan z reakcijami, ki vodijo do oksidativnega stresa v celicah in tkivih. Homeostaza bakra je skrbno upravljana z različnimi proteini, od transportnih in skladiščnih proteinov ter encimov vse do šaperonov. Bakrova vloga v celici je dvojna: na eni strani sodeluje pri nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) preko Fentonove reakcije (Slika 1), po drugi strani pa propagira celično antioksidativno aktivnost, saj je potreben za delovanje superoksid dismutaze - SOD1.

$$M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH^\bullet + M^{(n+1)+}$$

Slika 1: *Fentonova reakcija*.

Nepravilna vezava kovinskih ionov na proteine oz. celična izguba nadzora nad bakrovo homeostazo se lahko odraža v nastanku težkih obolenj, med drugim tudi nevrodegenerativnih (Gaggelli in sod., 2006).

Koncentracija bakra je bila v amiloidnih plakih v možganih bolnikov z nevrodegenerativnimi boleznimi najdena v koncentraciji tudi do 400 μM, medtem ko je normalna ekstracelularna koncentracija bakra v krvnem serumu ocenjena na približno 10 μM. Homeostaza bakra je tako povezana z vrsto nevrodegenerativnih bolezni. Za številne amiloidne proteine je bila interakcija z bakrom že dokazana, pri čemer baker sproži agregacijo proteina preko direktnih interakcij ali pa je vpliv bakra na stabilnost proteina posreden - preko porušene homeostaze tega kovinskega iona. Med proteine, ki so tako ali drugače vpleteni v presnovo bakra, spadajo α-sinuklein (Uversky in sod., 2001), amiloid beta (Jiao in Yang, 2007), prionski protein (Bocharova in sod., 2005), β-mikroglobulin (Antwi in sod., 2008) ter drugi.

Kot že omenjeno, bakrov ion sodeluje s SOD1, kjer opravlja funkcijo redoks agenta s pretvorbo superoksidnega radikala O_2^- v O_2 in H_2O_2. Mutacije znotraj SOD1 encima se lahko odražajo v izgubi njegove antioksidativne funkcije oz. v pridobitvni nove, pro-oksidativne funkcije, kar vodi do nastanka **amiotropne lateralne skleroze** - ALS (Gaggelli in sod., 2006).

Vezava bakrovih ionov na nativno obliko prionskega proteina PrP^C sicer pomembno prispeva k transportu te kovine v celici, vendar neobičajna vezava lahko povzroči konformacijsko pretvorbo prionskega proteina v patološko obliko ter s tem pospeši razvoj **prionskih bolezni**. Čeprav natančna vpletenost Cu^{2+} ionov oz. njegova vezava na PrP^C še vedno ni pojasnjena, biokemijske raziskave nakazujejo povečanje antioksidativne aktivnosti (Gaggelli in sod., 2006, Brown in sod., 1997).

Prekurzorski protein peptida amiloid-beta (APP), pri procesiranjeu katerega nastaja peptid amiloid-beta (glavna sestavina amilodnih plakov pri **Alzheimerjevi bolezni**), je prav tako udeležen pri bakrovi homeostazi. Zadnje *in vitro* ter *in vivo* raziskave na mišjem modelu APP so pokazale, da APP in posledična prekomerna produkcija peptida amiloid-beta omogočita znorajceličnemu bakru, da zapusti celico. Manjša koncentracija bakra znotraj celic tako privede do okrnjenega delovanja superoksid dismutaze SOD-1, kar povzroči povečanje oksidativnega stresa v celicah. Zaradi tega pride do povečanega kopičenja peptida amiloida-beta znotraj nevronov, le-to pa je glavni vzrok izgube nevronov pri transgenih mišjih modelih. Zaključimo lahko, da je razpoložljivost bakra znotraj živih celic kritičnega pomena za patogenezo Alzheimerjeve bolezni (Bayer in sod., 2006).

Poleg vpliva bakra in drugih kovinskih ionov na oksidativni stres, pa bakrov vpliv na samo proteinsko agregacijo (simptom večine nevrodegenerativnih bolezni) peptida amiloid-beta ni zanemarljiv. Neznatna razlika v aminokislinskem zaporedju - gre za zamenjavo treh aminokislin – med človeškim in podganjim peptidom amiloid-beta je odločilna za podvrženost človeške rase obolevanju za Alzhemerjevo bolezen, medtem ko podgane za to boleznijo ne zbolijo. Možno je, da te tri aminokisline pogojujejo različno afiniteto peptida amiloid-beta do kovinskih ionov, kar bi lahko vplivalo na dovzetnost peptida za proteinsko agregacijo (Gaggelli in sod., 2006).

Skupina iz Italije (Capanni in sod., 2004) je na modelnem proteinu pokazala, da odsotnost vezavnih mest oz. regij za Cu^{2+} na proteinu ne izniči njegove tendence k vzpodbujanju proteinske agregacije.

Prisotnost bakra je tako pomemben dejavnik procesa amiloidne agregacije, saj ima lahko bodisi pozitiven bodisi negativen učinek.

1.6.2 Interakcije protein – protein

Globularni proteini in proteini, ki so sicer v nativnem stanju razviti, gredo v procesu amiloidne fibrilacije preko delno razvite oziroma delno zvite konformacijske oblike (Ahmad in sod., 2003; Uversky in Fink, 2004). V tem prehodnem stanju prihaja do izpostavljenosti hidrofobnih regij amiloidogenega proteina, kar pogosto vodi do nespecifičnih hidrofobnih interakcij med različnimi proteini v amiloidnem procesu. S tem lahko medsebojno vplivajo na sam proces fibrilacije, ne da bi bila med njimi kakšna specifična vzajemna afiniteta.

Na primer, s peptidom amiloid-beta (Alzheimerjeva bolezen) interagirajo številni amiloidogeni proteini. Če omenimo le nekatere: gelsolin, α2- makroglobulin, kristalin-αB. Ti vezavni proteini peptida amiloid-beta, tako imenovani »amaterski šaperoni«, predstavljajo zanimovo potencialno tarčo pri iskanju zdravila v boju proti Alzhemerjevi bolezni (Wilhelmus in sod., 2006, 2007).

1.6.2.1 Peptid amiloid-beta

Peptid amiloid-beta je od 39 do 42 aminokislin dolga proteinska veriga, ki je glavna sestavina amiloidnih plakov, prisotnih v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo. Nastane pri nepravilnem procesiranju transmembranskega proteina, imenovanega amiloid-beta prekurzorski protein (Tsend in sod., 2004). Tako oligomere peptida amiloid-beta, pripravljene *in vitro,* kakor tudi izolirane oligomere iz živih celic, delujejo citotoksično in povzročijo reverzibilno izgubo spomina pri živalskih modelih (Cleary in sod., 2005).

Peptid amiloid-beta agregira v zunajcelične amiloidne plake, nekakšne skupke, sestavljene še iz drugih obarjenih proteinov ter celičnih komponent, katerih vloga pri samem procesu amiloidne fibrilacije še ni dobro pojasnjena. Prisotnost drugih komponent v amiloidnih plakih (poleg samega amiloidogenega proteina) je lahko bodisi vzrok bodisi posledica nenavadnega in patološkega obnašanja samega peptida amiloid-beta.

V amiloidnih plakih peptida amiloid-beta so poleg drugih proteinov potrdili tudi prisotnost stefinov (Ii in sod., 1993; Bernstein in sod., 1994a). Prav tako so našli cistatin C v amiloidnih plakih v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (Maruyama in sod., 1992). Kasneje se je izkazalo, da predstavlja nižji nivo njegove prisotnosti v možganih faktor tveganja za pojav Alzheimerjeve bolezni, ki se pojavlja s starostjo (*eng.* late onset), za razliko od družinske oblike bolezni, ki nastopi bolj zgodaj (Benussi in sod., 2003). Vezava cistatina C in peptida amiloid-beta je bila dokazana tako *in vitro* (Sastre in sod., 2004) kot *in vivo* (Mi in sod., 2007, 2009). V zunajceličnih amiloidnih plakih so potrdili prisotnost stefina A in B (Ii in sod., 1993; Bernstein in sod., 1994a) in pojavilo se je vprašanje vloge cistatinov (stefinov) pri razvoju Alzheimerjeve bolezni (Bernstein in sod., 1994b; Benussi in sod., 2006; Levy, 2008; Žerovnik, 2009) .

Cistatin C je sicer sestavljen iz 120 aminokislin (stefin A in B iz 98) in ima dva disulfidna mostička (stefin A in stefin B nobenega), poleg tega pa je njihova lokalizacija precej pomembna razlika med tremi glavnimi cistatini. Cistatin C je namreč zunajcelični protein (kot primarno tudi peptid amilod-beta), medtem ko sta stefina A in B znotrajcelična, čeprav so bili tudi sicer zunajcelični peptid amiloid-beta in njegove oligomerne oblike opaženi znotraj celic (Walsh in Selkoe, 2004b). Zanimiv je podatek, da so pri cistatinu C, ki se sicer po sintezi izloči iz celice (sekretorni protein), opazili, da homozigotna varianta B gena CST3 B/B, zaradi katere se cistatin slabo izloča iz celice, poveča dovzetnost za pozno Alzheimerjevo boleznijo (Benussi in sod., 2003).

Vpogled v povezavo med našim modelnim proteinom, stefinom B, in glavnim pataloškim proteinom Alzheimerjeve bolezni, peptidom amilod-beta, bi lahko razkril dodatno celično vlogo stefina B. Prav tako bi stefin B lahko potencialno imel posredni ali neposredni vpliv na samo agregacijo peptida amiloid-beta in s tem posledično na njegovo toksičnost. S tem bi se lahko pridružil potencialno pomembnim proteinom, pri katerih je bila potrjena interakcija s peptidom amiloidom-beta (gelsolin, α2-makroglobulin, kristalin-αB,...), zaradi česar so zanimivi za preučevanje preprečevanja oziroma zdravljenja Alzheimerjeve bolezni (Wilhelmus in sod., 2006, 2007).

1.7. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* kot modelni organizem

Spremljanje molekularnih mehanizmov zgolj pri *in vitro* pogojih še zdaleč ni dovolj za razumevanje biokemijskih procesov znotraj same celice.

Nukleotidno zaporedje znotraj genoma določa programe genskega izražanja, ki usmerjajo delovanje živih celic. Način, kako celice globalno upravljajo s programi genskega izražanja, pa ostaja zaenkrat nepojasnjen fenomen. Vsaka celica je produkt specifičnega genskega izražanja, ki vključuje regulacijo transkripcije tisoče genov. Transkripcija genov se spreminja tekom življenjskega cikla celice in predstavlja odgovor na razvoj organizma v kombinaciji s vplivi okolja (Lee in sod., 2002).

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja enega najbolje preučenih evkariontskih organizmov na molekularnem nivoju. *S. cerevisiae* so leta 1996 prvemu med vsemi evkariontskimi organizmi določili zaporedje genoma (Goffeau in sod., 1996). Kvasovka spada med enoceličarje, njen genom obsega 6607 kodirajočih genov. Celični procesi, vezani na genom, so bili temeljito preučeni, zaradi česar je kvasovka *S. cerevisiae* odličen eksperimentalno-modelni sistem s paleto dostopnih laboratorijskih tehnik (Wolinski in sod., 2009; Curk in sod.,2009), primernih za študij celotnega genoma.

Tehnologija DNA mikromrež in tehnika za sistematično določanje sintetičnih genskih interakcij v kvasovki *S. cerevisiae* sta primerni metodologiji, ki ju lahko uporabimo za raziskovanje molekularnih mehanizmov znotraj živih celic.

Tehniko za sistematično določanje sintetičnih genskih interakcij (ang. »synthetic genetic array analysis, SGA«) so razvili leta 2001 (Tong in sod., 2001). Temelji na določitvi interaktorjev preverjanega gena s pomočjo križanja urejene zbirke delecijskih mutant s preverjanim sevom, ki vsebuje delecijo preverjanega gena. Zbirko delecijskih mutant (zbirka SKO – ang. »single-gene knock-out collection«) so razvili pod okriljem projekta Saccharomyces Genome Deletion Project (Winzeler in sod., 1999; Giaever in sod., 2002). Zbirka vsebuje 4850 živih mutiranih haploidnih sevov, pri katerem vsakemu izmed njih manjka po en ne-esencialen gen (Winzeler in sod., 1999). Na njegovem mestu se nahaja zapis, ki zagotovi rezistenco mutiranega seva na antibiotik kanamicin. Pri SGA analizi preko križanja preverjanega seva z zbirko SKO, sporulaciji in naknadni selekciji (tvorba dvojnih mutant) določimo interaktorje preverjanega gena z analizo relativne sposobnosti rasti dvojnih mutant.

Pri določitvi interakcij stefina B z geni kvasovke *S. cerevisiae* smo se poslužili postopka SDL (ang. »synthetic dosage lethality«). Pri postopku SDL proizvedemo zbirko vseh enojnih delecijskih mutant iz zbirke SKO, ki obenem vsebujejo še preverjani gen (stefin B) pod kontrolo inducibilnega promotorja (galaktozni promotor). Analiza SDL poteka po enakih korakih kot analiza SGA. Razlikuje se le v zadnjem koraku, kjer induciramo izražanje preverjanega gena (Mattiazzi, 2010).

Tehnologija DNA mikromrež omogoča celostne študije genoma (DNA) in transkriptoma (RNA). Na ravni transkriptoma sledimo izražanju genov z ekspresijskimi mikromrežami. DNA mikromreže so mikroskopske skupine tisočih DNA molekul z znanimi nukleotidnimi zaporedji, ki jih pritrdimo na podlago. Vsak gen je na mikromreži zastopan z vsaj eno skupino identičnih DNA molekul. Organizirana razporeditev skupin DNA molekul predstavlja matrico, na kateri po hibridizaciji določimo razliko v izražanju genov med poskusnim vzorcem in kontrolo. Mikromrežo z organizirano razporeditvijo tarčnih DNA molekul izpostavimo fluorescentno ali radioaktivno označeni preizkusni snovi (imenovani proba ali sonda), ki jo pripravimo iz preiskovanih celic ali tkiv. Hibridizacijski signal na določenem mestu matrice nam izraža identiteto nukleotidnega zaporedja, velikost signala pa je merilo za količino izraženega genskega produkta. Priprava in uporaba mikromrež vključuje veliko bioinformacijskega dela, in sicer pri izboru nukleotidnih zaporedij, ki bodo predstavljala posamezne gene, pri načrtovanju poskusov ter pri zajemanju, urejanju, shranjevanju in analizi pridobljenih podatkov (Juvan in Rozman, 2006). Tehnika DNA mikromrež se s pridom uporablja predvsem za pogled na izbrani biološki proces na ravni celotnega genoma, globalni pristop k testiranju potencialnih zdravilnih učinkovin in diagnosticiranje kompleksnih obolenj z odkrivanjem genov, vključenih v bolezenske fenotipe.

S pomočjo bioinformacijskih prijemov (Curk in sod., 2005) lahko združimo podatke o izražanju genov s podaki o genskih interakcijah ter s tem oplemenitimo naše rezultate (Mattiazzi in sod., 2010).

Med evkariontskimi organizmi, t.j. vse od enocelične kvasovke pa do višjih evkariontov (vključno s človekom), se je tekom evolucije ohranilo precej biokemijskih poti. Dokazano je, da lahko kar 37% kvasnim proteinom določimo ortologe pri človeku (Reguly in sod., 2006). Zaradi omenjene evolucijske sledljivosti lahko kvasovko uporabimo za študij nekaterih biomedicinsko pomembnih fenomenov. Tako npr. današnje znanje o biologiji rakavih celic temelji tudi na osnovnih študijah, opravljenih na kvasnih celicah (Gitler, 2008).

Prednosti kvasnega modelnega sistema so torej sledeče:

- biokemijske celične povezave so v veliki meri podobne tistim v sesalskih celicah,
- celični procesi, vezani na kvasni genom, so bili izdatno preučeni, tako da je kvasni genom primeren za manipulacijske genetske študije,
- na razpolago imamo metode, ki omogočajo prekomerno izražanje ali izbitje (delecijo) praktično vsakega posamičnega gena,
- na razpolago imamo obsežne baze podatkov o genskih in proteinskih interakcijah, transkripcijskih mrežah ter lokalizaciji proteinov.

»Humanizirani« kvasni modeli igrajo pomembno vlogo pri razvoju novih zdravil. V primerjavi s sesalskimi celicami imajo kvasni modeli številne prednosti pri izvedbi visoko zmogljivih presejalnih testov obsežnih zbirk kemijskih substanc. Ne samo, da je delovanje potencialno zdravilnih molekul preverjeno v fiziološko relevantnem okolju, temveč je izvedba tudi cenovno ugodna, prijazna uporabniku, organizem je hitro rastoč in genetsko prilagodljiv, predvsem pa ti celični testi omogočajo takojšnjo selekcijo toksičnih in nestabilnih kemijskih substanc ter substanc, ki niti ne uspejo prodreti preko membranskega dvosloja žive celice (Winderickx in sod., 2008).

1.7.1 Kvasovka *S. cerevisea* in nevrodegeneracija

Proces zvijanja proteinov je izrednega pomena za vse žive organizme, od mikrobov pa vse do človeka. Za uravnavanje tega izjemno občutljivega procesa se je razvila zapletena mreža celičnih mehanizmov, od šaperonskega delovanja in oksidacijsko-redukcijskih encimov pa vse do razgradnje nepravilno zvitih proteinov preko ubikvitin-proteasomskega sistema (UPS) in avtofagije.

Friedreichova ataksija (FRDA) je ena prvih nevrodegenerativnih bolezni, katere patološki mehanizem je bil direktno pojasnjen s pomočjo »humaniziranih« kvasnih celic. Pri kvasnem modelu se je prvič razjasnila povezava med boleznijo, frataksinom (mitohondrijski protein, povezan s kopičenjem železa v celici), presnovo železa in vlogo mitohondrijev (Gitler, 2008).

V zadnjih letih so bili zasnovani osnovni kvasni modeli za več nevrodegenerativnih obolenj. Kvasna celica kot enocelični organizem sicer nima primerljivih strukturnih in funkcionalnih lastnosti z nevronsko celico, ki so nujno potrebne za napredovanje nevrodegeneracije, vendar so bili ti osnovni kvasni modeli dragoceni pri pridobivanju osnovnega znanja o celičnih mehanizmih, ki spremljajo toksičnost in celično smrt v primeru človeških nevrotoksičnih proteinov.

Zmanjšana kompleksnost kvasne celice v primerjavi z nevronsko celico je lahko tudi pomembna prednost nevrotoksičnih kvasnih modelov. Kvasni genom je zgoščen, na razpolago so obširne zbirke kvasnih genskih delecij ter cDNA knjižnic (Giaever in sod., 2002; Hu in sod., 2007). Kljub temu, da homologni proteini nekaterih človeških nevrotoksičnih proteinov v samih kvasovkah niso prisotni, so njihove molekulske interakcijske mreže presenetljivo ohranjene. Na primer, protein α-sinuklein sodeluje s kvasnimi proteini, udeleženimi v vezikularnem transportu, kar se ujema z njegovo predlagano funkcijo v nevronskem vezikularnem transportu (Cooper in sod., 2006). Prav tako je veliko biokemijskih poti celične smrti pri kvasovkah poenostavljenih, pa vendar ohranjenih vse do nevronskih celic. Oksidativni stres in glavni mitohondrijski doprinos k celični smrti, ki je značilen za npr. α-sinukleinopatije in poliglutaminske motnje, lahko opazimo tako pri nevrotoksičnih kvasnih modelih, kot tudi pri nevronih (Braun in sod., 2010).

Kvasovka *S. cerevisiae* je služila kot modelna evkariontska celica pri določanju mehanizma patologije Parkinsonove in Huntingtove bolezni. Raziskovalci so uporabili kvasno funkcijsko genomiko pri preučevanju odziva žive celice na prisotnost agregatov dveh amiloidnih proteinov, α-sinukleina and huntingtina (Willinghamin sod., 2003; Outeiro in Lindquist, 2003). Zanimivo, rezultati molekularnih mehanizmov obeh proteinov so bili bistveno različni.

Tekom zadnjih let so raziskovalci ustvarili različne kvasne modele za raziskovanje celičnih mehanizmov človeških nevrodegenerativnih obolenj, med njimi α-sinukleinopatij, poliglutaminskih motenj in obolenj, povezanih s peptidom amiloid-beta, ter tauopatije in TDP-43 proteinopatije. Dobljeni rezultati

kažejo na visoko specifičnost posameznih nevrotoksičnih proteinov, pri katerih so nekatere rezultate kvasnih raziskav testirali in potrdili tudi na višjih modelnih organizmih (Braun in sod., 2010).

Več lastnosti nevrodegeneracijskih bolezni, med katere spadajo proteinska agregacija, povečana celična smrt, oksidativni stres, mitohondrijske poškodbe, ER stres ter poškodovana proteosomska in avtofagna razgradnja proteinov, lahko pri kvasovki na ravni celotnega genoma preučujemo z naprednimi, visoko zmogljivimi metodami. Poleg tega lahko na kvasnih sevih z vstavljenimi nevrotoksičnimi proteini izvajamo transkriptomske in proteomske analize ter s tem razkrijemo ustrezne mRNA ali proteinske kandidate, ki (ne)posredno vplivajo na toksičnost in celično smrt. Genski presejalni testi in profili izražanja genov so pristopi, ki se dopolnjujejo in bi lahko z njihovo pomočjo določili različne vidike toksičnosti, kar je bilo pred kratkim pokazano za toksičnost α-sinukleina (Yeger-Lotem in sod., 2009). Uporaba novih matematičnih algoritmov omogoča združitev pristopov z razpoložljivo zbirko kvasnih protein-protein interakcij (Braun in sod., 2010).

Genetski pristopi so pomembni pri preučevanju nevrodegeneracije na kvasnem organizmu, saj bi lahko razkrili nove gene, ki jih prej niso povezovali s samo nevrodegeneracijo. Ti geni ter njihovi produkti bi lahko postali zanimive terapevtske tarče za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (Outeiro in Muchowski, 2004).

2 Namen dela

Povezava med tvorbo (amilodnih) agregatov in pojavnostjo nevrodegenerativnih obolenj ter preostalih amiloidoz kljub številnim raziskavam še vedno ni jasna. Nepojasnjen je že sam mehanizem nastanka proteinskih agregatov, kaj šele vplivi okoliščin, ki privedejo do njihovega nastanka. Prav tako so še vedno nedorečene posledice prisotnosti patoloških tvorb znotraj živih celic, kar je sicer ena najbolj pomembnih informacij za razvoj potencialnih terapij.

Namen doktorske disertacije je bil prispevati znanje v mozaik razumevanja tvorbe amiloidnih fibril in agregatov s preučevanjem tvorbe amiloidnih fibril tako v *in vitro* kot v *in vivo* sistemih.

In vitro eksperimenti so zajemali morfološke, strukturne in kinetične lastnosti fibrilogeneze stefina B, s pomočjo katerih smo predpostavili model nastanka fibril omenjenega proteina. Model mehanizma fibrilacije preučevanega proteina stefina B bi lahko opisal tvorbo fibril tudi drugih amiloidogenih proteinov in bi tako lahko postal širše veljaven. Dodaten vpogled v mehanizem nastanka fibril stefina B smo dobili tudi z opazovanjem vplivov nekaterih okoliških dejavnikov na sam proces, natančneje vpliva povečane koncentracije bakrovih ionov na mehanizem nastanka fibril in medsebojnega vpliva prisotnosti drugih amiloidnih proteinov na fibrilacijski proces. Interakcija s peptidom amiloid-beta kot prototipom amiloidnega peptida, ki jo želimo dokazati *in vitro* ter *in vivo*, bi lahko imela pomemben fiziološki vpliv.

Z *in vivo* študijami smo želeli zbrati informacije o odzivu živih celic na prisotnost patogenih proteinskih agregatov. V sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo vpeljali človeški protein stefin B ter s prekomernim izražanjem proteina oziroma z inhibicijo proteasoma sprožili tvorbo agregatov. Z združevanjem dveh metod (metodo mikromrež ter metodo za sistematično določanje sintetičnih genetskih interakcij) smo poskušali določiti biokemijske poti, ki so vključene v celični odgovor na prisotnost agregatov stefina B znotraj evkariontske celice na ravni celotnega genoma.

V povzetku so bili naši glavni cilji sledeči:

- na osnovi temperaturne in koncentracijske odvisnosti procesa amiloidne fibrilacije proteina stefina B določiti model mehanizma nastanka amilodnih fibril stefina B, ki bi lahko delil splošne zakonitosti z drugimi amiloidnimi proteini,
- oceniti vpliv okoliških dejavnikov na proces amiloidne fibrilacije stefina B
    - ob povišani koncentraciji bakrovih ionov
    - ob prisotnosti patogenega amiloidnega proteina peptida amiloid-beta (Alzheimerjeva bolezen),
- spremljati odziv evkariontskega organizma (kvasovke *S. cerevisiae*) na prisotnost (agregatov) stefina B s pomočjo:
    - mikromrež in spremenjenih vzorcev genskega izražanja po vstavitvi stefina B v genom kvasovke,
    - določitve genskih interakcij med kodirajočim genom za stefin B ter celotnim genomom kvasovke *S. cerevisiae* (z izjemo esencialnih genov).

3 Materiali in metode

3.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril

3.1.1 Materiali

3.1.1.1 Kemikalije

Vse uporabljene kemikalije so bile p.a. ali višje stopnje čistosti.

2,2,2-trifluoro-etanol (TFE)	Fluka
Chelex	Sigma
Cu_2SO_4	Fluka
glicin	Serva
$NaCH_3COO$	BDH, VWR International
NaCl	Merck
NaH_2PO_4	Merck
Na_2HPO_4	Merck
peptid amiloid-beta (liofiliziran)	Peptide Institute, Osaka
uranil acetat	Spi supplies
thioflavin T (ThT)	Aldrich

3.1.1.2 Raztopine

acetatni pufer pH 4,8	0,015 M $NaCH_3COO$ 0,150 M NaCl pH 4,8
fosfatni pufer pH 6,3	0,06 M NaCl 0,001 M NaH_2PO_4 x $2H_2O$ 0,004 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$ pH 6,3
fosfatni pufer pH 7,5	0,1 M NaCl 0,005 M NaH_2PO_4 x $2H_2O$ 0,020 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$ pH 7,5
pufer A	0,015 M acetatni pufer pH 4,8 0,150 M NaCl pH 5,0
pufer B	0,01 M fosfatni pufer 0,15 M NaCl pH 7,0 (oz. NaCl/P_i pH 7,3)
pufer C	pufer A 10 % TFE (v/v)

pufer PBS	0,145 M NaCl 0,003 M NaH_2PO_4 x $2H_2O$ 0,008 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$ pH = 7,2
ThT pufer	25 mM natrijev fosfat, pH 7.5 15 μM ThT: A_{416} = 0,660 ± 0,005

3.1.1.3 Laboratorijska oprema

aparatura Biacore X	GE Healthcare
aparatura za FPLC	UPC-900 c črpalko P-920 in s frakcijskim kolektorjem Frac-900 (Pharmacia)
avtomatske pipete P-20, P-200, P-1000	Eppendorf
centrifuga RC 5C plus	Sorvall
centrifuge	Eppendorf 5402, 5410, 5417R, 5415R, 5810R
filter Minisart z velikostjo por 0,2 μm	Sartorius
fluorimeter C-61	Photon Technology International
fluorimeter LS 50B	Perkin Elmer
fluorimeter za mikrotiterske plošče Safire	Tecan, Safire
koncentratorji Centricon	Millipore
magnetna mešala MM-530	Tehtnica
mikrotitrne plošče s 96 odprtinami	Perkin Elmer
pH meter	Metrel
spektropolarimeter	Aviv, 62A DS
spektrofotometer Lambda 18	Perkin Elmer
spektrofotometer ND-1000	Nanodrop
transmisijski elektronski mikroskop	Philips CM 100
vodna kopel SW 20	Julabo

3.1.2 Metode

3.1.2.1 Proteinska izolacija

Človeški rekombinantni stefin B (C3S, E31Y) smo izrazili v *E. coli* po že opisanem protokolu (Jerala in sod. 1988). Pri izolaciji željenega proteina smo uporabili afinitetno (CM-papain Sepharose) in gelsko (Sephacryl-200; Amersham-Pharmacia, Upsalla, Sweden) kromatografijo. Proteinsko koncentracijo smo določili spektrofotometrično pri valovni dolžini 280 nm z ekstinkcijskim koeficientom 5300 $M^{-1}cm^{-1}$.

3.1.2.2 Reakcija fibrilacije

Pri meritvah temperaturne odvisnosti smo uporabili standardno koncentracijo proteina 34 μM. Stefin B smo raztopili v 0,015 M natrijevem acetatu in 0,15 M natrijevem kloridu ter umerili pH vrednost na 4,75. Pridobljeni raztopini smo dodali TFE do končne volumske koncentracije 10% (vol/vol). Reakcije fibrilacije smo spremljali v intervalu med 25 °C in 44 °C v 3-4 stopinjskih intervalih (25, 29, 32, 35, 38, 41, 44 °C).
Pri meritvah koncentracijske odvisnosti smo uporabili enako pripravljeno raztopino stefina B (ista pH vrednost pufra, 10% TFE), tokrat z naraščujočo začetno koncentracijo proteina znotraj 10-kratnega obsega (18, 34, 46, 68, 102, 142, 186 μM). Meritve so bile opravljene pri temperaturi 38 °C. Proces fibrilacije smo v obeh primerih spremljali 2-3 tedne (dokler reakcija ni dosegla končnega platoja).

3.1.2.3 Merjenje ThT fluorescence

Tioflavin T (ThT) je specifično barvilo za spremljanje prisotnosti fibrilnih tvorb. Preverjeno ne veže monomernih in dimernih oblik stefina B.

ThT fluorescenco smo merili s fluorimetrom LS 50B (Perkin Elmer). Eksitacijska valovna dolžina je znašala 440 nm, emisijski spekter smo merili od 455 do 600 nm, pri čemer smo vrh spektra odčitali pri valovni dolžini 482 nm. Širina eksitacijske in emisijske reže je bila nastavljena na 5 oz. 7 mm. Alikvot (50 µl) reakcijske mešanice s tvorjenimi fibrili smo razredčili s 570 µl ThT pufra neposredno pred samo meritvijo.

Za potrditev ročno zbranih rezultatov smo uporabili avtomatiziran flourimeter za mikrotiterske plošče (Safire, Tecan). Tokrat smo alikvot (10 µl) reakcijske mešanice zmešali s 114 µl ThT pufra v mikrotiterski plošči ter uporabili program Xflour4. Eksitacijo smo izvedli pri 440 nm, emisijo odčitali pri 480 nm, integracijski čas je znašal 40 µs pri občutljivostni vrednosti 60.

3.1.2.4 Cirkularni dikroizem (merjenje CD spektrov)

Za kinetično spremljanje fibrilacije s CD spektri smo uporabili CD spektropolarimeter (AVIV, 60 DS), opremljen s termoelektričnim držalom za vzorce. Merili smo daljne UV CD spektre pri valovni dolžini 220 nm s pasovno širino 1 nm. Za raztopine s proteinsko koncentracijo pod 100 µl je bila uporabljena 2 mm celica s končnim volumnom raztopine 660 µl, pri raztopinah z višjo koncentracijo smo uporabili 1 mm celico s končnim volumnom 380 µl. Kinetiko odvisnosti od proteinske koncentracije smo spremljali pri temperaturi 38 °C, medtem ko smo pri temperaturni odvisnosti (merili smo z zamikom 1 minute zaradi kalibracije) uporabili konstantno končno koncentracijo proteina 34 µl. Pri vsakem parametru so bile meritve ponovljene vsaj 3-krat.

3.1.2.5 Transmisijski elektronski mikroskop (TEM)

20 µl reakcijske raztopine s proteinsko koncentracijo 34 oz 45 µM smo po potrebi razredčili od 10- do 50-krat. Vzorce smo nato nanesli na mrežico (prevlečeno z ogljikom), jih po petih minutah sprali s pufrom PBS (pH 7,3) ter prepojili z 1 % uranil acetatom. Preparate smo preučili s TEM pri 80 kV in od 10000- do 130000-kratni povečavi. Slike fibril so bile posnete z Bioscan CCD kamero Gatan, analizirane pa s programom Digital Micrograph.

3.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije

3.2.1. Materiali

Glej točko 3.1.1.

3.2.2 Metode

3.2.2.1 Proteinska izolacija

Glej točko 3.1.2.1.

3.2.2.2 Reakcija fibrilacije

Proces fibrilacije smo spremljali pri treh variantah proteina stefina B (divji tip, varianta E31Y in mutanta P79S) brez in v prisotnosti bakrovih ionov. Za eksperimente brez prisotnosti bakrovih ionov smo proteinskim vzorcem predhodno zamenjali izhodiščno raztopino z dilucijo v kelatnih pufrih. Le-te smo pripravili s pomočjo kelatnega medija (Chelex, Sigma). Pri eksperimentih ob prisotnosti bakrovih ionov pa smo uporabili 50 µM oz 150 µM raztopino Cu_2SO_4, pri čemer smo dobili ob 45 µM proteinski koncentraciji stefina B razmerje med proteinom in bakrovimi ioni v nasičeni raztopini (1 molekula stefina B ima dve vezavni mesti za Cu^{2+}) 1:1 ter 1:3.

Poleg tega smo uporabili tudi tri različne osnovne reakcijske pufre. Sestava pufra A je bila 0,015 M acetatni pufer z 0,15 M NaCl, pH 5,0; pufer B je vseboval 0,01 M fosfatni pufer z 0,15 M NaCl, pH 7,0 (oz. NaCl/P_i pH 7,3), pufer C pa je imel isto sestavo kot pufer A (pH 5) z dodatkom TFE do končne koncentracije 10 % (v/v). Proces fibrilacije smo v primeru pufra A in B izpeljali pri temperaturi 40 °C, medtem ko smo fibrilacijo v pufru C opazovali pri temperaturi 25 °C. V vseh primerih smo reakcijo fibrilacije spremljali 14 dni. Vsi poskusi so bili ponovljeni vsaj dvakrat.

3.2.2.3 Merjenje ThT fluorescence

Za potrditev prisotnosti tvorjenih amiloidnih fibril smo uporabili barvilo Tioflavin T (ThT). ThT smo raztopili v fosfatnem pufru do končne vrednosti absorbance A_{416} = 0,66 pri valovni dolžini 416 nm. 10 µL reakcijske raztopine s proteinsko koncentracijo 45 µM smo združili s 114 µL ThT pufra ter 124 µL tako pripravljene mešanice odpipetirali v bele mikrotitrske plošče. Za merjenje fluorescence smo uporabili stektrofluorometer Tecan s priloženim programom Xflour4. Eksitacija je bila izvedena pri 440 nm, emisijo smo odčitali pri 480 nm in integracijskemu času 40 µs. Kontrolni test smo opravili pod istimi pogoji, le brez dodanega fibrilajočega proteina, ob prisotnosti ter odsotnosti bakrovih ionov. V nobenem primeru nismo zaznali signala fluorescence.

3.2.2.4 Cirkularni dikroizem (CD spektroskopija)

CD spektri so bili posneti s CD spektropolarimetrom Aviv, model 62A DS, opremljenim s termoelekričnim grelcem za vzdrževanje temperature kivete. Eksperimente smo izvajali pri stalni temperaturi 25 °C. V daljnem UV območju smo podatke zbirali na 1 nm pri pasovni širini 1 nm, pri bližjem UV območju smo snemali v intervalu 0,5 nm pri pasovni širini 0,5 nm. Za snemanje spektrov, katerim vrh smo odčitali pri absorbanci 280 nm, smo uporabili 1 mm pravokotno celico, kjer je proteinska koncentracija vzorca znašala približno 0,2 mg/mL (18 µM). Pri spektrih, ki smo jih snemali do absorbance 190 nm, je bila uporabljena 0,2 mm koničasta celica s 5-krat višjo proteinsko koncentracijo, za snemanje bližnjih UV spektrov pa smo uporabili 10 mm pravokotno celico s približno proteinsko koncentracijo 1–1.5 mg/mL (90–136 µM). Daljne UV CD spektre smo podali v enotah povprečne molarne eliptičnosti aminokislinskega ostanka $[\Theta]_{MRW}$ (deg/cm^{2}dmol). Pri termični denaturaciji smo dvigovali temperaturo po korakih 1 °C in pri vsakem koraku merili 15 s. Spektre smo posneli pri 222 in 210 nm, vendar je do spremembe signala ob segrevanju prišlo samo pri 210 nm. Dodatne meritve bližnjih UV CD spektrov so bile narejene s pomočjo Applied Photophysics Chirascan (Applied Photophysics, Leatherhead, UK). Uporabili smo 10 mm pravokotno mikrocelico s proteinsko koncentracijo 1,1 mg/mL (100 µM). Spektri so bili posneti pri temperaturi 20 °C, pasovni širini 0,5 nm, povprečenjem signala 3s na vsakem koraku za 0,5 nm. Ti spektri so podani v enotah mdeg. CD spektri, posneti do 190 nm, so bili ovrednoteni z javno dostopnim programom, Circular Dichroism Analysis dichroweb **(**http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/).

3.2.2.5 Transmisijski elektronski mikroskop (TEM)

Glej točko 3.1.2.5.

3.3 *In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta

3.3.1 Materiali

Glej točko 3.1.1.

3.3.2 Metode

3.3.2.1 Proteinska izolacija

Glej pod točko 3.1.2.1. Po afinitetni in gelski kromatografiji smo proteinske vzorce nanesli še na tekočinsko kromatografijo z ločevanjem po proteinski velikosti (s sistemom FPLC) z nosilcem Superdex 75 HR. Elucija nemutiranega rekombinantnega stefina B (E31 oz. Glu31) je vsebovala paleto oligomer, ki smo jih naknadno ločili na monomere, dimere, tetramere in višje oligomere. Za varianto stefina B (Y31 oz. Tyr31) se je po eluciji izkazalo, da je v večini zastopana v obliki dimer. Vsi rekombinantni proteini imajo namesto aminokisline cistein (Cys) aminokislino serin (Ser) na mestu 3, da bi se ognili prekomernemu obarjanju proteinskih vzorcev zaradi tvorbe disulfidnih mostičkov.

3.3.2.2 Reakcija fibrilacije

Založno raztopino peptida amiloid-beta smo pripravili z raztapljanjem komercialno dostopnega liofiliziranega vzorca peptida amilod-beta v destilirani vodi do končne koncentracije 476 μM. Tako pripravljen koncentrat smo do pričetka same reakcije fibrilacije hranili na ledu. Alikvot založne razopine peptida amiloid-beta smo dodali reakcijski mešanici stefina B v pufru PBS (pH 7.3), nakar smo reakcijo fibrilacije peptida amiloid-beta sprožili s termostatiranjem reakcijske mešanice na 40 °C. Molarno razmerje stefina B proti peptidu amiloid-beta je znašalo od 1:1 do 1:8, z začetno koncetracijo stefina B (katerekoli oligomerne oblike) 17 μM, ki smo ji dodali ustrezno količino peptida amiloid-beta (do končne koncentracije 17, 34, 68 oz. 136 μM). Tekom reakcije fibrilacije smo iz reakcijske mešanice jemali alikvote, ki smo jim merili ThT fluorescenco in jih pripravljali za TEM eksperiment .

3.3.2.3 Merjenje ThT fluorescence

Glej točko 3.1.2.3.

3.3.2.4 Transmisijski elektronski mikroskop (TEM)

Glej točko 3.1.2.5.

3.3.2.5 Površinska plazmonska resonanca (ang. »Surface Plasmon Resonance« - SPR)

SPR eksperimente smo izvedli s pomočjo aparature Biacore X. Peptid amiloid-beta (ligand) smo kovalentno vezali na senzorski čip CM5. Za imobilizacijo liganda na površino čipa smo uporabili Amine Coupling Kit (Bio Rad), ki veže ligande preko aminskih $–NH_2$ skupin. Površino čipa smo aktivirali s 0.4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidom in 0.1 M N-hidroksisukcinimidom ter nanj vezali ligand peptid amiloid-beta, raztopljen v 10 mM acetatnem pufru, pH 4,0. Preostanek prostih reaktivnih mest na čipu smo blokirali z etanolaminom. Da bi preverili stabilnost peptida amiloid-beta v SPR pufrih, smo raztopili in inkubirali peptid 1 minuto v acetatnem pufru pH 4,0 (kot pri vezavi na CM5 čip), dodali ThT barvilo ter 7 minut merili ThT fluorescenco pri 482 nm (z eksitacijo 440 nm). Vezavni partnerji (analiti), ki smo jih s pomočjo mikrotekočinskega sistema spuščali preko površine, so bili: a) monomere, dimere, tetramere in višje oligomere nemutiranega stefina B E31 ter b) dimere variante stefina B Tyr_{31} (Y31). Meritve kinetike so bile izvedene pri konstantni temperaturi 25 °C in tekočinskemu toku 5 μL/min v PBS pufru s pH vrednostjo 7,3. Koncentracijski razpon vezave stefina B na imobiliziran peptid amiloid-beta je bil za Y31 varianto prikazan v intervalu od 0,5 do 200 μM, za nemutirano obliko stefina B E31 pa znotraj intervala od 20 do 200 μM. Odziv liganda na prisotnost analita smo odčitali relativno glede na sosednjo prazno celico, ki je bila aktivirana in blokirana na enak način kot celica z ligandom, le da je bil izpuščen nanos peptida amiloid-beta. Regeneracijo površine senzorskega čipa po vezavi analita na ligand smo dosegli s 3 μl 10 mM Glicina pH 3.0 pri vezavi Y31 variante oz. s 5 μl 2M NaCl pri vezavi nemutirane

oblike stefina B E31.

3.4 Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*

3.4.1 Materiali

3.4.1.1 Kemikalije

Vse uporabljene kemikalije so bile *p.a*. ali višje stopnje čistosti.

1-butanol	Merck
2-propanol	Sigma
aceton	Carlo Erba
adenin sulfat	Serva
agar	Sigma
agaroza	Serva
akrilamid / N,N-metilenbisakrilamid	Serva
ampicilin (natrijeva sol)	Sigma
APS (amonijev persulfat**)**	Serva
Canavanine	Sigma
Chelex	Sigma
Cy3	Amersham
Cy5	Amersham
D-(+)-galaktoza min 99 %	Sigma
D-(+)-glukoza	Sigma
D-(+)-rafinoza	Sigma
DMSO (dimetilsulfoksid)	Merck
DNA-velikostni standardi (1 kb in 100 bp)	MBI Fermentas
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100mM)	MBI Fermentas
DTT (ditiotreitol; $C_4H_{10}O_2S_2$) 1 M	Sigma
EDTA (dinatrijeva sol, dihidrat)	Serva
etanol, 100 %	Carlo Erba
etanol, 96 %	Carlo Erba
etidijev bromid	Sigma
fenol, kisel	Sigma
fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1)	Fluka
formaldehid 20 %	Fluka
geneticin disulfat (G418)	Formedium
glicerol	Carlo Erba
glicin	Serva
HCl, 37 %	Merck
HEPES	Serva
IPTG (izopropil-*D*-1-tiogalaktopiranozid)	Sigma
kalijev acetat	Fluka
kanamicin	Sigma
kazeinski hidrolizat	Sigma
kemikalije za PCR (dNTP, $MgCl_2$)	MBI Fermentas
kloroform	Sigma
kompleksna hranila (ang. »nutrient broth«)	Difco
kvasni ekstrakt	Sigma
L-kanavanin	Sigma
L-alanin	Serva
L-asparagin	Sigma
L-asparaginska kislina	Sigma
L-cistein	Serva
L-fenilalanin	Serva
L-glutamin	Serva

L-glutaminska kislina	Mann Research laboratories
L-glutaminska kislina (natrijeva sol)	Sigma
L-izolevcin	Sigma
L-kanavanin	Sigma
L-levcin	Fluka
L-lizin	Sigma
L-metionin	Serva
L-serin	Sigma
L-tirozin	Serva
L-treonin	Fluka
L-triptofan	Fluka
L-valin	Fluka
Li-acetat	Sigma
metanol	Carlo Erba
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)	Biomol International
MSG (monosodium glutamate)	Sigma
NaCl	Merck
NaDS (natrijev dodecil sulfat)	Serva
NaH_2PO_4	Merck
Na_2HPO_4	Merck
NaN_3	Merck
nanašalni pufer za PAGE, 6X	MBI Fermentas
NaOH	Merck
natrijev acetat	Serva
natrijev bikarbonat	Merck
natrijev borat	Merck
nourseotricin (*cNat*)	Werner BioAgents
označevalec velikosti proteinov: PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
PEG 3350	Fluka
pepton	Sigma
PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid)	Fluka
prolin	Merck
ProLong Antifade reagent z DAPI barvilom ali brez	Molecular Probes, Invitrogen
poli-L-lizina hidrobromid 0,1 %	
razvijalec in fiksir (GBX developer and fixer)	Kodak
S-AEC (S-(2-aminoetil)-L-cistein hidroklorid)	Sigma
ss-DNA (salmon sperm DNA)	Sigma
SyberSafe	Invitrogen
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin)	Merck
Tris	Serva
Triton X-100	Serva
Tween-20	Serva
uracil	Serva
X-Gal	Diagnostic Chemicals
YNB (ang. »Yeast Nitrogen Base«) brez aminokislin	Formedium
YNB brez aminokislin in brez amonijevega sulfata	Sigma
začetni oligonukleotidi	Proligo, Eurofins

3.4.1.2 Encimi in drugi proteini

*Bam*HI	Fermentas
ClaI	New England BioLabs
goveji serumski albumin (*bovine serum albumin*, BSA)	New England BioLabs
*Hind*III	MBI Fermentas
litikaza	Sigma
Pfu DNA-polimeraza	Promega
rekombinantni stefin B	dr. Eva Žerovnik
SacI	MBI Fermentas
T4 DNA-ligaza	New England BioLabs
Taq DNA-polimeraza	MBI Fermentas
reverzna transkriptaza Stratascript	Stratagene

3.4.1.3 Začetni oligonukleotidi

Začetna oligonukleotida za pripravo pRD53:E31

stefB_E_L
5’ - GCGGATCCATGATGTGCGGGGCGCCCTC - 3’

stefB_E_R
5'-GCAAGCTTCTAGAAATAGGTCAGCTCATCATGCT

Začetna oligonukleotida za pripravo pAG25:E31

Pred_GAL1
5' – TATAGGGCGAATTGGAGCTCCACC – 3’

Po_STB
5’ – CGAGGTCGACGGTATCGATAAGC – 3’

Začetna oligonukleotida za pripravo AYJ217 z E31 (za homologno rekombinacijo)

Primer_Lm
5’ –ATCTGTAACTGTTTCTCGGATAAAACCAAAATAAGTACAAAGCCATCGAA
TAGAACTGTTTAGCTTGCCTTGTCCCCGC – 3'

Primer_Dm
5’- GGTGTAGCGGAAAAGGAAGATAAAGGAGGGAGAACAACGTTTTTGTACG
CAGAAACCGCATAGGCCACTAGTGGATCTGA – 3’

Začetna oligonukleotida za potrditev uspešne rekombinacije pri AJY217 z E31

PR_I_ZA_L
5' –TTTTTTCGCCTCGACATCAT– 3’

PR_I_ZA_R
5' –GCAGGTACAGGGTATCAAAA– 3’

3.4.1.4 Protitelesa

- primarna poliklonska kunčja protitelesa proti človeškemu stefinu B (dr. Nataša Kopitar Jerala)
- sekundarna kunčja antimišja in kozja antikunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma, Dakko)
- HCA, Alexa Flour 488 kozja antikunčja protitelesa (Invitrogen – molecular probes)

3.4.1.5 Gojišča

gojišče LB	2,5 g kazeinski hidrolizat (končna konc. 1 %) 10 g NaCl (končna konc. 1 %) 5 g kvasni ekstrakt (končna konc. 0,5 %) (20 g agar (končna konc. 2 %)) do 1 L dH_2O; pH 7,0
gojišče LBA	gojišče LB ampicilin (50 g/mL; končna konc. 0,1 mg/mL)
gojišče YNB	6,7 g YNB brez aminokislin (končna konc. 0,67 %) 20 g vir ogljika (končna konc. 2 %) 0,67 g CSM (-Ura) (20 g agar (končna konc. 2 %)) do 1 L dH_2O
gojišče YPD	10 g kvasni ekstrat (končna konc. 1 %) 20 g pepton, encimski hidrolizat, tip I (končna konc. 2 %) 20 g glukoze (končna konc. 2 %) (20 g agar (končna konc. 2 %)) do 1 L dH_2O
gojišče YPD+*cNat*	990 µL gojišča YPD 10 µL *cNat* (100 mg/L)
gojiščeYPgal+*cNat*	100 µL YP 10x 100 µL gal 20 % 10x 10 µL cNat do 1 mL dH_2O
gojišče YPraf+ *cNat*	1 mL YP 2x 200 µL rafinoza 10x 20 µL cNat do 2 mL dH_2O

Gojišča za analizo SGA:

»drop out« mešanica ak	adenin (3 g), alanin (2 g), asparagin (2 g), asparaginska kislina (2 g), cistein (2 g), fenilalanin (2 g), glutamin (2 g), glutaminska kislina (2 g), glicin (2 g), inozitol (2 g), izolevcin (2 g), levcin (10 g), metionin (2 g), prolin (2 g), serin (2 g), treonin (2 g), triptofan (2 g), tirozin (2 g), uracil (2 g), valin (2 g)
CSM mešanica ak	adenin (10 mg/L), arginin (50 mg/L), asparaginska kislina (80 mg/L), fenilalanin (50 mg/L), histidin (20 mg/L), izolevcin (50 mg/L), levcin (100 mg/L), lizin (50 mg/L), metionin (20 mg/L), treonin (100 mg/L), triptofan (50 mg/mL), tirozin (50 mg/L), uracil (20 mg/L), valin (140 mg/L)
gojišče YPAD (+G418+*cNat*) »trata«	120 mg adenine sulfat 10 g kvasni ekstrat (končna konc. 1 %) 20 g pepton, encimski hidrolizat, tip I (končna konc. 2 %) 20 g glukoze (končna konc. 2 %) (20 g agar (končna konc. 2 %)) (1 mL cNat (100 mg/mL)) (0,5 mL G418 (200mg/L)) do 1 L dH_2O

gojišče Pre-SPO	10 g kvasni ekstrakt (končna konc. 1 %) 20 g agar (končna konc. 2 %) 30 g kompleksna hranila (končna konc. 3 %) 50 g glukoza (končna konc. 5 %) do 1 L dH_2O
gojišče SPO	20 g agar (končna konc. 2 %) 0,5 g CSM-Ura-Trp (končna konc. 0,05 %) 2,5 mL Uracil (20 mM; končna konc. 0,05 mM) 2,5 mM Triptofan (20 mM; končna konc. 0,05 mM) 20 mL kalijev acetat (500 mg/mL; končna konc. 1 %) do 1 L dH_2O
gojišče HS (haploid selection)	6,7 g YNB brez aminokislin (končna konc. 0,67 %) 20 g agar (končna konc. 2 %) 20 g glukoza (končna konc. 2 %) 2 g »drop out« mešanica ak (končna konc. 0,2 %) 0,5 mL kanavanin (100 mg/mL; končna konc. 50 mg/l) 0,5 mL S-AEC (100 mg/mL; končna konc. 50 mg/l) do 1 L dH_2O
gojišče SM (single mutant selection)	gojišče HS glutaminska kislina - natrijeva sol (1g/L) G418 (200 mg/L)
gojišče DM (double mutant selection)	gojišče SM *cNat* (200 mg/L)
gojišče DMgal	gojišče DM z galaktozo kot vir ogljika namesto glukoze

3.4.1.6 Gostiteljske kulture

Escherichia coli

- DH5α (genotip: *SupE44 80lacZΔM15 Δ U169 hdsR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 deoR endA1 phoA*)

Saccharomyces cerevisiae

- BY4742 - nemutiran (genotip: *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)
- BY4741 – zbirka SKO (genotip: *MATa his3Δ leu2Δ ura3Δ met15Δ yyyΔ::kanMX CAN1 LYP1*)
- BY4741 – zbirka SKO: ***erg6***, 12-ta plošča, 22/11 (genotip: *MATa his3Δ leu2Δ ura3Δ met15Δ erg6Δ::kanMX CAN1 LYP1*)
- AJY217 (genotip: *MATα, his3Δ leu2Δ ura3Δ met15Δ can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ*)
- AJY217-AtxA (genotip: *MATα, his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ mfa1Δ::GAL1pr-ATXA natMX*)
- AJY217-*izh3Δ* (genotip: *MATα, his3Δ leu2Δ ura3Δ met15Δ can1Δ::MFA1pr-HIS3 lyp1Δ izh3Δ::natMX*)

3.4.1.7 Vektorji in plazmidi

- pcDNA3:E31 (dr. Slavko Čeru, Institut Jožef Stefan, Slovenija)

- pGEM-T (Promega)
- pGEM-T:E31

- pRD53 (izhaja iz pRS316, s promotorjem *GAL1* in avksotrofnim markerjem *URA3*)
- pRD53:E31

- pAG25 (z rezistenčno kaseto *natMX* – gen *nat1* kodira nourseotricin N-acetil-transferazo)
- pAG25:E31

3.4.1.8 Kompleti reagentov

komplet reagentov za čiščenje DNA z agarozne elektroforeze in produktov PCR-ja Wizard®SV	Promega
komplet reagentov za malo izolacijo plazmidne DNA »Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System«	Promega
komplet reagentov za malo izolacijo plazmidne DNA »Jetquick plasmid MINIPREP spin kit«	Genomed
komplet reagentov »pGEM-T Easy Vector System I«	Promega
komplet reagentov za reverzno transkriptazo	Stratagene
komplet reagentov za verižno polimerizacijo s Pfu polimerazo	Promega
komplet reagentov za ligacijo s T4 DNA ligazo	New England BioLabs

3.4.1.9 Raztopine

4x nanašalni pufer z NaDS za poliakrilamidne gele	200 mM TRIS 400 mM DTT 8 % NaDS 0,4 % bromfenol modro 40 % glicerol
10x elektroforezni pufer	250 mM Tris 2 M glicin 1 % NaDS
10x pufer TAE	0,445 M Tris-acetat pH 8,0 0,01M EDTA
5 % koncentracijski gel	1,25 mL 0,5 mM Tris, pH = 6,8 3,2 mL dH2O 50 µL 10 % NaDS 0,5 mL 40 % akrilamid-bisakrilamid 25 µL 10 % APS 5 µL TEMED
12,5 % ločevalni gel	2,5 mL 1,5 mM Tris, pH = 8,8 3,6 mL dH2O 100 µL 10 % NaDS 3,75 ml 40 % akrilamid-bisakrilamid 50 µL 10 % APS 5 µL TEMED
blokirni pufer	pufer PBS-T 5 % mleko v prahu

hibridizacijska mešanica	18,5 µL Cy3+Cy5 vzorec 3,6 µL 20x SSC 1 µL poliA (10 mg/mL) 0,5 µL 1M HEPES pH 7,0 0,5 µL 10 % NaDS
izpiralni pufer I	340 mL dH_2O 10 mL 20x SSC 1 mL 10 % NaDS
izpiralni pufer II	350 mL dH_2O 1 mL 20x SSC
pufer 1x ETS (za elucijo)	2,85 mL mQ dH2O 60 µL 0,5 M EDTA 30 µL 1,0 M Tris, pH 7,4
pufer 1x NETS	10,5 mL mQ dH2O 1,5 mL 5,0 M NaCl 250 µL 0,5 M EDTA 125 µL 1,0 M Tris, pH 7,4 125 µL 20 % NaDS
pufer 2x NETS	1,37 mL mQ dH2O 480 µL 5,0 M NaCl 80 µL 0,5 M EDTA 40 µL 1,0 M Tris, pH 7,4 32 µL 20 % NaDS
pufer PBS	145 mM NaCl 3 mM NaH_2PO_4 x $2H_2O$ 8 mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$ pH = 7,2
pufer PBS-T	pufer PBS 0,005 % Tween-20
pufer za prenašanje	25 mM Tris 192 mM *L*-glicin 15 mM NaDS 20 % metanol
pufer za razbitje celic kvasovke	10 mM Tris/HCl pH 8,0 2 % Triton X-100 1 % NaDS 100 mM NaCl 1 mM EDTA
raztopina ICH	1 mL Fish Skin Gelatine (FSG) 1 g BSA 100 mL PBS + Na-azid (NaN_3) – za noževo konico
reakcijska mešanica za sintezo cDNA /reakcijo	3 µL Pufer RT (10x) 0,6 µL aa-dNTP: dNTP + aa-dUTP (50x) 3 µL DDT (0,1 M) 4 µL reverzna transkriptaza (50 U/ µL) do 14,5 µL dH_2O

3.4.1.10 Laboratorijska oprema

aparatura za prenos Western P8DS PenguinTM	Owl Separation Systems
aparatura za PCR	MWG Biotech AG
avtomatske pipete P-20, P-200, P-1000	Gilson in Eppendorf
centrifuga RC 5C plus	Sorvall
centrifuge 5402, 5410, 5417R, 5415R, 5810R	Eppendorf
centrifuga za objektna stekelca	Iris StatSpin
centrifugirke, odporne na fenol/kloroform	Nalgene
epruvetke »RNaze, DNaze –free«	Costar
falkonke »phase-lock«	Eppendorf
filter 0,2 µm	Sartorius
filmi Biomax Light Film	Kodak
filter Minisart z velikostjo por 0,2 µm	Sartorius
fluorescenčni mikroskop	Olympus IX81
fluorimeter za mikrotiterske plošče	Tecan, Safire
kadička za agarozno elektroforezo	Owl Separations Systems
kadička za NaDS	Owl Separations Systems
kadička za NaDS PAGE Mini Protean II ™	Biorad
kaseta za razvijanje flmov X-omatic regular screens	Kodak
koncentratorji Centricon	Millipore
konfokalni mikroskop	Leica TCS SP5
kromatografske kolonice	Biorad
magnetna mešala MM-530	Tehtnica
mikrotitrske plošče s 96 odprtinami	Perkin Elmer
nitrocelulozna membrana NC45	Sigma
okvir za poravnavo plošč VP380	V&P Scientific
optični čitalec (scanner za čipe) GenePix 4100A	Axon Instruments
ročni replikator VP386, konice d=1,19 mm	V&P Scientific
robotski manipulator	Adept Plus
pH meter	Metrel
sistem za vakuumsko sterilno filtracijo, 250 in 500 mL	TPP
spektrofotometer Lambda 18	Perkin Elmer
spektrofotometer ND-1000	Nanodrop
sterilne plošče s pokrovom Omni-Tray	Nunc, Thermo Fischer Scintific
stresalnik 30 °C	New Brunswick Scientific
svetlobni mikroskop	Olympus IX81
vodna kopel SW 20	Julabo

3.4.2 Metode

3.4.2.1 Priprava konstrukta E31 z restrikcijskimi mesti za *Hind III* in *Bam HI*:

Vektor pcDNA3:E31 smo vstavili v celice DH5α in iz namnoženih transformiranih kolonij izolorali plazmidno DNA s pomočjo kompleta reagentov za malo izolacijo plazmidne DNA »Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System«. Na izolirani plazmidni DNA smo izvedli verižno polimerizacijo z začetnimi oligonukleotidi za pripravo pRD53:E31 (glej točko 3.4.1.3), preverili prisotnost produktov s pomočjo elektroforeze ter jih eluirali iz gela z uporabo kompleta reagentov za čiščenje DNA z agarozne elektroforeze in produktov PCR-ja »Wizard®SV«.

3.4.2.1.1 Transformacija celic DH5α

200 µL celic DH5α ($A_{600\ nm}$ = 0,4), shranjenih pri -80 °C, smo odtajali na ledu ter jim dodali 3 µL konstrukta pcDNA3:E31 oz. 5 µL kontrolne DNA . Po polurni inkubaciji na ledu smo jih izpostavili 40-sekundnem temperaturnem šoku pri 42 °C, jih prestavili na led za 2 minuti, dodali 0,8 mL gojišča LB in jih 1 h stresali pri 37 °C s hitrostjo 220 obr/min. Nato smo celice zgostili, namazali na plošče LBA ter jih 16 ur inkubirali pri 37 °C.

3.4.2.2 Priprava vektorja pGEM:E31

Za pripravo vektorja pGEM:E31 smo uporabili komplet reagentov »pGEM-T Easy Vector System I«. Po predpisanem postopku smo na produkt verižne polimerizacije konstrukta stefina B E31 dodali poli-A (poli-adenin) podaljške (*Taq* polimeraza, 70 °C, 30 min). Nato smo izvedli ligacijo, transformirali celice DH5α s produktom ligacije (ob tem uporabili modro - beli test) in po prekonočni inkubaciji kolonij pri 37 °C ob stresanju z 220 obr/min izolirali plazmidno DNA pGEM-E31 s kompletom reagentov za malo izolacijo plazmidne DNA »Jetquick plasmid MINIPREP spin kit«.

3.4.2.2.1 Modro – beli test

Modro – beli test pride v poštev za plazmide, ki nosijo zapis za β-galaktozidazo (*lacZ*), s katerim preverimo uspešnost transformacije. Modre kolonije predstavljajo celice brez inserta, bele kolonije vsebujejo željen insert (pozitivna transformacija).

LBA plošče smo 1 h pred nanosom transformiranih celic namazali z mešanico, sestavljeno iz 10 µL 0,1 M IPTG, 40 µL raztopine X-gal in 50 µl vode. Vedno smo uporabili sveže pripravljen X-gal: 20 mg X-Gal smo raztopili v 1 ml DMSO ter shranili v temnem in hladnem (-20 °C) prostoru.

3.4.2.3 Priprava vektorja pRD53:E31

Z vstavitvijo konstrukta stefina B E31 v vektor pRD53 smo konstrukt obogatili z galaktoznim promotorjem *Gal1*.

Na dveh vektorjih, predpripravljenem pGEM:E31 in praznem pRD53, smo v komercialnem pufru Tango izvedli 8-urno restrikcijo pri 37 °C z restrikcijskima encimoma *Bam HI* in *Hind III*. Ustrezno velikost in obliko rezanih produktov smo preverili na elektroforeznem gelu. Po eluciji produktov iz gela smo izvedli ligacijo rezanega konstrukta stefina B E31 in vektorja pRD53 s T4 DNA-ligazo. Po uspešni transformaciji ligacijskega produkta in izolaciji plazmidne DNA smo s testno restrikcijo potrdili prisotnost in ustrezno velikost vektorja pRD53:E31. Trem različnim inačicam istega vektorja pRD53:E31 (A2, D1, D2) smo določili nukleotidno zaporedje. Analiza je potrdila, da so imele vse tri paralelke pričakovano nukleotidno zaporedje.

3.4.2.4 Priprava vektorja pAG25:E31

S prenosom konstrukta stefin B E31 iz vektorja pRD53 v vektor pAG25, je bil konstruktu dodan gen za rezistenco na antibiotik nourseotricin.

Vektor pRD53:E31 je služil za matrično DNA verižne polimerizacije z začetnimi oligonukleotidi PRED_GAL1 in PO_STB. Po eluciji iz gela smo produkt polimerizacije in prazen plazmid pAG25 rezali z restrikcijskima encimoma *ClaI* in *SacI*, nakar smo zlepili nukleotidne konce produktov s T4 DNA-ligazo, uporabili DH5α kot gostiteljske celice ter izolirali plazmidno DNA vektorja pAG25:E31 s kompletom reagentov za malo izolacijo plazmidne DNA »Jetquick plasmid MINIPREP spin kit«.

3.4.2.5 Transformacija seva BY4742 *S. cerevisiae* z vektorjem pRD53:E31

Pripravili smo prekonočno kulturo (30 °C, 230 obr/min) seva BY4742 v gojišču YPD in razredčene celice razraščali dva generacijska časa, da so celice dosegle logaritemsko fazo rasti. Celice smo sprali z vodo in resuspendirali v 0,1 M Li-acetatu. Po odstranitvi supernatanta smo jim dodali predpripravljeno transformacijsko mešanico, inkubirali 30 min pri 30 °C in nadaljnjih 30 min pri 42 °C. Po inkubaciji smo celice sprali z vodo ter ustrezen delež celic razmazali na selekcijsko gojišče YNBglc+CSM-Ura. Plošče smo 16 ur inkubirali pri 30 °C.

Transformacijska mešanica	240 µL 50% PEG 3350 36 µL 1 M Li-acetat 50 µL 2 mg/mL ss-DNA (predhodno 2 min kuhana in prenešena na led) 5 µL plazidne DNA do 360 µL dH_2O

3.4.2.6 Transformacija *S. cerevisiae* seva AJY217 z vektorjem pAG25:E31

Vektor pAG25:E31 smo uporabili za matrično DNA verižne polimerizacije z začetnimi oligonukleotidi za pripravo AYJ217:E31 s homologno rekombinacijo (Primer_Lm in Primer_Dm). Produkt verižne polimerizacije smo vstavili v sev AJY217 s postopkom transformacije *S.Cerevisiae* z Li-acetatom (glej točko 3.4.2.5), le da smo na koncu po polurni inkubaciji transformacijske mešanice s celicami pri 30 °C in nadaljnje pol ure pri 42 °C vzorce sprali z vodo, dodali 1 mL gojišča YPD ter izpostavili celice 30 °C za 2 h. Po spiranju z vodo smo celice razmazali po pološčah YPD+*cNat* in jih 16 ur inkubirali pri 30 °C.

3.4.2.6.1 Izolacija genomske DNA transformiranih celic AJY217 s precipitacijo v etanolu

1,5 mL prekonočne kulture transformiranih celic AJY217 s konstruktom stefina B E31 smo odstranili gojišče ter celicam dodali po 200 µL pufra za razbitje celic: mešanica fenol:kloroform:izoamilalkohola (v razmerju 25:24:1) in steklenih kroglic. Po vorteksiranju in centrifugiranju mešanice smo odvzeli 100 µL zgornje (vodne) faze za nadaljnjo etanolno precipitacijo. Vodni fazi smo dodali 96 % etanol (-20 °C), ki smo ga po enourni inkubaciji pri -20 °C odstranili in dodali 70 % etanol (-20 °C). Zmes smo premešali, odstranili 70 % etanol ter usedlino dobro posušili. Suh pelet smo raztopili v vodi in shranili vzorec pri -20 °C.

3.4.2.6.2 Ugotavljanje uspešnosti homologne rekombinacije na genomu celic AJY217

Genomsko DNA transformiranih celic AJY217 s konstruktom stefina B E31 smo uporabili za testno osnovo za verižno polimerizacijo z »začetnimi oligonukleotidi za potrditev uspešne rekombinacije pri AJY217 z E31«. Prisotnost in ustrezna velikost izbranih odsekov transformiranega genoma je bila potrjena.

3.4.2.7 Določitev morfologije celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31 z mikroskopom Olympus IX81

Kulturo seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31 smo s trdnega gojišča YNBglc+CSM-Ura nacepili v 2 mL tekočega gojišča, ki je kot vir ogljika vseboval rafinozo (YNBraf+CSM-Ura). Raztopino rafinoze smo predhodno sterilno fitrirali in ne avtoklavirali, kot je sicer v navadi pri pripravi sterilnih reagentov. Avtoklaviranje namreč povzroči razpad rafinoze (trisaharid). Celice smo razraščali dva dni pri 30 °C ob stresanju s hitrostjo 220 obr/min. Nato smo jih s centrifugiranjem (3000 obr./min, 3 min) zgostili in sprali z dH_2O, ¼ vseh celic resuspendirali v galaktoznem gojišču (YNBgal+CSM-Ura) in jih ob stresanju inkubirali pri 30 °C dobrih 10 ur, da je OD ($A_{600\ nm}$) narasel na vrednost med 0,6 in 0,7. Celice smo nato analizirali pod mikroskopom s 1000x povečavo (ob 100x povečavi na objektivu in 10x povečavi na okularju).

3.4.2.8 Določitev rastnih krivulj celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31

Kulturo seva BY4742 z pRD53:E31, ki smo jo 2 dni razraščali v gojišču z rafinozo (glej točko 3.4.2.7), smo po spiranju z dH_2O razdelili na dva dela. Hkrati smo izvedli dva poskusa, pri prvem poskusu smo sprožili izražanje stefina B E31 z izpostavitvijo seva galaktoznemu gojišču (YNBgal+CSM-Ura), medtem ko nam je poskus z glukoznim gojiščem (YNBglc+CSM-Ura) služil za negativno kontrolo. Reakcijska mešanica je bila sestavljena iz 280 µL medija in 3 µL prekonočne kulture z rafinoznega gojišča. Celice smo razraščali 48 ur in jim medtem neprekinjeno vsaki 2 minuti merili OD ($A_{600\ nm}$) s spektrofotometrom Tecan.

3.4.2.9 Določitev rastnih krivulj celic seva AJY217 z vstavljenim vektorjem pAG25:E31

Pripravili smo predkulturo v rafinoznem gojišču (YPraf+*cNat*) s sledečimi sevi: sev AJY217 z vstavljenim stefinom B E31 - paralelke 1, 3, 4 (testirani sevi) in sev AJY217 *izh3*Δ, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo. Vpeljava dobro preučenega seva AJY217 *izh3*Δ (odporen na nourseotricin - *cNat*) kot negativno kontrolo nam je omogočila uporabo antibiotika nourseotricina v vseh gojiščih, s čimer smo izničili morebiten vpliv antibiotika na potek eksperimenta. Po dveh dneh smo namnožene celice sprali, zgostili in alikvotirali v reakcijske mešanice, kjer smo v gojišču YPgal+*cNat* vzpodbudili izražanje stefina B E31, medtem ko do tega pri gojišču YPD+*cNat* ni prišlo. Celice smo razraščali 146 ur in jim medtem vsaki 2 minuti merili OD ($A_{600\ nm}$) s spektrofotometrom Tecan-om.

3.4.2.10 Potrditev prisotnosti stefina B v treh bioloških ponovitvah seva BY4742 z vektorjem pRD53:E31 s prenosom »Western«

3.4.2.10.1 Priprava celičnih lizatov celic seva BY4742 z vektorjem pRD53:E31

Kulturo seva BY4742 z pRD53:E31, ki smo jo 2 dni razraščali v gojišču z rafinozo (glej točko 3.4.2.7), smo s centrifugiranjem (3000 obr./min, 3 min) zgostili in sprali z dH_2O. Eno četrtino vseh celic smo prenesli v galaktozno gojišče za pričetek izražanja stefina B E31, hkrati pa smo pripravili enako količino celic za negativno kontrolo v glukoznem gojišču. Celice smo razraščali približno 10 ur, da je OD ($A_{600\ nm}$) narasel do vrednosti med 0,6 in 0,7. Koncentracijo celic različnih paralelk smo normirali in jih po spiranju z vodo resuspendirali v nanašalnem puferu za poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim detergentom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS) in reducentom DTT, suspenzijo celic inkubirali 10 minut pri 100 °C ter jo, pripravljeno za uporabo, shranili na -20 °C.

3.4.2.10.2 Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) smo uporabili kot dokazno metodo za izražanje vstavljenega proteina (Stefina B E31) ob aktivaciji galaktoznega promotorja. Poliakrilamidni gel je bil sestavljen iz ločevalnega in koncentracijskega gela. Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali nanašalni pufer, ki je vseboval NaDS in DTT. Za kontrolo velikosti proteinov smo, poleg naših vzorcev, na gel nanesli tudi proteinske standarde. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru v aparaturi za elektroforezo pri konstantnem toku 30 mA/gel.

3.4.2.10.3 Detekcija proteinov s prenosom »Western«

Iz poliakrilamidnega gela smo prenesli proteine pod vplivom električnega toka na nitrocelulozno membrano. Prenos proteinov je potekal 120 minut v prenašalnem pufru pri konstantnem toku 200 mA. Po končanem prenosu smo nezasedena vezavna mesta na membrani blokirali z enourno inkubacijo membrane v blokirnem pufru pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju.V blokirnem pufru smo redčili tudi protitelesa, ki smo jih uporabili za detekcijo proteinov. Najprej smo preko noči membrano izpostavili raztopini primarnih protiteles (primarna poliklonska kunčja protitelesa proti človeškemu stefinu B, začetna koncentracija 1,0 mg/mL, redčitev 1:800) pri 4 °C. Nato smo membrano trikrat sprali s pufrom PBS-T (po 15 minut), nakar je sledila dveurna inkubacija pri sobni temperaturi s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo (0,8 mg/mL, redčitev 1:2000). Ponovno smo membrano sprali trikrat po 15 minut s pufrom PBS-T. Vse stopnje inkubacij so potekale ob rahlem stresanju. Za detekcijo proteinskih lis na nitrocelulozni membrani smo uporabili sistem ECL, ki temelji na kemiluminiscenčni reakciji ter fotografski film X-Omat (Kodak), občutljiv na kemiluminiscenco.

3.4.2.11 Časovno spremljanje izražanja stefina B E31 pri sevu D22 (celice BY4742 z vektorjem pRD53:E31) s prenosom »Western«

Kulturo seva D22, ki smo jo 2 dni razraščali v gojišču z rafinozo (glej točko 3.4.2.7), smo zgostili s centrifugiranjem (3000 obr./min, 3 min) in sprali z dH_2O. Eno četrtino vseh celic smo prenesli v galaktozno gojišče za pričetek izražanja stefina B E31, hkrati pa smo pripravili enako količino celic za negativno kontrolo v glukoznem gojišču. Celice smo razraščali 48 h, pri čemer smo jemali alikvote vzorca iz gojišča ob različnih časovnih točkah: 0, ½, 1, 2, 6, 10 in 48 h. Koncentracijo celic različnih alikvotov smo normirali in jih po spiranju z dH_2O resuspendirali v nanašalnem pufru za poliakrilamidno gelsko elektroforezo z NaDS in DTT. Suspenzijo celic smo kuhali 10 minut pri 100 °C ter zamrznili na -20 °C.

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS in detekcijo proteinov s prenosom »Western« smo izvedli po postopku, opisanem pod točkama *3.4.2.10.2* in *3.4.2.10.3*, s sledečo izjemo: po prenosu proteinov na membrano smo le-to inkubirali v raztopini primarnih protiteles, redčenih v razmerju 1:500, sekundarna protitelesa pa smo redčili v razmerju 1:1000.

3.4.2.12 Potrditev prisotnosti stefina B E31 v sevu 3 (celice AJY217 z vektorjem pAG25:E31) s prenosom »Western«

Kulturo seva 3 smo iz trdnega gojišča YPD+*cNat* nacepili v 2 mL tekočega gojišča, ki je kot vir ogljika vseboval rafinozo in antibiotik nourseotricin (YPraf+*cNat*). Celice smo razraščali dva dni pri 30 °C ob stresanju s hitrostjo 220 obr/min. Nato smo jih zgostili, sprali z dH_2O, četrtino vseh celic resuspendirali v galaktoznem gojišču (YPgal+*cNat*) in jih ob 10 h stresanju inkubirali pri 30 °C. Za negativno kontrolo smo uporabili dobro preučen sistem celic AJY217 z integriranim proteinom AtxA (amoditoksin A), tako da je bil v obeh gojiščih prisoten antibiotik nourseotricin, s čimer smo izničili morebiten vpliv antibiotika na potek poskusa. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili predhodno potrjen sev D22 (celice BY4742 z insertom pRD53:E31), namnožen v gojišču YNBgal+CSM-Ura. Koncentracijo celic različnih alikvotov smo normirali in jih po spiranju z dH_2O resuspendirali v nanašalnem pufru za poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodanim NaDS in DTT. Suspenzijo celic smo kuhali 10 minut pri 100 °C ter zamrznili na -20 °C.

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS in detekcijo proteinov s prenosom »Western« smo izvedli po postopku, opisanem pod točko 3.4.2.11.

3.4.2.13 Tehnika za sistematično določanje sintetičnih genetskih interakcij v kvasovki *S. cerevisiae* ob indukciji prekomernega izražanja stefina B (ang. »synthetic dosage lethality« - SDL)

Za eksperiment določanja sintetičnih genetskih interakcij smo izbrali sev AJY217, v katerega smo vstavili vektor pAG25: E31. Vektor pAG25, v našem primeru nosilec zapisa preiskovanega proteina stefina B E31, je nosil zapis za N-acetil-transferazo, s čimer nam je omogočil delo s selekcijskimi gojišči, obogatenimi z antibiotikom nourseotricinom (*cNat*). Celoten ekspriment je bil sestavljen iz osmih zaporednih korakov. Po vseh korakih precepljanja smo plošče inkubirali pri 30° C, edino procesa sporulacije in križanja sta potekala pri 22° C oziroma pri sobni temperaturi.

Na začetku smo pripravili prekonočno kulturo seva 3 celic AJY217 z vstavljenim stefinom B E31 v tekočem gojišču YPD+*cNat*, ki smo ga uporabili za pripravo trate (enakomerno razmazana kultura po bogatem gojišču YPAD+*cNat*). Nato smo na gojišče YPAD+G418 s pomočjo robotskega manipulatorja (Adept) precepili kolonije knjižnice delecijskih mutant (zbirka SKO) in na iste točke gojišča še trato preverjanega seva 3, s čimer je prišlo do križanja med zbirko SKO paritvenega tipa *Mat* a in preverjanim sevom 3 nasprotnega paritvenega tipa *Mat* α. Vse korake smo izvajali v formatu 768 (na eni plošči dve ponovitvi formata 384, tj. 24 stolpcev x 16 vrstic). Plošče smo preko noči inkubirali pri 30 °C. V drugem koraku smo kolonije precepili na bogato gojišče, ki je vsebovalo tako geneticin kot nourseotricin (YPAD+G418+*cNat*), ter s tem omogočili rast le s križanjem nastalim heterozigotnim diploidom. Sledilo je precepljanje diploidov na predsporulacijsko gojišče (Pre-SPO), ki vsebuje poleg kvasnega ekstrakta tudi kompleksna hranila (30 g/l) ter večji delež glukoze (5 % glukoze), s čimer se poveča učinkovitost sporulacije. V četrtem koraku smo iz Pre-SPO plošč z replikatorjem ročno precepili kolonije na revno gojišče, ki je vsebovalo kalijev acetat (1 %) in le 0,05 % ogljika in dušika (sporulacijski medij, SPO), kar je induciralo sporulacijo celic (iz diploida smo po procesu mejoze dobili štiri haploidne spore). Nastale spore

smo nato v naslednjih dveh korakih precepili na gojišče, ki je omogočalo selektivno kalitev haploidov paritvenega tipa *Mat* a (gojišče HS). To minimalno gojišče, brez histidina, je omogočilo rast le celicam paritvenega tipa *Mat* a, saj je preverjalni sev 3 vseboval *MFA1pr-HIS3* reporter. Reporter ima namreč v haploidih paritvenega tipa *Mat* α in v diploidih *Mat* a/α zavrto izražanje. V tem koraku smo torej izločili *Mat* α haploide ter diploide. Gojišče HS je za dodatno selekcijo vsebalo še kanavanin (50 mg/l) in S-AEC (50 mg/l). Kanavanin je aminokislinski analog arginina, ki je toksičen za celico, ko ga ta vgradi v proteine. Celice, ki imajo *can1Δ* mutacijo (okvarjena arginin permeaza) so odporne na kanavanin, saj ga ne morejo vnesti v celico. S-AEC je analog lizina in deluje po enakem principu kot kanavanin. Celice, ki so *lyp1Δ* (okvarjena lizin permeaza) so odporne na S-AEC. Po dveh korakih selekcije *Mat* a haploidov smo kolonije precepili na enojno selekcijsko gojišče SM1, ki je zaradi prisotnosti antibiotika geneticin omogočilo rast *Mat* a haploidom z delecijo iz zbirke SKO. Na koncu smo v osmem koraku precepili kolonije na dvojno selekcijsko gojišče (DM) z antibiotikom nourseotricin (100 mg/l) in s tem omogočili rast le celicam, ki vsebujejo obe deleciji (preverjano delecijo in delecijo, ki izvira iz zbirke SKO). Z zadnjim korakom smo dobili urejeno zbirko haploidnih dvojnih delecijskih mutant. S precepitvijo le-teh na gojišče DMgal z galaktozo kot vir ogljika (prekomerno izražanje stefina B E31) in vzopredno na gojišče DMglc z glukozo kot vir ogljika (negativna kontrola) smo z relativno primerjavo rasti mutiranih sevov na obeh ploščah z rastjo nemutiranih sevov določili sintetične interakcije (sintetično letalen fenotip) ter počasnejšo rast (počasi rastoči fenotip) kolonij na gojišču DMgal v primerjavi z rastjo na gojišču DMglc.

Analizo SDL smo izvedli v formatu 786 kolonij/ploščo, kar zajema dve biološki ponovitvi po 393 kolonij/ploščo. Vsako biološko ponovitev smo analizirali posebej, s čimer smo dobili dva seta podatkov relativnih sposobnosti rasti dvojnih mutant.

Genetske interaktorje smo določili kvantitativno s skeniranjem plošč in polavtomatskim izračunom relativne sposobnosti rasti sevov. Pri izvedbi polavtomatskega računa smo se poslužili postopka, opisanega v diplomskem delu Petre Kaferle (Kaferle, 2008). Izračun temelji na predpostavki, da lahko zaradi različne prepustnosti svetlobe pri različno debelih plasteh celic pri skeniranju pridobimo informacijo o volumnu kolonij. Skenirane plošče smo analizirali s programom GenePix Pro 5.1 (Axon Instru,emts, Molecular Devices, ZDA). Za vsako ploščo zbirke SKO smo pripravili definicijsko datoteko z mrežo kolonij s pripadajočimi oznakami izbitih genov ter datoteko za določitev vrednosti ozadja. S programom GenePix smo analizirali intenziteto znotraj določenih indikatorjev pri kolonijah in mediano intenzitet pikslov pri podatkih za izračun ozadja. Izračun relativne sposobnosti rasti z makri, razvitimi v programu Excel, je zajemal štiri korake: izračun intenzitete ozadja, izračun intenzitete kolonij, izračun relativnega volumna kolonij in izračun relativne sposobnosti rasti seva.

Pri določitvi meje za značilne genetske interaktorje obeh bioloških ponovitev smo upoštevali tiste mutante, katerih relativna sposobnost rasti je bila pod vrednostjo 0,4 (2,5-krat slabša relativna sposobnost rasti) v eni biološki ponovitvi in hkrati pod vrednostjo 0,67 (1,5-krat slabša relativna sposobnost rasti) v drugi biološki ponovitvi (Mattiazzi, 2010).

3.4.2.14 DNA mikromreže

Zbiranje celic: Za eksperiment z mikromrežami smo izbrali celice BY4742 z vstavljenim vektorjom pRD53:E31 z galaktoznim promotorjem (sev D22). Za negativno kontrolo smo uporabili celice BY4742 z vstavljenim praznim vektorjem pRD53. Oba tipa celic smo najprej pripravili v rafinozni predkulturi (gojišče YNBraf CSN-Ura), ki smo jo namnožili v galaktoznem mediju YNBgal CSM-Ura do končnega volumna 1200 mL. Postopek razraščanja smo ustavili v eksponentni fazi pri OD ($A_{600\ nm}$) okoli vrednosti 0,35, saj je v stacionarni fazi stena kvasnih celic trša. Celice smo filtrirali skozi 0,2 μm filter s pomočjo vodne nuče (da centrifugiranje ne bi vplivalo na izražanje genov), jih skupaj s filtrom namočili v tekoč N_2 in shranili v falkonkah pri -80 °C.

Izolacija celokupne RNA: Pri izolaciji RNA smo morali biti pozorni na to, da smo uporabljali material, namenjen izključno delu z RNA (avtoklaviranje steklovine RNaz ne uniči, ker so bolj obstojne od DNaz) in da so bile delavne raztopine zakisane, ker se RNA v alkalnem razgradi oz. se ne precipitira.
Zvitku filtra s celicami, ki smo ga prestavili z -80 °C na led, smo dodali acetatni pufer pH 5,2 ter previdno sprali celice s filtrov. Raztopini celic smo dodali 1 mL 20 % NaDS in nato še 12 mL kislega fenola. Mešanico smo z namenom razbitja celic inkubirali v vodni kopeli, segreti na 65 °C in izmenično vorteksirali 10 minut. Postopek razbitja celic se je nadaljeval s 5-minutnim temperaturnim šokom na ledu. Po 15-tih minutah cetrifugiranja pri 10.000 rpm smo izvedli ekstrakcijo s kloroformom, pri kateri so proteini ostali v nepolarni organski fazi, RNA pa se je raztopila v vodni fazi. Za ločitev dveh ekstrakcijskih faz smo uporabili falkonke »phase-lock« z gelom za vezavo nepolarne faze. Po 5-tih minutah

centrifugiranja falkonk pri 25°C in 1500 rpm smo ekstrakcijski mešanici dodali še 13 mL kloroforma in ponovili centrifugiranje. Za precipitacijo RNA iz vodne faze smo supernatantu dodali 1/10 volumna 3 M Na-acetata s pH 5,4 in podvojili volumen mešanice z dodatkom izopropanola. Temu je sledilo 45-minutno centrifugiranje pri 4 °C in 12000 rpm. Za odstranitev nečistoč smo supernantantu dodali 70 % etanol, centrifugirali 20 minut in pelet posušili v eksikatorju. Vodno raztopino peleta (celokupne RNA) smo shranili pri -80 °C.

Izolacija poliA RNA: Vodno raztopino RNA smo za 10 minut segreli na 65 °C, da bi se raztopila vsa RNA. Hkrati smo na 65 °C segreli tudi sveže pripravljene pufre 1x NETS, 2x NETS in 1x ETS. Gel v epruvetah z navojem smo 3-krat sprali z 1x NETS-om, dodali 2x NETS in hkrati enako količini vodne raztopine RNA. Mešanico smo 1 h nežno mešali. Vmes smo pripravili kromatografske kolonice (regeneracija kolonic: čez gel/oligo-dT-celulozo smo spustili 10-kratni volumen gela 0,01 M Tris-HCl s pH 7,5 z dodanim 1 mM EDTA, zatem še 10-kratni volumen gela 0,1 M NaOH, po prenosu gela v nove kromatografske epruvetke smo le-te centrifugirali 1 min pri maksimalnih obratih, da se je gel dobro posedel), previdno vanje prenesli mešanico gela in RNA, 3-krat sprali z 1x NETS-om ter eluirali RNA z 1x ETS (elucijskim pufrom). Eluatu smo dodali 3 M Na-acetat in izopropanol ter ikubirali vzorec 1 h pri -20 °C (precipitacija). Sledilo je enourno centrifugiranje pri 4 °C. Supernatant smo previdno odstranili ter sprali pelet z 70 % etanolom.Vzorec smo posušili, raztopili v vodi in shranili pri -80 °C.

Sinteza cDNA: 14,5 µL vzorca RNA smo dodali 1 µL začetnih oligonukleotidov oligo-dT ter 8 minut pustili v termobloku pri 70 °C. Po končani reakciji smo vsakemu vzorcu RNA dodali po 14,5 µL reakcijske mešanice za sintezo cDNA in inkubirali 2 h v termobloku pri 42 °C. Nato smo celotni mešanici dodali 10 mM EDTA in NaOH do končne koncentracije 50 mM ter vse skupaj inkubirali 10 minut pri 65 °C (v alkalnem mediju smo razgradili preostanek mRNA). Za čiščenje cDNA produkta smo uporabili komplet reagentov za čiščenje DNA z agarozne elektroforeze in produktov PCR-ja Wizard®SV. Prisotnost cDNA smo potrdili na elektroforezi in določili koncentracijo cDNA z Nanodropom.

Barvanje z barvili Cy3 in Cy5: Vzorec smo skoncentrirali na končni volumen 10 µL in mu dodali 1 µL 0,1 M Na-bikarbonata pH 9,25. Na posušeno barvilo Cy3/Cy5 smo dodali vzorec cDNA, intenzivno premešali ter zmes inkubirali 1 uro v temnem prostoru na sobni temperaturi. Po končanem barvanju smo vzorec cDNA sprali s pomočjo kompleta reagentov za čiščenje DNA.

Cy5	rdeč signal	635 nm	D22 (testni vzorec E31)
Cy3	zelen signal	532 nm	pRD53 (kontrola)

Hibridizacija: Cy3 in Cy5 vzorca istega seva smo združili v skupno epruvetko in pripravili hibridizacijsko mešanico. Po dveminutnem kuhanju smo vzorce ohladili, potem pa jih s pomočjo distančnikov previdno nanesli na mikromreže. Tako pripravljene mikromreže smo prenesli v kovinsko komoro za hibridizacijo, ki smo jo izdatno navlažili, nato pa vzorce v komori izpostavili prekonočni inkubaciji (14 do 16 h) pri 65 °C.

Izpiranje mikromrež: Izpiralni pufer I smo uporabili za izpiranje hibridizacijske mešanice z mikromrež, izpiralni pufer II pa za odstranitev reducenta. Pred pregledom mikromrež z optičnim čitalcem smo le-te posušili s 5-minutnim centrifugiranjem pri 600 obr/min na sobni temperaturi.

Slike, posnete z optičnim čitalcem GenePix 4100A (Axon Instruments), smo analizirali z uporabo proizvajalčeve programske opreme (GenePix Pro 6.0, Axon Instruments) in vrednosti razmerja median Cy5 in Cy3 normalizirali s programom Nomad. Pri določitvi genov z značilno spremenjeno ravnijo izražanja smo upoštevali pogoj, da se mora raven izražanja spremeniti za več kot 3-krat (absolutna vrednost log 2 vrednosti razmerja median intenzitet Cy5 (testni vzorec) in Cy3 (kontrolni vzorec) mora biti večja od 1.585).

3.4.2.15 Imunofluorescenca - potrditev prisotnosti agregatov stefina B E31 v transformiranih kvasnih celicah BY4742

Pripravili smo prekonočno kulturo transformiranih celic BY4742 s praznim vektorjem pRD53 in z vektorjem pRD53:E31 (sev D22) in v rafinoznem gojišču YNB raf CSM-Ura. Po 14-16 urah razraščanja smo namnožene celice zgostili in sprali z vodo, nakar smo osmino vseh celic uporabili za pripravo prekomerno izraženega stefina B E31 v sevu D22 (galaktozno gojišče YNB gal CSM-Ura) ter za pripravo negativne kontrole (prazen pRD53 vektor) na glukoznem gojišču (YNB glc CSM-Ura). Celice smo razraščali 12 ur, da so dosegle stacionarno fazo. Alikvotu (petini vseh celic) gojišča s celicami smo dodali

20 % vodno raztopino formaldehida (do končne koncentracije 4 %) ter 30 minut inkubirali pri 30 °C, da je formaldehid prešel v celice. Nato smo celice sprali s sveže pripravljenem pufrom PBS z dodanim 0,15 M glicinom. Z namenom razgraditi celično steno smo polovico vseh celic izpostavili detergentu 0,02 M DTT in encimu litikazi (2000 U/mL). 400U/mL litikaze je 30 minut delovalo pri 30 °C, nakar smo celice sprali s pufrom PBS, dodali raztopino polilizina do končne koncentracije 0,01 % in tretjino vseh celic nanesli na vnaprej pripravljeno objektno stekelce (15-minutno sušenje kaplje 0,01 % poli-L-Lysin hidrobromida na stekelcu pri 37 °C). Celice smo na objektno stekelce nanesli z uporabo centrifuge s 2200 rpm (6 minut), jih nežno sprali s PBS, za 6 minut potopili v ohlajen metanol (-20 °C) in takoj zatem za 30 sekund v ohlajen aceton (-20 °C). Celice smo posušili, 1 uro blokirali prosto površino stekelca z raztopino BSA v PBS pri sobni temperaturi ter pripravili prekonočno inkubacijo celic s primarnimi protitelesi proti stefinu B (poliklonska kunčja, redčitev 1:800) v ICH raztopini.

Naslednji dan smo celice 3-krat sprali s PBS, jih inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles (HCA, Alexa Flour 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen – molecular probes), redčitev 1:800) 1 uro na sobni temperaturi, sprali in celice posušili. Na suhe celice smo kanili kapljo »Prolong Gold antifade reagent with DAPI« (Molecular probes), ki je barvilo v sekundarnih protitelesih ščitilo pred bledenjem in hkrati obarvalo celična jedra. Tako pripravljena stekelca smo do opazovanja pod mikroskopom spravili v hladen (+4 °C), suh in temen prostor. Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 ter analizirali s programom ImageJ.

3.4.2.16 Inhibicija razgradnje proteinov

Za inhibicijo proteasoma smo izbrali dva inhibitorja, MG132 in PMSF. Iz knjižnice delecijskih mutant smo izbrali sev *erg6* z oslabljeno celično membrano, saj membrana seva divjega tipa *S.cerevisiae* onemogoča prehod kemikaliij v notranjost celic (Lee in Goldberg, 1998).

Sev *erg6* smo namnožili v prekonočni kulturi YPD pri 30 °C in izvedli transformacijo celic s konstruktom stefin B E31 (plazmidna DNA seva D22) in s praznim pRD53 za negativno kontrolo. Na trdnem gojišču YNB+CSM-Ura so pri temperaturi 30 °C po petih dneh zrasle majhne kolonije, ki so dosegle običajno velikost po sedmih dneh rasti. Kolonije smo precepili v tekoče gojišče YNBglc+CSM-Ura, izolirali genomsko DNA (glej točko *3.4.2.6.1*) in z verižno polimerizacijo potrdili uspešnost kloniranja.

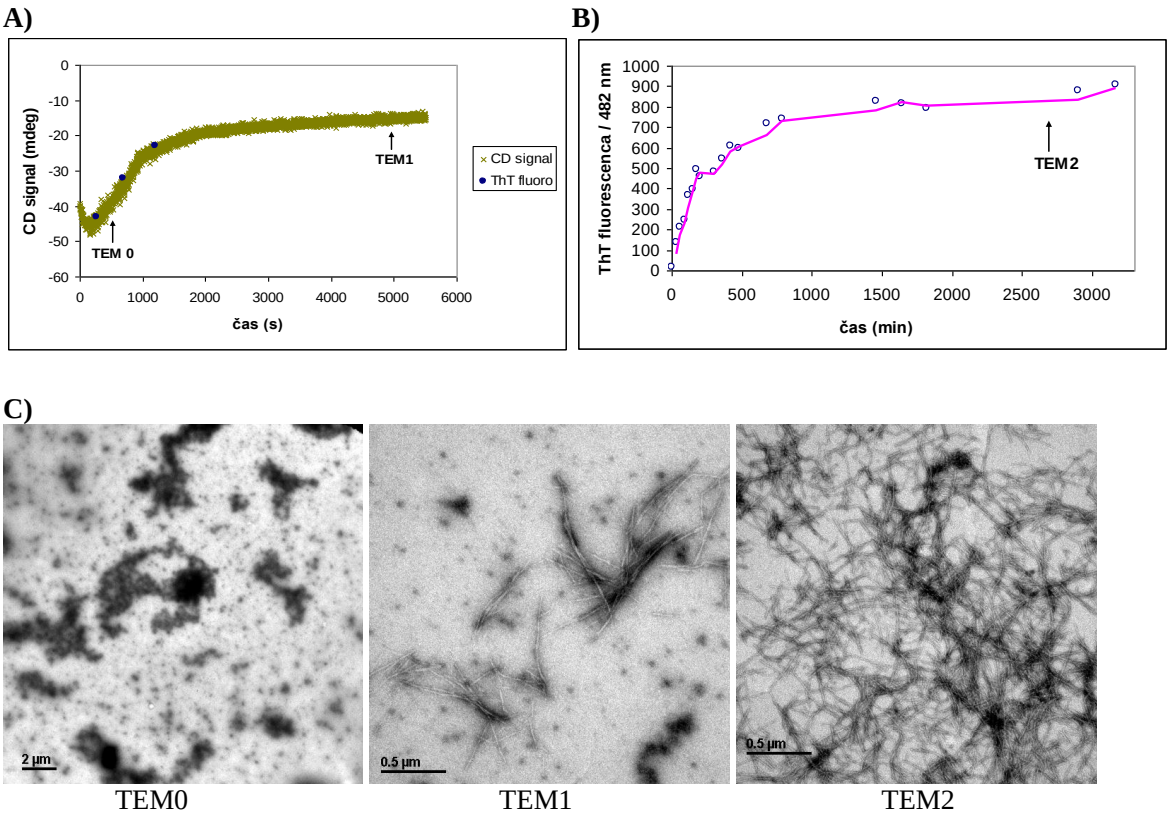
Vpliv inhibitorjev smo preverili z določitvijo hitrosti rasti celic (rastne krivulje). Rastne krivulje smo določili po postopku, opisanem v točki 3.4.2.8, s tem da smo predkulturi z rafinoznega gojišča dodali inhibitorje v bodisi galaktozno bodisi glukozno gojišče. Rafinozne prekonočne kulture smo pri inkubaciji zaradi povečane občutljivosti seva *erg6* stresali le s 190 obr/min (Jensen-Pergakes in sod., 1998).

4 Rezultati

4.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril

S predhodnimi študijami so Žerovnik in sod. (Žerovnik in sod., 2002, 2006, 2007) ugotovili, da se proces amiloidne fibrilacije prične s fazo zakasnitve, kjer pride do kopičenja zrnastih agregatov (Jenko Kokalj in sod., 2007). Začetno fazo zakasnitve lahko zmanjšamo s povišanjem temperature, dodajanjem organskih topil (TFE) in/ali predhodno tvorjenih fibril ter z izpostavitvijo preiskovanega vzorca povišanemu magnetnemu polju (Jenko in sod., 2004).

Na Sliki 2 je prikazana reakcija fibrilacije z začetno fazo zakasnitve in sledečo rastjo fibril (podaljševanje). S pomočjo različnih tehnik lahko zapazimo dve fazi procesa fibrilacije. Prvi, začetni fazi lahko sledimo z metodo cirkularnega dikroizma (CD) in deloma z rahlo spremembo ThT fluorescence (Slika 2A), medtem ko lahko drugo fazo opazujemo zgolj s spremembo ThT fluorescence (Slika 2B). V prvi fazi se zrnasti agregati združujejo v krajše fibrile - protofibrile (TEM0 and TEM1 na Sliki 2C), ki se v drugi fazi podaljšajo in zgladijo v zrele fibrile, ob čemer reakcijska krivulja doseže plato (TEM2 na Sliki 2C).

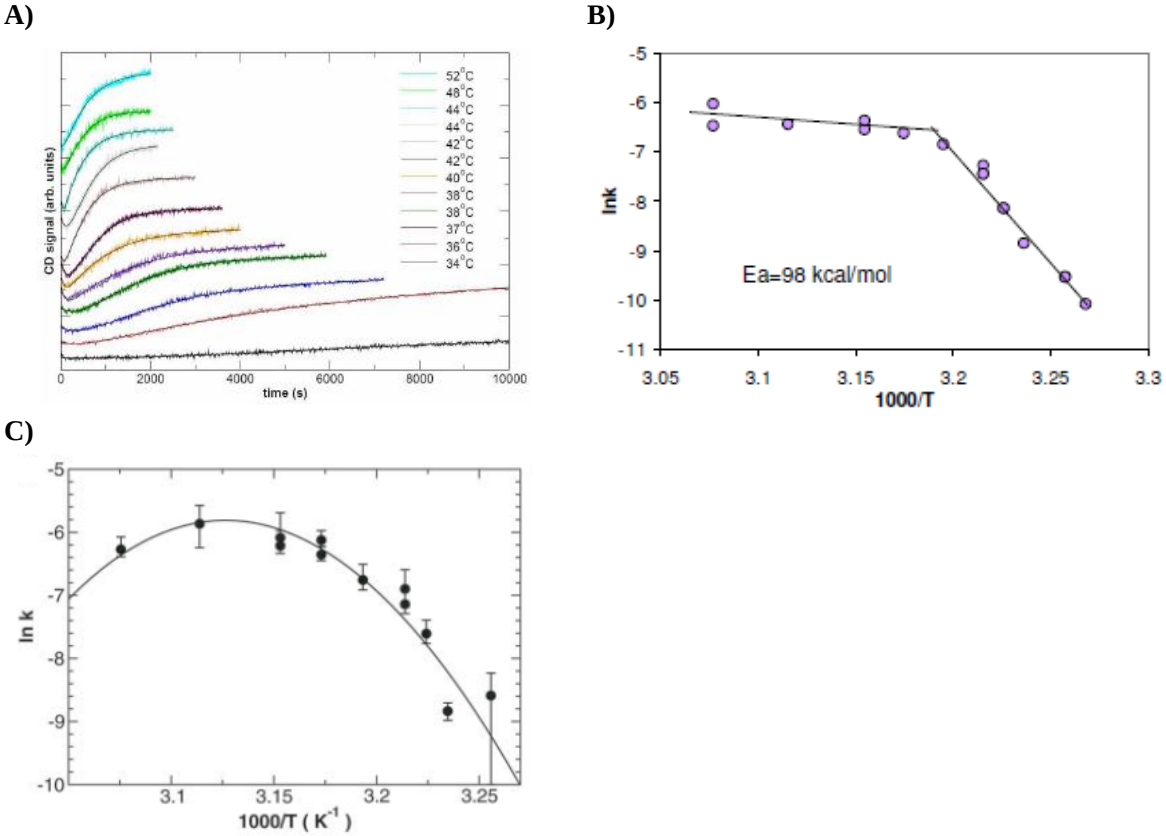


Slika 2: *Analiza oblik agregatov med procesom fibrilacije stefina B.* (A) Fibrilacija stefina B s koncentracijo 34 µM, pri temperaturi 41 °C, pH 4,75, 10 % TFE, ki odraža spremembo CD signala pri valovni dolžini 222 nm (neprekinjena črta) in spremembo ThT fluorescence pri valovni dolžini 482 nm (posamezne točke). (B) Ista reakcija fibrilacije kot pri točki (A), spremljana daljši čas z metodo ThT fluorescence. (C) Morfologija tvorjenih agregatov pri istih pogojih kot pri (A) in (B), posneta s pomočjo transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM). Časovne točke odvzema vzorcev za slike TEM0, TEM1,TEM2 so označene s puščicami na slikah (A) in (B). TEM0 prikazuje vzorec odvzet ob koncu faze zakasnitve, TEM1 med fazo rasti in TEM2 v plato fazi.

4.1.1 Temperaturna odvisnost hitrosti fibrilacije prve faze (sprememba CD signala)

Reakcijo fibrilacije stefina B smo pripravili v standarni razopini: proteinska koncentracija 34 µM, 0,015 M acetatni pufer, 0,15 M NaCl, 10 % TFE, pH vrednost 4,75. Reakcije smo spremljali s pomočjo CD spektrofotometrije pri različnih temperaturah znotraj intervala med 34 °C in 52 °C (Slika 3A). Spremembo signala CD pri valovni dolžini 222 nm (Slika 3A) je mogoče jasno zapaziti pri temperaturi nad 35 °C, kjer pride do izostanka začetne faze zakasnitve. Amplituda signala CD pada z nižanjem temperature in je ni več mogoče zaznati pri temperaturah, nižjih od 32 °C.

Kinetiko reakcij, posnetih s CD spektrofotometrijo, smo opisali s prileganjem dveh eksponentnih funkcij, ki so vrisane na diagramu, skupaj z eksprimentalnimi podatki. Iz prilegajočih se krivulj smo določili počasnejšo konstanto hitrosti k. Za izračun aktivacijske entalpije reakcije (E_a) smo uporabili Arrhenius-ov diagram, ki podaja ln(k) v odvisnosti od 1/T. Najprej smo povezali eksperimentalne podatke z dvema premicama (Slika 3B), ki sta se sekali pri 40 °C, kar je nakazovalo spremembo poteka reakcije znotraj opazovanega območja. Ocenjena vrednost E_a za začetno fazo je tako znašala 98 kcal mol^{-1}, kar je blizu energiji, potrebni za odvitje proteinov ter za prepletanje domen (Jerala in Žerovnik, 1999). Nato pa smo predpostavili konstantno spremembo specifične toplotne kapacitete (Δc_p) in eksperimentalne podatke povezali s krivuljo (Slika 3C). S prilagajanjem parametrov enačbe na Sliki 4 smo določili vrednost Δc_p, ki je (ob vrednosti ΔH_0 = 95 kcal mol^{-1}) znašala -8,2 kcal mol^{-1} K^{-1}.



Slika 3: *Temperaturna odvisnost prve faze fibrilacije*. (A) Sprememba CD signala pri valovni dolžini 222 nm za reakcijo v standardni raztopini znotraj temperaturnega intervala 34-52 °C. (B) Arrhenius-ov diagram konstant hitrosti, določenih pri (A). Eksperimentalni podatki so povezani z dvema premicama. (C) Arrhenius-ov diagram konstant hitrosti, določenih pri (A). Eksperimentalni podatki so povezani s krivuljo, ki izhaja iz enačbe na Sliki 4 in predpostavke o konstantni Δc_p.

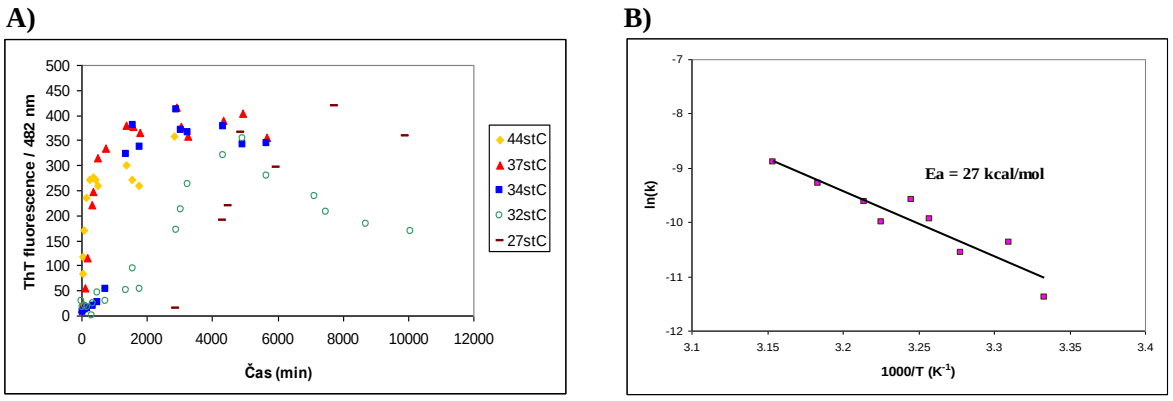
$$\ln k = \frac{-\Delta H_0}{RT} - \frac{\Delta C_p}{R}\left(1 - \frac{T_0}{T} + \ln\frac{T_0}{T}\right) + \text{const.}$$

Slika 4: *Enačba za določitev entalpije aktivacije oziroma aktivacijske energije*, pri čemer je k *konstanta reakcijske hitrosti,* ΔH_0 *sprememba entalpije,* Δc_p *sprememba specifične toplotne kapacitete pri konstantnem tlaku,* T *temperatura,* T_0 *referenčna temperatura ter* R *splošna plinska konstanta.*

4.1.2 Temperaturna odvisnost hitrosti fibrilacije druge faze (sprememba signala ThT fluorescence)

Fibrilacijo stefina B v standardni raztopini smo spremljali s spektrofotometrijo ThT fluorescence znotraj temperaturnega intervala med 27 °C in 44 °C (Slika 5A). Pri višjih temperaturah lahko poleg opazovane druge faze fibrilacije zaznamo tudi prisotnost prve faze (značilna sprememba CD signala), ki ji pripada hitrejša konstanta hitrosti rasti fibril, medtem ko počasnejša konstanta hitrosti rasti zaznamuje drugo fazo.

Za izračun konstant hitrosti podaljševanja fibril v drugi fazi procesa smo krivuljam ThT fluorescence pri različnih temperaturah (Slika 5A) odrezali začetne faze zakasnitve, jim prilagodili monoeksponentne funkcije ter izračunali pripadajoče parametre s programom GraFit. Z Arrhenius-ovega diagrama (ln(k) v odvisnosti od 1/T) smo ocenili aktivacijsko entalpijo druge faze fibrilacije (Slika 5B) in glede na raztresenost eksperimentalih podatkov ocenili 20-odstotno relativno napako. Vrednost aktivacijske entalpije je znašala 27 ± 5 kcal mol^{-1}.



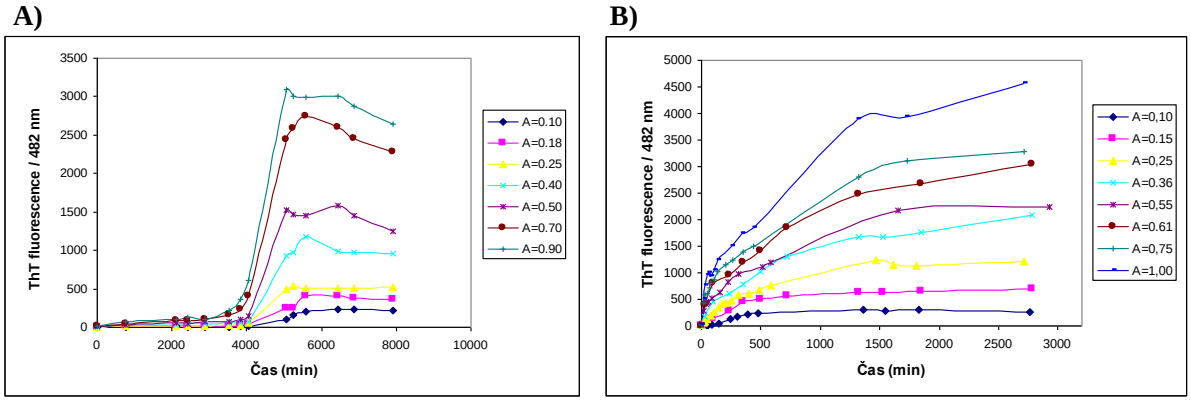
Slika 5: *Temperaturna odvisnost druge faze fibrilacije*. (A) Sprememba signala ThT fluorescence pri valovni dolžini 482 nm za reakcijo v standardni raztopini (34 µM, 10 % TFE, pH 4,75) znotraj temperaturnega intervala 27-44 °C. (B) Arrhenius-ov diagram konstant hitrosti, določenih s pomočjo meritev ThT signala (A), ki je podal vrednost E_a (27 ± 5 kcal mol^{-1}) druge faze firbilacije.

Eksperimentalne rezultate kinetike, merjene s ThT fluorescenco, smo simulirali z modelnimi matematičnimi enačbami (glej Priloge, članek Škerget in sod., 2009, Figure 3). Iz izračunanih konstant hitrosti k_I, značilnih za izomerizacijo znotraj samega agregatnega jedra, smo dobili entalpijo aktivacije 55 kcal mol^{-1}. Ko smo pri obdelavi eksprimentalnih podatkov upoštevali trajanje faze zakasnitve reakcij v odvisnosti od temperature, smo preko Arrhenius-ove odvisnosti izračunali pripadajočo aktivacijsko entalpijo E_a = 53 ± 6 kcal mol^{-1}. Vrednost je torej v skladu z izračunano vrednostjo k_I (izpeljano z integralnega modela), ki znaša 55 kcal mol^{-1}.

4.1.3 Odvisnost konstante hitrosti fibrilacije druge faze od proteinske koncentracije (sprememba signala ThT fluorescence)

ThT fluorescenco smo merili pri dveh različnih temperaturah, pri 25 °C, kjer sprememb pri CD spektrih ni zaznati in pri 35 °C, kjer so tranzicijske spremembe na CD spektrih lepo vidne. Koncentracijski razpon stefina B je bil 10-kraten, od A_{280} = 0,11 pa do A_{280} = 1,00, oziroma od 19 µM do 190 µM.
Zbrani podatki pri 25 °C (Slika 6A) odražajo dolgo fazo zakasnitve, ki ji sledi relativno kratka faza rasti fibril. Dolžina faze zakasnitve je skoraj neodvisna od proteinske koncentracije, kar kaže na to, da je odločujoč korak za začetek rasti fibril reakcija prvega reda.

Pri kinetiki, posneti pri temperaturi 35 °C (Slika 6B), faza zakasnitve popolnoma izostane, zaradi česar pa je pri spremembi ThT fluorescence dobro vidna prisotnost prve faze (hitrejša konstanta hitrosti prve faze v primerjavi s sledečo počasnejšo konstanto hitrosti rasti zrelih fibril v drugi fazi). Pri temperaturi 35 °C pride do zanimive anomalije, kjer reakcija pri najnižji proteinski koncentraciji hitreje doseže plato - končno točko reakcije (okoli 500 minut) v primerjavi z reakcijo pri najvišji poteinski koncentraciji (približno 2000 minut). Pojav anomalije močno namiguje na prisotnost fenomena »stranske poti« znotraj procesa fibrilacije, ki bi lahko bil transformacijski prehod drugega ali višjega reda.



Slika 6: *Odvisnost fibrilacije od proteinske koncentracije*. (A) Sprememba ThT fluorescence v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C pri proteinskih koncentracijah 19, 34, 47, 75, 94, 132, 170 µM (od A_{280}=0,10 do A_{280}=1,00). (B) Sprememba ThT fluorescence v odvisnosti od časa pri temperaturi 35 °C pri proteinskih koncentracijah 19, 34, 47, 68, 104, 115, 142, 189 µM (od A_{280}=0,10 do A_{280}=1,00).

E_a smo izračunali iz vrednosti k_G podaljševanja fibril pri obeh temperaturah (25 °C in 35 °C). Le-ta je za eksperimente s proteinsko koncentracijo znašala 30 ± 4 kcal mol^{-1}, kar se dobro ujema z vrednostjo 27 ± 5 kcal mol^{-1}, izpeljano iz eksperimentov temperaturne odvisnosti fibrilacije.

Pri vsaki tempraturi smo eksperimentalnim podatkom prilagodili parametre točkam diagramov, iz česar smo narisali krivulje (glej Priloge, članek Škerget in sod., 2009, Figure 4), ki so rezultat numeričnih rešitev enačbe na Sliki 4. Pri iskanju primernih parametrov, ki bi najbolje povezali eksperimentalne podatke med seboj, smo s pomočjo kinetičnega modela prišli do konstante hitrosti prvega reda za notranjo izomerizacijo k_I=9,7*$10^{-6}$$s^{-1}$ in konstanto hitrosti drugega reda za rast zrelih fibril oz. za fazo podaljševanja k_G/N_{OL}=5,6 *10^{-6} $\mu M^{-1}s^{-1}$.

Pri pojavu anomalije, ki običajno naznanja fenomen »stranske poti«, smo s pomočjo kinetičnega modela določili konstante hitrosti k_{-OP}=1,5*10^{-5} s^{-1}, k_I=7*10^{-5} s^{-1} and k_G/N_{OL}=2,9*10^{-5} $\mu M^{-1}s^{-1}$.

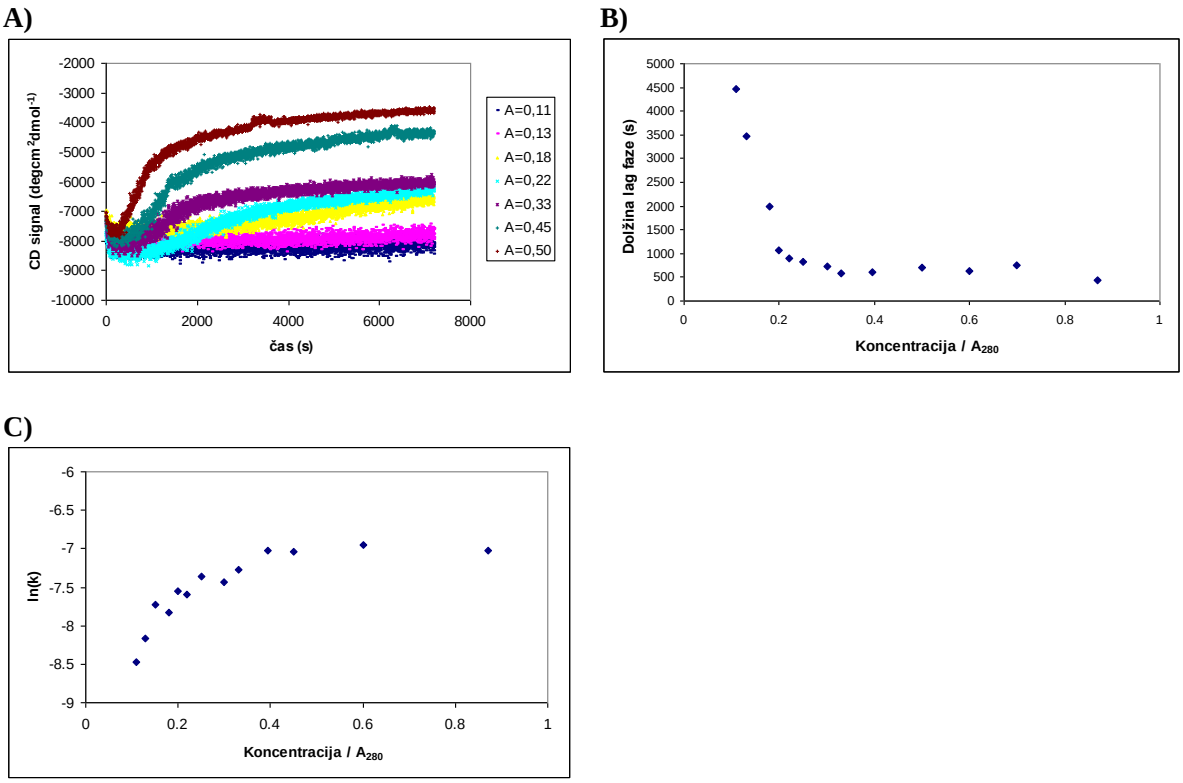
Vse konstante so zbrane v Tabeli 1. Diferencialne enačbe, vključene v kinetično shemo, so prikazane v prilogi članka (glej Priloge, članek Škerget in sod., 2009, Appendix).

Tabela 1: *Kinetični parametri predlaganega modela*.

Parameter	Vrednost pri 25°C	Vrednost pri 35°C	
K_{OP}		0,009 μM^{-1}	globalno prileganje pri 35°C
k_{-OP}		1,5*10^{-5} s^{-1}	globalno prileganje pri 35°C
k_I	9,7*$10^{-6}$$s^{-1}$	7*10^{-5} s^{-1}	globalno prileganje
k_G	5,6*10^{-6} $\mu M^{-1}s^{-1}$	2,9*10^{-5} $\mu M^{-1}s^{-1}$	globalno prileganje
c_R	10 µM	2,5 µM	
η	0,05	1	globalno prileganje

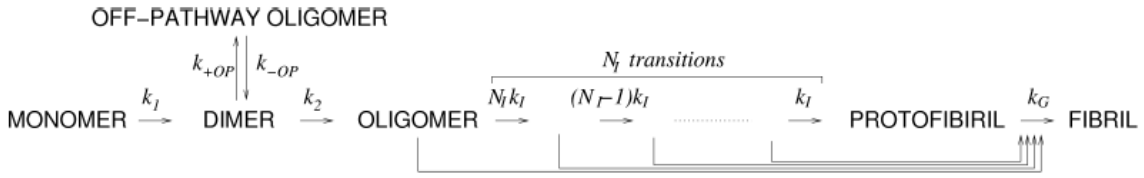
4.1.4 Odvisnost konstante hitrosti fibrilacije prve faze od proteinske koncentracije (sprememba CD signala)

Slika 7A prikazuje spremembo CD signala v odvisnosti od proteinske koncentracije. Analiza podatkov je pokazala, da dolžina faze zakasnitve prve faze pada z naraščujočo proteinsko koncentracijo vse do koncentracije 35 μM, kar utreza vrednosti A_{280} = 0,2 (Slika 7B). Od te točke dalje proteinska koncentracija nima več vpliva na dolžino faze zakasnitve. V skladu s tem doseže konstanta hitrosti reakcije prve faze po začetni rasti z naraščujočo proteinsko koncentracijo plato pri proteinski koncentraciji 76 μM (Slika 7C), kjer se koncentracijska odvisnost zaključi. Pričakovali bi, da protein hitreje agregira z naraščajočo proteinsko koncentracijo, vendar pa se odvisnost hitrosti ustavi ob nasičenju raztopine (podobno kot pri micelah). Reakcije so bile spremljane v standardni raztopini pri temperaturi 38 °C.



Slika 7: *Odvisnost konstante hitrosti prve faze fibrilacije od proteinske koncentracije*. (A) Sprememba CD signala pri valovni dolžini 222 nm, 38 °C, za reakcijo v standardni raztopini s proteinskimi koncentracijami od A_{280} = 0,11 do A_{280} = 1,0 oziroma od 19 μM do 190 μM. (B) Odvisnost dolžine faze zakasnitve od proteinske koncentracije istih reakcij kot pri točki (A). (C) Odvisnost logaritemske vrednosti konstante hitrosti od proteinske koncentracije istih reakcij kot pri točki (A).

4.1.5 Izbira primernega kinetičnega modela



Slika 8: *Shema kinetičnega modela mehanizma fibrilacije stefina B.*

V skladu z vsemi opravljenimi kinetičnimi meritvami, ustreznimi odgovarjajočimi parametri in izračuni ter morfološkimi in strukturnimi študijami (Žerovnik in sod., 2002b; Jenko in sod., 2004; Kenig in sod., 2006; Jenko Kokalj in sod., 2007), smo predlagali model mehanizma fibrilacije stefina B (Slika 8). Zasnovali smo ga na osnovi sledečih opažanj:

1. Pri nizkih temperaturah je za reakcijo značilna dolga faza zakasnitve, ki ji sledi hitra nukleacija in strma rastna faza. Ob tem ThT fluorescenca pri 482 nm naglo naraste in doseže plato ob koncu rasti fibril (Slika 6A).
2. Čas trajanja faze zakasnitve pri nižjih temperaturah rahlo upada z višanjem proteinske koncentracije, vendar je padec premajhen za reakcijo drugega reda.
3. Pri višjih temperaturah pride do izostanka faze zakasnitve (Slika 6B), medtem ko se pri fazi rasti pojavi anomalija glede koncetracijske odvisnosti. Reakcije pri nižjih koncentracijah proteina dosežejo plato (konec) reakcije hitreje kot reakcije pri višjih proteinskih koncentracijah (Slika 6B).
4. Med začetno, prvo fazo fibrilacije, so bile opažene oligomere, sestavljene iz približno 60-tih podenot (neobjavljeni TEM, AFM in DLS rezultati).

Pri postavitvi osnovnega modela mehanizma fibrilacije stefina B smo v skladu z 2. točko (zgoraj) predpostavili, da je korak z največjo energetsko prepreko pri nukleaciji fibril reakcija prvega reda. To pomeni, da se notranja izomerizacija monomernih enot oziroma nukleacije odvija znotraj oligomernega jedra, kjer je lokalna koncentracija neodvisna od proteinske koncentracije raztopine. Zaradi prisotnosti izrazite faze zakasnitve in naglega vzpona hitrosti rasti fibril sama nukleacija vsebuje predvidoma veliko število zaporednih reakcij ali visoko stopnjo kooperativnosti podenot. Tako smo za fazo nukleacije predpostavili N_I ireverzibilnih notranjih prehodov (tranzicij), ki sem morajo zgoditi, preden se nukleacija zaključi in preden se lahko prične rast protofibril (faza rasti fibril). Če določimo, da predstavlja N_I število 64, t.j. 64 stopenj znotraj same nukleacije in morebiten nastanek 64-mer, teorija lepo sovpada s podatki o ThT fluorescenci in z velikostjo agregatov, opaženih med začetno fazo rasti (Čeru in sod., 2008).

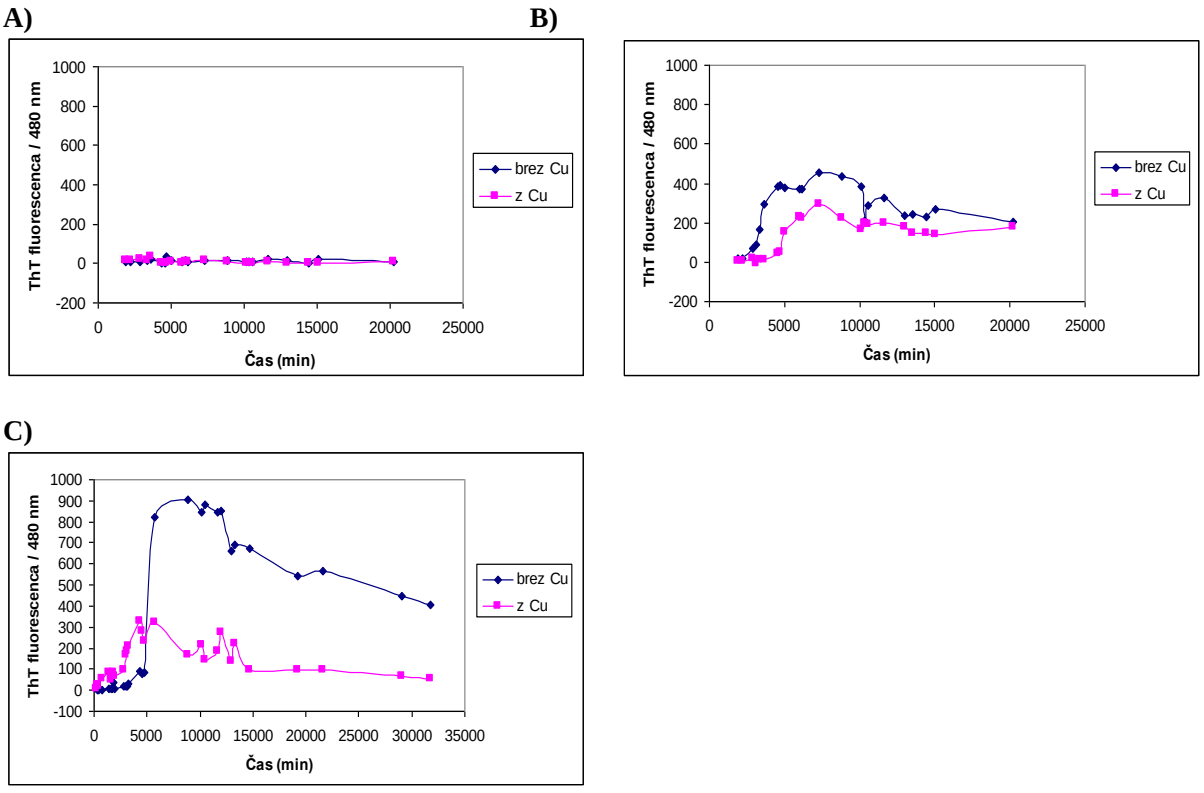
Ugotovitev pod točko št. 3 je nenavadna za predhodno postavljene kinetične modele mehanizmov različih drugih proteinov iz literature, najbolj verjetna razlago zanjo pa je pojav »stranske poti«, kjer nastajajo (verjetno) zaključene prepletene dimere. Če želimo pojasniti, zakaj se večja količina proteina na »stranski poti« kopiči pri višjih kot pri nižjih proteinskih koncentracijah, obravnavamo prehod v »stransko pot« kot reakcijo drugega ali višjega reda. V primeru, da je »stranska pot« reakcija drugega reda, se eksperimetalni podatki dobro ujamejo z zastavljenim modelom.

Model mehanizma fibrilacije stefina B se prične s hitro dimerizacijo monomernih enot (konstanta hitrosti k_1). Nato lahko dimerna enota vstopi na »glavno« pot fibrilacije (konstanta hitrosti k_2, reakcija prvega reda), ki vodi do tvorbe kritičnih oligomer (64-mer), ali na »stransko pot« (stanje OP – *ang. Off Pathway*) s pripadajočo konstanto hitrosti k_{+OP}. Oligomere s »stranske poti« se postopno vrnejo na glavno pot fibrilacije s konstanto hitrosti k_{-OP}, kar naj bi bil pri višjih temperaturah najpočasnejši del celotne fibrilacije. Preden pa se oligomere lahko začnejo združevati v protofibrile in naprej v fibrile, so podvržene ireverzibilni izomerizaciji prvega reda s konstanto hitrosti k_I. Izomerizacija poteka na vseh N_I podenotah vzporedno, tako da je naslednji korak izomerizacije pri določeni podenoti pogojen z izpolnitvijo predhodnega koraka pri vseh N_I podenotah. Prvi korak izomerizacije ima tako efektivno konstanto hitrosti $N_I k_I$, drugi $(N_{I-1})k_I$, in tako naprej do zadnjega koraka z efektivno konstanto hitrosti k_I, ki pripelje do stanja, ko so izomerizirane vse N_I podenote. V tem stanju pride do nastanka prvega protofibrila, ki lahko veže okoliške podenote ne glede na njihovo stopnjo izomerizacije. Proces rasti fibrila naj bi bila reakcija drugega reda s konstanto hitrosti k_G.

4.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije

Preverjanje vpliva bakrovih ionov na oligomerizacijo, agregacijo in amiloidno fibrilacijo stefina B smo se na začetku lotili s tekočinsko kromatografijo z ločevanjem po proteinski velikosti. Želeli smo ugotoviti vpliv bakrovih ionov na razmerje med različnimi oligomernimi enotami, ki neobhodno sodelujejo pri tvorbi fibril. Nemutiran stefin B E31 je zastopan z lestvico različnih oligomer, ki smo jih karakterizirali s pomočjo kromatografije s sistemom FPLC. Izolirane monomere smo inkubirali na pH 5 in pH 7 ob prisotnosti in odsotnosti bakrovih ionov ter 7 dni na sobni temperaturi oziroma 4 dni na 36 °C. Kromatogrami vzorcev pri pH 7 pri testiranem vzorcu s sobne temprature niso pokazali nobenih razlik v primerjavi s kontrolnim vzorcem, medtem ko smo pri testnem vzorcu s 36 °C opazili premik razmerja v prid dimerne oblike. Pri pH 5 protein popolnoma dimerizira že ob odsotnosti bakrovih ionov. Sklepali smo, da prisotnost bakrovi ionov olajša prehod stefina B iz monomerne oblike v dimerno že pri nevtralni pH vrednosti ter s tem vpliva na sledečo agregacijo in fibrilacijo proteina (Žerovnik in sod., 2006).

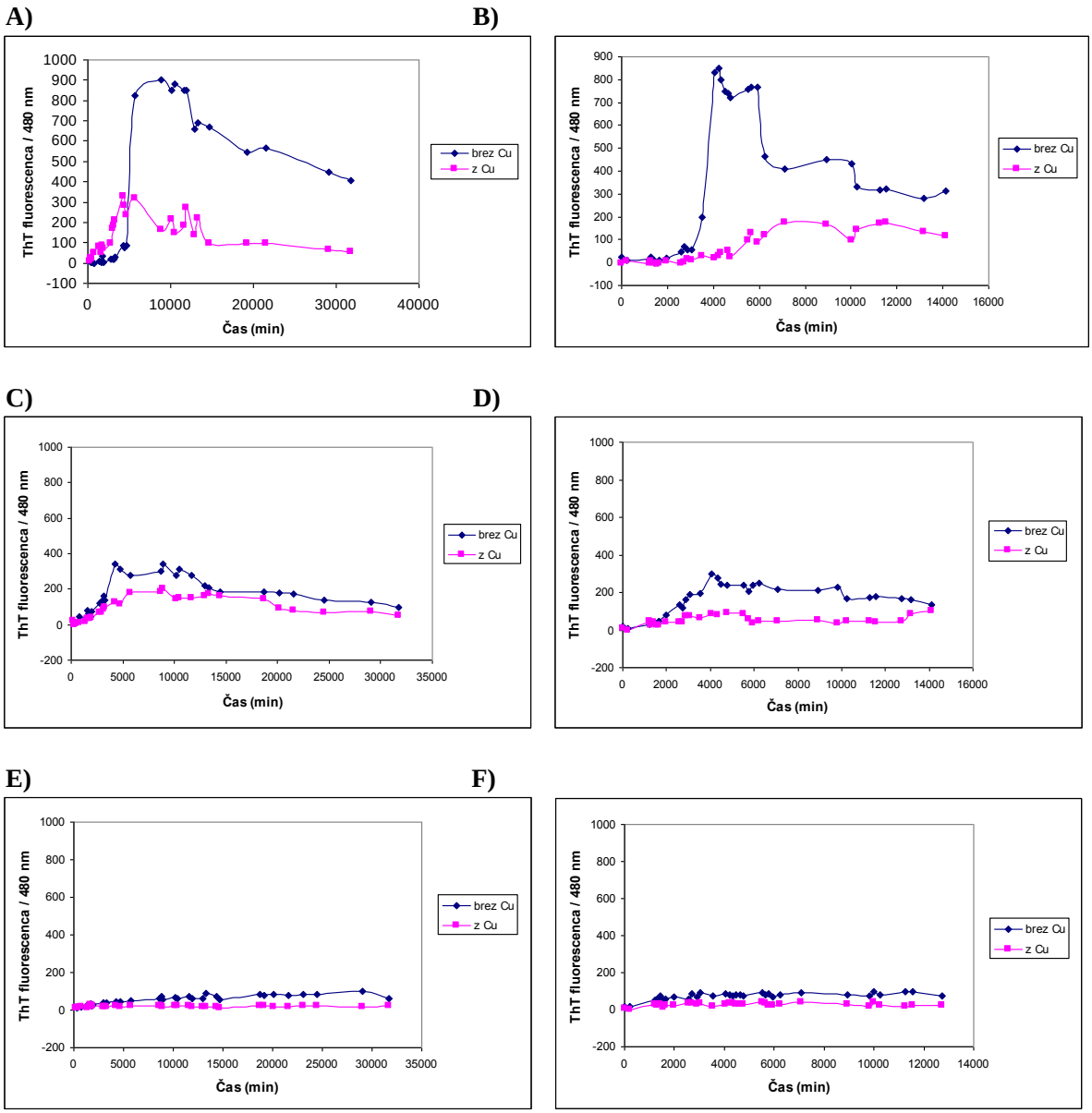
Kljub temu, da je bila fibrilacija stefina B v predhodnih raziskavah že temeljito preučena in so bili postavljeni standardni pogoji (10 % TFE, pH 5) za študij fibrilacije (Žerovnik in sod., 2002a; Jenko in sod., 2004), smo želeli izločiti čimveč nepotrebnih faktorjev, ki bi lahko imeli morebiten medsebojni vpliv. Vedeli smo, da stefin B pri pH 7 na sobni temperaturi ne fibrilira, tako da smo najprej nemutirano obliko stefina B E31 izpostavili raztopini bakrovih ionov pri pH 7 in temperaturi 40 °C, brez dodanega TFE. Izkazalo se je, da do fibrilacije sploh ni prišlo, niti ob prisotnosti niti ob odsotnosti bakrovih ionov (Slika 9A). V naslednjem koraku smo znižali pH vrednost na 5 (Slika 9B), vendar smo primerne pogoje za opazovanje vpliva bakrovih ionov na fibrilacijo stefina B odkrili šele pri temperaturi 25 °C, pH 5 in 10 % TFE (Slika 9C).



Slika 9: *Fibrilacija stefina B E31v prisotnosti in odsotnosti bakrovih ionov*. (A) pH 7 in 40 °C, (B) pH 5 in 40 °C, (C) pH 5, 25 °C in 10 % TFE.

Pri nizu eksperimentalnih reakcij smo preverili obnašanje nemutirane (običajne) oblike stefina B E31, variante stefina B Y31 in mutirane variante stefina B P79S ob prisotnosti in odsotnosti bakrovih ionov pri 25 °C, pH 5,0 in 10 % TFE. Opazovali smo vpliv dveh različnih koncentracij Cu_2SO_4 na reakcijo fibrilacije, 50 µM in 150 µM, kar je pomenilo razmerje med proteinom in bakrovim ioni 1:1 in 1:3.

Izkazalo se je, da je prisotnot bakrovih ionov inhibirala rast fibril pri vseh treh oblikah stefina B, tako v razmerju 1:1, kot pri 3-kratnem presežku bakrovih ionov (Slika10). Rezultate smo normirali, da bi lažje primerjali diagrame, procent inhibicije fibrilacije pa je za vsako reakcijo podan v Tabeli 2.



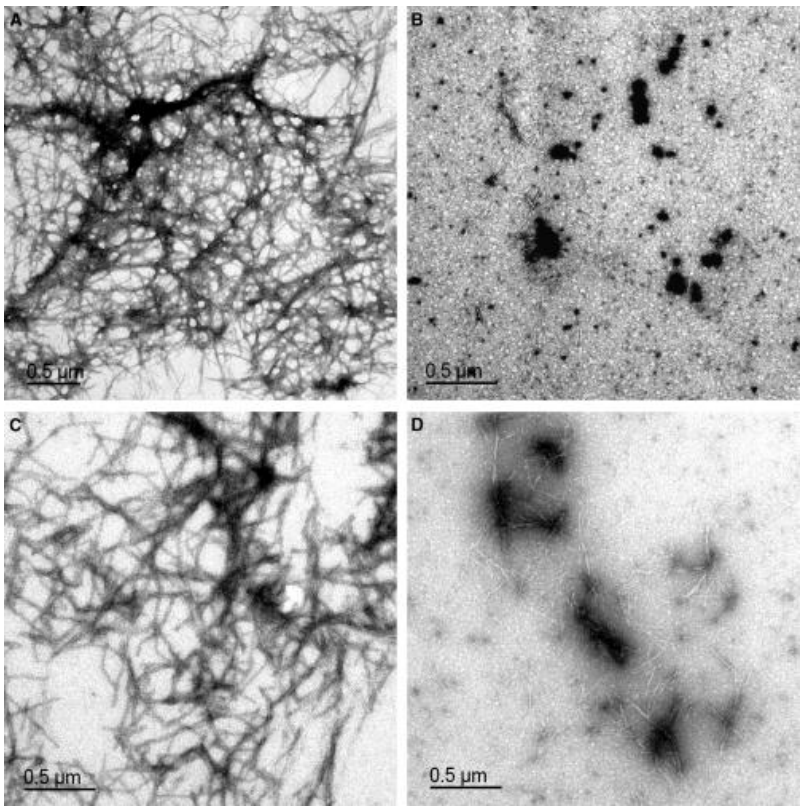
Slika 10: *Inhibicija fibrilacije različnih oblik stefina B ob prisotnosti Cu^{2+}, pH 5, 25 °C, 10 % TFE.* (A) Inhibicija fibrilacije nemutranega stefina B E31 ob prisotnosti 50 µM Cu^{2+}. (B) Inhibicija fibrilacije nemutranega stefina B E31 ob prisotnosti 150 µM Cu^{2+}. (C) Inhibicija fibrilacije variante stefina B Y31 ob prisotnosti 50 µM Cu^{2+}. (D) Inhibicija fibrilacije variante stefina B Y31 ob prisotnosti 150 µM Cu^{2+}. (E) Inhibicija fibrilacije mutrane variante stefina B P79S ob prisotnosti 50 µM Cu^{2+}. (F) Inhibicija fibrilacije mutrane variante stefina B P79S ob prisotnosti 150 µM Cu^{2+}.

Tabela 2: *Inhibicija fibrilacije različnih oblik stefina B ob prisotnosti 50 μM Cu^{2+}.*

Protein/varianta	[Cu^{2+}]	Sestava raztopine	% inhibicije
Stefin B E31	50	10 % TFE, pH 5	63 ± 12
	150	10 % TFE, pH 5	80 ± 2
Stefin B Y31	50	10 % TFE, pH 5	41 ± 10
	150	10 % TFE, pH 5	66 ± 2
Stefin B P79S	50	10 % TFE, pH 5	58 ± 10
	150	10 % TFE, pH 5	62 ± 3
Stefin B E31	50	pH 5	32 ± 10
	50	pH 7	0
Stefin B Y31	50	pH 5	50 ± 10
	50	pH 7	0

Višji procent inhibicije pri vseh reakcijah sovpada z višjo koncentracijo bakrovih ionov. Kljub temu, da je bilo pokazano, da mutanta variante P79S ne veže bakrovih ionov pri nevtralnem pH-ju (verjetno zaradi tetramerne oblike) in je intenziteta fibrilacije veliko manjša od nemutiranega E31 oz. variante Y31, lahko še vedno opazimo vpliv (inhibicijo) prisotnih bakrovih ionov na samo reakcijo fibrilacije.

Posnetki transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM) potrjujejo odsotnost fibril pri dodatku bakrovih ionov raztopini stefina B (Sliki 11B in 11D).

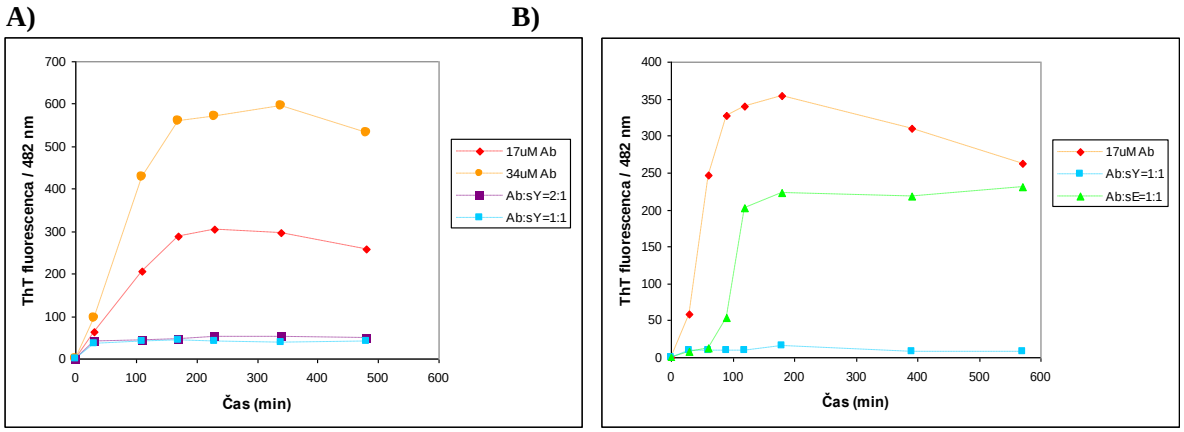


Slika 11: *Posnetki inhibicije amiloidne fibrilacije stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov*. Vzorčenje je potekalo po 9000 minutah, t.j. ko so reakcije fibrilacije dosegle plato (konec). (A) Varianta stefina B Y31, pripravljena v kelatnem pufru pri pH 5, 10 % TFE. (B) Varianta stefina B Y31, pripravljena v 100 μM $CuSO_4$ pri pH 5, 10 % TFE. (C) Nemutiran stefin B E31, pripravljen v kelatnem pufru pri pH 5, 10 % TFE. (D) Nemutiran stefin B E31, pripravljena v 100 μM $CuSO_4$ pri pH 5, 10 % TFE.

4.3. In vitro interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta

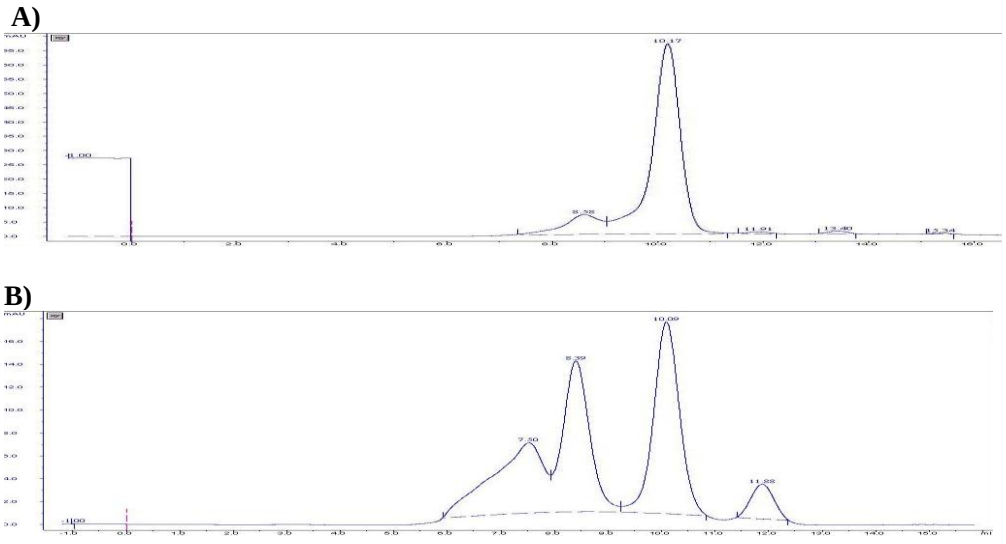
4.3.1 Rast fibril peptida amiloid-beta inhibirajo le določena oligomerna stanja stefina B

Pri pogojih, pod katerimi pride do fibrilacije peptida amiloid-beta in ne stefina B (pufer PBS, pH 7,3, 40 °C, brez dodatka TFE in brez agitacije), smo izvedli reakcijo amiloidne fibrilacije. Opazovana proteina smo zmešali v različnih molarnih razmerjih in reakcijskim mešanicam s sprotnim odvzemanjem vzorcev merili ThT fluorescenco v izbranih časovnih intervalih. Varianta stefina B Y31 je popolnoma inhibirala fibrilacijo peptida amiloid-beta (Slika 12A), medtem ko je nemutirana (običajna) oblika stefina B E31 fibrilacijo peptida amiloid-beta inhibirala le deloma (Slika 12B).



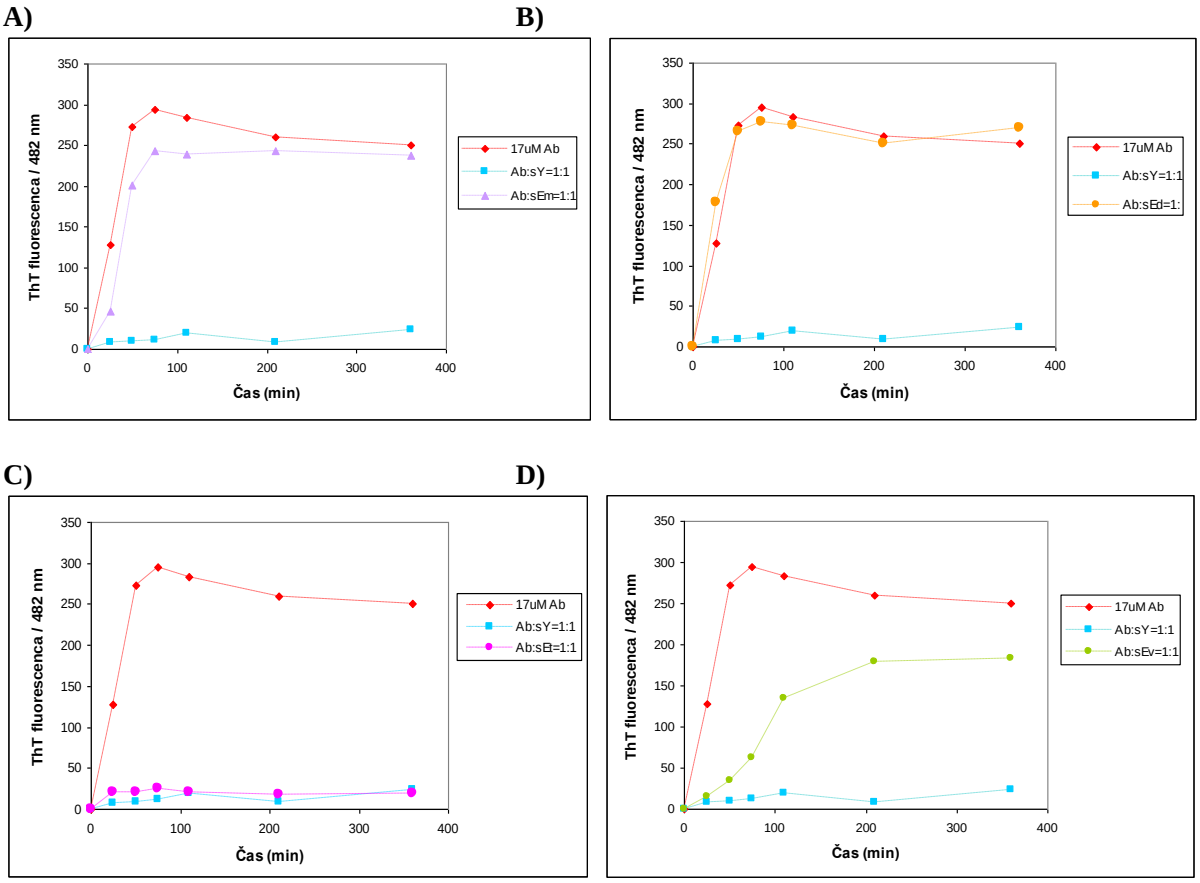
Slika 12: *Inhibicija fibrilacije peptida amiloid-bet (Ab) ob prisotnosti stefina B.* ThT fluorescenca, pH 7,3, 40 °C. (A) Prisotnost stefina B Y31 (sY). Koncentracija peptida amiloid-beta 17 in 34 µM, Y31 dodan v molarnem razmerju 1:1 in 2:1. (B) Prisotnost stefina B Y31 (sY) in nemutiranega stefina B E31 (sE). Koncentracija peptida amiloid-beta 17 µM, Y31 in E31 dodana v molarnem razmerju 1:1.

Ko smo varianti stefina B Y31 in nemutiranemu stefin B E31 določili oligomerno sestavo s sistemom FPLC, smo ugotovili, da je varianta Y31 pretežno dimerne oblike (Slika 13A), medtem ko je nemutiran stefin B E31 sestavljen iz lestvice stabilnih oligomer (Slika 13B). Da bi globlje raziskali delovanje nemutirane oblike E31, smo celoten vzorec stefina B E31 razdelili na posamezne oligomere. Izolirane monomere, dimere, tetramere in višje oligomere so se izkazale za stabilne še pri 40 °C, kar smo potrdili z naknadnimi testi s sistemom FPLC in z masno spektrometrijo (ESI-MS).



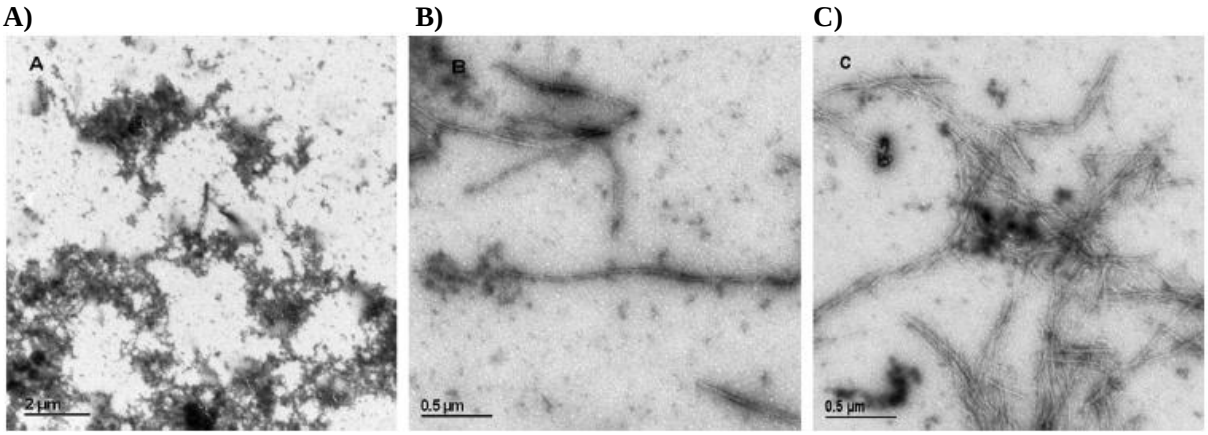
Slika 13: *Kromatograma stefina B Y31 in E31, posneta s sistemom FPLC.* (A) Dimerna oblika variante stefina B Y31. (B) Lestvica oligomer stefina B E31.

Ločene monomere, dimere, tetramere in višje oligomere smo zatem vsako posebej pomešali s peptidom amiloid-beta in opazovali njihov vpliv na fibrilacijo (Slika 14). Izkazalo se je, da so zgolj tetramere v celoti zaustavile rast firbil (Slika 14C).



Slika 14: *Inhibicija fibrilacije peptida amiloid-beta (Ab) ob prisotnosti posamičnih izoliranih oligomernih enot nemutiranega stefina B E31*. Merjeno s ThT fluorescenco. Koncentracija peptida amiloid-beta 17 µM, stefin B dodane v molarnem razmerju 1:1. (A) Monomere (sEm). (B) Dimere (sEd). (C) Tetramere (sEt). (D) Višje oligomere (sEv).

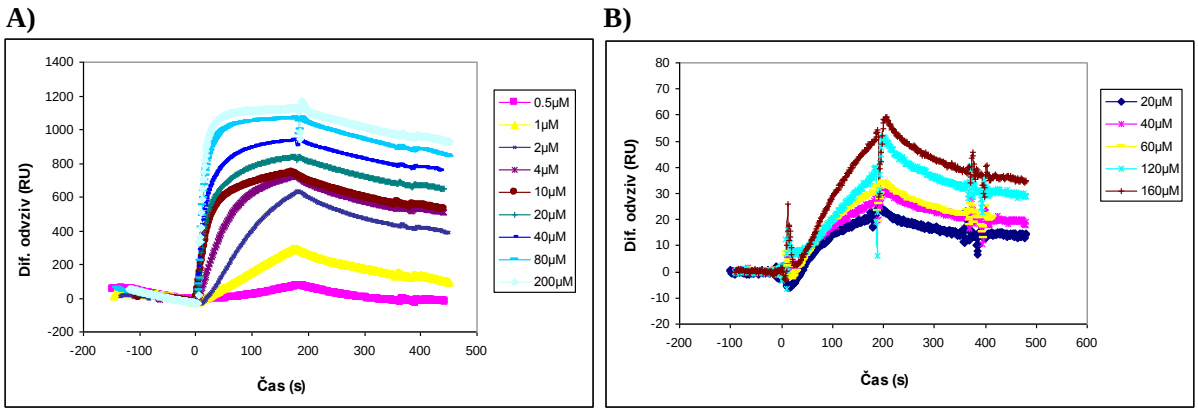
Ugotovitve smo potrdili tudi s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Slika 15).



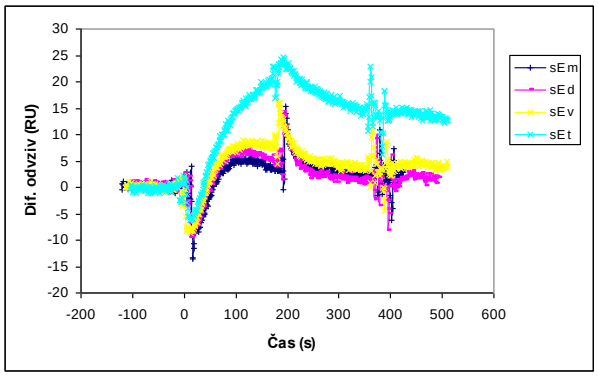
Slika 15: *Morfologija agregatov in fibril peptida amiloid-beta*. Posneto s TEM. (A) Peptid amiloid-beta z varianto stefina B Y31. (B) Peptid amiloid-beta z nemutiranim stefinom B E31. (C) Peptid amiloid-beta.

4.3.2 S peptidom amiloid-beta interagirajo le določena oligomerna stanja stefina B

Specifično vezavo med oligomernimi oblikami stefina B in peptidom amiloid-beta smo pokazali s površinsko plazmonsko resonanco (surface plasmon resonance – SPR). Peptid amiloid-beta smo imobilizirali na površino senzorskega čipa in preko njega injicirali varianto stefina B Y31, nemutiran stefin B E31 ter njegove ločene oligomerne oblike. Močno, koncentracijsko odvisno, specifično interakcijo smo izmerili med varianto Y31 in peptidom amiloid-beta (Slika 16A). Za potrditev dobljenega rezultata smo na senzorski čip vezali varianto Y31 in nanjo injicirali peptid amiloid-beta ter dobili potrjeno obratno interakcijo. Tetramere nemutiranega stefina B E31 so do peptida amiloid-beta pokazale koncentracijsko odvisno afiniteto (Slika 16B), medtem ko so monomere, dimere in višje oligomere stefina B E31 pri vezavi močno zaostajale za tertamerami (Slika 17). Rezultat eksperimenta z merjenem površinske plazmonske resonance je potrdil ugotovitve o inhibitorni aktivnosti posameznih oblik stefina B.



Slika 16: *Koncentracijsko odvisna interakcija stefina B s peptidom amilod-beta*. Posneto s SPR. (A) Interakcija s stefinom B Y31. (B) Interakcija z nemutiranim stefinom B E31.

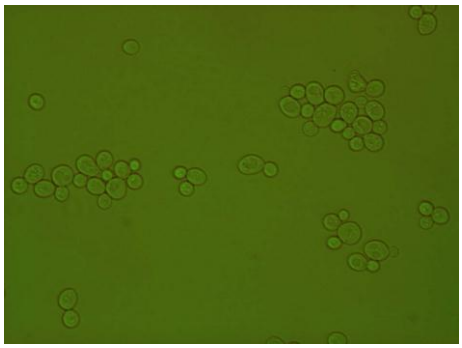


Slika 17: *Interakcija monomer (sEm), dimer (sEd), tetramer (sEt) in višjih oligomer (sEv) nemutiranega stefina B E31 s peptidom amilod-beta*. Posneto s SPR.

4.4. Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.1 Določanje morfologije celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31

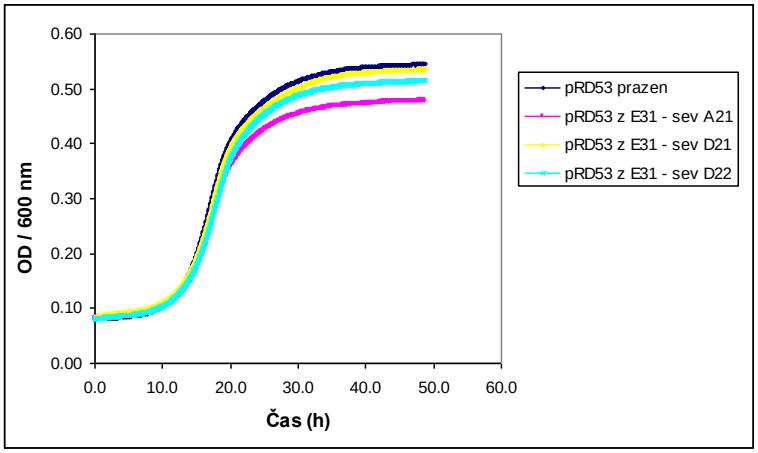
Po uspešni vstavitvi konstrukta stefina B E31 v kvasne celice smo želeli preveriti osnovno morfologijo transformiranih celic s človeškim proteinom stefin B E31, za kar smo uporabili transmisijski mikroskop Olympus IX81. Ugotovili smo, da so imele transformirane celice normalno morfologijo (Slika 18), le ponekod je bilo opazno rahlo grupiranje. Sicer se je njihov izgled skladal z izgledom kvasnih celic brez vstavljenega stefina B E31.



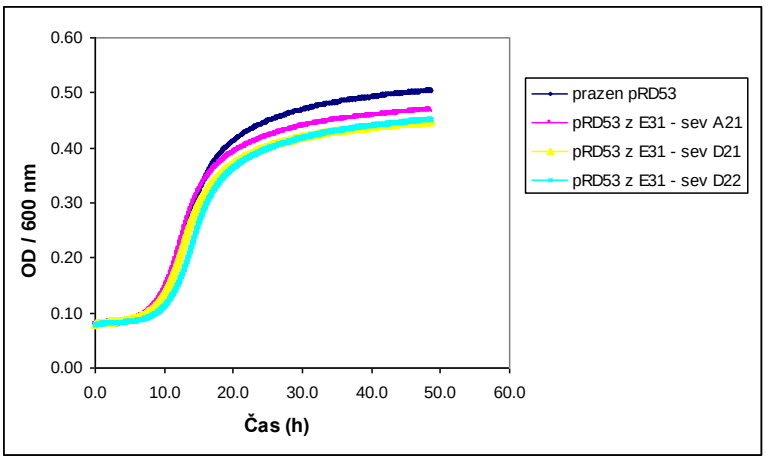
Slika 18: *Morfologija transformiranih kvasnih celic seva BY4742 s človeškim proteinom stefin B E31*. Posnetek celic seva BY4742 z vstavljenim konstruktom stefina B E31 pri 1000-kratni povečavi, posnet s transmisijskim mikroskopom Olympus IX81.

4.4.2 Določitev rastnih krivulj celic seva BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53:E31

Če bi prisotnost vstavljenega stefina B v kvasne celice vplivala na vitalnost celic, bi se to poznalo pri hitrosti rasti transformiranih celic. Pri določitvi rastnih krivulj opazovanih celic smo za testirane seve vzeli tri potrjeno uspešno transformirane seve z oznakami A21, D21 in D22 (celice BY4742 z vstavljenim stefinom B E31). Za negativno kontrolo nam je služil sev celic BY4742 z vstavljenim praznim plazmidom pRD53, poleg tega smo eksperiment izvedli v glukoznem gojišču (Slika 20), kjer do izražanja stefina ni prišlo in v galaktoznem gojišču (Slika 19), ki je induciralo prekomerno izražanje stefina B E31 v testiranih sevih.



Slika 19: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov in kontrolnega seva na galaktoznem gojišču*. Galaktozno gojišče inducira prekomerno izražanje stefina B v kvasnih celicah sevov A21, D21 in D22. Sev z vstavljenim praznim vektorjem pRD53 služi za negativno kontrolo.



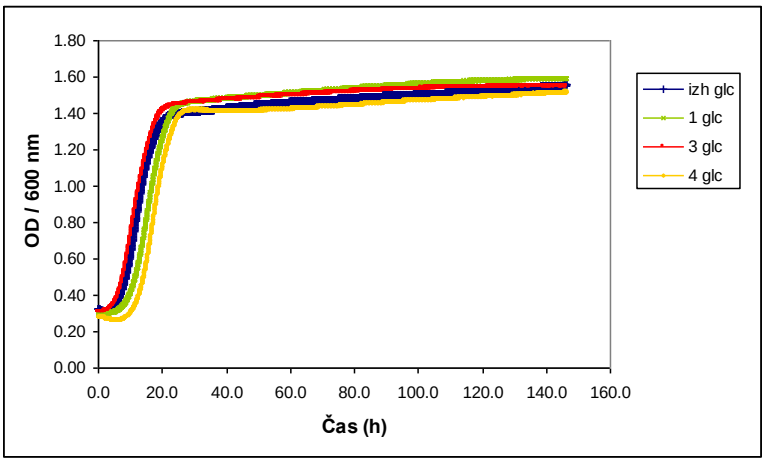
Slika 20: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov in kontrolnega seva na glukoznem gojišču*. Glukozno gojišče ne sproži izražanja stefina B (negativna kontrola).

Iz primerjave rastnih krivulj smo zaključili, da prisotnost stefina B oz. njegovih morebitnih agregatov v celicah *S. cerevisiae* nima vpliva na rastni fenotip kvasnih celic, torej stefin B najverjetneje ne vpliva na vitalnost celic.

4.4.3 Določitev rastnih krivulj celic seva AJY217 z vstavljenim vektorjem pAG25:E31

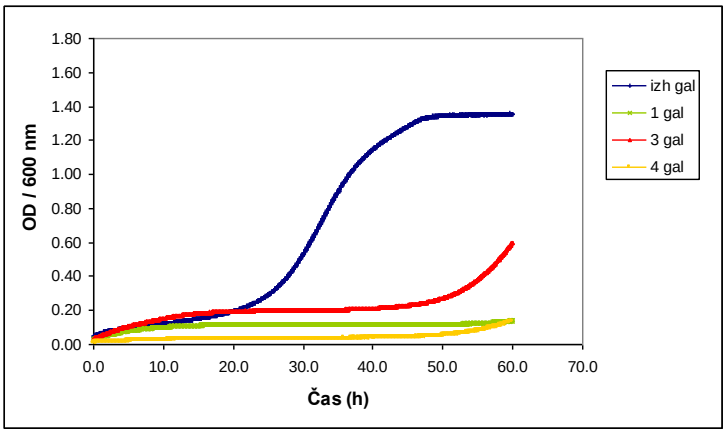
Celice seva AJY217 z vstavljenim stefinom B E31 smo v nadaljnjih eksperimentih uporabili pri analizi SDL, zato smo predhodno preverili njihov rastni fenotip. Preverjali smo tri različne biološke ponovitve (sev 1, 3 in 4), da bi določili najprimernejšega za analizo SDL. Negativno kontrolo smo postavili na dveh mestih: za začetek smo rast testiranih sevov primerjali z dobro preučenim sevom AJY217 *izh3*Δ, ki se obnaša enako kot nemutirane celice AJY217 in je za razliko od njih odporen na antibiotik nourseotricin. Le-tega namreč vsebuje selekcijsko gojišče za celice AJY217 z vstavljenim stefinom B E31 in smo želeli izničiti morebiten vpliv antibiotika na hitrost rasti sevov. Kot drugo negativno kontrolo smo uporabili različne vire ogljika. Pri glukoznem gojišču do izražanje stefina B E31 ni prišlo, medtem ko je galaktoza v gojišču sprožila prekomerno izražanja stefina.

Analiza rastnih krivulj na glukoznem gojišču (Slika 21) je potrdila pričakovanja: hitrost rasti preiskovanih transformiranih sevov 1, 3 in 4 je bila enaka hitrosti rasti seva AJY217 *izh3*Δ.

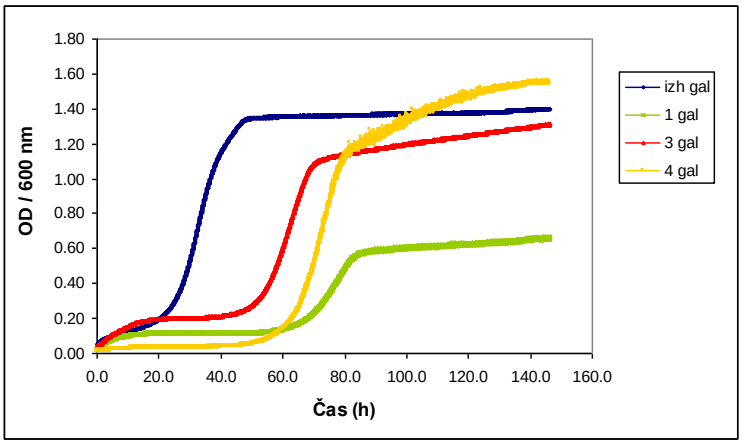


Slika 21: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov 1, 3, 4 in kontrolnega seva AJY217 izh3*Δ *na glukoznem gojišču*. Glukozno gojišče ne sproži izražanja stefina B (negativna kontrola).

Pri meritvi rastnih krivulj testiranih sevov na galaktoznem gojišču, kjer je galaktoza sprožila izražanje stefina B E31 v transformiranih celicah sevov 1, 3 in 4, smo zapazili precejšen zamik začetne faze zakasnitve rasti v primerjavi s kontrolnim sevom. Prisotnost stefina B E31 v kvasnih celicah je pri vseh testiranih sevih povzročila približno 3-krat daljšo fazo zakasnitve (Slika 22), končne vrednosti OD oziroma končna količina kvasne populacije se pa je, kljub enaki začetni koncentraciji celic, razlikovala od seva do seva (Slika 23). Za nadaljnje eksperimente smo izbrali sev 3, katerega obnašanje se je zdelo najbližje povprečni vrednosti tako dolžin faz zakasnitve, hitrosti eksponentnih rasti kot tudi končnih OD vrednosti rastnih krivulj.



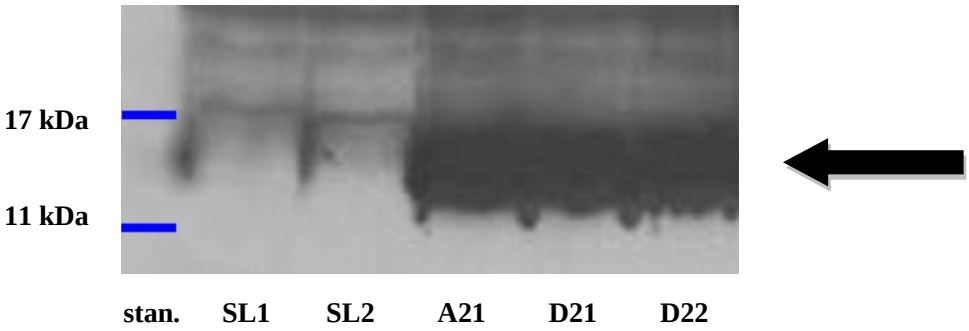
Slika 22: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov 1,3,4 in kontrolnega seva AJY217 izh3Δ na galaktoznem gojišču – začetna faza.* Galaktozno gojišče sproži izražanje stefina B. Testirani transformirani sevi celic AJY217 z vstavljenim stefinom B E31 imajo občutno daljšo začetno fazo zakasnitve v primerjavi s kontrolnim sevom AJY217 *izh3*Δ.



Slika 23: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov 1,3,4 in kontrolnega seva AJY217 izh3Δ na galaktoznem gojišču – celoten proces.*Galaktoza je v gojišču, ki je inducirala prekomerno izražanje stefina B v transformiranih sevih, začasno zaustavila njihovo rast. Le-ta se v nadaljevanju nemoteno nadaljuje, vendar doseže različne končne vrednosti OD pri posameznih transformiranih sevih.

4.4.4 Potrditev prisotnosti stefina B v treh bioloških ponovitvah seva BY4742 z vektorjem pRD53:E31 s prenosom »Western«

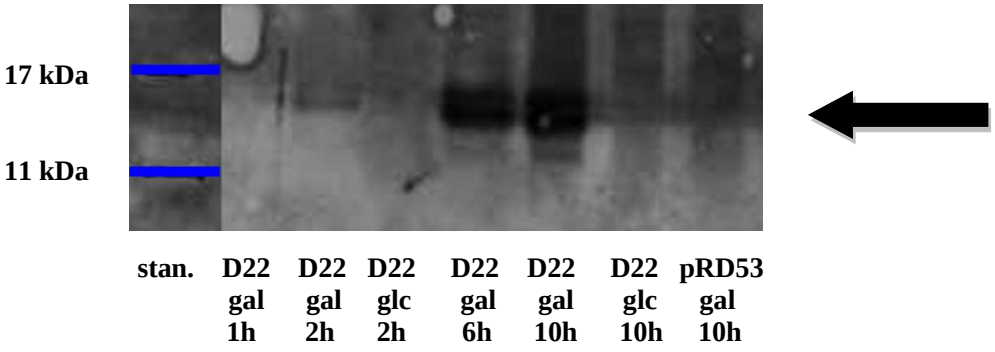
Za potrditev dejanske prisotnosti stefina B E31 znotraj transformiranih celic smo izbrali metodo prenosa »Western«. Poleg tega smo rastnim krivuljam treh bioloških ponovitev A21, D21 in D22 (točka 4.4.3) želeli dodati še rezultate imunodetekcije prisotnosti stefina B E31 v celicah paralelk, s čemer smo se lažje odločili za izvajanje poskusov samo z eno izbrano biološko ponovitvijo. Po 10-tih urah razraščanja celic se je izkazalo, da je stefin B E31 obilno zastopan pri vseh treh bioloških ponovitvah (Slika 24). Tako smo za nadaljnje poskuse izbrali sev D22 celic BY4742 z vstavljenim stefinom B E31.



Slika 24: *Imunodetekcija stefina B E31 znotraj celic BY4742*. Od leve proti desni: označevalec velikosti proteinov - proteinski velikostni standard (11, 17 kDa), 2x negativna kontrola (prazen PRD53 v BY4742) SL1, SL2, sev A21, sev D21, sev D22. Temne lise označujejo prisotnost proteina stefina B E31.

4.4.5 Časovno spremljanje izražanja stefina B E31 pri sevu D22 (celice BY4742 z vektorjem pRD53:E31) s prenosom »Western«

Ko smo potrdili prisotnost človeškega proteina stefina B E31 v kvasnih celicah BY4742, nas je zanimalo, kako hitro začnejo celice izražati protein v zaznavnih količinah in kako dolgo se protein nahaja v celicah oziroma, če ga celice morda izločijo. Izmed treh bioloških ponovitev transformiranih celic, ki so nam bile na razpolago (sevi A21, D21 in D22), smo izbrali sev D22. Razraščali smo ga 4 dni, medtem pa smo v časovnih intervalih jemali alikvote celic za analizo. Rezulatati imunodetekcije so pokazali, da je stefin B E31 v vzorcu v zaznavnih količinah prisoten že po dveh urah (Slika 25), lisa stefina B E31 na gelu pa je lepo vidna še po štirih dneh (ni prikazano).

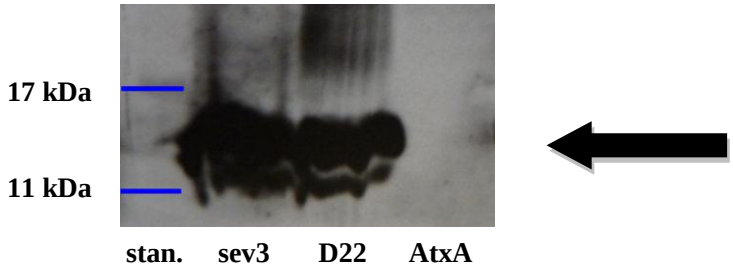


Slika 25: *Časovno spremljanje izražanja stefina B E31 pri sevu D22*. Za negativno kontrolo smo uporabili razraščanje seva D22 na glukoznem gojišču (glc), ki ne sproži izražanja stefina B E31 v celicah, in celice BY4742 z vstavljenim praznim vektorjem pRD53. Od leve proti desni: označevalec velikosti proteinov - proteinski velikostni standard (11, 17 kDa), D22 po 1 h, D22 po 2 h, D22 na glc po 2 h (neg.), D22 po 6h, D22 po 10h, D22 na glc po 10h (neg.), celice z praznim pRD53 po 10h (neg.). Temne lise označujejo prisotnost proteina stefina B E31.

4.4.6 Potrditev prisotnosti stefina B E31 v sevu 3 (celice AJY217 z vektorjem pAG25:E31) s prenosom »Western«

Za eksperiment SDL (tehnika za sistematično določanje genskih interaktorjev prekomerno izraženega preiskovanega gena) smo potrebovali vstavljen stefin B E31 v celicah AJY217, ki so kompatibilne s knjižnico delecijskih mutant. Celice AJY217 same po sebi nimajo zapisa za N-acetil-transferazo in s tem niso odporne na selekcijski marker, uporabljen pri poskusu SDL, antibiotik nourseotricin. Zaradi identičnih pogojev (sestava gojišča), ki morajo veljati za negativno kontrolo in preiskovani sev, smo za kontrolo namesto praznih celic AJY217 uporabili celice AJY217 z vstavljenim proteinom AtxA (amoditoksin A), ki

so potrebno odpornost na nourseotricin imele. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili sev D22, s predhodno potrjenim vključkom za izražanje stefina B E31 (točka 4.4.4). Imunodetekcija stefina B E31 znotraj celic AJY217 je bila uspešna (Slika 26).

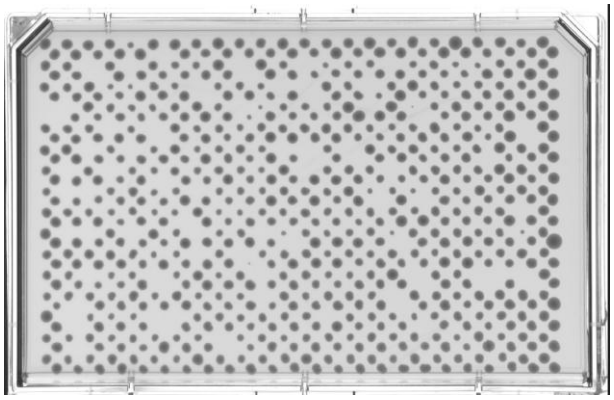


Slika 26: *Imunodetekcija stefina B E31 znotraj celic AJY217*. Od leve proti desni: označevalec velikosti proteinov - proteinski velikostni standard (11, 17 kDa), testiran sev 3, sev D22 (poz. k.), AtxA (neg. k.).Temne lise označuje prisotnost proteina stefina B E31.

4.4.7 Določanje sintetičnih genetskih interakcij v kvasovki *S. cerevisiae* ob indukciji prekomernega izražanja stefina B (ang. »synthetic dosage lethality« - SDL)

S tehniko SDL smo določili relativne sposobnosti rasti dvojnih mutant, ki so imele sistematično izbit po en gen iz kvasnega genoma in so hkrati vsebovale vstavljen človeški stefin B E31. S precepitvijo dvojnih mutant na gojišče DMgal z galaktozo kot vir ogljika (prekomerno izražanje stefina B E31) in vzporedno na gojišče DMglc z glukozo kot vir ogljika (negativna kontrola) smo lahko določili sintetične interakcije (sintetično letalen fenotip) oziroma počasnejšo rast (počasi rastoči fenotip) kolonij na gojišču DMgal v primerjavi z rastjo na gojišču DMglc. Glede na to, da smo vse korake izvajali v formatu 768 (dve ponovitvi formata 384) kolonij/ploščo in smo vsako ponovitev analizirali posebej, smo v enem poskusu hkrati pridobili dve biološki ponovitvi.

Genske interaktorje smo določili s primerjavo skeniranih glukoznih in galaktoznih plošč (Slika 27), ki smo jih analizirali s pomočjo programa GenePix Pro 5.1 (Axon Instruments, Molecular Devices, ZDA) in polavtomstkega izračuna relativne sposobnosti rasti dvojnih mutant, opisanega v diplomskem delu Petre Kaferle (Kaferle, 2008).



Slika 27: *Primer posnete galaktozne plošče št. 2*.

Rezultati analize SDL so zbrani v Tabeli 3. Pri določitvi meje smo za značilne genetske interaktorje upoštevali tiste mutante, katerih relativna sposobnost rasti je bila pod 0,4 (2,5-krat slabša relativna sposobnost rasti) pri eni biološki ponovitvi in hkrati pod 0,67 (1,5-krat slabša relativna sposobnost rasti) pri drugi biološki ponovitvi. Iz končnega seznama genetskih interaktorjev smo izločili seve z delecijo genov, povezanih s presnovo galaktoze, histidina, arginina in lizina.

Določili smo 45 sevov z značilno spremenjeno relativno sposobnostjo rasti na galaktoznem gojišču, od česar je imelo 20 mutant zmanjšano relativno sposobnost rasti. Med sevi s spremenjenim fenotim rasti smo zasledili tudi tiste z rahlo povišano stopnjo rasti. Glede na to, da stefin B ni povzročil močno izraženih sprememb v kvasnih celicah, smo pripisali rahlo povišano stopnjo rasti določenih sevov eksperimentalnemu šumu. Med skupino sevov z izrazitejšo rastjo velja omeniti le sev z izbitim genom YML048W (GSF2). Gen GSF2 kodira integralni membranski protein na ER, ki veže napačno zvite proteine. Povprečna relativna sposobnost rasti obeh bioloških ponovitev seva z izbitim genom GSF2, ki je funkcionalno povezan s proteinsko agregacijo, je imela eno najvišjih vrednosti (10,597).

Tabela 3: *Genetski interaktorji gena stefina B – mutante z zmanjšano relativno sposobnostjo rasti*. Ob oznaki gena je podana funkcija ustreznega proteina in povprečna relativna sposobnost rasti (R) obeh bioloških ponovitev na plošči.

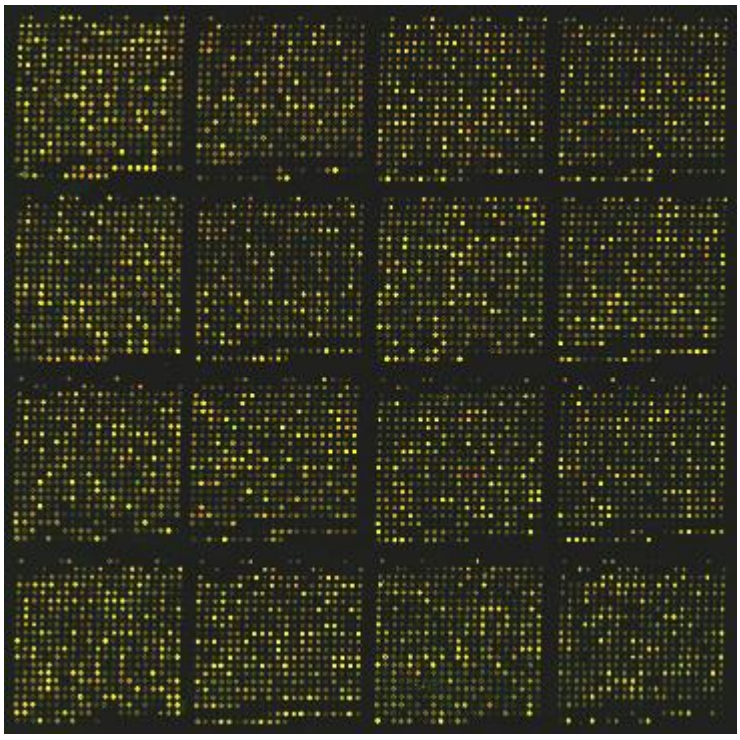
Sistematična oznaka (simbol) gena	Povzetek funkcije proteina	R
YBR267W (REI1)	Citosolni protein, ki sodeluje pri nastanku velike podenote ribosoma, pri mitozi in brstenju.	0,381
YCR085W	Nejasen bralni okvir, ki verjetno ne kodira funkcionalnega proteina. Sicer soseden gen od gena CSM1.	0,408
YCR086W (CSM1)	Jedrni protein, pomemben za delitev kromosomov in rDNA ponovitev pri mejozi.	0,294
YDR174W (HMO1)	Uravnavanje transkripcije in ukrivljanje dsDNA.	0,406
YDR215C	Nejasen bralni okvir, ki verjetno ne kodira funkcionalnega proteina.	0,442
YDR333C	Protein z neznano funkcijo.	0,461
YDR378C (LSM6)	Protein, vpleten v procesiranje jedrne mRNA in njeno citosolno razgradnjo.	0,395
YER155C (BEM2)	Aktivacija Rho GTPaze, sodeluje pri nadzoru tvorbe celične oblike in citoskeleta ter pri brstenju.	0,099
YGR270W (YTA7)	Protein se nahaja na kromatinu in uravnava ekspresijo histonskih genov.	0,314
YHR081W (LRP1)	Jedrni protein, povezan z eksosomi, sodeluje pri uravnavi popravljanja napak pri DNA in rekombinaciji ter je vpleten v procesiranje, izvoz in razgradnjo RNA.	0,331
YIL087C	Mitohondrijski protein z neznano funkcijo.	0,429
YIL128W (MET18)	Popravljanje napak pri DNA, sodeluje pri transkripciji RNA polimeraze in ohranjanju telomer.	0,424
YJR099W (YUH1)	Kvasna ubikvitin hidrolaza, ki cepi vezan ubikvitin na odpadnih proteinih.	0,261
YLL028W (TPO1)	Transportni protein za spermin, spermidin in putreskin (poliamini, rastni faktorji in razkrojevalci proteinov).	0,414
YLR410W (VIP1)	Citosolna kinaza, pomembna pri biosintezi inozitol fosfatov.	0,499
YML032C (RAD52)	Jedrni protein, vpleten v podaljševanje, rekombinacijo in popravljanje DNA verige pri vegetativni rasti in mejozi.	0,429
YNL070W (TOM7)	Protein, ki skrbi za prehod proteinov skozi mitohondrijsko membrano.	0,462
YNR047W (FPK1)	Citoplazemska kinaza.	0,266
YOR309C	Nejasen bralni okvir, ki verjetno ne kodira funkcionalnega proteina.	0,420
YPL067C	Citoplazemski protein z neznano funkcijo.	0,441

Geni, ki so povezani s stefinom B preko sintetične genske interakcije, natančneje geni z oslabljenim fenotipom rasti, so udeleženi pri procesih brstenja, mitoze in mejoze, pri transkripciji, nekateri pa delujejo kot transportni proteini. Naloge in lokalizacijo določenega proteina smo povzeli po spletni bazi podatkov o *Saccharomyces Cerevisiae* (http://www.yeastgenome.org/).

Glede na to, da so celični proteini nemalokrat vpleteni v številne procese hkrati, ki se po možnosti med seboj prepletajo, in zaradi ogromnega števila novo odkritih genov, proteinov in informacij, pridobljenih s pomočjo fukcijske genomike, proteinomike in metabolomike, so podatki opisani z izrazi genske ontologije (GO). S pomočjo GO lahko (če so informacije na razpolago) preiskovanemu genu na podlagi genskih interaktorjev določimo okvirno molekulsko funkcijo pripadajočega proteina, vpletenost v specifičen biološki proces ter celično lokalizacijo. S pomočjo spletne strani http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder/GOTermFinder smo želeli na osnovi GO povezati in umestiti gene, pridobljene z analizo SDL, v celovito celično dogajanje. Izkazalo se je, da geni niso značilno povezani niti preko molekulske funkcije niti ne sodelujejo v kakšnem skupnem biološkem procesu.

4.4.8 Določanje sprememb v izražanju genov kvasovke kot posledica izražanja stefina B z metodo mikromrež

Pri določitvi vpliva vstavljenega gena stefina B v genom kvasovke na povišanje ali znižanje ekspresije ostalih kvasnih genov smo primerjali stopnjo izražanja genov celic BY4742 z vstavljenim vektorjem pRD53 kot nosilcom gena za stefin B (sev D22) s stopnjo izražanja genov celic BY4742 z vstavljenim praznim plazmidom pRD53. V ta namen smo mikromreže po hibridizaciji in spiranju (opisano v točki 3.4.2.14 *DNA mikromreže*) posneli z optičnim čitalcem GenePix 4100A ter sliko analizirali s pripadajočo programsko opremo (Slika 28). Vrednosti razmerja intenzitet barvil Cy5:Cy3 smo normalizirali s programom Nomad.



Slika 28: *Posnetek mikromreže genoma kvasovke S.cerevisiae, celic seva BY4742 z /brez vstavljenega stefina B E31.* Rdeč signal priprada barvilu Cy5 - testiranemu sevu z vstavljenim stefinom B E31, zelen signal kontrolnemu sevu, označenim z barvilom Cy3. Rumen signal je posledica primerljivih intenzitet rdečega in zelenega signala.

Za mejo značilne spremembe genskega izražanja smo izbrali 3-kratni faktor (pri analizi smo upoštevali, da je bila absolutna vrednost log 2 od vrednosti razmerja intenzitet barvil Cy5:Cy3 večja od 1,585). Ob prisotnosti stefina B se je stopnja izražanja spremenila 88-tim kvasnim genom za več kot 3-krat, od tega se je stopnja izražanja povišala 32-tim genom (Tabela 4), znižala pa 56-tim genom (Tabela 5).

Tabela 4: *Vpliv stefina B na genom kvasovke: geni s povišano stopnjo izražanja*. Sistematičnim oznakam (simbolom) genov sledi vrednost log 2 od vrednosti razmerja intenzitet barvil Cy5:Cy3.

Geni s vsaj 3-krat višjo stopnjo izražanja					
Oznaka gena	*log2*	*Oznaka gena*	*log2*	*Oznaka gena*	*log2*
YNR044W (AGA1)	*2,92*	*YMR120C (ADE17)*	*2,00*	*YPL139C (UME1)*	*1,73*
YGL089C (MFα2)	*2,62*	*YMR206W*	*1,98*	*YDL204W (RTN2)*	*1,72*
YEL011W (GLC3)	*2,48*	*YGL090W (LIF1)*	*1,95*	*YML128C (MSC1)*	*1,71*
YFR015C (GSY1)	*2,48*	*YBR296C (PHO89)*	*1,91*	*YOR178C (GAC1)*	*1,69*
YJR004C (SAG1)	*2,38*	*YDR345C (HXT3)*	*1,88*	*YPR030W (CSR2)*	*1,68*
YCR098C (GIT1)	*2,38*	*YDR342C (HXT7)*	*1,85*	*YHR094C (HXT1)*	*1,68*
YLR136C (TIS11)	*2,36*	*YKL178C (STE3)*	*1,85*	*YKL217W (JEN1)*	*1,67*
YMR291W	*2,27*	*YMR105C (PGM2)*	*1,85*	*YDR516C (EMI2)*	*1,63*
YLR377C (FBP1)	*2,07*	*YGL055W (OLE1)*	*1,83*	*YIL080W*	*1,62*
YDR343C (HXT6)	*2,02*	*YLR149C*	*1,81*	*YOR344C (TYE7)*	*1,60*
YCRX18C	*2,00*	*YDL215C (GDH2)*	*1,78*		

Tabela 5: *Vpliv stefina B na genom kvasovke: geni z znižano stopnjo izražanja*. Sistematičnim oznakam (simbolom) genov sledi vrednost log 2 od vrednosti razmerja intenzitet barvil Cy5:Cy3.

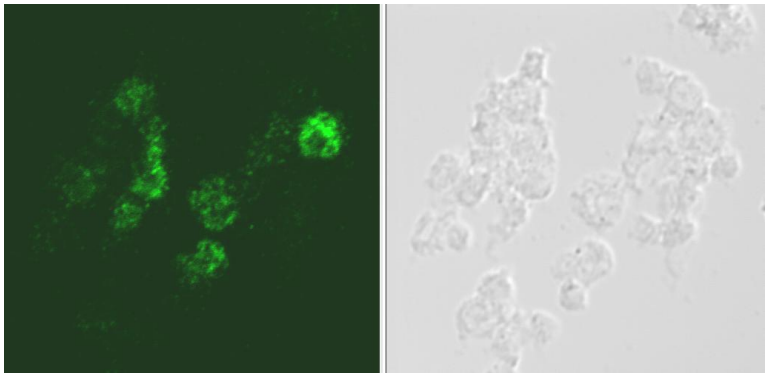
Geni s vsaj 3-krat nižjo stopnjo izražanja					
Oznaka gena	*log2*	*Oznaka gena*	*log2*	*Oznaka gena*	*log2*
YGL255W (ZRT1)	*-3,32*	*YAR060C*	*-1,89*	*YKL097C*	*-1,69*
YLL060C (GTT2)	*-3,18*	*YBL082C (RHK1)*	*-1,89*	*YGL241W(KAP114)*	*-1,64*
YBL018C (POP8)	*-2,94*	*YDL003W (MCD1)*	*-1,89*	*YLR365W*	*-1,64*
YBR087W (RFC5)	*-2,56*	*YGL158W (RCK1)*	*-1,89*	*YOL017W (ESC8)*	*-1,64*
YBR085W (AAC3)	*-2,47*	*YGR070W (ROM1)*	*-1,89*	*YOL162W*	*-1,64*
YNL036W (NCE103)	*-2,47*	*YKL069W*	*-1,89*	*YDR015C*	*-1,60*
YOR394W	*-2,47*	*YPL241C (CIN2)*	*-1,89*	*YDR526C*	*-1,60*
YBR124W	*-2,40*	*YAR053W*	*-1,84*	*YEL008W*	*-1,60*
YBL064C (PRX1)	*-2,32*	*YBL010C*	*-1,84*	*YER106W (MAM1)*	*-1,60*
YBL085W (BOI1)	*-2,32*	*YMR069W*	*-1,84*	*YER135C*	*-1,60*
YBR098W (MMS4)	*-2,25*	*YPL008W (CHL1)*	*-1,84*	*YLR184W*	*-1,60*
YCL034W (LSB5)	*-2,12*	*YBL079W (NUP170)*	*-1,79*	*YMR031WA*	*-1,60*
YOR221C (MCT1)	*-2,12*	*YBR047W*	*-1,79*	*YMR175W (SIP18)*	*-1,60*
YAR029W	*-2,06*	*YBR144C*	*-1,79*	*YNL080C*	*-1,60*
YDR336W	*-2,06*	*YBL091C (MAP2)*	*-1,74*	*YPL065W (VPS28)*	*-1,60*
YJR112W (NNF1)	*-2,00*	*YDL043C (PRP11)*	*-1,74*	*YPL212C (PUS1)*	*-1,60*
YPL209C (IPL1)	*-2,00*	*YDR355C*	*-1,74*	*YPR136C*	*-1,60*
YAL004W	*-1,94*	*YHR169W (DBP8)*	*-1,74*	*YAL007C (ERP2)*	*-1,60*
YAL011W	*-1,89*	*YDR469W (SDC1)*	*-1,69*		

S pomočjo spletne strani http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl smo naboru genov s spremenjeno ekspresijo ob prisotnosti stefina B določili obogatenost skupin genske ontologije (GO) in poiskali povezave med njihovimi biološkimi procesi, funkcijami in celičnimi komponentami. Med vsemi 88-timi geni, ki imajo spremenjeno stopnjo izražanja v prisotnosti stefina B, jih je skoraj 5 % udeleženih pri transmembranskem transportu sladkorjev, podrobneje monosaharidov, med njimi pa je največ tistih, povezanih s transportom heksoz (glukoze, fruktoze in manoze; p-vrednosti med 0,0030 in 0,0015). Pri skupini genov z zvišano stopnjo izražanja so najpogosteje omenjeni biološki procesi transport in presnova sladkorjev (natančneje glukoze), glikogena in glukana. Najpogosteje omenjena funkcija je transmembranski transport (23 %), med 32 ugotovljenimi geni z močnejšo ekspresijo pa najdemo tudi dva

gena, povezana s celično adhezijo – sprijemnostjo (*SAG1* in *AGA1*). Ta rezultat je v skladu z opažanjem, da je filtriranje celic seva D22 potekalo veliko počasneje v primerjavi s kontrolnimi celicami, kar bi lahko nakazovalo na njihovo povečano stopnjo adhezije. Dobra četrtina vseh genov z višjo stopnjo izražanja kodira proteine, ki jih lahko najdemo v plazemski membrani (26 %, p-vrednost 0,00085). Pri skupini genov z znižano stopnjo izražanja ob prisotnosti stefina B nam analiza obogatenosti razredov GO ni podala skupnih pojmov genov glede njihovih funkcij in lokacij, pa tudi pri iskanju skupne točke med biološkimi procesi se je izkazalo, da gre za bolj funkcijsko razpršene gene, med katerimi je izstopala le kromosonska oddvojitev (15 % vseh genov, p-vrednost 0,00187).

4.4.9 Potrditev prisotnosti agregatov stefina B E31 v transformiranih kvasnih celicah BY4742 z imunofluorescenco

Z metodo imunofluorescence smo želeli potrditi prisotnost prekomerno izraženega stefina B v kvasnih celicah *S. cerevisiae* seva D22 (stefin B E31 z vektorjem pRD53 v sevu BY4742). S konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 smo posneli fluorescenco sekundarnih Alexa Flour 488 kozjih antikunčjih protiteles, ki so bila specifično vezana na primarna poliklonska kunčja protitelesa proti človeškemu stefinu B. Opazili smo, da je med različnimi kvasnimi celicami prišlo do različne stopnje izražanja stefina B, saj je bil stefin B v nekaterih celicah prisoten v velikih količinah (40 % vseh celic), v drugih pa je bil signal izraženega stefina B komaj zaznaven (60 % vseh celic). Celice so bile zlepljene med seboj, nemalokrat v gručah. Leplenje celic je bilo opaženo tudi pri prekomernem izražanju stefina B v sevu AJY217 (rezultati niso prikazani). V kvasnih celicah BY4742 je bil lepo viden signal izraženega stefina B in s tem je bila njegova prisotnost v celicah potrjena, prav tako smo lahko opazili nastale agregate (Slika 29), vendar pri manjšem številu celic. Opazovane celice BY4742 smo obarvali tudi z barvilom DAPI (jedrni označevalec), kar nam je pomagalo določiti lokalizacijo izraženega stefina. Stefin B vsekakor ni prisoten v celičnem jedru, niti se agregati ne koncentrirajo okoli njega, kakor je bilo dokumentirano v delu S. Čeruja (Čeru in sod., 2010). Prekomerno izražen stefin B se nahaja v citoplazmi kvasne celice, prav tako njegovi agregati.

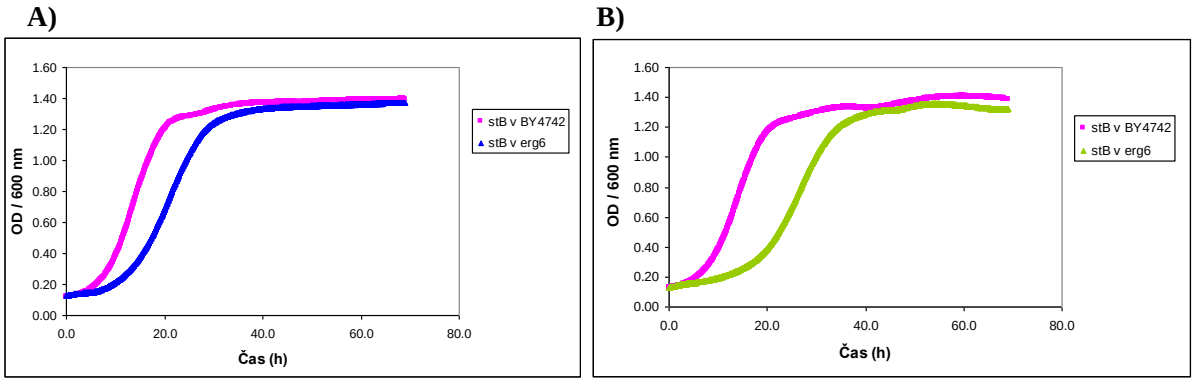


Slika 29: *Lokalizacija stefina B E31 v kvasnih celicah BY4742*. Imunofluorescenčno označen stefin B (levo), z-projekcija svetlega polja (desno). Slike posnete s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5.

4.4.10 Poskus povečanja števila agregatov stefina B v kvasnih celicah z inhibicijo razgradnje proteinov

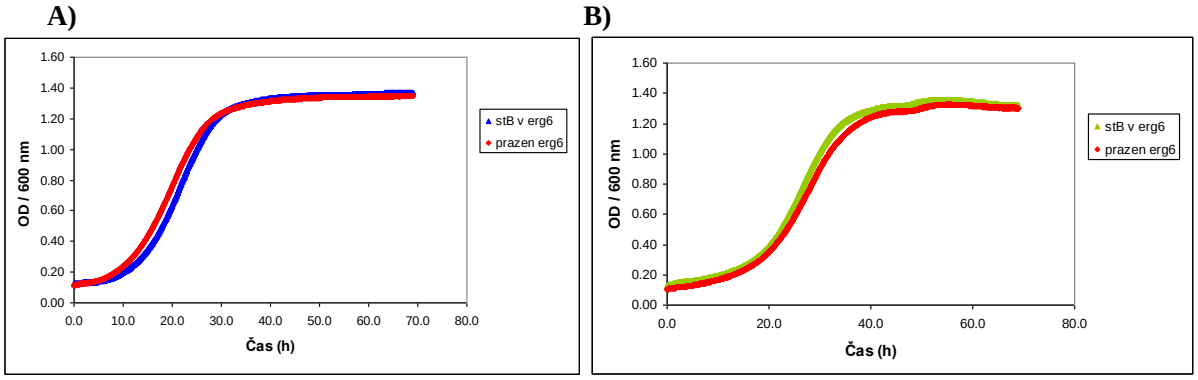
Glede na to, da izražanje stefina B E31 ni prineslo izrazitega celičnega odziva na prisotnost testiranega proteina in njegovih agregatov znotraj kvasnih celic, smo se odločili povečati število agregatov z (delno) okvaro celičnih mehanizmov za odstranjevanje napačno zvitih proteinov. Uporabili smo dva inhibitorna reagenta, MG132 in PMSF, ki se razlikujeta po mehanizmu delovanja. PMSF inhibira razgradnjo dolgoživečih proteinov z blokado avtofagije, MG132 pa razgradnjo kratkoživečih proteinov preko inhibicije proteasoma (Lee in Goldberg, 1996). V literaturi smo zasledili podatek (Lee in Goldberg, 1998), da ima reagent MG132 vpliv samo na mutiran sev *erg6* (oslabljena membrana), saj je membrana divjega tipa *S. cerevisiae* nepropustna za to substanco. Tako smo izvedli vse nadaljnje eksperimente na sevu *erg6*. Vpliv obeh inhibitorjev smo preverili z določitvijo hitrosti rasti celic (rastne krivulje).

Analiza rastnih krivulj (Slika 30) nam je potrdila večjo dovzetnost celic seva *erg6* (z oslabljeno celično membrano) za delovanje izbranih inhibitorjev v primerjavi z celicami seva BY4742 (neokrnjena celična membrana).



Slika 30: *Vpliv inhibitorjev razgradnje proteinov na seva erg6 in BY4742 z vstavljenim stefinom B E31*. Sev *erg6* ima oslabljeno celično membrano, medtem ko je celična membrana seva BY4742 stabilna. (A) Vpliv inhibitorja MG132. (B) Vpliv inhibitorja PMSF.

Rastne krivulje testiranih celic pri dodanem inhibitorju MG132 (Slika 31A) se skoraj prekrivajo, prav tako pri dodanem inhibitorju PMSF (Slika 31B).



Slika 31: *Vpliv inhibitorjev razgradnje proteinov na sev erg6 z oziroma brez integriranega stefina B E31*. Za kontrolni sev (celice brez integriranega stefina B E31) je služil sev erg6 z vstavljenim praznim vektorjem pRD53. (A) Vpliv inhibitorja MG132. (B) Vpliv inhibitorja PMSF.

Pri primerjavi rastnih krivulj med celicami seva *erg6* z integriranim stefinom B E31 in s celicami z vstavljenim praznim nosilnim vektorjem (negativna kontrola) smo zaključili, da prisotnost stefina B E31, tudi v primeru delne inhibicije razgradnje proteinov znotraj celic, nima izrazitejšega vpliva.

5 Razprava

5.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril

5.1.1 Primerjava fibrilacije stefina B z drugimi modelnimi proteini

Kljub številnim podobnostim z ostalimi modelnimi proteini je proces fibrilacije stefina B precej specifičen. Če se osredotočimo na začetno fazo zakasnitve, je prehod, ki določa trajanje faze zakasnitve, reakcija prvega reda.

- Kinetika procesa faze zakasnitve stefina B je v nasprotju s procesom fibrilacije inzulina (Ahmad in sod., 2005; Librizzi in Rischel, 2005) ali transtiretina (TTR), kjer je korak faze zakasnitve dvomolekularen. Pri TTR faza zakasnitve sovpada z disociacijo relativno stabilne tetramere, kar je predpogoj za tvorbo fibril. Tako pride pri TTR do tekmovanja dveh vzporednih procesov, med ponovnim nastankom tetramer in tvorbo fibril (Wiseman in sod., 2005; Sørensen in sod., 2007).
- Pri fibrilaciji amilina oziroma islet amiloid polipeptida (IAPP) je faza zakasnitve popolnoma neodvisna od proteinske koncentracije (Padrick in Miranker, 2002).
- Tretjo obliko faze zakasnitve lahko najdemo pri fibrilaciji histonov (Munishkina in sod., 2004), kjer pride do anomalije. Trajanje faze zakasnitve je namreč obratno sorazmerno s koncentracijo proteina (večja kot je koncentracija, krajša je faza zakasnitve), kar lahko razložimo s pojavnostjo »stranske poti«.
- Fenomen »stranske poti« so opazili tudi pri fibrilaciji lahke verige imunoglobulina (Souillac in sod., 2002).
- Pri β_2-mikroglobulinu so potrdili prisotnost več različnih oblik končnih fibril, kar je posredno povezano s prisotnostjo vsaj dveh vzporednih fibrilacijskih poti, od katerih naj bi bila ena neodvisna od nukleacije, druga pa naj bi bila odvisna od nukleacije in naj bi vključevala začetno fazo zakasnitve (Radford in sod., 2005).
- Peptid amiloid-beta prav tako fibrilira vsaj preko dveh vzorednih poti. Aktivacijsko energijo polimerizacijskega procesa, odvisnega od nukleacije (Sabate in sod., 2003), pripisujejo reorganizaciji agregatov oziroma konformacijskim spremembam oligomer, ki se povezujejo v protofibrile, združevanje protofibril preko ne-kooperativnega podaljševanja, ki je neodvisno od nukleacije, pa so opisali kot linearno koloidno agregacijo (Carrotta in sod., 2005).

Kinetiki začetne faze fibrilacije stefina B v celoti ne ustreza nobena od zgoraj opisanih reakcij. Z IAPP si stefin B deli začetno fazo zakasnitve prvega reda, medtem ko se je sledeča faza rasti pri nižjih temperaturah izkazala za reakcijo drugega reda, kar je bliže fibrilaciji inzulina ali TRR. Pri višjih temperaturah pri kinetiki fibrilacije stefina B naletimo na anomalijo procesa, kot je bila opažena pri histonih (Munishkina in sod., 2004). Prisotnost vzporednih fibrilacijskih poti, kot se v našem primeri kaže v obliki fenomena »stranske poti«, lahko zapazimo tako pri β_2-mikroglobulinu, peptidu amiloid-beta, TRR in fosfoglicerat kinazi (Radford in sod., 2005).

5.1.2 Vloga prepletanja domen pri amiloidni fibrilaciji

Model, ki je bil nedavno deležen precej pozornosti na področju amiloidne fibrilacije, je t.i. model kontinuiranega, zaporednega prepletanja domen (*ang.* »run-away domain-swapping model«). Ta predpostavlja, da so osnovne gradbene enote tvorjenja fibril oligomere s prepletenimi domenami, začenši s prepletenimi dimerami (Guo in Eisenberg, 2006; Schlunegger in sod., 1997). Prisotnost prepletenih dimer in višjih oligomer (vse do oktamer) je bila namreč potrjena pri številnih amiloidogenih proteinih (Ahmad in sod., 2005; Nillson in sod., 2004; Serag in sod., 2001). Prav tako je stefin B, podobno kot ostali cistatini

(Jerala in Žerovnik, 1999; Staniforth in sod., 2001; Janowski in sod., 2001), podvržen tvorbi prepletenih dimer. Z določitvijo tri-dimenzionalne strukture tetramere stefina B (Jenko Kokalj in sod., 2007) je bilo ugotovljeno, da je tetramera sestavljena iz dveh prepletenih dimer, ki se med seboj povežeta z mehanizmom »izmenjave zanke«, imenovane rokovanje (*ang.* »hand-shaking«). Ravno proces rokovanja je verjetno razlog, da izolirane tetramere ne vodijo pod izbranimi pogoji do nastanka fibril. V primeru cistatina C je bilo pokazano, da protein ne tvori amiloidnih fibril, če preprečimo nastajanje prepletenih dimer (Nillson in sod., 2004). Medtem pa so Morgan in sod. za stefina B pokazali, da model direktnega zlaganja prepletenih dimer pri tvorbi fibril ni ustrezen in da so potrebne dodatne prostorske preureditve β trakov, s poudarkom na prolinski izomerizaciji (Morgan in sod., 2008).

5.1.3 Določitev energetskih barier za začetek fibrilacije, nukleacijo in podaljševanje fibril

Skupna lastnost precejšnjega števila amiloidogenih proteinov je, da lahko brez večjih težav istočasno zavzamejo dve različni konformacij (Ferreira in De Felice, 2001), tako da hkrati obstajata dve precej stabilni konformeri, kar je posledica visokih energetskih barier med njima. Pri stefinu B so Žerovnik in sod. opazili različna vmesna stanja in oligomere (Žerovnik in sod., 1992, 1997), ki so bile ena ob drugi v ravnotežju prisotne dalj časa, torej so bile po sklepanju med njimi prisotne visoke energetske bariere (Jerala in Žerovnik, 1999).

Prvi fazi fibrilacije stefina B (značilna sprememba CD signala) pripada izrazito visoka energetska bariera. Predstavlja začetek tvorbe fibril (Slika 2) s pripadajočo aktivacijsko energijo 95 ± 5 kcal mol^{-1}, kar ustreza skoraj popolnemu odvitju stefina B, ki je predpogoj za nastanek prepletenih dimer. Podobno visoko vrednost energetske bariere so namreč opazili že pri nastanku prepletenih dimer stefina A pri nevtralnih pH vrednostih (Staniforth in sod., 2001).

Drugi fazi fibrilacijskega procesa so pri mnogih amiloidogenih proteinih, med katere sodijo α-sinuklein (Uversky in sod, 2001b), človeški inzulin (Ahmad in sod., 2005), barstar (Kumar in sod., 2007) in peptid amiloid-beta (Sabate in sod., 2005; Kusumoto in sod., 1998), pripisali energetsko bariero 25 kcal mol^{-1}. Omenjena vrednost je značilna za prolinsko izomerizacijo.

V primeru stefina B je bila aktivacijska energija druge faze (značilna sprememba ThT fluorescence), ki odraža podaljševanje fibril, ocenjena na 27 ± 5 kcal mol^{-1}. Vrednost je blizu opaženi barieri pri prehodu dimere v tetramero (Jenko Kokalj in sod., 2007), ki znaša 28 ± 3 kcal mol^{-1}, kar nakazuje na morebitno potrebo po reorganizaciji podenot za nadaljevanje fibrilacijskega procesa. V tetrameri stefina B (določene z uporabo mutante P79S stefina B Y31) je prolin 74 v cis izomerni obliki (Jenko Kokalj in sod., 2007). To je vzrok za počasno oligomerizacijo ob ponovnem zvijanju in ima značilno energetsko bariero 28 ± 3 kcal mol^{-1}. Konformacija ob peptidni vezi Pro 74 v monomeri je sicer v trans obliki (Stubbs in sod., 1990).

Poleg tega je bila pred kratkim določena NMR struktura zrelih fibril stefina B (Morgan in sod., 2008). Podatki kažejo, da je jedro fibrila sestavljeno iz štirih (od petih) β trakov. Povezujoče zanke so izpostavljene okolici, tako kot pri monomerni obliki, medtem ko α vijačnica in prvi β trak (prvih 37 aminokislin) nista del fibrilnega jedra. Pri povezavi drugega in tretjega β traku iz dveh različnih molekul s petim β trakom iz tretje molekule, se zanki 4 in 5 sterično močno približata, prolinska izomerizacija prolina P74 iz trans v cis obliko pa prepreči njun preplet. Podobno se zgodi v primeru tetramere, kar razloži zelo podobne vrednosti aktivacijskih energij tetramerizacije in druge faze fibrilacije (podaljševanje fibril).

Zaradi energetske podobnosti nastajanja tetramere in rasti zrelih fibril stefina B ter na osnovi poskusov s prolil izomerazo (Smajlović in sod., 2009) smo sklepali, da lahko energetsko bariero stefina B, ki jo opazimo pri podaljševanju fibril (30 ± 4 kcal mol^{-1}), pripišemo prolinski izomerizaciji. Znano je, da prolinska izomerizacija močno vpliva na hitrost proteinskega zvijanja. Poleg tega so že pri nekaterih drugih proteinih opazili, da je prolinska izomerizacija vplivala na zastopanost različnih oligomer na začetku reakcije fibrilacije (Eakin in sod., 2006). V primeru p13suc1 ima pomembno vlogo tudi pri nastanku prepletenih dimer (Rousseau in sod., 2001), saj je razmerje med monomero in prepleteno dimero odvisno od konformacijske oblike dveh ohranjenih prolinov v prepletni zanki.

Pri usklajevanju modelnih parametrov in eksperimentalnih podatkov se nam je pri spremembi ThT fluorescence razkrila še tretja energijska bariera z aktivacijsko entalpijo 55 kcal mol^{-1}. Pripisali smo jo sosledju počasnih konformacijskih sprememb znotraj nukleacijskega jedra, kar je že bilo zavedeno v literaturi kot konformacijska reorganizacija začetnih agregatov (Serio in sod., 2000; Kumar in sod., 2007; Cerda-Costa in sod., 2007). Energetska bariera pa bi lahko, glede na vrednost, predstavljala tudi zaporedno izomerizacijo dveh prolinov.

5.1.4 Smernice za nadaljnje študije

Veliko podrobnosti predlaganega modela mehanizma fibrilacije stefina B je ostalo še nedorečenih. Povezava med prepleteno dimero in zrelimi fibrili še ni pojasnjena: do katere mere se prepletene dimere razpletejo pred združevanjem v fibrile, kakšna je oblika kritičnih oligomer, pri katerih oligomerah pride do izraza prolinska izomerizacija, kaj vpliva na razmerje med »stransko potjo« in potjo fibrilacije, kam lahko umestimo stabilno tetramero, kako nastane heksamera... Veljalo bi tudi raziskati, če sta poti fibrilacije enaki pri nižjih in višjih temperaturah. Za odgovore na zastavljena vprašanja bo potrebno nadaljnje delo o strukturnih, termodinamskih in kinetičnih lastnosti prehodov med oligomernimi intermediati.

Predlagan model vsekakor lahko služi kot osnova za naknadno biokemijsko in biofizikalno karakterizacijo oligomernih intermediatov stefina B. Z manipulacijo reakcijskih pogojev prve in druge faze fibrilacije bi lahko dosegli manjšo težnjo kritičnih oligomer po združevanju ter s tem povečali količino razpoložljivih kritičnih oligomer, potrebnih za natančnejše študije. Hkrati bi lahko oligomere kinetično stabilizirali ter morda tako popolnoma preprečili njihovo agregacijo. Vsekakor so nadaljnje raziskave oligomernih intermediatov zaradi njihove toksičnosti izjemno pomembne.

5.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije

5.2.1 Stefin B kot vezavni protein za bakrove ione

K študiju fibrilacije stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov nas je vzpodbudilo ugotovljeno dejstvo, da stefin B močno veže baker, medtem ko pri stefinu A ni bilo zapažene nobene interakcije. Pri povezavi eksperimentalnih podatkov z odgovarjajočimi parametri vezavnih mest se je izkazalo, da ima stefin B pri pH 7 kar dve vezavni mesti z afiniteto vezave pikomolarnega velikostnega razreda in da veže bakrove ione tudi pri pH 5, tokrat z afiniteto nanomolarnega velikostnega razreda. Pri dodatnih eksperimentih z izotermalno titracijsko kalorimetrijo smo preverili še sposobnost vezave bakrovih ionov na različne oblike stefina B. Varianta stefina B Y31 je vezala bakrove ione s podobno afiniteto kot bolj razširjena nemutirana oblika stefina B E31, medtem ko pri mutirani varianti stefina B P79S, sicer prisotni v tetramerni obliki, ni bilo zapažene specifične vezave bakrovih ionov niti pri pH 7 niti pri pH 5 (Žerovnik in sod., 2006).

V naslednjem koraku smo preverili vpliv prisotnosti bakrovih ionov na potek fibrilacije stefina B. Pri nizu eksperimentalnih reakcij smo opazovali obnašanje nemutiranega stefina B E31, variante stefina B Y31 in mutirane variante stefina B P79S ob prisotnosti in odsotnosti bakrovih ionov. Izkazalo se je, da je prisotnot bakrovih ionov inhibirala rast fibril pri vseh treh oblikah stefina B že pri molarnem razmerju 1:1. Višji procent inhibicije je pri vseh fibrilarnih reakcijah sovpadal z višjo koncentracijo bakrovih ionov. Kljub temu, da mutanta variante P79S ne veže bakrovih ionov pri nevtralnem pH-ju (verjetno zaradi tetramerne oblike) in je bila intenziteta fibrilacije že sicer veliko manjša kot pri nemutiranem stefinu B E31 oz. varianti stefina B Y31, je še vedno prišlo do inhibicije rasti fibril ob prisotnosti bakrovih ionov.

Razlike v specifičnosti vezave bakrovih ionov pri različnih oblikah stefina B smo želeli najprej preveriti na strukturnem nivoju. Vpliv prisotnosti bakrovih ionov na sekundarno in terciarno strukturo proteinov smo preverili s pomočjo spektrofotometrije cirkularnega dikroizma (CD).

Za določitev sekundarne strukture pred in po dodatku bakrovih ionov smo vsem preiskovanim proteinom posneli spektre CD v dalnjem UV območju. Spektri se ob prisotnosti oziroma odsotnosti bakrovih ionov niso razlikovali, zaradi česar smo zaključili, da vezava bakrovih ionov na stefin B ne spremeni njegove sekundarne strukture. Ugotovitve smo potrdili tudi z izračuni približkov sekundarne strukture s pomočjo spletnega programa Dichroweb (Whitmore in Wallace, 2004).

Terciarno strukturo stefina B in njegovih variant smo preverili s spektri CD v bližnjem UV območju. Izkazalo se je, da je stefin B občutljiv na prisotnost bakrovih ionov pri pH 7 (precejšnji upad eliptičnosti), medtem ko pri pH 5 nismo zaznali sprememb.

Stabilnosti stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov smo določili s termično denaturacijo. Pri spektrih, posnetih pri valovni dolžini 210 nm (ki omogoča uporabo nižjih koncentracij proteina – okoli 20 μM), nismo zaznali razlike pri temperaturi, kjer je polovica proteina denaturiranega, medtem ko je prišlo pri segrevanju ob spektralni valovni dolžini 277 nm (višje koncentracije proteina – 100 μM) do močne agregacije proteina pri pH 7 in do agregacije v manjšem obsegu pri pH 5 (Žerovnik in sod., 2006).

Zanimivo je, da stefin A, za razliko od stefina B, ne veže bakrovih ionov, čeprav imata praktično enako 3D strukturo. Kljub temu, da je struktura obeh proteinov skoraj identična, pa se njuno nukleotidno zaporedje razlikuje na precej mestih. Stefin B ima namreč na C-terminalnem delu aminokisline histidine na pozicijah 92, 75, 66 in 58. Glede na to, da so histidini neobhodno potrebni pri vezavi bakrovih ionov pri velikem številu proteinov, predstavljajo znotraj C-terminalnega dela stefina B verjetno (vsaj) del bakrovega vezavnega mesta. Poleg štirih omenjenih histidinov na C-terminalnem delu pa je na mestu 18 prisoten še en histidin, ki bi lahko tudi bil, glede na določeno 3D strukturo proteina, del bakrovega vezavnega mesta. Niti stefin A niti cistatin C nimata na teh mestih histidinskih aminokislin, kar namiguje na to, da je stefin B edini med človeškimi cistatini, ki ima vezavno(a) mesto(a) za bakrove ione. Omenimo še, da se mutanta variante stefina B P79S razlikuje od nemutiranega stefina B E31 in variante stefina B Y31 po točkovni mutaciji znotraj C-terminalnega dela. To bi lahko sterično vplivalo na obliko vezavnega mesta. Naj spomnimo, pri P79S ni bilo zapažene nobene vezave niti pri pH 7 niti pri pH 5, čeprav je do inhibicije fibrilacije vsaj deloma prišlo. Vsekakor pa na tem mestu ne smemo pozabiti omeniti, da se mutanta variante P79S razlikuje od ostalih oblik tudi po tem, da je primarno v tetramerni obliki. Možno je namreč, da je vezano mesto za bakrove ione porušeno zaradi tvorbe tetramere.

Ena od funkcijskih nalog stefina B v možganih bi lahko bila regulacija občutljive bakrove homeostaze. Homeostaza bakra je v možganih zelo pomembna, zato vloga vezave bakra nekega proteina oziroma izguba sposobnosti te vezave lahko močno vpliva na patološki razvoj dogodkov, povezanih z odstopajočo količino prostega bakra v možganih. V primeru agregacije in fibrilacije stefina B bi se homeostaza porušila, saj bi se vezani bakrovi ioni sprostili, ti pa bi potencialno lahko inhibirali nadaljnji nastanek amiloidnih fibril stefina B. Glede na to, da je bilo pokazano, da so prefibrilarne oligomere, ki vodijo do fibril, veliko bolj toksične od samih fibril (zaradi tvorbe por v membranah celic), bi inhibicija tvorbe fibril pripeljala do kopičenja prefibrilnih oligomer in posledično neizogibne celične smrti. S tega vidika je področje nove funkcije stefina B v celicah kot vezavnega proteina bakrovih ionov zanimivo gradivo za nadaljnje študije.

Zaključimo lahko, da se pri stefinu B bakrovi ioni vežejo specifično zgolj na monomero in dimero, medtem ko se pri tetrameri afiniteta vezave izgubi. To se ujema z ugotovitvijo, da pride do inhibicije fibrilacije stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov.

5.2.2 Inhibicjia amiloidne fibrilacije stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov

Inhibicija amiloidne fibrilacije stefina B zaradi prisotnosti bakrovih ionov bi lahko bila posledica stabilizacije proteina z bakrovimi ioni. S tekočinsko ločevalno kromatografijo na osnovi velikosti proteinov (aparatura FPLC) smo pokazali, da bakrovi ioni pri pH 7 pomaknejo razmerje med monomero in dimero v prid dimere (Žerovnik in sod., 2006), kar se pri pH 5 že samodejno zgodi. Običajno od te točke dalje steče proces fibrilacije, ki jo prisotnost bakrovih ionov očitno zaustavi. Bakrovi ioni oziroma njihova vezava na C-terminalni del stefina B bi tako lahko stabilizirala dimerno obliko stefina B.

5.2.3 Vpliv vezave bakrovih ionov na amiloidno fibrilacijo drugih amiloidogenih proteinov

Pri številnih drugih amiloidogenih proteinih so odkrili vezavna mesta za bakrove ione, s tem da je vezava bakra pri enih specifičen proces, pri drugih pa nespecifičen. V splošnem so se bakrovi ioni (kot ostale redoks kovine) izkazali kot dejavnik, ki pospešuje agregacijo oziroma polimerizacijo.

- Kljub temu, da prionski protein specifično veže bakrove ione v svojem nativnem stanju (Brown in sod., 1997), je prisotnost bakrovih ionov pospešila prionsko agregacijo ter dvignila infektivnost izoliranih prionskih proteinov (Qin in sod., 2000). V slednjem primeru prionske agregacije je šlo za nespecifično vezavo, pri specifični vezavi na prionski protein pa je bakrov ion stabiliziral celično, topno obliko priona (PrPC) ter s tem preprečil tvorbo delno razvitih intermediatov, ki so potrebni za proces fibrilacije (Tsenkova in sod., 2004).
- Pri nativno razvitem proteinu α-sinukleinu vezava bakrovih ionov povzroči agregacijo in fibrilacijo (Rasia in sod., 2005). Stefin B je sicer nativno globularne oblike.

- Bakrovi ioni se vežejo tudi na prekurzorski protein peptida amiloid-beta (APP) ter na njegov produkt peptid amiloid-beta, ki nastane po delovanju β-sekretaz (Hesse in sod., 1994; Atwood in sod., 2000). Medtem ko vezava bakrovih ionov na APP prepreči delovanje β-sekretaz in s tem nastanek peptida amiloid-beta (Borchardt in sod., 1999), vezava bakrovih ionov na peptid amiloid-beta sproži njegovo polimerizacijo (Atwood in sod., 1998). V isti študiji so pokazali tudi, da je za vezavo bakrovih ionov in posledično agregacijo potrebna prisotnost histidinov. V naslednji raziskavi so dokazali, da vezava bakrovih in cinkovih ionov na peptid amiloid-beta (1-40), za razliko od železovih ionov, zaustavi amiloidno fibrilacijo (Raman in sod., 2005).
- Protein β2-mikroglobulin ob prisotnosti bakrovih ionov (in ne tudi nikljevih) bolj izrazito agregira (Eakin in sod., 2006). Bakrovi ioni se namreč vežejo z visoko afiniteto na konformacijsko spremenjeno monomero M*, kar premakne ravotežje med enotami proti prefibrilarnim oligomeram. V njihovem primeru torej specifična vezava bakrovih ionov na oligomere pospeši amiloidno agregacijo β2-mikroglobulina.

Glede na zgoraj opisane primere vpliva bakra kot inhibitorja amiloidnih fibrilacij različnih proteinov predlagamo, da lahko specifična vezava bakrovih ionov (verjetno tudi drugih kovinskih ionov) pri globularnih proteinih deluje kot zaščita pred amiloidno fibrilacijo. Ohranjanje ustrezne interakcije protein - kovinski ion bi lahko vplivalo na vstop amiloidnih proteinov v sam amiloidni proces. Zavedati pa se moramo, da nespecifična vezava bakrovih ionov ne prepreči nastanka prefibrilarnih agregatov. Le-ti so za celico veliko bolj toksični od zrelih fibril, kar je bilo za primer stefina B že pokazano (Anderluh in sod., 2005, Čeru in sod. 2008).

Zanimivo je tudi vprašanje, kateri so dejavniki, ki vplivajo na vezavo kovinskih ionov na proteine. Ti dejavniki bi lahko pomagali razumeti vlogo amiloidogenih proteinov pri številnih nevrodegenerativnih boleznih.

Kot pomemben okoljski faktor bi poleg vpliva kovinskih ionov bilo med drugim zanimivo študirati tudi interakcijo z lipidi, tako umetnimi kot naravnimi membranami. Znano je, da ob membranah amiloidne oligomere spremenijo konformacijo in se obnašajo podobno kot bakterijski toksini.

5.3. *In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta

5.3.1 Dognanja *in vitro* študij

Ugotovili smo, da varianta stefina B Y31 (pretežno dimerne oblike) in tetramerna oblika nemutiranega stefina B E31 inhibirata rast fibril peptida amiloid-beta ter da se obe obliki stefina B specifično, koncentracijsko odvisno vežeta na imobiliziran peptid amiloid-beta. Niti pri monomerah, dimerah ali višjih oligomerah nemutiranega E31 teh pojavov nismo opazili. Vzrok za različno obnašanje dimer variante stefina B Y31 in dimer nemutiranega stefina B E31 lahko razložimo z različno stabilnostjo obeh dimer (Rabzelj in sod., 2005). Dimere variante Y31 so namreč bolj nestabilne od bolj pogostih, nemutiranih dimer stefina B E31 in kažejo tendeco tvorbe razrahljanega klobčiča (Žerovnik in sod., 1997). Na osnovi eksperimentov termične denaturacije pa se da sklepati, da so dimere variante Y31 v obliki prepletenih dimer, kar je bilo potrjeno že za dimere stefina A (Jerala in Žerovnik, 1999; Staniforth in sod., 2001) in cistatina C (Janowski in sod., 2001).

Na podlagi 3D struktur monomere (Stubbs in sod., 1990) in tetramere (Jenko Kokalj in sod., 2007) stefina B ter strukturnih vzorcev fibril (Morgan in sod., 2008) bi lahko določili potencialna vezavna mesta peptida amiloid-beta. Vezavna mesta verjetno niso izpostavljena pri višjih oligomerah stefina B E31, saj pri njih nismo opazili znatne spremembe SPR signala. Pri monomerah in dimerah stefina B E31 pa nismo zaznali odziva signala SPR, kar pomeni, da do vezave s peptidom amiloid-beta sploh ni prišlo. Glede na to, da verjetno predstavlja kristalizacija kompleksa stefina B in peptida amiloid-beta prevelik izziv, bi se lahko določitve strukture kompleksa in mesta interakcije stefina B s peptidom amiloid-beta lotili z metodo NMR.

5.3.2 Dognanja *in vivo* študij

V okviru določanja interakcije stefina B s peptidom amiloid-beta je bilo opravljenih tudi nekaj celičnih študij. Poskus s celicami z vstavljenim nemutiranim proteinom APP oziroma z vstavljenim proteinom APP s švedsko mutacijo je pokazal, da hkratno izražanje stefina B z APP v zgoraj omenjenih celicah nima vpliva niti na količino izraženega APP niti na celično preživetje. Ugotovitve se ujemajo s predhodnimi eksperimenti s cistatinom C (Mi in sod., 2001). Zanimivo pa je dejstvo, da je prisotnost stefina B v celicah nemutiranega APP zvišala količino C-terminalnih koncev, cepljenih z β-sekretazo (bCTF), v celicah s proteinom APP s švedsko mutacijo pa znižala nivo C-terminalnih koncev, cepljenih z α-sekretazo (aCTF). Z eksperimentom imunoprecipitacije lizatov celic z nemutiranim APP in stefinom B smo odkrili kompleks, nastal med stefin B in C-terminalnim koncem APP-ja, ki nosi zapis za peptid amiloid-beta. Z nadaljnim poskusom kolokalizacije pa smo pokazali, da stefin B delno kolokalizira z intracelularnimi inkluzijami peptida amiloid-beta (Škerget in sod., 2010). Vsi ti eksperimenti nakazujejo možnost, da stefin B interagira s peptidom amiloid-beta in C-ternimalnimi konci proteina APP *in vivo*.

5.3.3 »Amaterska« šaperonska aktivnost stefina B

Na osnovi vseh eksperimentov v celotni študiji interakcij stefina B s peptidom amiloid-beta smo predlagali novo potencialno funkcijo stefina B, t.j. šaperonska aktivnost prepletenih oligomer stefina B (Škerget in sod., 2010). Namreč, Di Giamo in sod. so odkrili, da je stefin B del multiproteinskega kompleksa v cerebelumu, obkrožen s številnimi proteini citoskeleta, med katerimi nobeden izmed njih ni cisteinska proteaza (Di Giamo in sod., 2002). Tako je moč sklepati, da opravlja stefin B še dodatno(e) funkcijo(e), poleg dobro poznane inhibicije cisteinskih proteaz. Glede na eksperimentalne podatke in slike TEM (Slika 14 in Slika 15) dimerna oblika variante Y31 in tetramerna oblika nemutiranega stefina B E31 zaustavita fibrilacijo peptida amiloid-beta na stopnji granularnih agregatov. Tetramere in prepletene dimere stefina B bi se lahko *in vivo* vezale na peptid amiloid-beta in s tem preprečile njegovo fibrilacijo. Taka »amaterska« šaperonska aktivnost je bila pripisana številnim drugim proteinom, ki se tudi sicer vežejo na peptid amiloid-beta (Wilhelmus in sod., 2007). Pri drugih vezavnih proteinih peptida amiloid-beta je bila predlagana vezava preko robov β trakov (Yoshiike in sod., 2008). Tako izpostavljeno površino lahko pri stefinu B najdemo pri nevezanem β traku številka 5 oziroma pri izpostavljeni površini prepletenih trakov številka 2 in 3, nastali pri procesu prepletanja dimer.

Pri številnih nevrodegenerativnih boleznih, med drugim tudi pri povečanem oksidativnem stresu, pride do prekomerne ekspresije stefina B (Lehtinen in sod., 2009). Naši rezultati nakazujejo, da bi v primeru nepravilnega zvitja stefina B ali njegove agregacije prišlo do izgube potencialne šaperonske aktivnosti stefina B, kar bi lahko bila razlaga za povečan oksidativni stres ob njegovi odsotnosti in za posledično agregacijo drugih proteinov (Žerovnik, 2009; Škerget in sod., 2010).

5.4. Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*

5.4.1 Odziv kvasnih celic *S. cerevisiae* na prisotnost agregatov stefina B E31

Z določitvijo sprememb v genskem izražanju (analiza transkriptoma) ter določitvijo genskih interakcij (eksperiment SDL) po izpostavljenosti kvasnih celic znotrajceličnim agregatom stefina B smo želili pridobiti dodatno razumevanje biokemijskih poti, ki se sprožijo ob prisotnosti domnevno toksičnih agregatov znotraj žive celice.

Človeški amiloidogeni protein stefin B E31 smo vstavili v dva različna seva kvasnih celic. S sevom BY4247 smo izvedli analizo sprememb transkriptoma v poskusu z mikromrežami, sev AJY217 pa smo uporabili pri eksperimentu SDL, ki razkriva genske interakcije (sev je kompatibilen za križanje z zbirko delecijskih mutant).

Po potrjeno uspešnih transformacijah stefina B E31 v izbranih kvasnih celicah smo najprej izvedli osnovno biokemijsko in biofizikalno karakterizacijo pridobljenih sevov.

Prisotnost stefina B E31 v kvasnih celicah smo dokazali s pomočjo imunodetekcije. Mikroskopska slika nam je razkrila normalno morfologijo celic, podobno morfologiji kvasnih celic brez vključkov, le da je mestoma prihajalo do delnega grupiranja celic. Pri podrobnejši imunofluorescenčni obdelavi celic pod konfokalnim mikroskopom smo opazili, da je med celicami prišlo do različne stopnje izražanja stefina B E31. Protein je bil namreč pri 40 % vseh celic prisoten v velikih količinah, pri 60 % celic pa je bil signal izraženega stefina B komaj zaznaven (slike niso prikazane). Celice so bile tudi tokrat zlepljene med seboj, nemalokrat v gručah. Imunofluorescenca je tako potrdila prisotnost agregatov znotraj kvasnih celic, vendar pri manjšem številu celic. Agregati niso bili prisotni v celičnem jedru, niti se niso koncentrirali okoli njega, kot je bilo opaženo za prekomerno izražen stefin B na sesalskih celičnih kulturah, pač pa so se nahajali v citoplazmi kvasnih celic. Razpršene citoplazemske agregate je tvoril tudi endogeni stefin B E31 v sesalskih celicah (Čeru in sod., 2010).

Pri obdelavi rastnih krivulj transformiranih sevov smo odkrili, da stefin B E31 ni imel pomembnega vpliva na hitrost rasti celic seva BY4742, pri celicah seva AJY217 pa je prišlo do podaljšanja začetne faze zakasnitve. Razliko pri vplivu stefina B na dva izbrana seva bi lahko pripisali različni stopnji ekspresije stefina B, možno pa je tudi, da je prišlo do razlike fenotipov obeh sevov tudi zaradi razlike v njunih genotipih (seva BY4752 in AJY217 nista genetsko identična) oziroma zaradi razlik v gojišču (sintetično gojišče za sev BY4742 proti bogatemu gojišču za sev AJY217). Odstopanja v izraženih fenotipih bi vendarle najverjetneje lahko pripisali močni selekciji v prid integriranih AJY217 celic zaradi gojišču dodanega antibiotika nourseotricina, medtem ko je bila populacija transformiranih celic BY4742 neenotna (razmerje transformiranih proti netransformiranim celicam celo v prid slednjih). S pomočjo rastnih krivulj smo izmed treh bioloških ponovitev pri obeh tipih celic izbrali najprimernejši sev za nadaljnje eksperimente.

Za določitev genskih interakcij med vstavljenim genom amiloidogenega proteina stefina B E31 in posameznimi geni kvasovke *S. cerevisiae* smo izbrali tehniko SDL.

Do genske interakcije pride sicer med geni, ki delujejo znotraj iste biokemijske poti, in geni, ki so udeleženi v dveh različnih poteh, pri čemer lahko en proces funkcijsko kompenzira odsotnost oziroma nepravilno delovanje drugega. Poznavanje genskih interakcij nam tako služi pri določitvi genov, ki delujejo znotraj neke biokemijske poti ter pri določitvi paralelnih poti, ki se lahko funkcijsko nadomeščajo (Mattiazzi, 2010).

Pri analizi rezultatov SDL smo ugotovili, da lahko značilno različne gene razdelimo v dve skupini. V prvo skupino smo razvrstili gene, pri katerih so pripadajoče kolonije kazale oslabljen fenotip rasti. Tu je prišlo do slabše rasti celic oziroma v skrajnem primeru do izostanka kolonij. Kljub temu, da so bili posamezni geni udeleženi pri procesih brstenja, mitoze, mejoze, transkripcije in transporta, značilno pomembne povezave v izrazih genske ontologije (GO) ni bilo mogoče najti.

V drugo skupino so se uvrstili geni, ki so pri interakciji s stefinom B E31 kazali ojačano rast v primerjavi s kontrolnimi kolonijami, vendar so imeli zgolj rahlo povišano stopnjo rasti. Kadar pride pri kvasnih celicah z izbitim specifičnim genom pri hkratnem povečanem izražanju amiloidogenega proteina do povečane hitrosti rasti celic, lahko kvasnemu specifičnemu izbitemu genu pripišemo domnevno vpletenost v procese celične smrti (Braun RJ in sod., 2010). Glede na to, da sicer stefin B ni povzročil močno izraženih sprememb v kvasnih celicah, smo pripisali rahlo povišano stopnjo rasti določenih sevov eksperimentalnemu šumu. Zanimiv je podatek, da je v skupini sevov z rahlo povišano rastjo izstopal sev z izbitim genom YML048W (GSF2), ki kodira integralni membranski protein na ER, le-ta pa veže napačno zvite proteine (sev je imel eno višjih vrednosti povprečne relativne sposobnosti rasti). Gen GSF2 je tako funkcionalno povezan s proteinsko agregacijo.

Povzetek rezultatov SDL bi lahko sklenili z ugotovitvijo, da prekomerno izražanje stefina B E31 nima izrazitega vpliva na celične procese v kvasnih celicah.

Pri določitvi vpliva vstavljenega gena stefina B E31 v genom kvasovke (z uporabo mikromrež) na povišanje ali znižanje izražanja ostalih genov smo odkrili 88 kvasnih genov, katerim stopnja izražanje se je spremenila vsaj za faktor 3. Naboru genov s spremenjeno ekspresijo smo določili gensko ontologijo (GO) ter s tem poiskali povezave med njihovimi biološkimi procesi, funkcijami in celičnimi komponentami. Skoraj 5 % **vseh genov** s spremenjeno stopnjo izražanja je bilo udeleženih pri transmembranskem transportu sladkorjev, podrobneje monosaharidov oziroma heksoz (glukoze, fruktoze in manoze; p-vrednosti med 0,0030 in 0,0015).

Pri skupini genov z **zvišano** stopnjo izražanja se jih je dobra četrtina (26 %, p-vrednost 0,00085) nahajala v plazemski membrani, najpogosteje omenjeni biološki procesi so bili transmembranski transport (23 %) in presnova sladkorjev, glikogena in glukana. Med 32 ugotovljenimi geni z močnejšo ekspresijo smo naleteli tudi na dva gena, povezana s celično adhezijo – sprijemnostjo (*SAG1* in *AGA1*), kar bi lahko razložilo opaženo večjo sprijemnost kvasnih celic z integriranim stefinom B E31 (lepljenje celic).

Pri skupini genov z **znižano** stopnjo izražanja ob prisotnosti stefina B nismo našli obogatenih razredov GO. Očitno je šlo tudi v tem primeru za funkcijsko razpršene gene, med katerimi je izstopala le kromosomska oddvojitev (15 % vseh genov, p-vrednost 0,00187).

Analiza transkriptoma je potrdila ugotovitve eksperimenta SDL. Integriran stefin B E31 kljub prisotnim agregatom, kvasnim celicam ni povzročil večje škode.

Potrebno pa je še poudariti, da je bil eksperiment z mikromrežami narejen zgolj v enkratni izvedbi in bi bile potrebne dodatne ponovitve za potrditev rezultatov. Gre torej za preliminaren rezultat na osnovi ene replike.

Za vzpodbuditev močnejšega celičnega odziva kvasovke *S. cerevisiae* na vstavljen amiloidogen stefin B smo imeli na razpolago dva pristopa. Lahko bi spremljali sistem kvasnih celic z okvarjenim sistemom razgrajevanja proteinov ali pa bi v kvasne celice vstavili bolj agresivno mutanto stefina B (mutanta stefina B Y31 ali R68X), ki dokazano sproži močno agregacijo v sesalskih celicah (Čeru in sod., 2010).

Odločili smo se, da pri razpoložljivih transformiranih kvasnih celicah s stefinom B E31 sprožimo inhibicijo sistemov za razgradnjo proteinov. Število agregatov smo želeli povečati z inhibicijo proteasomskega sistema (reagent MG132) ali z blokado avtofagije (reagent PMSF). Pri metodi določitve hitrosti rasti (rastne krivulje) nismo zaznali večjega vpliva stefina B E31 na obnašanje prizadetih kvasnih celic.

V prihodnje bi kazalo poskuse nadaljevati v smeri sledenja poti avtofagije (z markerji vezikularnega transporta), saj je bilo pred kratkim dokazano, da ima sorodni protein cistatin C zaščitno vlogo v celicah ravno preko avtofagije (Tizon in sod., 2010a,b). Cistatin C je namreč povečal delež avtofagije (preko inhibicije poti mTOR) v celicah in s tem njihovo preživetje. Prav tako je bila zaščitna vloga stefina B v celicah že prikazana v obliki zmanjšanja oksidacijskega stresa v njegovi prisotnosti oziroma povečanje le-tega ob njegovi odsotnosti (Lehtinen in sod., 2009).

5.4.2 Odziv »humaniziranih« kvasnih modelov na druge nevrotoksične proteine

Kvasne celice kot enocelični organizmi nimajo strukturnih in funkcionalnih lastnosti nevronskih celic, potrebnih za napredovanje nevrodegenerativnih bolezni, vendar so se kljub temu kvasni modeli izkazali kot neprecenljivo orodje za opazovanje osnovnih celičnih mehanizmov, ki se sprožijo ob vstavljenih nevrotoksičnih proteinih.

Presejalni testi na ravni celotnega kvasnega genoma so bili narejeni z namenom poiskati gene in proteine, ki slabijo oziroma jačajo citotoksičnost amiloidogenih proteinov. Poleg splošnega odziva, ki bi ga pričakovali zaradi prisotnosti toksičnosti proteinskih agregatov, bi lahko bila pomembna lastna funkcija vstavljenega proteina, saj ob agregaciji pride do izgube le-te.

Ugotovljeno je bilo, da ima večina kvasnih genov, ki so vplivali na spremembo toksičnosti **α -sinukleina**, človeške ortologe (Gitler, 2008). α-sinuklein se nahaja v plazemski membrani, kjer se njegova agregacija tudi začne, ob napredovanju procesa pa se razširi na citoplazemske inkluzije. Agregati α-sinukleina ustavijo rast celic in sčasoma povzročijo celično smrt. Toksičnost α-sinukleina je pri kvasovkah, skladno z ugotovitvami pri višjih organizmih, večinoma povezana s presnovo lipidov in vezikularnim transportom. Prisotnost α-sinukleina v celičnih kulturah in na živalskih modelih naj bi sicer povzročila oksidativni stres, nepravilno delovanje mitohondrijev in celično smrt. Ugotovili so, da povečano izražanje kvasnega proteina Ypt1p (s funkcijo Rab-gvanozin-trifosfataze), ki sodeluje pri transportu ER–Golgi, ščiti kvasne celice pred toksičnim efektom agregatov α-sinukleina (Cooper in sod., 2006). Ravno tako je prekomerno izražanju homologa proteina Rab1 pri nematodu *Caenorhabditis elegans* in vinski mušici *Drosophila melanogaster* preprečilo nevrodegeneracijo, sproženo s prisotnostjo α-sinukleina (Braun in sod., 2010).

Za razliko od α-sinukleina, sama agregacija **huntingtina** v kvasnih modelih ni nujno toksična za celice, toksični efekt je močno odvisen od dolžine poliglutaminskega podaljška in sosednjih aminokislin. Prolinska domena, ki se nahaja blizu poliglutaminske domene, ne prepreči agregacije, ampak izniči citotoksičen efekt huntingtinskega fragmenta (Dehay in Bertolotti, 2006). Prolinska domena je namreč pomembna za

učinkovito tvorbo agresomov, ki bi lahko bili del mehanizmov, ki celico ščitijo pred obilico nepravilno zvitih proteinov. Pri določitvi lokalizacije agregatov huntingtina v kvasovki so ugotovili, da se je le-ta prekrivala z lokalizacijo avtofagnih označevalcev, kar nakazuje na pomembo vlogo avtofagije pri odstanjevanju poliglutaminskih agregatov. Pokazano je namreč bilo, da povečana avtofagija prepreči nekrozo in podaljša življenjsko dobo pri kvasovki, nematodu in vinski mušici. Pomembno vlogo pri toksičnosti agregatov huntingtina pa imajo dokazano tudi šaperoni. Disagregaza Hsp104, specifična za kvasne celice, onemogoči agregacijo poliglutaminskih ponovitev. Sicer pa k mehanizmu toksičnosti poliglutaminskih agregatov pripomore zmanjševanje sposobnosti mitohondrijskega delovanja, kar vodi do zmanjšane oksidativne fosforilacije in povečane produkcije prostih radikalov. Poliglutaminski agregati so torej vpleteni v mitohondrijsko mrežo delovanja (Braun in sod., 2010).

Raziskave kvasnih modelov z vstavljenim **peptidom amilod-beta** so odkrile, da povzroči zunajcelični oligomerni (vendar ne fibrilarni) peptid amilod-beta smrt kvasnih celic, medtem ko se celice dobro odzivajo na znotrajcelični peptid. Prisotnost znotrajceličnega peptida povzroči le rahlo zmanjšanje rasti celic. Glede na to, da so na drugih modelnih sistemih ugotovili, da prisotnost peptida amiloid-beta znotraj celic poviša oksidativni stres, sproži tvorbo prostih radikalov in okvari mitohondrijske, proteasomske in avtofagne funkcije, bodo potrebne dodatne raziskave za razlago tolerance in detoksifikacije prisotnosti nevrotoksičnega peptida amiloid-beta znotraj kvasnih celic (Braun in sod., 2010). Lahko bi bila morda pomembna količina znotrajceličnih vključkov oziroma pakiranje agregatov v agresome, ki jih nazadnje iz celice počisti avtofagija.

Pri opazovanju **prionskega proteina** URE3 (infektivna oblika amiloidogenega proteina Ure2p), ki sodeluje pri presnovi dušika, se je izkazalo, da prekomerno izražanje kvasnega proteina Btn2p oziroma njegovega homologa Ypr158 (Cur1p) prepreči infektivnost URE3, normalna zastopanost omenjenih proteinov pa vpliva na prionsko tvorbo in nadaljnje širjenje (Kryndushkin in sod., 2008).

TDP-43 je protein, udeležen pri transkripciji, transportu in procesiranju mRNA, ki predstavlja glavno komponento znotrajceličnih inkluzij pri večini oblik ALS in FTDL (*ang. Frontotemporal lobar degeneration*), najbolj pogosti obliki predsenilne demence takoj za Alzheimerjevo boleznijo. Pri sesalskih celicah so v inkluzijah TDP-43 med drugim našli tudi agregirane ubikvitinske podenote, pri kvasnih celicah pa je bila potrjena toksičnost citoplazemskih agregatov, vendar molekulsko ozadje in vrsta celične smrti (apoptoza ali nekroza) zaenkrat še nista nepojasnjeni (Braun RJ in sod., 2010).

Če povzamemo izsledke raziskav o nevrotoksičnih proteinih v kvasnih modelih, se agregati TDP-43 razlikujejo od prionskih ali poliglutaminskih agregatov tako po biokemijskih kakor biofizikalnih lastnostih. Poleg tega so regulatorji toksičnosti poliglutaminskih agregatov in agregatov α-sinukleina pri kvasnih celicah značilno različni. Zbrani izsledki raziskav močno nakazujejo na specifičen, individualiziran kvasni odgovor na prisotnost posameznih amiloidogenih proteinov.

5.4.3 Umestitev rezultatov kvasnega modela prekomernega izražanja amiloidogenega stefina B

Pri vključitvi stefina B E31 v kvasne celice smo želeli dobiti vpogled v dogajanje evkariontske celice pri obrambi pred amiloidnimi agregati stefina B. Prav tako smo se z določitvijo biokemijskih poti, pri katerih bi bil stefin B E31 v kvasnih celicah signifikantno pomembno udeležen, nadejali odkriti (ali vsaj nakazati) novo funkcijo stefina B. Razkrile bi se nam lahko nove informacije o njegovem mehanizmu delovanja in potencialne neodkrite celične tarče.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo le, da E31 oblika stefina B (nemutirana oblika divjega tipa) ni dovolj agresivna, da bi sprožila izrazit celični odziv. Po izvedenih eksperimentih SDL in analizi transkriptoma z mikromrežami smo ugotovili, da prekomerno izražanje stefina B E31 nima večjega vpliva na celične procese kvasne celice, saj integriran stefin B E31, kljub prisotnim agregatom, ne ogroža niti ne poveča vitalnosti kvasnih celic.

Dobljene rezultate bi morda lahko pripisali majhnemu številu opaženih tvorjenih agregatov z imunofluorescenco, lahko pa nemutirana oblika amiloidogenega stefina B E31 sama po sebi nima zadostnega citotoksičnega efekta. Študija stefina B na sesalskih celicah namreč razkriva, da obstaja endogeni stefin B v oligomerni obliki, ki za celico ni škodljiv. Odvečne agregate celica sproti odstranjuje z **avtofagijo**, tako da agregatom navkljub ne pride do celičnega propada (Čeru in sod., 2010). Avtofagija je bila dokazano vključena v detoksifikacijo tudi pri drugih amiloidnih, nevrotoksičnih proteinih pri sesalskih celicah, npr. pri odstranitvi agregatov pri superoksid dismutazi pri bolezni ALS (Hetz in sod., 2009; Madeo in sod., 2009). Pred kratkim je bilo pri kvasnih celicah pokazano, da avtofagija, sprožena z dodatkom

zunanjega poliamina **spermidina,** omili oksidativni stres in prepreči nekrozo (Eisenberg in sod., 2009). Pri eksperimentu SDL nam nabor izrazov GO sicer ni dal signifikantno pomembne metabolne poti, kjer bi bili udeleženi geni s spremenjenim fenotipom rasti in povezani s spermidonom, pa vendar je med izstopajočimi geni moč najti gen *YLL028W (TPO1)*, ki sodeluje pri transportu poliaminov spermina, spermidina in putreskina.

Morda ima pomembno vlogo pri detoksifikaciji agregatov stefina B E31 tudi **prolinsko obogatena regija** kot v primeru huntingtina (Dehay in Bertolotti, 2006). Pri huntingtinu gre sicer za prolinsko bogato regijo, kjer se prolini vrstijo eden za drugim, vendar je pomembno dejstvo, da o toksičnosti odloča ravno ustrezna prolinska izomerna oblika (cis-konformacija). Pri stefinu B je bila pomembnost prolinske regije in prolinske cis-konformacije poudarjena že pri zagotavljanju stabilne stukture stefina B (Jenko Kokalj in sod., 2007) ter pri mehanizmu nastanka amiloidnih fibril stefina B (Škerget in sod., 2009).

Med zaščitne mehanizme, ki ščitijo celice pred napačno zvitimi proteini in njihovimi agregati, spadajo med drugim tudi **molekulski šaperoni**. Dokazano je bilo, da molekulski šaperon Hsp104 ob pomoči šaperonov Hsp70s in Hsp40s reciklira že agregirane proteine (Glover in Lindquist, 1998). Molekulski šaperoni, natančneje kvasno specifična disagregaza Hsp104, onemogoči agregacijo poliglutaminskih ponovitev pri Huntingtonovi bolezni (HD) in širjenje kvasnih prionskih proteinov (Braun in sod., 2010). Morda je ravno delovanje kvasne disagregaze **Hsp104** odgovorno za pretežno neškodljive agregate stefina B E31 znotraj kvasnih celic. Disagregazo Hsp104 je namreč moč najti le v kvasnih celicah, v sesalskih celicah pa nima ustreznega homologa. Sicer je delovanje šaperonov preprečilo nevrodegeneracijo tudi pri živalskih modelih HD (Muchowski, 2002). Omenjena ideja o pomembnosti šaperonske aktivnosti pri detoksifikaciji agregatov stefina B se sklada tudi z ugotovitvami eksperimenta »*In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta« (glej točko 5.3.3 *»Amaterska« šaperonska aktivnost stefina B*), kjer smo predlagali, da določene oligomere stefina B vežejo nekatere amiloidne peptide ter s tem delujejo podobno kot »amaterski« šaperoni (Škerget in sod., 2010).

Nadaljnje študije v povezavi s »humanizirano« kvasno celico *S. cerevisiae* z vstavljenim človeškim proteinom stefinom B bi lahko razvijali vsaj v dveh smereh. Z namenom doseči izrazitejši vpliv agregacije stefina B na delovanje kvasnih celic, bi bilo potrebno vstaviti v celice agresivnejšo izbrano mutanto stefina B (Y31 ali R68X), ki dokazano močno agregira v sesalskih celicah (Čeru in sod., 2010). Le tako bi lahko prišli do željenih odgovorov na vprašanja o toksičnem vplivu proteinskih agregatov stefina B. Poleg tega bi veljalo posvetiti posebno pozornost vlogi stefina B pri procesu avtofagije, ki spada med celične načine odstranjevanja proteinskih agregatov in je zato zaščitni mehanizem. Novejše funkcijske študije namreč nakazujejo zaščitno vlogo cistatinov, tako cistatina C kot stefina B, pri nevrodegenerativnih spremembah, nastalih pri epilepsiji, ishemiji (pomanjkanju kisika), kapi in oksidacijskem stresu Lehtinen in sod., 2009; Benussi in sod., 2006; Žerovnik, 2009; Tizon in sod., 2010a).

Rezultati nevrodegenerativnih študij na kvasnih modelih kažejo visoko stopnjo specifičnosti za različne nevrotoksične proteine, saj se odzivi kvasnih modelov z vstavljenimi različnimi amiloidogenimi proteini med seboj precej razlikujejo. Tako bi lahko z nadaljnjimi raziskavami na kvasnih modelih pripomogli k razumevanju specifičnih molekularnih poti, povezanih s posamezno nevrodegenerativno boleznijo. Nabor genov oziroma proteinov, povezanih s propadom celic pri specifičnih boleznih, bi lahko uporabili za tarčni pristop preprečevanja nevronskih izgub pri človeških nevrodegenerativnih obolenjih.

6 Zaključki

6.1 Mehanizem amiloidne fibrilacije stefina B: temperaturna in koncentracijska odvisnost hitrosti rasti fibril

Študija kinetike fibrilacije stefina B nas je pripeljala do sledečih ugotovitev:

- Predlog novega modela amiloidne fibrilacije: na osnovi predstavljenih eksperimentalnih podatkov in predhodnih biokemijskih, morfoloških in strukturnih podatkov o fibrilaciji stefina B smo predlagali model mehanizma fibrilacije. Model vključuje precej hitro tvorbo dimer iz monomer, ki se združijo bodisi v oligomerno »stransko pot« bodisi v agregacijsko jedro, kjer mora priti do zaporednih $N_i = 64$ konformacijskih sprememb, preden lahko pride do rasti protofibril v fibrile.
- Detekcija treh energetskih barier. Prva faza fibrilacije, ki odraža nastanek oligomernih enot, zelo verjetno zajema »stransko pot« s prepletenimi dimerami. Aktivacijska entalpija prve faze 96±5 kcal mol^{-1} namreč ustreza energetski barieri tvorbe prepletenih dimer. Drugi fazi (podaljševanje fibril) pripada energetska bariera približno 30 kcal mol^{-1}, kar je predvidoma posledica potrebne prolinske izomerizacije, opažene tudi pri tetramerizaciji. S pomočjo modelnih matematičniih enačb smo izračunali še tretjo energetsko bariero 55 kcal mol^{-1}, ki se pojavi pri nastanku kritičnih oligomer, nastalih ob sosledju počasnih konformacijskih sprememb znotraj nukleacijskega jedra.

6.2. Visoko afinitetna vezava bakra na stefin B ter njegova vloga pri inhibiciji amiloidne fibrilacije

S študijo smo pokazali dve novi dejstvi: stefin B veže bakrove ione z visoko afiniteto in ob prisotnosti bakrovih ionov amiloidogen protein stefin B ne fibrilira. Ugotovili smo, da se afiniteta vezave bakrovih ionov manjša z nižanjem pH vrednosti in da pri tetramerni obliki do vezave ne pride. Z naštetimi ugotovitvami je vprašanje funkcijske vloge proteina v celicah ponovno odprto.

6.3. *In vitro* interakcija oligomer stefina B in peptida amiloid-beta

Ugotovili smo, da varianta stefina B Y31 (pretežno dimerne oblike) in tetramerna oblika običajnega stefina B E31 inhibirata rast fibril peptida amiloid-beta ter da se obe obliki stefina B specifično, koncentracijsko odvisno vežeta na imobiliziran peptid amiloid-beta, do česar ne pride pri monomerah, dimerah ali višjih oligomerah nemutiranega stefina B E31. V skladu z opravljenimi celičnimi študijami lahko sklepamo, da stefin B interagira s peptidom amiloid-beta in C-ternimalnimi konci proteina APP *in vivo*. Zaradi inhibicije fibrilacije peptida amiloid-beta smo predlagali novo potencialno funkcijo stefina B, t.j. »amaterska« šaperonska aktivnost stefina B.

6.4. Izražanje stefina B v celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*

Človeški amiloidogeni protein stefin B E31 smo vstavili v dva različna seva kvasnih celic, sev BY4247 in sev AJY217. Prisotnost stefina B E31 v kvasnih celicah smo dokazali s pomočjo imunodetekcije. Opazili smo, da je med celicami prišlo do različne stopnje izražanja stefina B E31. Protein je bil namreč pri 40 % vseh celic prisoten v velikih količinah, pri 60 % celic pa je bil signal izraženega stefina B komaj zaznaven. Imunofluorescenca je potrdila prisotnost tvorjenih agregatov znotraj kvasnih celic, vendar pri manjšem številu celic. Agregati so se nahajali v citoplazmi kvasnih celic. Stefin B E31 ni imel vpliva na hitrost rasti celic seva BY4742, pri celicah seva AJY217 pa je prišlo do podaljšanja začetne faze zakasnitve. Pri določitvi genskih interakcij med stefinom B E31 in posameznimi geni kvasovke *S. cerevisiae* smo ugotovili, da stefin B ni sprožil značilno pomembnih procesov znotraj celic niti nismo pri analizi transkriptoma odkrili značilno pomembnih metabolnih poti. Očitno integrirani stefin B E31 kljub prisotnim agregatom, kvasnim celic ni povzročil izrazite škode, pa tudi koristi ne.

7 Zahvala

Doktorsko delo sem opravljala na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Eve Žerovnik in somentorstvom doc. dr. Uroša Petroviča. Obema se zahvaljujem za vodstvo v času mojega doktorskega usposabljanja, za koristne nasvete in razprave ter pregled doktorskega dela. Eva Žerovnik me je vpeljala v znanstveno raziskovalno delo, Uroš Petrovič pa pokazal, da je znanost lahko zabavna kot otroška igra.

Za pomoč v laboratoriju, plodne razprave in prijetno vzdušje se zahvaljujem vsem sodelavcem z Instutita Jožef Stefan, še posebej Mojci Mattiazzi in Urški Požgan, sodelavcem z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in Centra za funkcijsko genomiko in bio-čipe ter sodelavcem z Department of Gene Technology, Tallinn University of Technology v Tallinnu.

Nanazadnje se zahvaljujem staršema za vso podporo in temelje mojih vrednot, bratu za nalezljivo navdušenje nad znanostjo, Vlasti za lektoriranje doktorske disertacije ter Eriku in Maksu za vso spodbudo, potrpljenje in ljubezen.

8 Literatura in viri

Alakurtti K.; Weber E.; Rinne R.; Theil G.; de Haan G.J.; Lindhout D.; Salmikangas P.; Saukko P.; Lahtinen U.; Lehesjoki A.E. Loss of lysosomal association of cystatin B proteins representing progressive myoclonus epilepsy, EPM1, mutations. *Eur. J. Hum. Genet.***13**, 208-15 (2005).

Ahmad A.; Millett I.S.; Doniach S.; Uversky V.N.; Fink A.L. Partially folded intermediates in insulin fibrillation. *Biochemistry* **42**, 11404-11416 (2003).

Ahmad A.; Uversky V.N.; Hong D.; Fink A.L. Early events in the fibrillation of monomeric insulin. *J Biol Chem* **280**, 42669–42675 (2005).

D'Amato E.; Kokaia Z.; Nanobashvili A.; Reeben M.; Lehesjoki A.E.; Saarma M.; Lindvall O. Seizures induce widespread upregulation of cystatin B, the gene mutated in progressive myoclonus epilepsy, in rat forebrain neurons. *Eur J Neurosci*. **12**(5), 1687-95 (2000).

Anderluh G.; Gutierrez-Aguirre I.; Rabzelj S.; Čeru S.; Kopitar-Jerala N.; Maček P.; Turk V.; Žerovnik E. Interaction of human stefin B in the prefibrillar oligomeric form with membranes. Correlation with cellular toxicity. *FEBS J.* **272**, 3042-51 (2005).

Antwi K.; Mahar M.; Srikanth R.; Olbris M.R.; Tyson J.F.; Vachet R.W. Cu(II) organizes beta-2-microglobulin oligomers but is released upon amyloid formation. *Protein Sci*. **17**(4), 748-59 (2008).

Atwood C.S.; Moir R.D.; Huang X.; Scarpa R.C.; Bacarra M.E.; Romano D.M.; Hartshorn M.A.; Tanzi R.E.; Bush A.I. Dramatic aggregation of Alzheimer Abeta by Cu2+ (II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* **273**, 12817–12826 (1998).

Atwood C.S.; Scarpa R.C.; Huang X.; Moir R.D.; Jones W.D.; Fairlie D.P.; Tanzi R.E.; Bush A.I. Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1–42. J *Neurochem* **75**, 1219–1233 (2000).

Avbelj F.; Grdadolnik SG. Electrostatic screening and backbone preferences of amino acid residues in urea-denatured ubiquitin. *Protein Sci*. **16**(2), 273-84 (2007).

Baglioni S.; Casamenti F.; Bucciantini M.; Luheshi L.M.; Taddei N.; Chiti F.; Dobson C.M.; Stefani M. Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms. *J Neurosci*. **26**(31), 8160-7 (2006).

Bayer T.A.; Schäfer S.; Breyhan H.; Wirths O.; Treiber C.; Multhaup G. A vicious circle: role of oxidative stress, intraneuronal Abeta and Cu in Alzheimer's disease. *Clin Neuropathol.* **25**(4), 163-71 (2006).

Bennett M.J.; Schlunegger M.P.; Eisenberg D. 3D Domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* **4**, 2455–2468 (1995).

Benussi, L.; Binetti, G.; Ghidoni, R. Cystatin C role in Alzheimer disease: from neurodegeneration to neuroregeneration. V: Žerovnik E .; Kopitar-Jerala N. (ed). *Human Stefins and Cystatins.* 115-125 (Nova Science, New York, 2006).

Benussi L.; Ghidoni R.; Steinhoff T.; Alberici A.; Villa A.; Mazzoli F.; Nicosia F.; Barbiero L.; Broglio L.; Feudatari E.; Signorini S.; Finckh U.; Nitsch R.M.; Binetti G. Alzheimer disease-associated cystatin C variant undergoes impaired secretion. *Neurobiol Dis.* **13**(1), 15-21 (2003).

Bernstein H.G.; Kirschke H.; Wiederanders B.; Pollak K.H.; Zipress A.; Rinne A. The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer disease: a review. *Mol Chem Neuropathol*. **27**(3), 225-47 (1996).

Bernstein H.G.; Rinne R.; Kirschke H.; Jarvinen M.; Knofel B.; Rinne A. Cystatin A-like immunoreactivity is widely distributed in human brain and accumulates in neuritic plaques of Alzheimer disease subjects. *Brain Res. Bull.* **33** (5), 477-481 (1994).

Bocharova O.V.; Breydo L.; Salnikov V.V.; Baskakov I.V. Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry* **44**(18), 6776-87 (2005).

Borchardt T.; Camakaris J.; Cappai R.; Masters C.L.; Beyreuther K.; Multhaup G. Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J* **344**, 461–467 (1999).

Braun R.J.; Büttner S.; Ring J.; Kroemer G.; Madeo F. Nervous yeast: modeling toxic cell death. *Trends in Biochemical Sciences* **35**(3), 135-144 (2010).

Brown D.R.; Qin K.; Herms J.W.; Madlung A.; Manson J.; Strome R.; Fraser P.E.; Kruck T.; von Bohlen A.; Schulz-Schaeffer W.; Giese A.; Westaway D.; Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**(6661), 684-7 (1997).

Bucciantini M.; Calloni G.; Chiti F.; Formigli L.; Nosi D.; Dobson C.M.; Stefani M. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J. Biol. Chem*. **279**, 31374-82 (2004).

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

Calamai M.; Chiti F.; Dobson C.M.: Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophysical Journal* **89** (6), 4201-4210 (2005).

Capanni C.; Taddei N.; Gabrielli S.; Messori L.; Orioli P.; Chiti F.; Stefani M.; Ramponi G. Investigation of the effects of copper ions on protein aggregation using a model system. *Cell Mol Life Sci*. **61**(7-8), 982-91 (2004).

Carrotta R.; Manno M.; Bulone D.; Martorana V.; San Biagio P.L. Protofibril formation of amyloid beta-protein at low pH via a non-cooperative elongation mechanism. *J Biol Chem*. **280**(34), 30001-8 (2005).

Cerda-Costa N.; Esteras-Chopo A.; Aviles F.X.; Serrano L.;Villegas V. Early kinetics of amyloid fibril formation reveals conformational reorganization of initial aggregates. *J Mol Biol* **366**, 1351–1363 (2007).

Cipollini E.; Riccio M.; Di;Giaimo R.; Dal Piaz F.; Pulice G.; Catania S.; Caldarelli I.; Dembic M.; Santi S.; Melli M. Cystatin B and its EPM1 mutants are polymeric and aggregate prone in vivo. *Biochim. Biophsy. Acta* **1783**, 312-22 (2007).

Cleary J.P.; Walsh D.M.; Hofmeister J.J.; Shankar G.M.; Kuskowski M.A.; Selkoe D.J.; Ashe K.H. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **8**, 79-84 (2005).

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. α-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313,** 324–328 (2006).

Curk T.; Demšar J.; Xu Q.; Leban G.; Petrovič U.; Bratko I.; Shaulsky G.; Zupan B. Microarray data mining with visual programming. *Bioinformatics* **21**(3), 396-8 (2005).

Curk T.; Petrovič U.; Shaulsky G.; Zupan B. Rule-based clustering for gene promoter structure discovery. *Methods Inf Med*. **48**(3), 229-35 (2009).

Čeru S. *Mehanizem citotoksičnosti prefibrilarnih agregatov stefina B in izbranih mutantov v razmerah in vitro/ex vivo: Doktorska disertacija* (Ljubljana, 2008).

Čeru S.; Layfield R.; Zavašnik-Bergant T.; Repnik U.; Kopitar-Jerala N.; Turk V.; Žerovnik E. Intracellular aggregation of human stefin B: confocal and electron microscopy study. *Biol Cell***. 102**(6), 319-34 (2010).

Čeru S.; Kokalj S.J.; Rabzelj S.; Škarabot M.; Gutierrez-Aguirre I.; Kopitar-Jerala N.; Anderluh G.; Turk D.; Turk V.; Žerovnik E. Size and morphology of toxic oligomers of amyloidogenic proteins: a case study of human stefin B. *Amyloid* **15**(3), 147-59 (2008).

Čeru S.; Rabzelj S.; Kopitar-Jerala N.; Turk V.; Žerovnik E. Protein aggregation as a possible cause for pathology in a subset of familial Unverricht-Lundborg disease. *Medical Hypoteses* **64**, 955-9 (2005).

Čeru S.; Žerovnik E. Similar toxicity of the oligomeric molten globule state and the prefibrillar oligomers. *FEBS Lett*. **582**(2), 203-9 (2008).

Dehay B.; Bertolotti A. Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem* **281**(47), 35608-15 (2006).

Di Giaimo R.; Riccio M.; Santi S.; Galeotti C.; Ambrosetti D.C.; Melli M. New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy: a multiprotein complex with cystatin B. *Hum. Mol. Genet.* **11** (23), 2941-2950 (2002).

DuBay K.F.; Pawar A.P.; Chiti F.; Zurdo J.; Dobson C.M.; Vendruscolo M. Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J Mol Biol*. **341**(5), 1317-26 (2004).

Eakin C.M.; Berman A.; Miranker A.D. A native to amyloidogenic transition regulated by a backbone trigger. *Nat Struct Biol* **13**, 202–208 (2006).

Eisenberg T.; Knauer H.; Schauer A.; Büttner S.; Ruckenstuhl C.; Carmona-Gutierrez D.; Ring J.; Schroeder S.; Magnes C.; Antonacci L.; Fussi H.; Deszcz L.; Hartl R.; Schraml E.; Criollo A.; Megalou E.; Weiskopf D.; Laun P.; Heeren G.; Breitenbach M.; Grubeck-Loebenstein B.; Herker E.; Fahrenkrog B.; Fröhlich K.U.; Sinner F.; Tavernarakis N.; Minois N.; Kroemer G.; Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* **11**(11), 1305-14 (2009).

Estrada S.; Nycander M.; Hill N.J.; Crave C.J.; Waltho J.P.; Björk I. The role of Gly-4 of human cystatin A (stefin A) in the binding of target proteinases. Characterization by kinetic and equilibrium methods of the interaction of cystatin A Gly-4 mutants with papain, cathepsin B and cathepsin L. *Biochemistry* **37**, 7551-60 (1998).

Ferreira S.T.; De Felice F.G. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS Lett* **498**, 129–134 (2001).

Floyd, R.A.; Hensley, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **23,** 795–807 (2002).

Gaggelli E.; Kozlowski H.; Valensin D.; Valensin G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev*. **106**(6), 1995-2044 (2006).

Giaever G.; Chu A. M.; Ni L.; Connelly C.; Riles L.; Veronneau S.; Dow S.; Lucau-Danila A.; Anderson K.; Andre B.; Arkin A. P.; Astromoff A.; El-Bakkoury M.; Bangham R.; Benito R.; Brachat S.; Campanaro S.; Curtiss M.; Davis K.; Deutschbauer A.; Entian K. D.; Flaherty P.; Foury F.; Garfinkel D. J.; Gerstein M.; Gotte D.; Guldener U.; Hegemann J. H.; Hempel S.; Herman Z.; Jaramillo D. F.; Kelly D. E.; Kelly S. L.; Kotter P.; LaBonte D.; Lamb D. C.; Lan N.; Liang H.; Liao H.; Liu L.; Luo C.; Lussier M.; Mao R.; Menard P.; Ooi S. L.; Revuelta J. L.; Roberts C. J.; Rose M.; Ross-Macdonald P.; Scherens B.; Schimmack G.; Shafer B.; Shoemaker D. D.; Sookhai-Mahadeo S.; Storms R. K.; Strathern J. N.; Valle G.; Voet M.; Volckaert G.; Wang C. Y.; Ward T. R.; Wilhelmy J.; Winzeler E. A.; Yang Y.; Yen G.; Youngman E.; Yu K.; Bussey H.; Boeke J. D.; Snyder M.; Philippsen P.; Davis R. W.; Johnston M. Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. *Nature* **418**(6896), 387-391 (2002).

Gitler A.D. Beer and bread to brains and beyond: can yeast cells teach us about neurodegenerative disease? *Neurosignals* **16**(1), 52-62 (2008).

Glover J.R; Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**(1), 73-82 (1998).

Goffeau A.; Barrell B.G.; Bussey H.; Davis R.W.; Dujon B.; Feldmann H.; Galibert F.; Hoheisel J.D.; Jacq C.; Johnston M.; Louis E.J.; Mewes H.W.; Murakami Y.; Philippsen P., Tettelin H.; Oliver S.G. Life with 6000 genes. *Science* **274**(5287), 563-7 (1996).

Guo Z.; Eisenberg D. Runaway domain swapping in amyloid-like fibrils of T7 endonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8042–8047 (2006).

Hesse L.; Beher D.; Masters C.L.; Multhaup G. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett* **349**, 109–116 (1994).

Hetz C.; Thielen P.; Matus S.; Nassif M.; Court F.; Kiffin R.; Martinez G.; Cuervo A.M.; Brown R.H.; Glimcher L.H. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev*. **23**(19), 2294-306 (2009).

Hlodan R.; Hartl U. How the protein folds in cell. V: Pain R.H. (ed.) *Mechanisms of protein foleding.* 194-219 (Oxford University Press, New York, 1994).

Hu Y.; Rolfs A.; Bhullar B.; Murthy T.V.; Zhu C.; Berger M.F.; Camargo A.A.; Kelley F.; McCarron S.; Jepson D.; Richardson A.; Raphael J.; Moreira D.; Taycher E.; Zuo D.; Mohr S.; Kane M.F.; Williamson J.; Simpson A.; Bulyk M.L.; Harlow E.; Marsischky G.; Kolodner R.D.; LaBaer J. Approaching a complete repository of sequence-verified protein-encoding clones for *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.* **17**, 536–543 (2007).

Ii K.; Ito H.; Kominami E.; Hirano A. Abnormal distribution of cathepsin proteinases and endogenous inhibitors (cystatins) in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease, parkinsonism-dementia complex on Guam, and senile dementia and in the aged. Virchows Arch. A. *Pathol. Anat. Histopathol*. **423**, 185-94 (1993).

Janowski R.; Kozak M.; Janowska E.; Grzonka Z.; Grubb A.; Abrahamson M.; Jaskolski M. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat. Struct. Biol*. **8**, 316-20 (2001).

Jaskolski M. 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim Pol* **48**, 807–827 (2001).

Jenko S.; Škarabot M.; Kenig M.; Gunčar G.; Muševič I.; Turk D.; Žerovnik E. Different propensity to form amyloid fibrils by two homologous proteins-Human stefins A and B: searching for an explanation. *Proteins* **55**(2), 417-25 (2004).

Jenko Kokalj S.; Gunčar G.; Stern I.; Morgan G.; Rabzelj S.; Kenig M.; Staniforth R.A.; Waltho J.P.; Žerovnik E.; Turk D. Essential role of proline isomerisation in stefin B tetramere formation. *J. Mol. Biol.* **9**,1569-79 (2007).

Jensen-Pergakes K.L.; Kennedy M.A.; Lees N.D.; Barbuch R.; Koegel C.; Bard M. Sequencing, disruption, and characterization of the Candida albicans sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in erg6 mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. **42**(5), 1160-7 (1998).

Jerala R.; Trstenjak M.; Lenarčič B.; Turk V. Cloning a synthetic gene for human stefin B and its expression in E. coli. *FEBS Lett.* **239**(1), 41-4 (1988).

Jerala R.; Žerovnik E. Accessing the global minimum conformation of stefin A dimer by annealing under partially denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* **291**, 1079-89 (1999).

Jiao Y.; Yang P. Mechanism of Copper(II) Inhibiting Alzheimer's Amyloid beta-Peptide from Aggregation: A Molecular Dynamics Investigation. *J Phys Chem B* **111** (26), 7646-7655 (2007).

Jiménez J.L.; Guijarro J.I.; Orlova E.; Zurdo J.; Dobson C.M.; Sunde M.; Saibil H.R. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J*. **18**(4), 815-21 (1999).

Joensuu T.; Kuronen M.; Alakurtti K.; Tegelberg S.; Hakala P.; Aalto A.; Huopaniemi L.; Aula N.; Michellucci R.; Eriksson K; Lehesjoki A.E. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myclonus epilepsy of Unverrich-Lundborg taype (EPM1) patients. *Eu. J. Hum. Genet*. **15**, 185-93 (2007).

Juvan P., Rozman D. Tehnologija DNA mikromrež in njena uporaba v medicini. *Informatica Medica Slovenica* **11**(1), 2-15 (2006).

Kaferle P. *Razvoj bioinformacijske podpore za visoko-zmogljivostne genetske eksperimente: uporaba na primeru valprojske kisline. Diplomsko delo* (Ljubljana, 2008).

Kenig M.; Berbič S.; Kriještorac A.; Kroon-Žitko L.; Tušek M.; Pompe-Novak M.; Žerovnik E. Differences in aggregation properties of three site-specific mutants of recombinant human stefin B. *Protein Sci*. **13**, 63-70 (2004).

Kenig M.; Jenko-Kokalj S.; Tušek-Žnidaric M.; Pompe-Novak M.; Gunčar G.; Turk D.; Waltho J.P.; Staniforth R.A.; Avbelj F.; Žerovnik E. Folding and amyloid-fibril formation for a series of human stefins' chimeras: any correlation? *Proteins* **62**, 918-927 (2006).

Kordiš D.; Turk V. Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC Evol Biol*. **9**, 266 (2009).

Kryndushkin D.S.; Shewmaker F.; Wickner R.B. Curing of the [URE3] prion by Btn2p, a Batten disease-related protein. *EMBO J* **27**(20), 2725-35 (2008).

Kumar S.; Mohanty S.K.; Udgaonkar J.B. Mechanism of formation of amyloid protofibrils from soluble oligomers: evidence for multiple steps and lateral association coupled to conformational conversion. *J Mol Biol* **367**, 1186–1204 (2007).

Kusumoto Y.; Lomakin A.; Teplow D.B.; Benedek G.B. Temperature dependence of amyloid β-protein fibrillization. *Proc Nat Acad Sci USA* **95**, 12277–12282 (1998).

Kyle R.A.; Bayrd E.D. Amyloidosis: review of 236 cases. *Medicine (Baltimore)* **54**(4), 271-299 (1975).

Kyle R.A. Amyloidosis: a convoluted story. *Brit. J. Haem.* **114,** 529-538 (2001).

Lee D.H.; Goldberg A.L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* **8**(10), 397-403 (1998).

Lee D.H.; Goldberg A.L. Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem.* **271**(44), 27280-4 (1996).

Lee T.I.; Rinaldi N.J.; Robert F.; Odom D.T.; Bar-Joseph Z.; Gerber G.K.; Hannett N.M.; Harbison C.T.; Thompson C.M.; Simon I.; Zeitlinger J.; Jennings E.G.; Murray H.L.; Gordon D.B.; Ren B.; Wyrick J.J.; Tagne J.B.; Volkert T.L.; Fraenkel E.; Gifford D.K.; Young R.A. Transcriptional regulatory networks in Saccharomyces cerevisiae. *Science* **298**(5594), 799 – 804 (2002).

Lehtinen M.K.; Tegelberg S.; Schipper H.; Su H.; Zukor H.; Manninen O.; Kopra O.; Joensuu T.; Hakala P.; Bonni A.; Lehesjoki A.E. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *J Neurosci*.**29**(18), 5910-5 (2009).

Levy E. Cystatin C: a potential target for Alzheimer's treatment. *Expert Rev Neurother.* **8**(5), 687-9 (2008).

Librizzi F.; Rischel C. The kinetic behavior of insulin fibrillation is determined by heterogeneous nucleation pathways. *Protein Sci* **14**, 3129–3134 (2005).

Liu R.; Liu I.Y.; Bi X.; Thompson R.F.; Doctrow S.R.; Malfroy B.; Baudry M. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/ catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14), 8526–8531 (2003).

Madeo F.; Eisenberg T.; Kroemer G. Autophagy for the avoidance of neurodegeneration. *Genes Dev.* **23**(19), 2253-9 (2009).

Malaspina A.; Kaushik N.; de Belleroche J.J. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *Neurochem.* **77**(1), 132-45 (2001).

Martin J.R.; Jerala R.; Kroon-Žitko L.; Žerovnik E.; Turk V.; Waltho J.P. Structural characterisation of human stefin A in solution and implications for binding to cysteine proteinases. *Eur J Biochem.* **225**(3), 1181-94 (1994).

Martin J.R.; Craven C.J.; Jerala R.; Kroon-Žitko L.; Turk V.; Waltho J.P. The threedimensional solution structure of human stefin A. *Journal of Molecular Biology* **246**, 331-43 (1995).

Maruyama K.; Kametani F.; Ikeda S.; Ishihara T.; Yanagisawa N. Characterization of amyloid fibril protein from a case of cerebral amyloid angiopathy showing immunohistochemical reactivity for both beta protein and cystatin C. *Neurosci Lett.* **144**(1-2), 38-42 (1992).

Mattiazzi M. *Homeostaza bioloških membran v evkariontski celici: vpliv fosfolipaze A_2 in cinka. Doktorska disertacija* (Ljubljana, 2010).

Mattiazzi M.; Curk T.; Križaj I.; Zupan B.; Petrovič U. Inference of the molecular mechanism of action from genetic interaction and gene expression data. *OMICS* **14**(4), 357-67 (2010).

Mi W.; Jung S.S.; Yu H.; Schmidt S.D.; Nixon R.A.; Mathews P.M.; Tagliavini F.; Levy E. Complexes of amyloid-beta and cystatin C in the human central nervous system. *J Alzheimers Dis.* **18**(2), 273-80 (2009).

Mi W.; Pawlik M.; Sastre M.; Jung S.S.; Radvinsky D.S.; Klein A.M.; Sommer J.; Schmidt S.D.; Nixon R.A.; Mathews P.M.; Levy E. Cystatin C inhibits amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Genet.* **39**(12), 1440-2 (2007).

Modler A.J.; Gast K.; Lutsch G.; Damaschun G. Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation. *J Mol Biol.* **325**, 135-148 (2003).

Molina-Holgado F.; Hider R.C.; Gaeta A.; Williams R.; Francis P. Metals ions and neurodegeneration. *Biometals* **20**(3-4), 639-54 (2007).

Morgan G.J.; Giannini S.; Hounslow A.M.; Craven C.J.; Žerovnik E.; Turk V.; Waltho J.P.; Staniforth R.A. Exclusion of the native alpha-helix from the amyloid fibrils of a mixed alpha/beta protein. *J Mol Biol* **375**, 487–498 (2008).

Muchowski P.J. Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron* **35**(1), 9-12 (2002).

Munishkina L.A.; Fink A.L.; Uversky V.N. Conformational prerequisites for formation of amyloid fibrils from histones. *J Mol Biol* **342**(4), 1305-24 (2004).

Murphy R.M. Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1768**(8), 1923-34 (2007).

Nillson M.; Wang X.; Rodziewicz-Motowidlo S.; Janowski R.; Lindström V.; Önnerfjord P.; Westermark G.; Grzonka Z.; Jaskolski M.; Grubb A. Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C. *J Biol Chem* **279**, 24236–24245 (2004).

Outeiro T.F.; Lindquist S. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* **302**(5651), 1772-5 (2003).

Outeiro T.F.; Muchowski P.J. Molecular genetics approaches in yeast to study amyloid diseases. *J Mol Neurosci*. **23**(1-2), 49-60 (2004).

Padrick S.B.; Miranker A.D. Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry* **41**, 4694–4703 (2002).

Papaleo E.; Invernizzi G. Conformational Diseases: Structural Studies of Aggregation of Polyglutamine Proteins. *Curr Comput Aided Drug Des*. ePub sept (2010).

Pellarin R.; Caflish A. Interpreting the Aggregation Kinetics of Amyloid peptides. *J.Mol.Biol.* **360**, 882–892 (2006).

Pennacchio L.A.; Lehesjoki A.E.; Stone N.E.; Willour V.L.; Virtaneva K.; Miao J.; D'Amato E.; Ramirez L.; Faham M.; Koskiniemi M.; Warrington J.A.; Norio R.; de la Chapelle A.; Cox D.R.; Myers R.M. Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* **271**, 1731-4 (1996).

Pol E.; Björk I. Role of single cysteine residue, Cys3, of human and bovine cystatin B (stefin B) in the inhibiton of cysteine proteinases. *Protein Science* **10**, 1729-38 (2001).

Qin K.; Yang D.S.; Yang Y.; Chishti M.A.; Meng L.J.; Kretzschmar H.A.; Yip C.M.; Fraser P.E.; Westaway D. Copper (II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. *Biol Chem* **275**, 19121–19131 (2000).

Rabzelj S.; Turk V.; Žerovnik E. In vitro study of stability and amyloid-fibril formation of two mutants of human stefin B (cystatin B) occurring in patients with EPM1. *Protein Sci*. **14**, 2713-22 (2005).

Radford S.E.; Gosal W.S.; Platt G.W. Towards an understanding of the structural molecular mechanism of beta(2)-microglobulin amyloid formation in vitro. *Biochim Biophys Acta*. **1753**(1), 51-63 (2005).

Raman B.; Ban T.; Yamaguchi K.; Sakai M.; Kawai T.; Naiki H.; Goto Y. Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid {beta} peptide. *J Biol Chem* **280**, 16157–16162 (2005).

Rasia R.M.; Bertoncini C.W.; Marsh D.; Hoyer W.; Cherny D.; Zweckstetter M.; Griesinger C.; Jovin T.M.;Fernandez C.O. Structural characterization of copper (II) binding to alpha-synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4294–4299 (2005).

Rawlings N.D.; Tolle D.P.; Barret A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal* **378**, 705-16 (2004).

Rawlings N.D.; Tolle D.P.; Barret A.J. MEROPS: the peptidase database. *NucleicAcid Research.* **32**, 160-4 (2004).

Reguly T.; Breitkreutz A.; Boucher L.; Breitkreutz B.J.; Hon G.C.; Myers C.L.; Parsons A.; Friesen H.; Oughtred R.; Tong A.; Stark C.; Ho Y.; Botstein D.; Andrews B.; Boone C.; Troyanskya O.G.; Ideker T.; Dolinski K.; Batada N.N.; Tyers M. Comprehensive curation and analysis of global interaction networks in *Saccharomyces cerevisia*. *Journal of Biology* **5**(11), 1-28 (2006).

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

Rinne R.; Saukko P.; Järvinen M.; Lehesjoki A.E. Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy. *Ann. Med*. **34**, 380-5 (2002).

Rojas Quijano F.A.; Morrow D.; Wise B.M.; Brancia F.L.; Goux W.J. Prediction of Nucleating Sequences from Amyloidogenic Propensities of Tau-Related Peptides. *Biochemistry* **45**(14), 4638-4652 (2006).

Rousseau F.; Schymkowitz J.W.; Wilkinson H.R.; Itzhaki L.S. Three-dimensional domain swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is controlled by conserved proline residues. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5596–5601 (2001).

Sabaté R.; Gallardo M.; Estelrich J. An autocatalytic reaction as a model for the kinetics of the aggregation of beta-amyloid. *Biopolymers* 71(2), 190-5 (2003).

Sánchez de Groot N.; Pallarés I.; Avilés F.X.; Vendrell J.; Ventura S. Prediction of »hot spots« of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC Struct Biol*. **5**, 18 (2005).

Sastre M.; Calero M.; Pawlik M.; Mathews P.M.; Kumar A.; Danilov V.; Schmidt S.D.; Nixon R.A.; Frangione B.; Levy E. Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiol Aging* **25**, 1033-1043 (2004).

Schlunegger M.P.; Bennett M.J.; Eisenberg D. Oligomer formation by 3D domain swapping: a model for protein assembly and misassembly. *Adv Protein Chem* **50**, 61–122 (1997).

Serag A.A.; Altenbach C.;Gingery M.; Hubbell W.L.;Yeates T.O. Identification of a subunit interface in transthyretin amyloid fibrils: evidence for self-assembly from oligomeric building blocks. *Biochemistry* **40,** 9089–9096 (2001).

Serio T.R.; Cashikar A.G.; Kowal A.S.; Sawicki G.J.; Moslehi J.J.; Serpell L.; Arnsdorf M.F.; Lindquist S.L. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. Science 289, 1317-1321 (2000).

Smajlović A.; Berbić S.; Schiene-Fischer C.; Tušek-Žnidarič M.; Taler A.; Jenko-Kokalj S.; Turk D.; Žerovnik E. Essential role of Pro 74 in stefin B amyloid-fibril formation: dual action of cyclophilin A on the process. *FEBS Lett.* **583**(7), 1114-20 (2009).

Sørensen J.; Hamelberg D.; Schiøtt B.; McCammon J.A. Comparative MD analysis of the stability of transthyretin providing insight into the fibrillation mechanism. *Biopolymers* **86**(1), 73-82 (2007).

Souillac P.O.; Uversky V.N.; Millett I.S.; Khurana R.; Doniach S.; Fink A.L. Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at psysiological pH. *J Biol Chem* **277**, 12657–12666 (2002).

Staniforth R.A.; Giannini S.; Higgins L.D.; Conory M.J.; Hounslow A.M.; Jerala R.; Craven C.J.; Waltho J.P. Three-dimensional domain swapping in the folded and moltenglobule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *EMBO J.* **20**, 4774-81 (2001).

Stefani M.; Dobson C. M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **81**, 678-99 (2003).

Stubbs M.; Laber B.; Bode W.; Huber R.; Jerala R.; Lenarcic B.; Turk V. The refined 2.4A X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: A novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J.* **9**, 1939-47 (1990).

Sunde M.; Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and Xray diffraction. *Adv. Protein Chem.* **50**, 123-59 (1997).

Škerget K.; Taler-Verčič A.; Bavdek A.; Hodnik V.; Čeru S.; Tušek-Žnidarič M.; Kumm T.; Pitsi D.; Pompe-Novak M.; Palumaa P.; Soriano S.; Kopitar-Jerala N.; Turk V.; Anderluh G.; Žerovnik E. Interaction between oligomers of stefin B and amyloid-beta in vitro and in cells. *J Biol Chem*. **285**(5), 3201-10 (2010).

Škerget K.; Vilfan A.; Pompe-Novak M.; Turk V.; Waltho J.P.; Turk D.; Žerovnik E. The mechanism of amyloid-fibril formation by stefin B: temperature and protein concentration dependence of the rates. *Proteins*. **74**(2), 425-36 (2009).

Tartaglia G.G.; Cavalli A.; Pellarin R.; Caflisch A. Protein Science The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determing protein aggregation rates. *Protein Sci*. **13**(7), 1939-41 (2004).

Tizon B.; Ribe E.M.; Mi W.; Troy C.M.; Levy E. Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity. *J Alzheimers Dis*. **19**(3), 885-94 (2010).

Tizon B.; Sahoo S.; Yu H.; Gauthier S.; Kumar A.R.; Mohan P.; Figliola M.; Pawlik M.; Grubb A.; Uchiyama Y.; Bandyopadhyay U.; Cuervo A.M.; Nixon R.A.; Levy E. Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. *PLoS One*. **5**(3), 9819 (2010).

Tong A. H.; Evangelista M.; Parsons A. B.; Xu H.; Bader G. D.; Page N.; Robinson M.; Raghibizadeh S.; Hogue C. W.; Bussey H.; Andrews B.; Tyers M. in Boone C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**(5550); 2364-2368 (2001).

Tseng B.P.; Kitazawa M.; LaFerla F.M. Amyloid beta-peptide: the inside story. *Curr Alzheimer Res*. **1** (4), 231-239 (2004).

Tsenkova R.N.; Iordanova I.K.; Toyoda K.; Brown D.R. Prion protein fate governed by metal binding. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 1005–1012 (2004).

Turk V.; Bode W. The cystatins: Proteins inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*. **285**, 213 (1991).

Turk V.; Stoka V.; Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance *Front Biosci*. **13**, 5406-20 (2008).

Uversky V.N.; Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* **1698**, 131-153 (2004).

Uversky V.N.; Li J.; Fink A.L. Evidence for a partially folded intermediate in a-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* **276**, 10737–10744 (2001).

Uversky V.N.; Li J.; Fink A.L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* **276** (47), 44284-44296 (2001).

Walsh D.M.; Selkoe D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44**, 181-193 (2004).

Walsh D.M.; Selkoe D.J. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett*. **11**, 213-228 (2004).

Westermark P. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J*. **272**(23), 5942-9 (2005).

Whitmore L.; Wallace B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, 668–673 (2004).

Wilhelmus M.M.M.; Boelens W.C.; Otte-Holler I.; Kamps B.; de Waal R.M.; Verbeek M.M. Small heat shock proteins inhibit amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta protein toxicity. *Brain Res.* **1089,** 67–78 (2006).

Wilhelmus M.M.M.; de Waal R.M.; Verbeek M.M. Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-Beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **35**(3), 203-16 (2007).

Willingham S.; Outeiro T.F.; DeVit M.J.; Lindquist S.L.; Muchowski P.J. Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntinhtin fragment or α-synuclein. *Science* **302**; 1769-1772 (2003).

Winderickx J.; Delay C.; De Vos A.; Klinger H.; Pellens K.; Vanhelmont T.; Van Leuven F.; Zabrocki P. Protein folding diseases and neurodegeneration: Lessons learned from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783**(7); 1381-95 (2008).

Winzeler E. A.; Shoemaker D. D.; Astromoff A.; Liang H.; Anderson K.; Andre B.; Bangham R.; Benito R.; Boeke J. D.; Bussey H.; Chu A. M.; Connelly C.; Davis K.; Dietrich F.; Dow S. W.; El Bakkoury M.; Foury F.; Friend S. H.; Gentalen E.; Giaever G.; Hegemann J. H.; Jones T.; Laub M.; Liao H.; Liebundguth N.; Lockhart D. J.; Lucau-Danila A.; Lussier M.; M'Rabet N.; Menard P.; Mittmann M.; Pai C.; Rebischung C.; Revuelta J. L.; Riles L.; Roberts C. J.; Ross-MacDonald P.; Scherens B.; Snyder M.; Sookhai-Mahadeo S.; Storms R. K.; Veronneau S.; Voet M.; Volckaert G.; Ward T. R.; Wysocki R.; Yen G. S.; Yu K.; Zimmermann K.; Philippsen P.; Johnston M.; Davis R. W. Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**(5429):901-906 (1999).

Wirths O.; Multhaup G.; Bayer T.A. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide-the first step of a fatal cascade. *J Neurochem*. **91**(3), 513-20 (2004).

Wiseman R.L.; Powers E.T.; Kelly JW. Partitioning conformational intermediates between competing refolding and aggregation pathways: insights into transthyretin amyloid disease. *Biochemistry* **44**, 16612–16623 (2005).

Wolinski H.; Petrovič U.; Mattiazzi M.; Petschnigg J.; Heise B.; Natter K.; Kohlwein S.D. Imaging-based live cell yeast screen identifies novel factors involved in peroxisome assembly. *J Proteome Res*. 8(1), 20-7 (2009).

Xu S.; Bevis B.; Arnsdorf M.F. The assembly of amyloidogenic Yeast Su35 as assessed by AFM: and analogy to linear colloidal aggregation? *Biophys.J*. **81**, 446-454 (2001).

Yeger-Lotem E.; Riva L.; Su L.J.; Gitler A.D.; Cashikar A.G.; King O.D.; Auluck P.K.; Geddie M.L.; Valastyan J.S.; Karger D.R.; Lindquist S.; Fraenkel E. Bridging high-throughput genetic and transcriptional data reveals cellular responses to α-synuclein toxicity. *Nat. Genet.* **41;** 316–323 (2009).

Yoshiike Y.; Minai R.; Matsuo Y.; Chen Y.R.; Kimura T.; Takashima A. Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins. *PLoS One*. **3**(9), 3235 (2008).

Žerovnik E. Amyloid-fibril formation; Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *European Journal of Biochemistry* **269**, 3362-71 (2002).

Žerovnik E. Protein conformational pathology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; new targets for therapy. *Curr Alzheimer Res*. **7**(1), 74-83 (2010).

Žerovnik E. The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *Bioessays* **31**(6), 597-9 (2009).

Žerovnik E.;Giannini S.; Stoka V; Tušek-Žnidarič M.; Pompe-Novak M.; Staniforth R.A. The mechanism of amyloid-fibrillation: stefin B as a good model protein. V: Žerovnik E.; Kopitar-Jerala N. (ed.) *Human stefins and cystatins.* 97-114 (Nova Science, New York, 2006).

Žerovnik E.; Jerala R.; Kroon-Žitko L.; Turk V.; Lohner K. Characterization of the equilibrium intermediates in acid denaturation of human stefin B. *Eur. J. Biochem*. **245**, 364-72 (1997).

Žerovnik E.; Jerala R.; Kroon-Žitko L.; Turk V.; Pain R.H. Denaturation of stefin B by GuHCl, pH and heat; evidence for molten globule intermediates. *Biol. Chem. HoppeSeyler* **373**, 453-458 (1992).

Žerovnik E.; Jerala R.; Poklar N.; Kroon-Žitko L.; Turk V. Compactness of the molten globule in comparison to unfolded states as observed by size-exclusion chromatography. *Biochim Biophys Acta*. **1209**(1), 140-3 (1994).

Žerovnik E.; Pompe-Novak M.; Škarabot M.; Ravnikar M.; Muševič I.; Turk V. Human stefin B readily forms amyloid fibrils in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**, 1-5 (2002).

Žerovnik E.; Jerala R.; Virden R.; Kroon-Žitko. L.; Turk V. in Waltho J. P. On the mechanism of human stefin B folding: II. Folding from GuHCl unfolded, TFE denatured, acid denatured, and acid intermediate states. *Proteins* **32**, 304-313 (1998).

Žerovnik E.; Škarabot M; Škerget K.; Giannini S.; Stoka V.; Jenko-Kokalj S; Staniforth R.A. Amyloid fibril formation by human stefin B: influence of pH and TFE on fibril growth and morphology. *Amyloid* **14**(3), 237-47 (2007).

Žerovnik E.; Škerget K.; Tušek-Žnidarič M.; Loeschner C.; Brazier M. W.; Brown D. R. High affinity copper binding by stefin B (cystatin B) and its role in the inhibition of amyloid fibrillation. *FEBS J*. **273**, 4250-63 (2006).

Žerovnik E.; Turk V.; Waltho J. P. Amyloid fibril formation by human stefin B: influence of the initial pH-induced intermediate state. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 543-47 (2002).

Žerovnik E.; Virden R.; Jerala R.; Kroon-Žitko L.; Turk V.; Waltho J.P. Differences in the effects of TFE on the folding pathways of human stefins A and B. *Proteins* **36**(2), 205-16 (1999).

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

Žerovnik E.; Zavašnik-Bergant V.; Kopitar-Jerala N.; Pompe-Novak M.; Škarabot M.; Goldie K.; Ravnikar M.; Muševič I.; Turk V. Amyloid fibril formation by human stefin B in vitro: immunogold labelling and comparison to stefin A. *Biol. Chem*. **383**, 859-63 (2002).

Kazalo slik

Slika 1: *Fentonova reakcija.* 7

Slika 2: *Analiza oblik agregatov med procesom fibrilacije stefina B.* (A) Fibrilacija stefina B s koncentracijo 34 μM, pri temperaturi 41 °C, pH 4,75, 10 % TFE, ki odraža spremembo CD signala pri valovni dolžini 222 nm (neprekinjena črta) in spremembo ThT fluorescence pri valovni dolžini 482 nm (posamezne točke). (B) Ista reakcija fibrilacije kot pri točki (A), spremljana daljši čas z metodo ThT fluorescence. (C) Morfologija tvorjenih agregatov pri istih pogojih kot pri (A) in (B), posneta s pomočjo transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM). Časovne točke odvzema vzorcev za slike TEM0, TEM1,TEM2 so označene s puščicami na slikah (A) in (B). TEM0 prikazuje vzorec odvzet ob koncu faze zakasnitve, TEM1 med fazo rasti in TEM2 v plato fazi. 35

Slika 3: *Temperaturna odvisnost prve faze fibrilacije*. (A) Sprememba CD signala pri valovni dolžini 222 nm za reakcijo v standardni raztopini znotraj temperaturnega intervala 34-52 °C. (B) Arrhenius-ov diagram konstant hitrosti, določenih pri (A). Eksperimentalni podatki so povezani z dvema premicama. (C) Arrhenius-ov diagram konstant hitrosti, določenih pri (A). Eksperimentalni podatki so povezani s krivuljo, ki izhaja iz enačbe na Sliki 4 in predpostavke o konstantni $\Delta c_{p.}$ 36

Slika 4: *Enačba za določitev entalpije aktivacije oziroma aktivacijske energije*, pri čemer je k *konstanta reakcijske hitrosti,* ΔH_0 *sprememba entalpije,* Δc_p *sprememba specifične toplotne kapacitete pri konstantnem tlaku,* T *temperatura,* T_0 *referenčna temperatura ter* R *splošna plinska konstanta.* 36

Slika 5: *Temperaturna odvisnost druge faze fibrilacije*. (A) Sprememba signala ThT fluorescence pri valovni dolžini 482 nm za reakcijo v standardni raztopini (34 μM, 10 % TFE, pH 4,75) znotraj temperaturnega intervala 27-44 °C. (B) Arrhenius-ov diagram konstant hitrosti, določenih s pomočjo meritev ThT signala (A), ki je podal vrednost E_a (27 ± 5 kcal mol-^{1}) druge faze firbilacije. 37

Slika 6: *Odvisnost fibrilacije od proteinske koncentracije.* (A) Sprememba ThT fluorescence v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C pri proteinskih koncentracijah 19, 34, 47, 75, 94, 132, 170 μM (od A_{280}=0,10 do A_{280}=1,00). (B) Sprememba ThT fluorescence v odvisnosti od časa pri temperaturi 35 °C pri proteinskih koncentracijah 19, 34, 47, 68, 104, 115, 142, 189 μM (od A_{280}=0,10 do A_{280}=1,00). 38

Slika 7: *Odvisnost konstante hitrosti prve faze fibrilacije od proteinske koncentracije*. (A) Sprememba CD signala pri valovni dolžini 222 nm, 38 °C, za reakcijo v standardni raztopini s proteinskimi koncentracijami od A_{280} = 0,11 do A_{280} = 1,0 oziroma od 19 μM do 190 μM. (B) Odvisnost dolžine faze zakasnitve od proteinske koncentracije istih reakcij kot pri točki (A). (C) Odvisnost logaritemske vrednosti konstante hitrosti od proteinske koncentracije istih reakcij kot pri točki (A). 39

Slika 8: *Shema kinetičnega modela mehanizma fibrilacije stefina B* 40

Slika 9: *Fibrilacija stefina B E31v prisotnosti in odsotnosti bakrovih ionov*. (A) pH 7 in 40 °C, (B) pH 5 in 40 °C, (C) pH 5, 25 °C in 10 % TFE. 41

Slika 10: *Inhibicija fibrilacije različnih oblik stefina B ob prisotnosti* Cu^{2+}*, pH 5, 25 °C, 10 % TFE*. (A) Inhibicija fibrilacije nemutranega stefina B E31 ob prisotnosti 50 μM Cu^{2+}. (B) Inhibicija fibrilacije nemutranega stefina B E31 ob prisotnosti 150 μM Cu^{2+}. (C) Inhibicija fibrilacije variante stefina B Y31 ob prisotnosti 50 μM Cu^{2+}. (D) Inhibicija fibrilacije variante stefina B Y31 ob prisotnosti 150 μM Cu^{2+}. (E) Inhibicija fibrilacije mutrane variante stefina B P79S ob prisotnosti 50 μM Cu^{2+}. (F) Inhibicija fibrilacije mutrane variante stefina B P79S ob prisotnosti 150 μM Cu^{2+} 42

Slika 11: *Posnetki inhibicije amiloidne fibrilacije stefina B ob prisotnosti bakrovih ionov*. Vzorčenje je potekalo po 9000 minutah, t.j. ko so reakcije fibrilacije dosegle plato (konec). (A) Varianta stefina B Y31, pripravljena v kelatnem pufru pri pH 5, 10 % TFE. (B) Varianta stefina B Y31, pripravljena v 100 μM $CuSO_4$ pri pH 5, 10 % TFE. (C) Nemutiran stefin B E31, pripravljen v kelatnem pufru pri pH 5, 10 % TFE. (D) Nemutiran stefin B E31, pripravljena v 100 μM $CuSO_4$ pri pH 5, 10 % TFE. 43

Slika 12: *Inhibicija fibrilacije peptida amiloid-bet (Ab) ob prisotnosti stefina B.* ThT fluorescenca, pH 7,3, 40 °C. (A) Prisotnost stefina B Y31 (sY). Koncentracija peptida amiloid-beta 17 in 34 μM, Y31 dodan v molarnem razmerju 1:1 in 2:1. (B) Prisotnost stefina B Y31 (sY) in nemutiranega stefina B E31 (sE). Koncentracija peptida amiloid-beta 17 μM, Y31 in E31 dodana v molarnem razmerju 1:1 44

Slika 13: *Kromatograma stefina B Y31 in E31, posneta s sistemom FPLC*. (A) Dimerna oblika variante stefina B Y31. (B) Lestvica oligomer stefina B E31. 44

Slika 14: *Inhibicija fibrilacije peptida amiloid-beta (Ab) ob prisotnosti posamičnih izoliranih oligomernih enot nemutiranega stefina B E31*. Merjeno s ThT fluorescenco. Koncentracija peptida amiloid-beta 17 μM, stefin B dodane v molarnem razmerju 1:1. (A) Monomere (sEm). (B) Dimere (sEd). (C) Tetramere (sEt). (D) Višje oligomere (sEv). 45

Slika 15: *Morfologija agregatov in fibril peptida amiloid-beta*. Posneto s TEM. (A) Peptid amiloid-beta z varianto stefina B Y31. (B) Peptid amiloid-beta z nemutiranim stefinom B E31. (C) Peptid amiloid-beta. 45

Slika 16: *Koncentracijsko odvisna interakcija stefina B s peptidom amilod-beta*. Posneto s SPR. (A) Interakcija s stefinom B Y31. (B) Interakcija z nemutiranim stefinom B E31. 46

Slika 17: *Interakcija monomer (sEm), dimer (sEd), tetramer (sEt) in višjih oligomer (sEv) nemutiranega stefina B E31 s peptidom amilod-beta*. Posneto s SPR. 46

Slika 18: *Morfologija transformiranih kvasnih celic seva BY4742 s človeškim proteinom stefin B E31*. Posnetek celic seva BY4742 z vstavljenim konstruktom stefina B E31 pri 1000-kratni povečavi, posnet s transmisijskim mikroskopom Olympus IX81. 47

Slika 19: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov in kontrolnega seva na galaktoznem gojišču*. Galaktozno gojišče inducira prekomerno izražanje stefina B v kvasnih celicah sevov A21, D21 in D22. Sev z vstavljenim praznim vektorjem pRD53 služi za negativno kontrolo. 47

Slika 20: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov in kontrolnega seva na glukoznem gojišču*. Glukozno gojišče ne sproži izražanja stefina B (negativna kontrola). 48

Slika 21: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov 1, 3, 4 in kontrolnega seva AJY217 izh3Δ na glukoznem gojišču*. Glukozno gojišče ne sproži izražanja stefina B (negativna kontrola). 48

Slika 22: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov 1,3,4 in kontrolnega seva AJY217 izh3Δ na galaktoznem gojišču – začetna faza.* Galaktozno gojišče sproži izražanje stefina B. Testirani transformirani sevi celic AJY217 z vstavljenim stefinom B E31 imajo občutno daljšo začetno fazo zakasnitve v primerjavi s kontrolnim sevom AJY217 *izh3Δ*. 49

Slika 23: *Hitrost rasti testiranih transformiranih sevov 1,3,4 in kontrolnega seva AJY217 izh3Δ na galaktoznem gojišču – celoten proces.*Galaktoza je v gojišču, ki je inducirala prekomerno izražanje stefina B v transformiranih sevih, začasno zaustavila njihovo rast. Le-ta se v nadaljevanju nemoteno nadaljuje, vendar doseže različne končne vrednosti OD pri posameznih transformiranih sevih. 49

Slika 24: *Imunodetekcija stefina B E31 znotraj celic BY4742*. Od leve proti desni: označevalec velikosti proteinov - proteinski velikostni standard (11, 17 kDa), 2x negativna kontrola (prazen PRD53 v BY4742) SL1, SL2, sev A21, sev D21, sev D22. Temne lise označujejo prisotnost proteina stefina B E31. 50

Slika 25: *Časovno spremljanje izražanja stefina B E31 pri sevu D22*. Za negativno kontrolo smo uporabili razraščanje seva D22 na glukoznem gojišču (glc), ki ne sproži izražanja stefina B E31 v celicah, in celice BY4742 z vstavljenim praznim vektorjem pRD53. Od leve proti desni: označevalec velikosti proteinov - proteinski velikostni standard (11, 17 kDa), D22 po 1 h, D22 po 2 h, D22 na glc po 2 h (neg.), D22 po 6h, D22 po 10h, D22 na glc po 10h (neg.), celice z praznim pRD53 po 10h (neg.). Temne lise označujejo prisotnost proteina stefina B E31. 50

Slika 26: *Imunodetekcija stefina B E31 znotraj celic AJY217*. Od leve proti desni: označevalec velikosti proteinov - proteinski velikostni standard (11, 17 kDa), testiran sev 3, sev D22 (poz. k.), AtxA (neg. k.).Temne lise označuje prisotnost proteina stefina B E31. 51

Slika 27: *Primer posnete galaktozne plošče št. 2*..... 51

Slika 28: *Posnetek mikromreže genoma kvasovke S.cerevisiae, celic seva BY4742 z /brez vstavljenega stefina B E31*. Rdeč signal priprada barvilu Cy5 - testiranemu sevu z vstavljenim stefinom B E31, zelen signal kontrolnemu sevu, označenim z barvilom Cy3. Rumen signal je posledica primerljivih intenzitet rdečega in zelenega signala. 53

Slika 29: *Lokalizacija stefina B E31 v kvasnih celicah BY4742*. Imunofluorescenčno označen stefin B (levo), z-projekcija svetlega polja (desno). Slike posnete s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5. 55

Slika 30: *Vpliv inhibitorjev razgradnje proteinov na seva erg6 in BY4742 z vstavljenim stefinom B E31*. Sev *erg6* ima oslabljeno celično membrano, medtem ko je celična membrana seva BY4742 stabilna. (A) Vpliv inhibitorja MG132. (B) Vpliv inhibitorja PMSF. 56

Slika 31: *Vpliv inhibitorjev razgradnje proteinov na sev erg6 z oziroma brez integriranega stefina B E31*. Za kontrolni sev (celice brez integriranega stefina B E31) je služil sev erg6 z vstavljenim praznim vektorjem pRD53. (A) Vpliv inhibitorja MG132. (B) Vpliv inhibitorja PMSF. 56

Kazalo tabel

Tabela 1: *Kinetični parametri predlaganega modela*. 38
Tabela 2: *Inhibicija fibrilacije različnih oblik stefina B ob prisotnosti 50 μM* Cu^{2+}. 43
Tabela 3: *Genetski interaktorji gena stefina B – mutante z zmanjšano relativno sposobnostjo rasti*. Ob oznaki gena je podana funkcija ustreznega proteina in povprečna relativna sposobnost rasti (R) obeh bioloških ponovitev na plošči. 52
Tabela 4: *Vpliv stefina B na genom kvasovke: geni s povišano stopnjo izražanja*. Sistematičnim oznakam (simbolom) genov sledi vrednost log 2 od vrednosti razmerja intenzitet barvil Cy5:Cy3. 54
Tabela 5: *Vpliv stefina B na genom kvasovke: geni z znižano stopnjo izražanja*. Sistematičnim oznakam (simbolom) genov sledi vrednost log 2 od vrednosti razmerja intenzitet barvil Cy5:Cy3. 54