ŠTUDIJ AGREGACIJE KONKANAVALINA A IN STEFINA B Z IR SPEKTROSKOPIJO

Urban Novak

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentor: izr. prof. dr. Jože Grdadolnik, Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:
izr. prof. dr. Eva Žerovnik, predsednica, Institut ''Jožef Stefan'', Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Gojmir Lahajnar, član, Institut ''Jožef Stefan'', Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Marjana Novič, članica, Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Urban Novak

ŠTUDIJ AGREGACIJE KONKANAVALINA A IN STEFINA B Z IR SPEKTROSKOPIJO

Doktorska disertacija

STUDY OF CONCANAVALIN A AND STEFIN B AGGREGATION BY IR SPECTROSCOPY

Doctoral Dissertation

Mentor: izr. prof. dr. Jože Grdadolnik

Ljubljana, Slovenija, februar 2017

Staršem

Zahvala

Mentorju, izr. prof. dr. Jožetu Grdadolniku, se zahvaljujem za ponujeno mesto mladega raziskovalca, nasvete, strokovno pomoč in pripravljenost kadarkoli razložiti nejasnosti glede metodologije ali zakonitosti vibracijske spektroskopije.

Prof. dr. Evi Žerovnik se zahvaljujem za predano znanje na področju proteinskega zvitja in agregacije. Hvala za izkazano zanimanje in sodelovanje pri študiju agregacije stefina B.

Hvala prof. dr. Gojmirju Lahajnarju za številna prijetna srečanja, za neutrudne razlage poglavij iz biofizike in vpogled v metode NMR na primeru akvaporinov.

Najlepša hvala dr. Magdi Tušek Žnidarič za pomoč pri slikanju vzorcev s transmisijsko elektronsko mikroskopijo.

Prof. dr. Marija Wierzejewska je posnela spektre kratkih alanin peptidov v izolirani okolici, za kar se ji lepo zahvaljujem.

Dr. Ajdi Taler Verčič se zahvaljujem za izolacijo stefina B.

Vsem sodelavcem iz Laboratorija za strukturo biomolekul na Kemijskem inštitutu se lepo zahvaljujem za pozitivno delovno vzdušje, pomoč pri delu in za razumevanje osebnih dejavnosti.

Zahvaljujem se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za financiranje podiplomskega študija.

Hvala staršem za podporo in spodbudo.

Hvala Moniki za spodbudo, razumevanje, potrpežljivost in pripravljenost prisluhniti temam, ki morda zanjo niso bile najzanimivejše.

Povzetek

Christian Anfinsen je pred dobrega pol stoletja napisal prvo poglavje o procesu proteinskega zvitja. Vse od takrat se trudijo znanstveniki na številnih področjih napisati nadaljnja poglavja, ki bi opisala procese, sile in zakonitosti proteinskega zvitja, razvitja, agregacije, ... V tem delu smo želeli prispevati kamenček k sestavljajočemu se mozaiku razumevanja procesa proteinskega zvitja.

Vibracijska spektroskopija ni najobičajnejša metoda pri študiju strukture proteinov in njihovih konformacijskih sprememb. Ker pa dovoljuje delo v različnih raztopinah, s čimer omogoča študij vpliva okolja na strukturo biomolekul in hkrati zaznava strukturne spremembe v majhnih časovnih skalah, je to metoda, ki lahko pomembno dopolnjuje informacije, pridobljene z bolj konvencionalnimi metodami.

Študij kratkih peptidov alanina v inertni okolici je razkril, da v vseh preučevanih homomernih sistemih prevladuje C_7 konformacija. V manjši meri so prisotne tudi PP_{II}, β in α-konformacije, katerih delež je odvisen od dolžine peptidne verige. Spektralna analiza najpreprostejših peptidov razkrije uporabno vrednost amidnega I in amidnega III območja, saj sta ti območji neodvisni od okolice.

Opazovanje strukturnih sprememb med hidratacijo proteinskih filmov konkanavalina A, kimotripsinogena A, pepsina in stefina B je razkrilo, da hidratacija v vseh primerih vzpodbudi nastanek β-struktur. Kljub temu da opazovane strukturne spremembe niso velike, jih lahko z metodami vibracijske spektroskopije uspešno zaznamo. Vpeljali smo metodo za določitev debeline proteinskih filmov na podlagi aminokislinske sestave posameznih modelnih proteinov in umeritvene krivulje, pripravljene na primeru različno debelih filmov govejega serumskega albumina. Določili smo število vezanih molekul vode na eno molekulo polipeptidne verige v odvisnosti od relativne vlažnosti atmosfere v okolici.

Z zavedanjem, da lahko z vibracijsko spektroskopijo zaznamo tudi majhne strukturne spremembe, ki nastopijo med procesom hidratacije proteinskih filmov, smo želeli slediti konformacijskim spremembam, ki nastanejo med agregacijo konkanavalina A in stefina B. Konkanavalin A v bazičnem okolju tvori amiloidne agregate, medtem ko v kislem okolju tvori amorfne agregate. Pri obeh tipih termično gnanih procesov smo sledili strukturnim spremembam in določili spektralne markerje, ki razlikujejo med obema morfološko si različnima tipoma agregatov. Opazovali smo tudi časovno odvisno tvorbo amiloidnih struktur konkanavalina A. Vse strukturne spremembe smo ovrednotili z metodo dekompozicije spektralnih trakov.

Agregacijo stefina B smo spremljali pri vrednostih pH 3, 5, 7,5 in 9. Pri vseh vrednostih pH stefin B tvori amiloidne agregate. Temperatura prehoda z višanjem pH narašča. Na podlagi naših rezultatov smo predstavili nov model, ki bi lahko opisal proces tvorbe amiloidnih fibril stefina B. Ta model v procesu agregacije ne predvideva popolnega razvitja polipeptidne verige, temveč le delno prestrukturiranje α-vijačnice in β-traku na način, da je omogočena tvorba prečnih β-ravnin, značilnega strukturnega elementa amiloidnih fibril.

Ključne besede: peptid, vibracijska spektroskopija, agregacija, hidratacija, proteinski filmi, amiloidne fibrile, amorfni agregati, stefin B, konkanavalin A

Abstract

More than half a century ago, Christian Anfinsen wrote the first chapter on the process of protein folding. Since then, researchers from different scientific fields have been trying to write further chapters, which would describe the forces that govern the processes of protein folding, unfolding and aggregation.

Vibrational spectroscopy is not the most common spectroscopic method for studying the protein structure. Since it enables experimentation with different solutions and detects structural changes in short time scales, this method can significantly complement the information gathered by more conventional methods.

The study of short alanine peptides in matrices under inert atmosphere revealed the C_7 conformation as the most favorable one in homomeric systems and to a lesser extent the presance of the PP_{II}, β and α-conformations. The relative amount of these latter conformations depends on the length of the polypeptide chain. Spectral analysis of short peptides reveals the useful value of the Amide I and Amide III bands, mainly because their spectral areas are independent of the surroundings.

Structural changes observed during hydration of the Concanavalin A, Chymotrypsinogen A, Pepsin and Stefin B protein films reveal that hydration stimulates the formation of β-structures. Despite the fact that the observed changes are not extensive, they are detectable by means of various methods of vibrational spectroscopy. We introduced a technique capable of determining the thickness of protein films, based on the known composition of amino acids in an individual protein and the calibration curve obtained for the case of bovine serum albumin protein films having various known thicknesses. The number of water molecules bonded to a single polypeptide chain as a function of relative humidity was determined.

Knowing that vibrational spectroscopy is capable of monitoring small structural changes that occur during the hydration processes, we applied this technique to follow up various conformational changes during the aggregation processes of Concanavalin A and Stefin B. Thus it was found that in a basic environment Concanavalin A forms amyloid aggregates while in an acidic environment it forms amorphous aggregates. For both types of thermally driven processes we followed up the respective structural changes and from the data obtained we defined the spectral markers which discriminate between both types of morphologically different aggregates. In addition to the thermally driven processes we followed up a thermally induced time dependent process of Concanavalin A aggregation at pH 9. All conformational changes were quantitatively characterized by means of the spectral band decomposition method.

The process of thermally driven aggregation of Stefin B was monitored at pH 3, 5, 7,5 and 9. At all pH values Stefin B forms amyloid aggregates. The melting point is increasing with increasing pH. Based on the results obtained we proposed a new model capable of describing the process of amyloid fibril formation of Stefin B. This model does not involve complete unfolding of the polypeptide chain, but rather partial restructuring of the α-helix and β-sheets in a way to allow the formation of cross β-sheets, a typical structural element of amyloid fibrils.

Keywords: peptide, vibrational spectroscopy, aggregation, hydration, protein films, amyloid fibrils, amorphous aggregates, Stefin B, Concanavalin A

Kazalo

Slike **xvii**

Tabele **xxv**

Kratice **xxvii**

Simboli **xxix**

Slovar **xxxi**

1 Uvod **1**
1.1 Struktura in zvitje proteinov ... 4
1.1.1 Levinthalov paradoks in klasični pogled na proces proteinskega zvitja ... 4
1.1.2 Nov pogled na proces proteinskega zvitja: energijske pokrajine in lijak zvijanja ... 5
1.2 Vodikove vezi v bioloških sistemih ... 6
1.2.1 Vodikova vez ... 6
1.2.2 Intermolekularna in intramolekularna vodikova vez ... 7
1.3 Infrardeča spektroskopija ... 8
1.3.1 Podatki, pridobljeni z IR spektroskopijo ... 9
1.3.2 Najpogostejši merilni tehniki vibracijske spektroskopije ... 10
1.3.2.1 Transmisija ... 10
1.3.2.2 Oslabljena popolna refleksija (angl. attenuated total reflection, ATR) ... 10
1.3.3 Območje nihanj proteinskih skupin v FTIR spektru ... 11

2 Cilji in hipoteze **13**

3 Kratki homopeptidi v inertni okolici **15**
3.1 Uvod ... 15
3.1.1 Konformacijske lastnosti majhnih peptidov in sekundarna struktura ... 16
3.1.1.1 Geometrija elementov sekundarne strukture: vijačnice, ravnine, zavoji oz. obrati (α-strukture, β-strukture in obrati) ... 17
3.1.1.2 Ramachandranov diagram ... 19
3.1.1.3 Konformacija majhnih peptidov v vodni raztopini ... 21
3.2 Materiali in metode ... 22
3.2.1 Priprava vzorcev ... 22
3.2.2 Snemanje in analiza FTIR spektrov ... 22
3.3 Rezultati ... 24
3.3.1 Ala dipeptid ... 25
3.3.2 Ala_2 peptid ... 28
3.3.3 Ala_3 peptid ... 30

3.4 Razprava ... 32
3.4.1 Ala dipeptid ... 32
3.4.2 Ala_2 peptid ... 32
3.4.3 Ala_3 peptid ... 33
3.5 Zaključki ... 34

4 Hidratacija proteinskih filmov 35
4.1 Uvod ... 35
4.1.1 Voda ... 35
4.1.1.1 Molekule vode in vodikove vezi z makromolekulami ... 37
4.1.2 Postopna hidratacija proteinov ... 37
4.1.2.1 Konfiguracijska interakcija molekul vode ... 38
4.1.3 Modelni proteini za študij hidratacije ... 38
4.2 Materiali in metode ... 41
4.2.1 Merilni instrumenti ... 41
4.2.2 Priprava proteinskih filmov ... 41
4.2.3 Meritve FTIR spektrov ... 41
4.2.4 Izračun debelin proteinskih filmov ... 42
4.2.5 Hidratacija proteinskih filmov ... 43
4.3 Rezultati ... 45
4.3.1 Določitev sekundarne strukture ... 45
4.3.2 Diferenčni hidratacijski spektri ... 48
4.3.2.1 Interakcija molekul vode z molekulami konkanavalina A v proteinskem filmu ... 50
4.3.2.2 Primerjava diferenčnih spektrov hidratacije konkanavalina A z ostalimi modelnimi proteini ... 52
4.3.3 Določevanje števila vezanih molekul vode ... 56
4.4 Razprava ... 63
4.5 Zaključki ... 67

5 Agregacija modelnih proteinov 69
5.1 Uvod ... 69
5.1.1 Napačno zvitje in amiloidne bolezni ... 70
5.1.2 Agregacija proteinov ... 71
5.1.2.1 Mehanizem fibrilacije ... 71
5.1.2.2 Strukturne lastnosti amiloidnih fibril ... 74
5.1.2.2.1 Amiloidne fibrile ... 74
5.1.2.2.2 Oligomerne strukture ... 75
5.1.2.2.3 Amorfni agregati ... 76
5.1.3 Konkanavalin A ... 77
5.1.4 Stefin B ... 78
5.2 Materiali in metode ... 79
5.2.1 Priprava vzorcev za FTIR spektroskopijo ... 79
5.2.1.1 Konkanavalin A ... 79
5.2.1.2 Stefin B ... 79
5.2.2 FT infrardeča spektroskopija ... 79
5.2.2.1 Konkanavalin A in Stefin B ... 79
5.2.2.1.1 Termično gnan proces: konkanavalin A in stefin B ... 80
5.2.2.1.2 Časovno odvisen proces: konkanavalin A ... 80
5.2.3 Transmisijska elektronska mikroskopija, TEM ... 81
5.2.3.1 Konkanavalin A ... 81

5.2.3.2 Stefin B ... 81
5.3 Rezultati ... 82
5.3.1 Konkanavalin A ... 82
5.3.1.1 Termično gnana agregacija ... 82
5.3.1.2 Časovno gnana agregacija ... 89
5.3.1.3 Transmisijska elektronska mikroskopija ... 92
5.3.2 Stefin B ... 94
5.3.2.1 Termično gnana agregacija ... 94
5.3.2.2 Transmisijska elektronska mikroskopija ... 101
5.4 Razprava ... 103
5.4.1 Konkanavalin A ... 103
5.4.1.1 Termično gnana agregacija ... 103
5.4.1.2 Časovno gnana agregacija konkanavalina A ... 107
5.4.1.3 Transmisijska elektronska spektroskopija ... 108
5.4.2 Stefin B ... 109
5.5 Zaključki ... 112

6 Zaključki **115**

Dodatek A **117**
A.1 Kratki homopeptidi v inertni atmosferi ... 117
A.2 Hidratacija proteinskih filmov ... 119
A.3 Agregacija konkanavalina A in stefina B ... 121

Dodatek B **123**
B.1 Hidratacija proteinskih filmov ... 123
B.2 Agregacija konkanavalina A in stefina B ... 125

Literatura **127**

Bibliografija **145**
Objave v povezavi z delom ... 145
Članki v revijah ... 145
Prispevek na konferenci ... 145
Druge objave ... 145

Biografija **147**

Stvarno kazalo **149**

Slike

Slika 1.1: Shematska predstavitev energijskih pokrajin za procese proteinskega zvitja, proteinskega napačnega zvitja (angl. mis-folding) in agregacije napačno zvitih proteinskih molekul. Prosta energija posameznih konformacijskih stanj je predstavljena z globino posamezne globeli, širina globeli pa predstavlja konformacijsko entropijo posameznega stanja. Razgibanost energijske pokrajine ustreza intermediatom in drugim metastabilnim stanjem. (1) Nezvita stanja zavzamejo številne konformacije; (2) Intermediati v procesu proteinskega zvitja; (3) Nativno zvita polipeptidna veriga; (4) Napačno zviti intermediati in majhni oligomeri; (5) Amorfni agregati; (6) Amiloidne fibrile, ki lahko zavzamejo več izrazitih morfoloških stanj; (7) Toksični oligomeri in protofibrile..... 6

Slika 1.2: Primer IR aktivnih in IR neaktivnih molekul. Za IR aktivnost molekul je potrebna sprememba dipolnega momenta [98]..... 8

Slika 1.3: Regija prstnega odtisa na primeru spektra konkanavalina A, posnetega pri 15 °C in pH 9. 12

Slika 3.1: Shematska predstavitev molekule v inertni atmosferi. Rdeče obarvani molekuli sta obdani z inertnimi molekulami argona ali ksenona (siva barva) pri zelo nizki temperaturi (10 K – 20 K).....16

Slika 3.2: Predstavitev klasičnega Ramachandranovega diagrama, poimenovanega tudi Φ, Ψ diagram. (A) Konformacijo alanin dipeptida lahko opišemo s tremi torzijskimi koti, to so Φ, Ψ in ω. Peptidna vez (HN - C'O) izkazuje karakter dvojne vezi, kar vodi v njeno togost in posledično v praktično planarno ureditev atomov. Z izjemo prolina so ostale levosučne aminokisline bolj naklonjene trans konformaciji peptidne vezi, kar torzijskemu kotu ω določa velikost blizu 180°. Ker je vrednost torzijskega kot ω enaka med peptidnimi enotami kot tudi v vseh pogostejših elementih sekundarnih struktur, je na ta način torzijski kot ω kot konstanta izključen iz predstavitve v Ramachandranovem diagramu. Peptidno vez na obeh straneh centralnega ogljikovega atoma, C_α, lahko obravnavamo kot togi ravnini, ki rotirata okoli dihidralnih kotov Φ in Ψ. Kot Φ je v dipeptidni enoti definiran kot torzijski kot med C_{i-1}-N_i – $C_{\alpha i}$-C_i peptidnim delom, kot Ψ pa definira torzijski kot N_i-$C_{\alpha i}$ – C_i-N_{i+1}. (B) Shematski prikaz Ramachandranovega diagrama za primer alanin dipeptida in tipičnih regij, značilnih za glavne elemente sekundarnih struktur. Povzeto po referenci: [132].....20

Slika 3.3: Blokirani alanin peptidi, izrisani s programom Avogadro. (A) Ala dipeptid, (B) Ala_2 peptid in (C) Ala_3 peptid..... 22

Slika 3.4: Shema matrične izolacije. (1) Žlahtni plin (argon oz. ksenon); (2) KBr okno; (3) Pot IR svetlobe; (4) Ohlajeno CSi kriospektroskopsko okno; (5) Matrica; (6) Ogrevalno oz. ohlajevalno telo; (7) Vzorec; (8) Regulator temperature; (9) Povezava do helijevega kompresorja..... 23

Slika 3.5: Spektri alanin peptidov v interni okolici. (A) Ala dipeptid v Xe matriki pri T=20 K; (B) Ala_2 peptid v Ar matriki pri T=10 K; (C) Ala_3 peptid v Ar matriki pri T=10 K; (D) Infrardeči spekter Ala dipeptida v Xe matriki pri T=20 K (modri spekter), polikristalinični film (rdeči speketer) in vodne raztopine Ala dipeptida (črn spekter). Pri slednjem je spekter vode odštet..... 24

Slika 3.6: Dekompozicija spektralnih trakov za primer Ala dipeptidov v inertni okolici. (A) Območje NH valenčnega nihanja z modelnimi trakovi; (B) Območje amida I z modelnimi trakovi; (C) Območje amida II z modelnimi trakovi; (D) Območje amida III z modelnimi trakovi. Z rdečo barvo je predstavljen eksperimentalno posneti spekter in s črno izračunan spekter, ki predstavlja vsoto modelnih trakov. Modelni trakovi so predstavljeni s sivo barvo..... 25

Slika 3.7: Konformacije Ala dipeptida: (A) α_R, (B) PP_{II}, (C) $C_5(\beta)$ in (D) C_7..... 27

Slika 3.8: Dekompozicija spektralnih trakov za primer Ala_2 peptidov v inertni okolici. (A) Območje NH valenčnega nihanja z modelnimi trakovi; (B) Območje amida I z modelnimi trakovi; (C) Območje amida II z modelnimi trakovi; (D) Območje amida III z modelnimi trakovi..... 28

Slika 3.9: Dekompozicija spektralnih trakov za primer Ala_3 peptidov v inertni okolici. (A) Območje NH valenčnega nihanja z modelnimi trakovi; (B) Območje amida I z modelnimi trakovi; (C) Območje amida II z modelnimi trakovi; (D) Območje amida III z modelnimi trakovi..... 30

Slika 4.1: Shematična predstavitev molekule vode (A) in njena tetrahedralna ureditev v ledu (B). Molekula vode za tvorbo H-vezi poseduje dve donorski in dve akceptorski mesti. 36

Slika 4.2: Tridimenzionalna predstavitev modelnih proteinov, na katerih smo študirali vpliv stopnje hidratacije na njihovo sekundarno strukturo. (A) Kimotripsenogen [158], (B) konkanavalin A (tetramer) [159], (C) pepsin [160] in (D) stefin B [161]. 39

Slika 4.3: Umeritvena krivulja za določevanje debeline proteinskih filmov, ki je bila pripravljena na podlagi različno debelih filmov govejega serumskega albumina. Na sliki je

prikazana odvisnost med površino traku, ki pripada CH valenčnemu nihanju (3003 cm^{-1} – 2895 cm^{-1}), in debelino proteinskega filma BSA [41, 59]. 42

Slika 4.4: (A) Shema hidratacijske aparature, s katero smo vlažili suhi dušik. Z navlaženim dušikom smo prepihovali transmisijsko celico, v kateri se je nahajal proteinski film. (1) Merilnik pretoka; (2) Mešalni ventil; (3) Zaporni ventil; (4) Zbiralnik z deionizirano vodo; (5) Zbiralnik s težko vodo. (B) Shema hidratacijske celice. (1) KBr okenci; (2) ZnSe okence (rumena barva) na katero je nanašen proteinski film (rdeča barva); (3) Vstop suhega dušika, ki je predhodno navlažen v hidratacijski aparaturi; (4) Izstop suhega dušika; (5) Vhod IR žarka; (6) Izstop IR žarka. 43

Slika 4.5: Predstavitveni spektri konkanavalina A. (A) Posušen proteinski film; (B) Polno hidratiran proteinski film; (C) Polno hidratiran proteinski film po tem, ko smo odšteli vodno paro; (D) Spekter konkanavalin A v vodni raztopini po odštevanju čiste vode (angl. bulk water). 45

Slika 4.6: Tipičen diferenčni spekter dveh različno hidratiranih proteinskih filmov. Od spektra delno hidratiranega proteinskega filma konkanavalina A smo odšteli spekter suhega proteinskega filma. Največje spremembe se nahajajo v območju OH valenčnega nihanja, tj. med 3000 cm^{-1} in 3600 cm^{-1}. Spremembe nastopijo kot posledica absorpcije molekul vode iz vlažne atmosfere s strani proteinskega filma. 49

Slika 4.7: Diferenčni spekter v območju med 1800 cm^{-1} in 1200 cm^{-1}. Od spektra delno hidratiranega proteinskega filma konkanavalina A smo odšteli spekter suhega proteinskega filma. 49

Slika 4.8: Karakteristični diferenčni spektri konkanavalina A, ki predstavljajo različne stopnje hidratacije. (A) Črn spekter z začetka hidratacije, moder spekter s sredine in rdeč spekter s konca hidratacije. Zelen spekter predstavlja spekter tekoče vode. (B) Diferenčni spekter z začetka hidratacije s pripadajočimi valovnimi števili. (C) Diferenčni spekter s srednje stopnje hidratacije s pripadajočimi valovnimi števili. (D) Zadnja stopnja hidratacije, predstavljena z diferenčnim spektrom in značilnimi valovnimi števili. 51

Slika 4.9: Začetna stopnja hidratacije. Diferenčni spektri, ki povzemajo konformacijske spremembe v sekundarnem zvitju proteinske molekule, ki nastanejo ob začetku hidratacije: (A) kimotripsinogen; (B) konkanavalin A; (C) pepsin in (D) stefin B. 53

Slika 4.10: Vmesna stopnja hidratacije. Diferenčni spektri, ki povzemajo konformacijske spremembe v sekundarnem zvitju proteinske molekule, ki nastanejo v vmesni stopnji hidratacijskega procesa: (A) kimotripsinogen; (B) konkanavalin A; (C) pepsin in (D) stefin B. 54

Slika 4.11: Končna stopnja hidratacije. Diferenčni spektri, ki povzemajo konformacijske spremembe v sekundarnem zvitju proteinske molekule, ki nastanejo v končni stopnji

hidratacije proteinskega filma: (A) kimotripsinogen; (B) konkanavalin A; (C) pepsin in (D) stefin B. 55

Slika 4.12: Shematski oris hidratacije COOH in COO^- stranskih aminokislinskih verig... 55

Slika 4.13: Grafična predstavitev procesa hidratacije glavne verige proteinske molekule. 56

Slika 4.14: Sorpcijska izoterma na primeru postopne hidratacije konkanavalina A. S črno črtkano črto je predstavljena sorpcijska izoterma, ki smo jo dobili z gravimetrijo. Z roza (brez korekcije) in vijolično (s korekcijo) barvo so predstavljeni rezultati določanja števila vezanih molekul vode na molekulo proteina, ki smo jih pridobili s FTIR spektroskopijo. 58

Slika 4.15: Število vezanih molekul vode na molekulo proteina, določeno s FTIR spektroskopijo. (A) Kimotripsinogen; (B) konkanavalin A, (C) pepsin in (D) stefin B. Roza barve so rezultati, kjer nismo upoštevali razlike v deležu aminokislinske sestave napram aminokislinski sestavi govejega serumskega albumina. Pri rezultatih v vijolični barvi smo razliko upoštevali. 59

Slika 4.16: Pregled števila vezanih molekul vode na molekulo proteina ob določeni relativni vlažnosti: stefin B (črna), pepsin (roza), konkanavalin A (vijolična), konkanavalin A-gravimetrija (oranžna), kimotripsinogen (svetlo siva) in goveji serumski albumin (temno siva). 60

Slika 4.17: Graf, ki predstavlja razmerje med številom atomov na površini nativno zvite polipeptidne verige in številom vezanih molekul vode ob določeni relativni vlažnosti (10 % – 90 %). Stefin B (črna), pepsin (roza), konkanavalin A (vijolična), konkanavalin A-gravimetrija (oranžna), kimotripsinogen (zelena) in goveji serumski albumin (rdeča)..... 62

Slika 5.1: Kaskada proteinske agregacije. Povzeto po referenci: [198]. 72

Slika 5.2: Shema nukleacijsko odvisnega mehanizma tvorbe fibril. V začetni fazi opazimo strukturne spremembe na peptidnih enotah, ki vodijo v ravnotežje med neugodnimi proteinskimi združki (K_n). Tej fazi sledi ugodno ravnotežje (k_g), ki vodi v tvorbo odraslih amiloidnih fibril. Povzeto po referenci: [207]. 73

Slika 5.3: Konkanavalin A pri pH 9. Sprememba integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} kot funkcija temperature. T_m=60,0 °C. 82

Slika 5.4: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu fibrilacije konkanavalina A pri pH 9. (A) FTIR spektri raztopine konkanavalina A, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 35 °C; moder pri 60 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 35 °C-15 °C; (C) 65 °C-35 °C in (D) 80 °C-65 °C. 83

Slika 5.5: Povečava diferenčnih spektrov, izračunanih iz spektrov, posnetih za raztopino konkanavalina A pri pH vrednosti 9. (Leva slika) Diferenčni spekter v ν_s COO^- spektralni regiji. (A) 35 °C-15 °C; (B) 60 °C-35 °C; (C) 75 °C-60 °C in (D) 75 °C-15 °C. (Desna slika) Diferenčni spektri v amidni III regiji: (A) 35 °C-15 °C; (B) 60 °C-35 °C; (C) 75 °C-60 °C in (D) 75 °C-15 °C. 84

Slika 5.6: Odvisnost intenzitete diferenčnega traku pri 1625 cm^{-1} od temperature za konkanavalin A, raztopljenega v 0,1 M raztopini fosfatnega pufra pri pH 5. T_m=65,4 °C. 84

Slika 5.7: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu fibrilacije konkanavalina A pri pH 5. (A) FTIR spektri raztopine konkanavalina A, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 35 °C; moder pri 60 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 50 °C-30 °C; (C) 65 °C-50 °C in (D) 80 °C-65 °C. 85

Slika 5.8: (A) Dekonvoliran spekter raztopine konkanavalina A pri 15 °C in pH 9. Parametra dekonvolucije sta γ=13,5 in glajenje 71 %. (B) Drugi odvod istega spektra. ..86

Slika 5.9: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri (A) KonA (pH 5) pri T=15 °C; (B) KonA (pH 5) pri T=75 °C; (C) KonA (pH 9) pri T=15 °C in (D) KonA (pH 9) pri T=75 °C. 88

Slika 5.10: Sprememba integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} kot funkcija časa. Spektri so bili posneti pri T=42 °C. 90

Slika 5.11: Aplikacija diferenčne spektroskopije na primeru spremljanja časovno odvisnih konformacijskih sprememb za primer fibrilacije konkanavalina A pri 42 °C. (A) FTIR spektri raztopine konkanavalina A, posneti ob različnih časih (črn pri 10 min; moder pri 165 min in rdeč pri 380 min). Spekter topila je odštet. (B) 85 min-110 min; (C) 165 min-110 min in (D) 380 min-165 min. 90

Slika 5.12: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri (A) KonA (pH 9) v lag fazi (t=10 min) in (B) KonA (pH 9) v stabilni fazi (t=380 min)....91

Slika 5.13: Rezultati transmisijske elektronske mikropskopije. (A) Spekter iz začetka (modra) in s konca (rdeča, 20 h) agregacijskega procesa v kislem okolju. (B) Amorfni agregati, ki nastanejo v termično gnanem procesu pri pH vrednosti 5 po 40 min od začetka iniciacije in (C) po 20 h od začetka iniciacije. Vidijo se posamezne monomerne enote, ki nimajo jasnih robov. (D) Spekter iz začetka (modra) in konca (rdeča, 20 h) agregacijskega procesa v bazičnem okolju. (E) Amiloidne fibrile, končni produkt agregacije konkanavalina A v bazičnem okolju (pH 9) po 40 min od začetka iniciacije in po 20 h od začetka iniciacije. Premer posamezne fibrile znaša približno 5 nm. 92

Slika 5.14: Sprememba integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} kot funkcija temperature. (A) pH 3, T_m=47 °C; (B) pH 5, T_m=54 °C; (C) pH 7,5, T_m=62 °C in (D) pH 9, T_m=62 °C. 94

Slika 5.15: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 3. (A) FTIR spektri raztopine stefina B, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 30 °C; moder pri 45 °C in rdeč pri 65 °C). Spekter topila je odštet. (B) 40 °C-30 °C; (C) 50 °C-40 °C in (D) 65 °C-50 °C. 95

Slika 5.16: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 5. (A) FTIR spektri raztopine stefina B, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 30 °C, moder pri 55 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 40 °C-20 °C; (C) 60 °C-50 °C in (D) 75 °C-60 °C. 96

Slika 5.17: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 7,5. (A) FTIR spektri raztopine stefina B, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 35 °C; moder pri 60 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 45 °C-30 °C; (C) 65 °C-50 °C in (D) 80 °C-65 °C. 97

Slika 5.18: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 9. (A) FTIR spektri raztopine stefina B posneti pri različnih temperaturah (črn pri 30 °C; moder pri 45 °C in rdeč pri 65 °C). Spekter topila je odštet. (B) 40 °C-30 °C; (C) 50 °C-40 °C in (D) 65 °C-50 °C. 98

Slika 5.19: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri: (A) stefinu B (pH 3) pri T=35 °C; (B) stefin B (pH 3) pri T=70 °C; (C) stefin B (pH 5) pri T=25 °C in (D) stefin B (pH 5) pri T=75 °C..... 99

Slika 5.20: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri: (A) stefinu B (pH 7,5) pri T=35 °C; (B) stefin B (pH 7,5) pri T=75 °C; (C) stefin B (pH 9) pri T=30 °C in (D) stefin B (pH 9) pri T=75 °C..... 100

Slika 5.21: Predlagani model tvorbe amiloidnih fibril stefina B, ki je bil pripravljen na podlagi rezultatov, pridobljenih s FTIR spektroskopijo. Nativno stanje smo predstavili s štirimi β-trakovi, ki se združujejo v eno β-ravnino in eno α-vijačnico. Tak motiv sekundarnega zvitja poimenujemo tudi »hot-dog« motiv. Natančnejša predstavitev sekundarnega zvitja stefina B se nahaja v Dodatku 6. Intermediati so delno razvite sekundarne strukture, v katerih prihaja do delne porušitve α-vijačnih sekundarnih struktur in prekinitev H-vezi med molekulskimi skupinami glavnih verig. V zadnji stopnji

smo z rdečo barvo predstavili β-trakove, ki v procesu amiloidne fibrilacije tvorijo prečne β-strukture. 101

Slika 5.22: Slike amiloidnih agregatov stefina B po 96 h od iniciacije agregacijskega procesa. Stefin B, raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru pri pH 5, smo pri 50 °C inkubirali 96 h. 101

Tabele

Tabela 1.1: Pregled možnih nihanj. 11

Tabela 1.2: Določitev modelnih trakov za amidno I, amidno II in amidno III regijo [20]. 11

Tabela 3.1: Predstavitev velikosti torzijskih kotov Φ in Ψ za običajne sekundarne strukture. 19

Tabela 3.2: Frekvence, integralna intenzitata in porazdelitev konformacij Ala dipeptida v Ar in Xe matriki. 26

Tabela 3.3: Frekvence, integralna intenzitata in porazdelitev konformacij Ala_2 peptida v argonski matriki. 29

Tabela 3.4: Frekvence, integralna intenzitata in porazdelitev konformacij Ala_3 peptida v argonski matriki. 31

Tabela 4.1: Pregled deležev sekundarnih elementov v nativni strukturi modelnih proteinov: kimotripsinogena [158], konkanavalina A [157], pepsina [160] in stefina B [167]. Ramachandranovi diagrami so predstavljeni v Dodatku 3. 40

Tabela 4.2: Seznam opreme s pripadajočimi modelnimi oznakami in proizvajalci. 41

Tabela 4.3: Valovna števila modelnih trakov v amidni I in amidni III regiji spektra konkanavalina A, ki smo jih pridobili iz dekonvoliranega spektra, drugega odvoda in metode samousklajevanja trakov. 46

Tabela 4.4: Izračunana porazdelitev sekundarnih struktur v konkanavalinu A na primeru posušenega, polno hidratiranega proteinskega filma, kot tudi konkanavalina A v vodni raztopini. Populacije posameznih konformer so izračunane na podlagi integralnih intenzitet pripadajočih modelnih trakov. 47

Tabela 4.5: Izračunane debeline hidratiranih proteinskih filmov in pripadajoča razmerja med molekulami vode v mikronski vodi in eno polipeptidno verigo. 57

Tabela 4.6: Število molekul vode, ki so vezane na molekulo modelnega proteina ob določeni relativni vlažnosti. Podatki, pridobljeni s FTIR spektroskopijo (razen za Kon A-gravi., kjer smo podatke pridobili z gravimetrijo). 60

Tabela 4.7: Pregled izračuna celokupnega števila atomov in aminokislinskih ostankov v sami strukturi in na površini nativnega modelnega proteina. Površina nativnih modelnih proteinov, ki je dostopna vodnim molekulam, in prosta energija solvatacije med proteinskim zvitjem [182]. 61

Tabela 4.8: Relativne vrednosti, ki opredeljujejo razmerje med številom vezanih molekul vode in razpoložljivimi atomi ter aminokislinskimi ostanki na površini določenega proteinskega zvitja, kot tudi razmerje med številom vezanih molekul vode in celokupno površino 3D proteinskega zvitja. 62

Tabela 5.1: Napačno zviti proteini se v celici nenehno razgrajujejo s proteolitskimi sistemi [185]. 70

Tabela 5.2: Lega modelnih trakov, izračunana z dekonvolucijo in drugim odvodom spektra raztopine konkanavalina A, posnetega pri pH 9 in temperaturi 15 °C. 87

Tabela 5.3: Povzetek konformacijskih sprememb v amidnem I in amidnem III področju, ki smo jih določili z metodo dekompozicije spektralnih trakov. Konformacijske spremembe so posledica termično odvisne agregacije konkanavalina A pri pH 5 in 9..... 89

Tabela 5.4: Povzetek konformacijskih sprememb časovno odvisnega procesa amiloidne agregacije konkanavalina A v amidnem I in amidnem III področju. 92

Tabela 5.5: Povzetek konformacijskih sprememb v amidnem I in amidnem III področju, ki smo jih določili z metodo dekompozicije spektralnih trakov. Konformacijske spremembe so posledica termično odvisne agregacije stefina B pri pH 3 in 5. 99

Tabela 5.6: Povzetek konformacijskih sprememb v amidnem I in amidnem III področju, ki smo jih določili z metodo dekompozicije modelnih trakov. Konformacijske spremembe so posledica termično odvisne agregacije stefina B pri pH 7,5 in 9. 100

Kratice

3D	...	Tridimenzionalno, tridimenzionalen, tridimenzionalnega
Ac-Ala-Ala-Ala-NHMe	...	Alanin (Ala_3) peptid
Ac-Ala-Ala-NHMe	...	Alanin (Ala_2) peptid
Ac-Ala-NHMe	...	Alanin (Ala) dipeptid
AFM	...	Mikroskopija na atomsko silo (angl. Atomic force microscopy, AFM)
AK	...	Aminokislina
Ala	...	Alanin
Asp	...	Asparaginska kislina
ATR	...	Tehnika IR spektroskopije, ki jo imenujemo metoda oslabljenega popolnega odboja (angl. Attenuated total reflectance)
BSA	...	Goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
C, Cys	...	Enočrkovna in tričrkovna oznaka aminokisline cistein
CCl_4	...	Kloroform
CD	...	Cirkularni dikroizem (angl. Circular dichroism, CD)
CsI	...	Cezijev jodid
DLS	...	Metoda dinamičnega sipanja svetlobe (angl. Dynamic light scattering method)
DNK	...	Deoksiribonukleinska kislina
DP	...	Diseminirani plazmocitom
DTGS	...	Tip detektorja IR svetlobe (angl. deuterated triglycine sulphate)
E. Coli	...	*Escherichia coli*, gram negativna bakterija iz rodu *Escherichia*
EPM1	...	Progresivna mioklonska epilepsija tipa 1 (angl. Progressive myoclonic epilepsy type one)
ELT	...	Teorija energijskih pokrajin (angl. Energy landscape theory)
FTIR	...	Fourier-transform infrardeča spektroskopija
Ge	...	Germanij, kemijski element
Glu	...	Glutaminska kislina

HCl	...	Vodikov klorid
HSE	...	Človeški serumski albumin (angl. Human Serum Albumin)
Hsps	...	Proteini toplotnega šoka (angl. heat shock proteins)
H-vez	...	Vodikova vez
INP proteini	...	Intrinzično neurejeni proteini (angl. intrinsically disordered proteins, IDPs)
IR	...	Infrardeče (angl. infrared)
K_2HPO_4	...	Dikalijev hidrogen fosfat
KBr	...	Kalijev bromid, IR neaktiven material
KH_2PO_4	...	Kalijev dihidrogen fosfat
Kon A	...	Konkanavalin A (angl. Concanavalin A)
NaCl	...	Natrijev klorid
NMR	...	Jedrska magnetna resonanca (angl. Nuclear magnetic resonance, NMR)
PP_{II}	...	Poliprolin II vijačnica (angl. polyprioline II helix)
rpm	...	Obrati na minuto (angl. revolutions per minute, rpm)
SEC	...	Kromatografija z ločevanjem po velikosti (angl. Size exclusion chromatography)
TEM	...	Transmisijski elektronski mikroskop, tudi transmisijska elektronska mikroskopija (angl. transmission electron microscopy)
TFE	...	2,2,2-trifluoroetanol (angl. Trifluoroethanol, TFE)
ThT	...	Tioflavin T, fluorescenčno barvilo, ki se uporablja pri spremljanju tvorbe amiloidnih fibril
TTR	...	Prenešalni protein v cerebrospinalni tekočini (angl. Transthyretin)
ZnSe	...	Cink-selen, material, ki ne absorbira IR svetlobe in ni topen v vodi
α-vijačnica	...	Alfa vijačnica (angl. alpha helix)
α-zavoj	...	Alfa zavoj (angl. alpha turn)
β-ravnina	...	Beta ravnina (angl. beta sheet)
β-trak	...	Beta trak (angl. beta strand)
β-zavoj	...	Beta zavoj (angl. beta turn)
γ-zavoj	...	Gama zavoj (angl. gamma turn)

Simboli

°C	...	Stopinja Celzija, enota za temperaturo, ki jo je vpeljal švedski astronom Andreas Celsius (1701 – 1744)
Å	...	Ångström, dolžinska enota (10^{-10} m)
cm^{-1}	...	Enota za valovno število. Valovno število predstavlja recipročno vrednost valovni dolžini.
D	...	Debye; 1 D ≈ $3{,}34 \cdot 10^{-30}$ Cm ≈ 0,21 eÅ
Da	...	Dalton, enota za maso, s katero izražamo atomske in molekulske mase. Opredeljena je kot $^1/_{12}$ mase nevezanega atoma C_{12} v mirovanju in v svojem osnovnem stanju
h	...	Planckova konstanta, ki znaša $6{,}63 \times 10^{-34}$ Js
K	...	Stopinja Kelvina
k_g	...	Ugodno ravnotežje v nukleacijsko odvisnem mehanizmu tvorbe fibril, ki vodi v tvorbo odraslih amiloidnih struktur
K_n	...	Ravnotežje med neugodnimi proteinskimi združki v nukleacijsko odvisnem mehanizmu tvorbe fibril
M	...	Molarnost, merilo koncentracije topljenca v določenem volumnu raztopine (mol/l)
M_r	...	Molekulska masa (g/mol oz. Da)
nm	...	Nanometer, enaka eni miljardinki metra, tj. 10^{-9} m
n_w	...	Število molekul vode na molekulo proteina
T_f	...	Temperatura zvijanja
T_g	...	Temperatura steklastega prehoda (angl. glass transition)
T_m	...	Temperatura prehoda (angl. melting point)
w/v	...	Razmerje med maso topljenca in volumnom topila v odstotkih (angl. weight/volume percentage)
α	...	Alfa
α_R	...	Alfa konformacija v majhnih peptidnih sistemih (brez H-vezi)
β	...	Beta
β_R	...	Beta konformacija v majhnih peptidnih sistemih (brez H-vezi)
γ	...	Gama (γ-zavoj, element sekundarne strukture)
γ	...	Parameter dekonvolucije
ΔG	...	prosta Gibbsova energija (kcal/mol oz. kJ/mol)
Φ	...	Psi
Ψ	...	Fi
ω	...	Omega

xxx

Slovar

2,2,2-trifluoroetanol	...	2,2,2-trifluoroethanol, TFE
Alfa vijačnica	...	angl. alpha helix
Alfa zavoj	...	angl. alpha turn
Amiotrofična lateralna skleroza, ALS	...	angl. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
Beta izboklina	...	angl. beta bulge
Beta ravnina	...	angl. beta sheet
Beta sodček	...	angl. beta barrel
Beta trak	...	angl. beta strand
Beta zavoj		angl. beta turn
Cirkularni dikroizem	...	angl. Circular dichroism, CD
Čista voda	...	angl. bulk water
Človeški serumski albumin	...	angl. Human Serum Albumin, HSE
Deformacijsko nihanje	...	angl. bending
Delilnik žarka		angl. beamsplitter
Delno razrahljan klobčič	...	angl. pre-molten globule
Devteriran triglicin sulfat, DTGS		angl. deuterated triglycine sulphate
Diseminirani plazmocitom, DP	...	angl. Disseminated plasmacytoma
Fourier-transform infrardeča spektroskopija	...	angl. Fourier-transform infrared spectroscopy
Gama zavoj	...	angl. gamma turn
Goveji serumski albumin	...	angl. Bovine Serum Albumin, BSA
Hipoteza izoliranega para	...	angl. isolated pair hypothesis
Hot dog zvitje, predstavlja zvitje proteina, kjer beta trakovi obdajajo alfa vijačnico	...	angl. Hot dog fold
Infrardeča spektroskopija matrično izoliranih molekul	...	angl. FT-IR matrix-isolation
Infrardeče	...	angl. infrared
Intrinzično neurejeni proteini	...	angl. intrinsically disordered proteins, IDPs
Jedrska magnetna resonanca	...	angl. Nuclear magnetic

		resonance, NMR
Kimotripsinogen A	...	angl. Chymotrypsinogen A
Kolebno nihanje	...	angl. wagging
Komponenta človeškega serumskega amiloida P	...	angl. Human serum amyloid P component
Kongo rdeče (barvilo)	...	angl. Congo red
Konkanavalin A	...	angl. Concanavalin A, Con A
Kromatografija z ločevanjem po velikosti	...	angl. Size exclusion chromatography, SEC
Lijak zvijanja	...	angl. folding tunnel
Linearno, koloidnim strukturam podobno sestavljanje sferičnih oligomerov	...	angl. linear, colloid-like assembly of spherical oligomers
Menjava domen	...	angl. domain swapping
Metoda dinamičnega sipanja svetlobe	...	angl. Dynamic light scattering method, DLS
Metoda oslabljenega popolnega odboja	...	angl. Attenuated total reflectance
Mikroskopija na atomsko silo	...	angl. Atomic force microscopy, AFM
Model difuzije in trka	...	angl. Diffusion-collision model
Nalaganje proteinov	...	angl. protein stacking
Nalaganje β-ravnin	...	angl. beta sheet packing
Notranje spreminjajoč		angl. interconverting
Obrati na minuto	...	angl. revolutions per minute, rpm
Obrnjen zavoj		angl. inverse turn
Odmaknjen (odmaknjene molekulske skupine)	...	angl. displaced
Peplikacijski (podvojevalni) proces	...	angl. replication process
Pepsin	...	angl. Pepsin
Ploščati trakovi	...	angl. flat ribbons
Podstruktura (npr. Oligomerna podstruktura)	...	angl. subpopulation
Poliprolin II vijačnica	...	angl. polyprioline II helix
Prečna beta struktura	...	angl. cross β-structure
Predor zvitja	...	angl. folding funnel
Premostitvene regije	...	angl. bridge regions
Premoščen	...	angl. bridged
Proteini toplotnega šoka	...	angl. heat shock proteins
Stefin B	...	angl. Stefin B
Steklasti prehod	...	angl. glass transition
Sterične zadrge	...	angl. steric zippers
Stranska pot (agregacije)	...	angl. off-pathway aggregation
Strižno nihanje	...	angl. scissoring
Šabloniranje in nukleacija	...	angl. templating and nucleation
Temperatura prehoda	...	angl. melting point

Teorija energijskih pokrajin	...	angl. Energy landscape theory, ELT
Tioflavin T (fluorescenčno barvilo)	...	angl. Thioflavin T, ThT
Transmisijska elektronska mikroskopija	...	angl. Transmission electron microscopy, TEM
Vse beta protein	...	angl. all beta protein
Vzdolžno valenčno nihanje	...	angl. stretching
Nagnjene (nagnjene molekulske skupine)	...	angl. tilted
Zibno nihanje	...	angl. rocking
Zvijanje	...	angl. twisting
α-kristalin	...	angl. α-Crystallin
π-vezan	...	angl. π-conjugated

Poglavje 1

Uvod

V času, ko se je genomika uveljavila kot standardno orodje v raziskovalnih ustanovah širom sveta, je hitra in učinkovita karakterizacija proteinske strukture eden glavnih izzivov. Glavni orodji pri določevanju proteinskih tridimenzionalnih (3D) struktur sta rentgenska kristalografija in jedrska magnetna resonanca (NMR). Obe tehniki imata svoje prednosti in slabosti. Ker nista uporabni za preučevanje vseh proteinskih struktur, se odpirajo vrata preostalim tehnikam, ki bi lahko pomembno dopolnjevale proteomske raziskave. Ena izmed takšnih metod je infrardeča spektroskopija na Fourierovo transformacijo (FTIR spektroskopija), ki je pridobila na prepoznavnosti, ker omogoča hitre in enostavne meritve na majhnih količinah vzorcev v vseh agregatnih stanjih in v različnih okoljih. Kljub opisanim prednostim potrebuje FTIR spektroskopija učinkovit napredek v interpretaciji proteinskih FTIR spektrov in razvoju metod, ki bi na podlagi FTIR spektrov uspešneje opisale proteinsko sekundarno strukturo, vključno s strukturo nestrukturiranih delov. Čeprav strukturna resolucija FTIR spektroskopije ne dosega atomske, je njena glavna prednost delo v različnih okoljih. Ta lastnost FTIR spektroskopijo izpostavlja kot eno redkih metod, ki je zmožna preučevati vpliv okolja na konformacijo proteinskih molekul.

Peptidi in proteini so biološke makromolekule, ki predstavljajo pomembne funkcionalne komponente vsake žive celice. Proteine sestavlja 20 različnih aminokislin (Dodatek 2), ki se med seboj kovalentno povezujejo v peptidne verige. Primarno aminokislinsko (AK) zaporedje v polipeptidni verigi po Anfinsenovi teoriji določa nativno, tridimenzionalno zvitje proteina [1]. Pravilno zvitje proteinske molekule je osnovni pogoj za njeno normalno delovanje. Kljub temu da je razumevanje proteinskega zvitja precej napredovalo, danes še vedno ne moremo dovolj zanesljivo napovedati nativne strukture na podlagi primarnega zaporedja. Vpliva in fizikalnega pomena sil in interakcij, ki sodelujejo pri proteinskem zvitju, še vedno ne razumemo zadovoljivo.

Razumevanje zgodnjih procesov in interakcij v mehanizmih proteinskega zvitja in agregacije nam bi omogočilo boljši vpogled v vzroke patoloških stanj, ki jih povezujemo z napakami v proteinskem zvitju in agregaciji. Agregacija je skupna lastnost denaturiranih proteinov. Z njeno pomočjo se hidrofobni deli, ki se v nativno zvitem proteinu nahajajo v notranjosti, zaščitijo pred energetsko neugodnim vplivom topila. Podobno agregirajo tudi proteini v primeru, ko število nepravilno zvitih proteinov preseže zmožnost celice po njihovi razgradnji [2-4].

Glavne gonilne sile, ki poganjajo proces zvitja proteinov, so hidrofobne [5, 6], elektrostatske [7-9] in Van der Waalsove interakcije [10, 11] ter vodikove vezi (H-vezi) [12, 13] in solvatacija [14]. V zvitem proteinu vsak aminokislinski ostanek zavzame značilen par dihedralnih kotov Ψ in Φ (Slika 3.2 A). Ta dva kota orientirata peptidne vezi v prostoru. Aminokislinski ostanki v enaki sekundarni strukturi imajo enake

dihedralne kote. Shematično aminokisline z definiranimi koti Ψ in Φ predstavimo v Ramachandrovem diagramu (Slika 3.2 B) [15].

Polipeptidna veriga je v določeni sekundarni strukturi stabilizirana s H-vezmi, ki se lahko vzpostavijo med NH in CO skupino peptidne verige oz. med molekulami topila in glavno verigo proteinske molekule. Najznačilnejša elementa sekundarne strukture sta alfa vijačnica (α-vijačnica) in beta ravnina (β-ravnina). Alfa vijačnica, ki je najpogosteje zastopan sekundarni element, je stabilizirana s H-vezmi med amidnim protonom aminokislinskega ostanka i in karbonilnim kisikom ostanka i+4. Beta ravnine so stabilizirane s H-vezmi med sosednjimi β-trakovi. Glede na smer poteka sosednjih peptidnih verig so β-ravnine paralelne oz. antiparalelne. Poleg omenjenih sekundarnih elementov v nativno zvitem proteinu najdemo tudi poliprolin II (PP_{II}) vijačnice, gama zavoje (γ-zavoje) in zanke. Slednji dve strukturi, za razliko od ostalih, spadata med neurejene sekundarne elemente [16, 17]. Za stabilno nativno obliko proteinske molekule so pomembne tako intramolekularne interakcije, prisotne v α-vijačnicah in β-ravninah, kot tudi intermolekularne interakcije, ki se nahajajo v PP_{II} vijačnih sekundarnih strukturah [18-20].

Nepravilno zvitje proteina skoraj vedno vodi do njegove agregacije. Mnogokrat takšni agregati zavzamejo pravilno urejeno β-strukturo, imenovano prečna β-struktura (angl. cross β-structure), ki se vije pravokotno na os amiloidnega vlakna (fibrila). Tovrstna agregacija proteinov je vzrok za številna patološka stanja v človeškem telesu, kar vodi k različnim obolenjem, kot so Alzheimerjeva in Huntingtonova bolezen, diabetes tipa 2, Parkinsonova bolezen ter številna druga, ki jih s skupnim imenom imenujemo amiloidoze [21, 22]. Vse omenjene bolezni so karakterizirane na podlagi amorfnih ali fibrilarnih zunajceličnih oz. znotrajceličnih depozitov, ki jih najdemo v različnih tkivih in imajo specifične lastnosti. Toksičnost se vse bolj pripisuje manjšim znotrajceličnim agregatom, kot so protofibrile in oligomerne strukture [23-25].

Navkljub številnim intenzivnim raziskavam sam mehanizem in vzroki tvorbe amiloidnih agregatov ostajajo slabo razumljeni. Trenutno razumevanje predpostavlja napačno zvite oz. razvite proteine kot prekurzorje iniciacije procesa fibrilacije. Napačno zvitje proteina je lahko posledica določenih mutacij, nenormalnih interakcij s kovinskimi ioni, fizioloških sprememb v mediju (pH, temperatura), oksidacije in proteolize [26-28].

Proteini in peptidi, ki tvorijo amiloidne agregate in jih povezujemo z amiloidozami, nimajo podobnih nativnih oblik, nimajo podobnega aminokislinskega zaporedja in niso enako veliki. Kljub temu pa vsi tvorijo amiloidne fibrile, ki imajo skupne lastnosti: dolga in razmeroma ravna morfologija, difrakcijski vzorec prečne β-strukture, specifična obarvanost z barvili kongo rdeče (angl. Congo red) in tioflavin T (angl. Thioflavin T, ThT) imajo podobne vezavne lastnosti in rigidno strukturo jedra. Tvorba amiloidnih fibril izzove strukturno prerazporeditev nativnega proteina v konformacijo z velikim deležem β-ravnin [29, 30]. Običajno so amiloidne fibrile široke 6 – 12 nm in sestavljene iz 2 – 6 protofilamentov, razporejenih v vijačno strukturo [31]. *In vitro* se lahko fibrile tvorijo iz proteinov, ki jih povezujemo z določenimi patološkimi stanji, kot tudi iz proteinov, ki jih ne povezujemo z nobeno znano boleznijo. Zmožnost tvorbe amiloidnih fibril, pod določenimi pogoji, naj bi bila osnovna lastnost vsake polipeptidne verige [32-34].

Tvorba amiloidnih fibril ne poteka neposredno iz nativne proteinske molekule, temveč preko nekakšnega delno zvitega intermediata [35]. Prvi korak v procesu tvorbe amiloidnih fibril so konformacijske spremembe v nativni strukturi. Te spremembe v nativnem zvitju omogočijo specifične intermolekularne interakcije (elektrostatske in hidrofobne interakcije, H-vezi), ki so potrebne za proces oligomerizacije in fibrilacije [36, 37]. Proces fibrilacije poizkušajo razložiti različni modeli, kot npr. model nukleacije, koloidom podobno združevanje sferičnih oligomer in zamenjava domen [38]. Z nukleacijskim modelom lahko

opišemo eksperimentalno opaženo kinetiko tvorbe amiloidnih fibril. Nukleacijski proces tvorbe fibril vključuje tri faze: lag fazo oz. fazo počasne nukleacije, fazo rasti in stacionarno fazo (Slika 5.2) [39, 40]. Kljub temu da ta model lahko opiše splošen proces tvorbe amiloidnih fibril, z njim ne moremo razumeti omenjenega procesa na molekularnem nivoju.

Znano je, da sta struktura in dinamika proteinov odvisni od stopnje hidratacije, torej od lastnosti in števila molekul vode, ki tvorijo prvi hidratacijski sloj. Stopnja hidratacije določa funkcije in lastnosti proteina. Številni procesi, kot so stabilnost strukture [41, 42], nalaganje proteinov (angl. protein stacking) [43], dinamika proteinov [44, 45], vezava ligandov [46], selektivnost interakcij [47] in katalitične lastnosti [48, 49], so v veliki meri odvisne od interakcije med proteinom in molekulami vode. Metode, kot so sipanje rentgenske svetlobe [14] in nevtronov [50], NMR [51, 52], infrardeča (IR) [53-59] in dielektrična [60] spektroskopija ter molekularne simulacije [45], so pomembno prispevale k razumevanju procesa hidratacije. Pomembno je tudi dejstvo, da lahko s postopno hidratacijo suhega proteina spremljamo majhne konformacijske spremembe proteina [59]. Prav to slednje smo uporabili pri testiranju občutljivosti kazalčnih nihanj proteina (nihanja v amidni I, amidni II, amidni III regiji ter nihanja karboksilnih ionov) v odvisnosti od vrste prevladujoče sekundarne strukture. Hidratacijske meritve govejega serumskega albumina (angl. Bovine serum albumin, BSA) [41, 59] so pokazale, da lahko z IR spektroskopijo in postopno hidratacijo določimo ne le mesta vezave hidratacijske vode, temveč tudi način njene vezave in njen vpliv na strukturo proteina.

Pri spremljanju konformacijskih sprememb, tako pri hidrataciji kot tvorbi agregatov, smo uporabili podoben pristop kot pri določevanju preferenčnih konformacij na nivoju dipeptidov (N-acetil-aminokislina-N'-metilamid). Izkazalo se je, da preferenčne konformacije obstajajo že na nivoju posameznega aminokislinskega ostanka [61, 62]. Tako je nastala hipoteza, da lokalna urejenost v nezvitem proteinu vodi polipeptidno verigo iz denaturinanega stanja v nativno konformacijo. Lokalna struktura v nezvitem proteinu je v povezavi s konformacijskimi preferencami ogrodja, efektom najbližjega soseda, kooperativne tvorbe večjih odsekov β-trakov in α-vijačnic ter hidrofobnimi klastri [63]. Ti kazalci se razlikujejo po stopnji kooperativnosti, torej s številom vključenih sosednjih aminokislinskih ostankov. Razlaga fizikalnega ozadja ni enotna. Hipoteza, razvita v našem laboratoriju, predvideva, da je glavni razlog za obstoj preferenčnih struktur peptidov in proteinov v lokalnih elektrostatskih interakcijah med glavno verigo in dipolom vode [7]. Razlike v porazdelitvi konformacij posameznih aminokislinskih ostankov so v senčenju te interakcije s stranskimi verigami. Aminokisline v homopeptidih imajo strukturne lastnosti, podobne aminokislinskim ostankom v nestrukturiranih delih proteinov. To dejstvo in odsotnost sosedov je razlog, zakaj so kratki homopeptidi uporabni kot modelne molekule.

1.1 Struktura in zvitje proteinov

Vsaka živa celica preko številnih procesov, ki potekajo v njej, aktivno sodeluje pri vzdrževanju homeostaze. Biološke molekule, ki v večini primerov sodelujejo v teh procesih, se imenujejo proteini. Njihovo 3D zvitje jim določa specifične lastnosti in s tem funkcijo v biološkem sistemu. Šele potem ko se peptidna veriga zvije v končno 3D obliko oz. takoimenovano nativno obliko, protein pridobi svojo aktivno vlogo in se je tako zmožen vezati na drugo proteinsko molekulo, ostale majhne organske molekule, nukleinske kisline itd. Kako se proteinske molekule v procesu proteinskega zvitja zvijejo v nativno strukturo, je eno izmed ključnih sodobnih vprašanj na raziskovalnem področju biologije, fizike, kemije in v zadnjem obdobju vedno bolj tudi na področju računalniških znanosti.

Proces proteinskega zvitja je kompleksen in zahteven proces, ki ne vodi vedno do nativne, polno funkcionalne oblike. Takšne, nepravilno zvite strukture, ki nastanejo v procesu napačnega proteinskega zvitja, in njihovi agregati, so znan vzrok številnim boleznim, med katerimi so najbolj poznane Alzheimerjeva, Parkinsonova in Huntingtonova bolezen [64, 65].

Podrobno razumevanje fizikalnih in kemijskih principov, ki ženejo proces (napačnega) proteinskega zvitja, je nujno za poglobljen vpogled v molekularni nivo omenjenih bolezni. Tako pridobljeno znanje ne bo koristilo le razumevanju procesov samih, temveč bo omogočilo razvoj sintetiziranih proteinov s terapevtsko ali encimatsko aktivnostjo [66, 67].

Pionir raziskovanja proteinskega zvitja, Christian Anfinsen, je v zgodnjih šestdesetih letih dvajsetega stoletja skupaj s sodelavci pokazal, da se informacija, ki je potrebna za zvitje proteinske molekule v nativno obliko, skriva v zaporedju aminokislin, ki to verigo sestavljajo [68]. Če torej poznamo aminokislinsko zaporedje, ki skriva celotno informacijo o nativni obliki proteinske molekule, ali ne bi morali potem na podlagi primarne strukture določiti končno, funkcionalno strukturo proteina? To je bilo logično vprašanje, ki so si ga zastavili številni raziskovalci po Anfinsenovem odkritju.

Danes vemo, da Anfinsenova hipoteza v popolnosti ne opiše vseh proteinskih struktur. Številne proteinske molekule v raztopinah ne zavzamejo stabilne sekundarne in/ali terciarne strukture, temveč se izrazijo kot dinamični skupki notranje spreminjajočih (angl. interconverting) se struktur. Takšne proteine splošno poimenujemo kot intrinzično neurejeni protein, INP (angl. intrinsically disordered proteins, IDPs). Tako kot nativno zviti proteini so tudi intrinzično neurejeni proteini zmožni tvoriti (amiloidne) agregate [69].

1.1.1 Levinthalov paradoks in klasični pogled na proces proteinskega zvitja

Na podlagi ugotovitev Christiana Anfinsena je Cyrus Levinthal začel raziskovati napovedovanje nativne strukture na osnovi primarnega aminokislinskega zaporedja. Levinthal je ob predpostavki, da je proces proteinskega zvitja dvostopenjska reakcija in ne vključuje intermediatov, poizkušal oceniti potreben čas za zvitje proteinske molekule iz razvite polipeptidne verige do njene nativne oblike. Izračun je temeljil na oceni časa, ki je potreben za naključno iskanje vseh možnih konformacij. Takšno naključno iskanje najugodnejše konformacije bi po Levinthalovih izračunih trajalo dlje časa, kot obstaja vesolje samo. Ta izračun, objavljen leta 1968 [70, 71], je postal znan kot Levinthalov

paradoks. Odprl je nov, t. i. klasičen pogled na problem proteinskega zvitja [70]. Ta pogled zagovarja kinetično gnan proces, kjer se proteinska veriga zvije v seriji zaporednih korakov, ki vodijo v nativno zvit protein z minimalno prosto Gibbsovo energijo, $_{\Delta}G$.

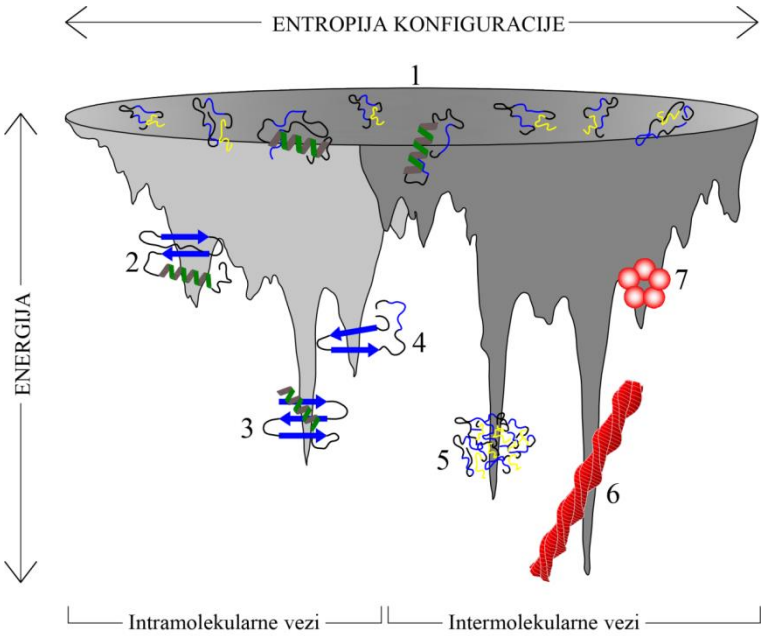
Kasneje so številni raziskovalci z različnimi modeli poizkušali razložiti proces proteinskega zvitja. Z izjemo t. i. modela difuzije in trka (angl. Diffusion-collision model) [72, 73], ki korelira čas zvitja z nekaterimi sistemskimi parametri, noben od teh modelov v popolnosti ne upošteva faktorja kinetike v procesu zvitja. Najpomembnejši preboj v razumevanju proteinskega zvitja po Levinthalovem paradoksu je bil narejen v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja s formulacijo Teorije energijskih pokrajin (angl. Energy landscape theory, ELT).

1.1.2 Nov pogled na proces proteinskega zvitja: energijske pokrajine in lijak zvijanja

Teorija energijskih pokrajin opisuje proces zvitja na energijski pokrajini, ki spominja na obliko lijaka. Na takšni površini lahko nezvita veriga v procesu proteinskega zvitja zavzame različne poti, ki vodijo do končne, nativne proteinske strukture [74]. Omenjena teorija temelji na predpostavki, da so energijske prepreke, ki ločujejo nezvito in nativno obliko, zanemarljive. Eksperimentalno overjene predpostavke [75-78] so potrdile teoretično ozadje Teorije energijskih pokrajin, v okviru katere bi lahko razumeli proces proteinskega zvitja.

Katere so glavne sile, ki v poteku proteinskega zvitja skrčijo izbor ustreznih konformacij, ostaja odprto vprašanje. Hidrofobne [5, 6] in elektrostatske interakcije [7-9], Van der Waalsove interakcije [10, 11], H-vezi [12] in solvatacija so prevladujoče gonilne sile [6]. Kakšen je prispevek posameznih gonilnih sil, ni povsem znano. Veliko argumentov favorizira H-vezi kot glavno gonilno silo zaradi dejstva, da so intramolekularne H-vezi energetsko ugodnejše od intermolekularnih H-vezi, ki se vzpostavijo med peptidno verigo in molekulami vode [79-81].

Kljub termodinamsko ugodni strukturi nativnega stanja to ne pomeni, da ne obstajajo strukture celo z nižjo prosto energijo [82, 83]. Že majhne spremembe v okolju lahko porušijo naravno stabilizirane kontakte znotraj peptidne verige, kar vodi do nepravilno zvitih molekul. Različni celični mehanizmi se trudijo popraviti te napake, vendar ko niso uspešni, se nepravilno zvite molekule združujejo v agregate. Gonilna sila agregacije nepravilno zvitih proteinov so lahko novonastale H-vezi oz. hidrofobni efekt, ki zaščiti hidrofobne dele makromolekul pred polarnim okoljem. Kadar agregati tvorijo zadostno urejene strukture in so zmožni vezati barvili kongo rdeče in tioflavin T, jih označimo kot amiloidne strukture [84]. Številni proteini, ki jih trenutno ne povezujemo z znanimi konformacijskimi boleznimi, lahko tvorijo amiloidne fibrile tako v pogojih *in vitro* kot *in vivo* [25, 85, 86]. Takšne proteine najdemo v raznovrstnih organizmih vključno s prokarionti, rastlinami, insekti in sesalci [87-90]. Kljub temu da si proteini, ki tvorijo amiloidne strukture v svojem nativnem stanju, ne delijo strukturnih podobnosti, v končnih amiloidnih strukturah zavzamejo podobne konformacijske lastnosti. Ta skupna lastnost je t. i. termodinamsko stabilna prečna β-struktura [91-93]. To spoznanje je vodilo do hipoteze, da zmožnost tvorbe amiloidnih fibril ni edinstvena lastnost le proteinov, ki jih povezujemo z degenerativnimi boleznimi. Danes se zmožnost tvorbe amiloidnih struktur šteje za generično lastnost vseh polipeptidnih molekul [32].



Slika 1.1: Shematska predstavitev energijskih pokrajin za procese proteinskega zvitja, proteinskega napačnega zvitja (angl. mis-folding) in agregacije napačno zvitih proteinskih molekul. Prosta energija posameznih konformacijskih stanj je predstavljena z globino posamezne globeli, širina globeli pa predstavlja konformacijsko entropijo posameznega stanja. Razgibanost energijske pokrajine ustreza intermediatom in drugim metastabilnim stanjem. (1) Nezvita stanja zavzamejo številne konformacije; (2) Intermediati v procesu proteinskega zvitja; (3) Nativno zvita polipeptidna veriga; (4) Napačno zviti intermediati in majhni oligomeri; (5) Amorfni agregati; (6) Amiloidne fibrile, ki lahko zavzamejo več izrazitih morfoloških stanj; (7) Toksični oligomeri in protofibrile.

Agregati zavzamejo stanja z nižjo prosto energijo ΔG kot nativno zvite proteinske molekule. Kaj je razlog, da termodinamsko ugodnejša, z β-strukturo bogata konformacija, ni preferenčna pod nativnimi pogoji? Hitrost zvitja v z β-ravninami bogate oligomerne strukture je za več redov velikosti počasnejša od hitrosti zvitja v nativne konformacije [94]. Za preprečitev prehoda med obema strukturama je med njima potrebna velika energijska pregrada, katere velik delež izvira iz delnega razvitja nativne strukture na poti do tvorbe z β-ravninami bogatih struktur [94-96].

1.2 Vodikove vezi v bioloških sistemih

1.2.1 Vodikova vez

Vodikova vez nastane med molekulsko skupino z vodikovim atomom (običajno O–H ali N–H) ter kisikovim ali dušikovim atomom na drugi (ali isti) molekulski skupini. Slednja dva atoma, akceptorja H-vezi, imata vsaj eno nevezno orbitalo z elektronskim parom, ki je usmerjena proti H-atomu polarne skupine. Akceptor H-vezi je lahko tudi oblak π-elektronov, kot ga najdemo pri aromatskih skupinah. Polarno skupino z vodikovim atomom imenujemo donor H-vezi [97].

Vodikova vez se lahko vzpostavi med dvema molekulama (intermolekularna H-vez) ali med molekulskimi skupinami znotraj ene molekule (intramolekularna H-vez). V splošnem

H-vez lahko tvori le vodikov atom, skupaj s svojima izotopoma, devterijem in tritijem, kar nakazuje, da je majhna velikost teh molekul pomembna za vzpostavitev H-vezi. Vse izotopske oblike vodikovega atoma imajo v molekuli enako elektronsko strukturo. Razdalja med obema kisikovima atomoma v H-vezi običajno znaša med 2,4 Å in 3 Å, odvisno od jakosti H-vezi. Entalpija, potrebna za vzpostavitev H-vezi, znaša med 10 kJ/mol za šibke in 70 kJ/mol za močne H-vezi. Te entalpijske vrednosti se nahajajo nekje med Van der Waalsovimi in kovalentnimi entalpijskimi vrednostmi. Za razliko od Van der Waalsovih interakcij pa so atomi, ki prispevajo k vzpostavitvi H-vezi, razporejeni na isti premici. Usmerjenost H-vezi spada med njene pomembnejše lastnosti [97].

Funkcionalne lastnosti H-vezi so nujno potrebne za življenjske procese. Zaradi svojih šibkih interakcij napram kovalentnim ali ionskim vezem se H-vezi lahko hitro vzpostavijo ali prekinejo. Energijske vrednosti, potrebne za vzpostavitev ali prekinitev H-vezi, so znotraj območja običajnih nihanj pri temperaturah, ki jih običajno srečamo v naravnih sistemih. Zaradi majhnih energijskih vrednosti, potrebnih za tvorbo H-vezi, lahko procesi, ki potrebujejo hitro intermolekularno prepoznavanje (angl. recognition) in reakcijo, potekajo hitro in enostavno. Močnejše interakcije z vezavnimi energijami, ki so višje od tistih pri H-vezeh, bi resno ovirale tok bioloških informacij in dogodkov.

1.2.2 Intermolekularna in intramolekularna vodikova vez

Večina H-vezi X–H $\cdot\cdot\cdot$ Y se tvori med dvema samostojnima molekulama X–H in Y. Takšne H-vezi, ki predstavljajo večino H-vezi, imenujemo intermolekularne H-vezi. Drugo skupino H-vezi, ki jih poimenujemo intramolekularne H-vezi, predstavljajo H-vezi, ki se tvorijo med deloma X–H in Y iste molekule.

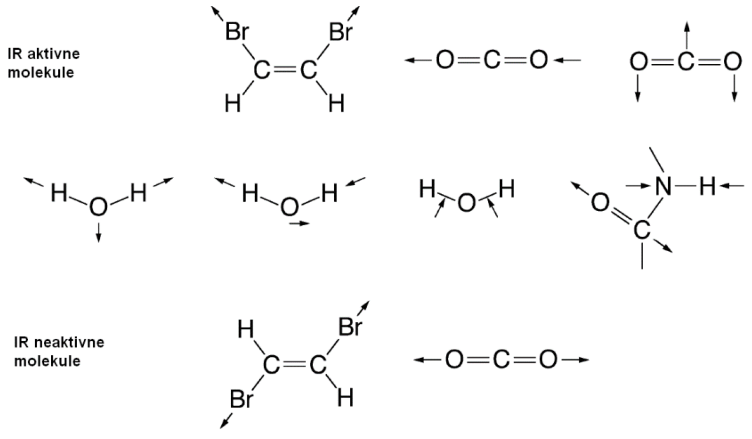
Oba tipa H-vezi se na makroskopskem nivoju izražata različno. Intramolekularna H-vez vključuje eno samo molekulo za razliko od intermolekularne H-vezi, ki na tak način združuje med seboj odvisni molekuli. Intermolekularne H-vezi predstavljajo relativno močne interakcije med molekulo in topilom, zaradi česar močno vplivajo na temperaturo izparevanja in izparilno toploto. To ne velja za primer intramolekularnih H-vezi, ki ne vplivajo na medmolekulske interakcije. Medmolekulske interakcije v primeru intramolekularnih H-vezi v večini primerov ostajajo Van der Waalsove interakcije.
Intramolekularne H-vezi, vzpostavljene med različnimi molekulskimi skupinami, stabilizirajo molekulsko strukturo. Intramolekularne H-vezi spadajo med najpomembnejše interakcije v majhnih in velikih bioloških molekulah, saj za svoj obstoj potrebujejo določeno molekulsko konformacijo. Ob svoji vzpostavitvi intramolekularne H-vezi k lastnosti makromolekule prispevajo dodatno rotacijsko stabilnost. Tako intramolekularne H-vezi določajo in definirajo 3D strukturo makromolekul in se vključujejo v njihove funkcionalne lastnosti. Te vezi so velikega pomena v globularnih proteinih, v katerih so vse H-vezi v sekundarnih elementih in terciarnih struktrurah intramolekularnega tipa [97].

1.3 Infrardeča spektroskopija

Infrardeča svetloba v srednjem IR območju ustreza elektromagnetnemu valovanju z valovnimi dolžinami (λ) med 2,5 in 25 µm (oz. valovnim številom (1/λ) med 4000 cm^{-1} in 400 cm^{-1}). Interakcijo elektromagnetnega valovanja z molekulami ali atomi poimenujemo tudi absorpcijski proces kjer je razlika v energiji med dvema stacionalrnima stanjema enaka energiji fotona (Enačba 1.1). Simbol h predstavlja Planckovo konstanto, simbol ν pa frekvenco fotona (s^{-1}), ki v primeru IR valovanja znaša 3×10^{13} s^{-1}. Energija fotonov v IR valovanju znaša 12 kJ/mol fotonov.

$$\Delta E_{\text{molekule}} = (h\nu)_{\text{fotona}} \qquad \text{Enačba 1.1}$$

Absorpcija IR svetlobe na molekulah povzroči spremembo vibracijskih stanj. Pogoj za IR aktivnost molekul je sprememba dipolnega momenta med absorpcijo fotonov IR svetlobe. Verjetnost absorpcije je odvisna od moči in polarizabilnosti kemijskih vezi, na katere pa vplivajo tako intra- kot tudi intermolekularne spremembe v strukturi in dinamiki absorbirajoče molekule. Atomi v molekuli nihajo na več načinov (Tabela 1.1). Število nihanj v posamezni molekuli lahko izračunamo po enačbi n=3N-6 v primeru nelinearnih molekul oz. po enačbi n=3N-5 pri linearnih molekulah, pri čemer je n število osnovnih nihanj, N pa predstavlja število atomov v molekuli. Približen položaj IR absorpcijskega signala lahko določimo s pomočjo reducirane mase atomov, ki sodelujejo v nihanju, tipa vezi (enojna, dvojna oz. trojna vez), natančnega položaja elektron donorskih in akceptorskih mest v intra- in intermolekularnem okolju ter z upoštevanjem vpliva (sklopitve) drugih vibracijskih skupin. Jakost absorpcije narašča z večanjem polarizabilnosti kemijskih vezi. Pri preiskovanju proteinov nam vpliv okolja na vibracijske skupine velikokrat pomaga razumeti zgradbo in delovanje proteina.



Slika 1.2: Primer IR aktivnih in IR neaktivnih molekul. Za IR aktivnost molekul je potrebna sprememba dipolnega momenta [98].

Vse polarne vezi prispevajo k absorpciji IR svetlobe. To dejstvo je hkrati slabost in moč IR spektroskopije. Slabost zato, ker je spekter večjih molekul sestavljen iz številnih prekrivajočih se signalov, kar pomeni, da je veliko informacij zakritih pod močnejšimi signali. Moč metode pa je v tem, da skoraj vse biomolekule absorbirajo IR svetlobo, zaradi česar ne potrebujejo posebnega označevanja, da bi jih lahko detektirali [98].

1.3.1 Podatki, pridobljeni z IR spektroskopijo

Vibracijske frekvence so odvisne od jakosti kemijske vezi in mas nihajočih atomov. Zaradi številnih prekrivajočih se vrhov iz IR spektrov težko enoznačno določimo strukturo proteinov. Lahko pa zaznamo spremembe v proteinski strukturi, kot so spremembe protoniranih mest na stranskih verigah. Protonacija stranskih verig je pomembna za funkcionalnost številnih proteinov. Poleg protonacije lahko spremljamo tudi spremembe v fosforilaciji proteinov [99, 100] ter spremembe, ki nastanejo med encimsko katalizirano reakcijo [101].

Na elektronsko gostoto vezi v molekuli vplivajo sosednje skupine znotraj molekule z induktivnim in resonančnim efektom. Slednji je vzrok, da amidne skupine absorbirajo pri nižjih valovnih dolžinah kot karbonilne skupine karboksilnih skupin [102].

Redoks reakcije so osnova energijskih procesov v živih organizmih. Te reakcije vplivajo na razporeditev elektronske gostote v molekuli, kar opazimo tudi na vibracijskih spektrih. Primer, v katerem lahko določimo strukturo z redoks stanji, je preučevanje bioloških kofaktorjev, ki sodelujejo pri procesu fotosinteze. Določitev signalov specifičnih molekulskih skupin kofaktorjev na proteinskem spektru nam pomaga razumeti proteinsko okolje, v katerem se lahko vežejo kofaktorji [103].

Vibracijska spektroskopija je zelo občutljiva na spremembe v jakosti vezi. Ker sta jakost in dolžina vezi neposredno povezani količini, lahko v procesu katalitske reakcije zaznamo spremembe v dolžini vezi, reda velikosti 1 pm. Kljub svoji preprostosti pa ima vibracijska spektroskopija tako veliko resolucijo, da lahko spremljamo spremembe v dolžini vezi 0,2 Å in manj. Takšne resolucije nima niti jederna magnetna resonanca [104].

Vibracije sosednjih skupin v molekuli so pogosto skupne, odvisne pa so od geometrije molekule. Skupne vibracije nam omogočajo vpogled v 3D strukturo molekule. Primer takšnih vibracij so C=O vibracije v COO^- skupini. Karboksilna skupina je absorpcijsko občutljiva v primeru kationske kelatacije (vezave ligandov na katione), zato lahko z njo preučujemo nekatere Ca^{2+} vezavne proteine [105, 106].

Vodikove vezi imajo pomembno vlogo pri stabilizaciji proteinske strukture. Vibracijska spektroskopija je ena izmed redkih metod, s katero lahko določimo jakost H-vezi. Vodikove vezi zmanjšajo frekvenco valenčnih nihanj ter povečajo frekvenco prečnih nihanj [102]. Zaradi vzpostavitve ene same H-vezi s C=O skupino metilacetata povzroči zmanjšanje frekvence signala C=O valenčnih nihanj za 20 cm^{-1} [107].

Za kvantitativno ocenjevanje premikov signalov, ki so posledica H-vezi, se uporablja Badger-Bauerjevo pravilo. Gre za linearno odvisnost med entalpijo vzpostavitve H-vezi, ΔH, in frekvenco valenčnih nihanj. Za karbonilno skupino metilacetata, ki predstavlja model za Asp in Glu sprememba 1 cm^{-1} ustreza spremembi vezavne entalpije 1,7 kJ/mol [108, 109].

Podobno kot H-vezi tudi električno polje spremeni elektronsko gostoto vibracijskih skupin. Pri karboksilnih skupinah, ki niso vezane s H-vezjo (trak nad 1740 cm^{-1}), opazimo obratno sorazmerno odvisnost med C=O valenčnim nihanjem in dielektrično konstanto ε [110].

Poleg položaja in intenzitete signala nam pomembne informacije sporoča tudi širina samega signala. Zaradi kratke časovne skale, reda velikosti 10^{-13} s, vibracijska spektroskopija ponuja vpogled v trenutno stanje konformer. Položaj signala za določeno vibracijo se običajno od konformere do konformere rahlo razlikuje, zaradi česar se širijo signali na spektru. Fleksibilne strukture bodo dale širše signale kot tiste bolj rigidne. S širino signalov lahko ocenimo entropijo in tako lahko spremljamo entropijske spremembe med procesom katalize [104].

1.3.2 Najpogostejši merilni tehniki vibracijske spektroskopije

1.3.2.1 Transmisija

Transmisijska spektroskopija je najbolj razširjena merilna tehnika. Uporablja se lahko za preučevanje plinastih, tekočih in trdnih snovi. Kvantitativno ocenjevanje temelji na osnovi Beer-Lambertovega zakona:

$$A = \log\left(I_0 / I\right) = c \cdot \varepsilon \cdot d \qquad \text{Enačba 1.2}$$

A predstavlja absorbanco, I_0 intenziteto svetlobe pred vzorcem, I intenziteto svetlobe po vzorcu, c koncentracijo preiskovane snovi, ε molarni ekstinkcijski koeficient in d dolžino svetlobne poti v vzorcu [98, 111].

Pri preučevanju proteinov in bioloških makromolekul ne moremo uporabljati enakih metod, kot jih uporabljamo pri manjših organskih spojinah. Za snemanje proteinov v fiziološkem okolju uporabljamo meritvene celice, ki so narejene iz v vodi netopnih materialov, kot so CaF_2, BaF_2 in ZnSe [112].

Glavna težava pri meritvah proteinskih raztopin nastane zaradi močne absorpcije vode, kar pripelje do prekrivanja vibracijskih signalov. Problematično je predvsem območje okoli 1645 cm^{-1}, kjer se nahajajo prečna nihanja molekul vode [113]. Ti signali prekrijejo pomembne signale amidnega I traku, pa tudi nekatere signale stranskih verig. Da preprečimo takšno prekrivanje signalov, pri transmisiji uporabljamo tanke proteinske filme, debeline 10 µm ali manj, ali za topilo uporabimo D_2O, kjer se trak, ki pripada prečnemu nihanju, premakne k 1210 cm^{-1}. Običajno se pri IR spektroskopiji uporablja vzorce s koncentracijo od 0,1 do 10 mM za proteine in od 1 do 100 mM za manjše molekule [114]. Zaradi majhnega volumna vzorca za transmisijsko merjenje običajno zadostuje od 10 do 100 µg proteina, lahko pa tudi veliko manj (50 ng) [115].

1.3.2.2 Oslabljena popolna refleksija (angl. attenuated total reflection, ATR)

Oslabljena popolna refleksija je eden od načinov snemanja IR spektrov v refleksiji. Za razliko od transmisije se pri ATR izognemo problemom, ki nastanejo v sistemih z zelo velikim ekstinkcijskim koeficientom, s potrebno kratko dolžino optične poti. Na tak način se izognemo nasičenju absorpcijskih trakov in s tem neuporabnosti pridobljenih spektrov za kvantitativno analizo. Pri ATR eksperimentu vzorec namestimo na kristal z lomnim količnikom, ki je večji od lomnega količnika vzorca. IR žarek je usmerjen na kristal pod kotom, ki omogoči popoln odboj žarka v prostor med kristalom in vzorcem.

Kljub popolnemu odboju infrardečega žarka na površini kristala se na robu kristala pojavi pojemajoče valovanje, ki delno prodre v preiskovani vzorec. Vdorna globina pojemajočega valovanja je odvisna od valovne dolžine (od 0,5 do 5 µm). Frekvenca pojemajočega valovanja je enaka frekvenci vstopnega žarka, amplituda pa pada eksponentno z oddaljenostjo valovanja od stika med kristalom in vzorcem. Molekule vzorca, ki so dovolj blizu kristalu, da jih tako valovanje lahko doseže, absorbirajo IR svetlobo. Žarek po enem ali več odbojih zapusti kristal in se usmeri na detektor [111].

1.3.3 Območje nihanj proteinskih skupin v FTIR spektru

Proces hidratacije proteinskih filmov kot tudi kasneje proces agregacije smo spremljali z vibracijsko spektroskopijo. Izjemno uporabna tehnika v FTIR spektroskopiji je spektroskopija oslabljene popolne refleksije (angl. Attenuated Total Reflectance, ATR) [116], kjer analiza vzorca poteka na površini močno reflektivnega kristala (ZnSe, Ge, diamant). Aplikacija spektroskopije ATR z enim odbojem, v primerjavi z bolj standardnimi vibracijskimi tehnikami, omogoča delo s proteini, raztopljenimi v vodnih raztopinah oz. različnih pufrih, dovoljuje delo z nizkimi koncentracijami topljenca in preprečuje nasičenje najbolj intenzivnih spektralnih trakov [117]. Prav zaradi nenasičenja najintenzivnejših trakov, ki v primeru raztopin pripadajo topilom, lahko te odštejemo od izhodnega spektra. Preostanek spektralne informacije nam omogoča uspešno analizo strukturno odvisnih proteinskih trakov, kakršni so amidni I, amidni II in amidni III trak.

Tabela 1.1: Pregled možnih nihanj.

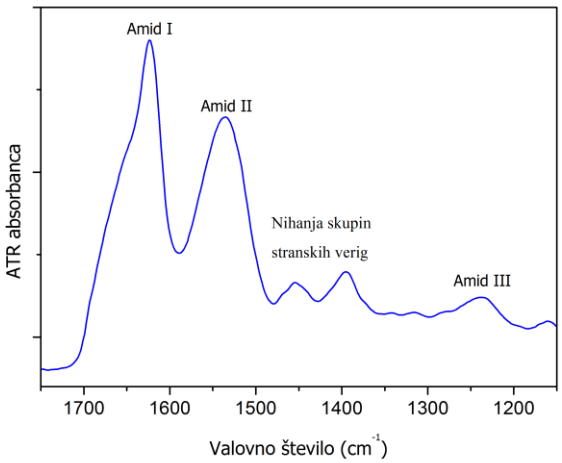
Nihanje	Smer nihanja	Način nihanja
Deformacijska nihanja (angl. bending)	Ravninsko nihanje	Strižno nihanje (angl. scissoring) Zibno nihanje (angl. rocking)
	Nihanje izven razvnine	Kolebno nihanje (angl. wagging) Zvijanje (angl. twisting)
Vzdolžno valenčno nihanje (angl. stretching)	Nihanje vzdolž vezi	Simetrično nihanje Asimetrično nihanje

Prvi in hkrati najintenzivnejši trak se imenuje amidni I trak. V tem območju prevladuje C=O vzdolžno valenčno nihanje z manjšim prispevkom izvenfaznih CN valenčnih nihanj, $C_\alpha CN$ deformacij ter NH ravninskega prečnega nihanja [118]. Opisana kompleksna sestava amidnega I traku se izraža v občutljivosti strukture traku na tip sekundarnega zvitja. Poleg potencialno kompleksne energijske porazdelitve amidnega I nihanja pa C=O skupina nastopa tudi kot proton akcepor in je tako občutljiva na tvorbo H-vezi. Za opredelitev kompleksne strukture smo uporabili strukturno-frekvenčno odvisnost amidnega I traku, ki sta jo predlagala A. Mirtič in J. Grdadolnik [20]. Omenjene korelacije so bile podane na podlagi strukturnih študij peptida poli-L-lizina (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Določitev modelnih trakov za amidno I, amidno II in amidno III regijo [20].

konformacija	Valovno število (cm^{-1})		
	Amid I	**Amid II**	**Amid III**
zavoj	1664 – 1674	1563 – 1572	1257 – 1260
PP_{II}	1648 – 1654	1543 – 1546	1308 – 1311
PP_{II}-konformacija	1634 – 1640	1560 – 1550	1308 – 1311
α_R	1643 – 1645	1550 – 1552	1290 – 1295
α-konformacija	1648 – 1654	1560 – 1550	1290 – 1295
β-konformacija	1648 – 1654	1560 – 1550	1270 – 1280
β-trak	1625 – 1630	/	1240 – 1243
β-ravnina	1685, 1630 – 1640	/	1230
agregirane β-ravnine	1692, 1618	1530	1219 – 1222

Kot lahko vidimo na Sliki 1.3 in v Tabeli 1.2, se poleg amidnega I traku nahaja amidni II trak. Amidna II nihanja se nahajajo pri približno 1550 cm^{-1} in so kombinacija izven faznega NH ravninskega prečnega nihanja in CN valenčnega nihanja z manjšim prispevkom CO ravninskega prečnega nihanja in $C_{\alpha}C$ ter $N_{\alpha}C$ valenčnih nihanj [118]. Prav tako kot pri amidu I nihanje amida II ni sklopljeno z nihanji stranskih verig. Ker kot najpomembnejši prispevek amidnega II traku nastopa izvenfazno NH ravninsko prečno nihanje, je ta trak občutljiv na tvorbo H-vezi. Proton NH skupine predstavlja donorski proton. Povezava med proteinsko sekundarno strukturo in frekvenco nihanj amida II ni tako neposredna, kot je to opaziti pri amidu I, saj v tem območju prihaja do močnega prekrivanja spektralnih trakov.



Slika 1.3: Regija prstnega odtisa na primeru spektra konkanavalina A, posnetega pri 15 °C in pH 9.

Traku amidne II regije sledi območje, ki pripada nihanju stranskih verig. V spektru konkanavalina A (Slika 1.3) opazimo dva trakova, prvega pri približno 1450 cm^{-1} in drugega pri 1400 cm^{-1}. Oba trakova pripadata številnim nihanjem, ki pripadajo stranskim verigam, od deformacij CH_2 in CH_3 skupin do simetričnega valenčnega nihanja ioniziranih COO^- skupin (1400 cm^{-1}) [119].

Amidna III regija zaključuje prikazan infrardeči spekter (Slika 1.3). Na prvi pogled izgleda kot neintenziven, celo nepomemben trak med 1320 cm^{-1} in 1220 cm^{-1}. K signalu amida III prispeva kombinacija faznega NH prečnega nihanja in NH valenčnega nihanja, z majhnim prispevkom CO ravninskega prečnega in CC valenčnega nihanja. Občutljivost vibracijskih stanj amidnega III traku na določeno sekundarno konformacijo je bila preučevana z eksperimentalnimi in teoretičnimi študijami [118]. Te študije nakazujejo, da je valovna dolžina amidnega III traku odvisna od velikosti obeh dihedralnih kotov peptidne vezi. Ta predpostavka odpira možnost, da lahko to vibracijsko lastnost uporabimo za razlikovanje med konformacijami, ki jih običajno ne moremo določiti z dekompozicijo amidnega I traku.

Poglavje 2

Cilji in hipoteze

Cilj disertacije je razvoj metodologije, s katero bi z uporabo infrardeče spektroskopije določevali porazdelitev konformacij majhnih peptidov (di, tri ...) in proteinov v nativnem stanju ali v agregiranih oblikah. Kratki peptidi niso pomembni samo za razumevanje proteinskega zvitja, predstavljajo namreč tudi zelo pomemben modelni sistem, ki odpira pot v določevanje proteinske strukture z uporabo infrardeče spektroskopije. Z uporabo inertnega okolja bomo ustvarili pogoje, v katerih so možne tudi konformacije, ki jih v vodi ne najdemo (C_7), so pa pomembne za določevanje strukturnih kazalčnih nihanj. Končni cilj naloge je razvoj zanesljive metode, ki bo omogočala spremljanje strukture proteina med agregacijo in fibrilacijo, kar bi posledično vodilo k boljšemu razumevanju teh procesov.

Hipoteza 1: Kratki alanin peptidi v inertni okolici
Pričakujemo, da bo prevladujoča konformacija C_7. Za to konformacijo je značilna močna intramolekularna H-vez. Četudi je ta konformacija na podlagi računov najverjetnejša, saj ima daleč najnižjo energijo, pričakujemo obstoj tudi ostalih konformacij (PP_{II}, β, α), vendar v povsem drugačnih porazdelitvah, kot smo jih določili v vodnih raztopinah. Odsotnost vode kot topila bistveno vpliva na velikost skeletnega dipola. Delež le-teh v posameznih peptidih mora biti odvisen od števila aminokislinskih ostankov, ki peptid sestavljajo.

Hipoteza 2: Hidratacija proteinov
Pričakujemo, da bo hidratacija stranskih verig podobna v vseh proteinih, ne glede na njihovo sekundarno strukturo. Razlikovati pa se mora struktura vode, ki je vezana na posamezne sekundarne elemente. Tu pričakujemo največje razlike, ki se bodo manifestirale v moči vezave molekul vode. Sekundarna struktura mora vplivati tudi na količino vode, ki jo je protein sposoben absorbirati. To velja tako za celotno vsebnost vode kot tudi za število hidratacijskih mest.

Hipoteza 3: Agregacija, fibrilacija
Zaradi očitnih razlik med proteinskimi amorfnimi agregati in amiloidnimi fibrili pričakujemo, da bomo našli kazalčna nihanja za njihovo detekcijo. Kandidata za taki nihanji bomo iskali v amidnem I in amidnem III območju. Ker je v splošnem prečna β-struktura zelo kompaktna, pričakujemo, da bo moč H-vezi večja kot v β-ravnini, kar pomeni, da moramo iskati kazalčna nihanja pri nižjih valovnih številih kot pa v primeru β-proteinov. Pričakujemo, da bo α/β prehod v primeru fibril potekal preko delnega razvitja α-vijačnice in posledično do tvorbe β-traku, ki se nato lahko združi v prečno β-strukturo.

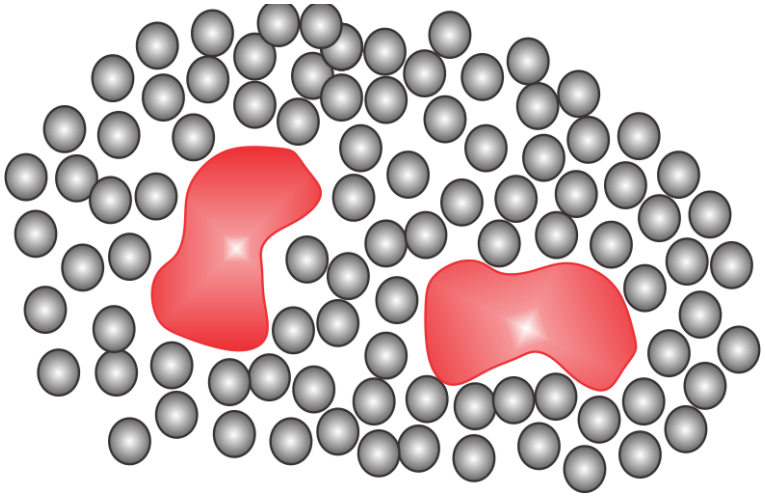
Poglavje 3

Kratki homopeptidi v inertni okolici

3.1 Uvod

Tridimenzionalno strukturo molekule lahko spremenimo v drugo konformacijo z vrtenjem okoli enojnih vezi. V peptidih ima vsaka enojna vez možnost konformacijske izomerije. Vendar je kljub veliki količini teoretično možnih konformacij le nekaj od teh sterično in termodinamsko ugodnih. Tako ima vsak protein le eno (ali nekaj) edinstveno 3D strukturo. Obstoj več kot ene stabilne konformacije poraja možnost, da med reakcijami ali katalizo veže druge molekule. Te konformacijske variacije so potrebne zaradi visoke specifičnosti biokemičnih procesov. Kljub neposredni povezanosti konformacije s funkcijo proteina je proces zvitja proteinov v energetsko ugodno in funkcionalno konformacijo še vedno nejasen.

Infrardeča spektroskopija matrično izoliranih molekul (angl. FT-IR matrix-isolation) je zelo primerna tehnika, ki razkriva konformacijsko raznolikost molekul. Pri matrični izolaciji v inertni okolici oz. matriki izključimo efekte okolice na konformacijo opazovane molekule. Tako lahko zaradi izključenosti medmolekulskih interakcij in rotacijske svobode raziskujemo konformacijska stanja z majhnimi razlikami v frekvencah. Le-te so v bolj kompleksnem okolju težje določljive. Izredno nizke temperature, ki se uporabljajo pri tovrstnem eksperimentu, omogočajo študij šibkih interakcij, kot so npr. H-vezi. Pri raziskovanju kondenzirane snovi imamo vedno vpletene interakcije med molekulami. Te interakcije bistveno zvišajo kompleksnost IR spektra. Tudi »inertna« topila, kot so npr. kloroform (CCl_4) ali benzen, torej topila, ki so »idealna« za uporabo v infrardeči spektroskopiji, lahko vplivajo na porazdelitev konformacij opazovane molekule. IR spektroskopija inertnih matrik se lahko do neke mere primerja z meritvami v plinastem stanju pri nizkih pritiskih, kjer lahko ustvarimo podobne pogoje tistim v popolnoma inertni okolici. Ti eksperimenti so v praksi težko izvedljivi, še posebno če imajo preiskovane snovi nizek parni tlak.



Slika 3.1: Shematska predstavitev molekule v inertni atmosferi. Rdeče obarvani molekuli sta obdani z inertnimi molekulami argona ali ksenona (siva barva) pri zelo nizki temperaturi (10 K – 20 K).

Za matrično izolacijo majhnih peptidov alanina (Ac-Ala-NHMe; Ala dipeptid, Ac-Ala-Ala-NHMe; Ala_2 peptid in Ac-Ala-Ala-Ala-NHMe; Ala_3 peptid) smo se odločili, ker nas zanimajo peptidne intermolekularne H-vezi, hkrati pa bi radi izvedeli, kakšen konformacijski prostor zavzemajo peptidi, gnani le z intrinzičnimi silami. Vodikove vezi med peptidnimi skupinami je zelo težko raziskovati v fizioloških okoljih, saj molekule vode konkurirajo pri njihovi tvorbi. Zaradi tega je populacija intramolekularnih interakcij z nastankom H-vezi majhna. V proteinih H-vezi postanejo glavni gradniki obeh sekundarnih struktur (α-vijačnica in β-ravnina), hkrati pa se pojavljajo v proteinskih zavojih, kjer sterična bližina proton akceptorjev (CO) in donorjev (NH) omogoča njihovo tvorbo. Infrardeči matrični spektri kratkih alanin peptidov nam bodo omogočili, da natančno analiziramo štiri pomembna območja peptidnega (proteinskega) spektra (NH valečno nihanje, amid I, amid II in amid III). Zaradi nizke temperature in odsotnosti intermolekularnih interakcij bodo absorpcijski trakovi bistveno ožji, s tem pa bo manj intenzivno tudi prekrivanje.

3.1.1 Konformacijske lastnosti majhnih peptidov in sekundarna struktura

Za boljše razumevanje procesa proteinskega zvitja, je smiselno podrobneje opisati vsa stanja, ki jih polipeptidna veriga v omenjenem procesu lahko zavzame.

Dvajset različnih α-L-aminokislin (Dodatek 2) predstavlja osnovne gradnike proteinskih molekul. Ti osnovni gradniki se med seboj povezujejo v specifično zaporedje preko peptidnih vezi in tako tvorijo polipeptidne verige z molekulsko maso (M_r) od nekaj tisoč do več sto tisoč g/mol. Poleg peptidnih so možne tudi dodatne kovalentne vezi v obliki disulfidnih mostičkov, ki se tvorijo med oksidiranimi stranskimi verigami cisteinskih (C, Cys) ostankov. Poleg kovalentnih vezi pomembno vlogo pri stabilizaciji kompleksne 3D proteinske strukture, karakteristične za vsak protein, igrajo H-vezi [12, 13], elektrostatske sile [7-9], hidrofobni efekt [5, 6] in nenazadnje Van der Waalsove sile [10, 11].

Zvitje globularnih proteinov temelji na organizaciji strukture na štirih nivojih. Aminokislinsko zaporedje oz. primarna struktura je zaporedje aminokislinskih enot, med

seboj povezanih s kovalentno oz. peptidno vezjo. Primarna struktura neposredno izhaja iz zaporedja nukleotidov v DNK molekuli in hkrati določa zvitje na višjem nivoju in biološko funkcijo proteinske molekule.

Sekundarna struktura definira konformacijo polipeptidne glavne verige na lokalni ravni. Glavni ponavljajoči se urejeni elementi so α-vijačnica, β-ravnina ter zavoji in zanke. Posamezne aminokisline zaradi narave svojih stranskih verig preferirajo določene sekundarne elemente pred drugimi. Ta preferenčnost nam omogoča okvirno napovedovanje sekundarnih elementov na podlagi znanega primarnega zaporedja [120, 121].

Ureditev regij s sekundarno strukturo, kot tudi neurejenih delov polipeptidne verige, v 3D prostoru predstavlja terciarno strukturo. Terciarna struktura globularnim proteinom pripiše njim specifično obliko, definira strukturo aktivnih mest in jim posledično določi specifično biološko funkcijo.

Kvartarna struktura predstavlja ureditev podenot večjih globularnih proteinskih struktur v končno, funkcionalno obliko. Kvartarna struktura predstavlja najvišjo stopnjo organiziranosti v procesu zvitja proteinskih molekul. Tako kot pri sekundarni in terciarni strukturi tudi pri urejanju kvarterne strukture sodelujejo le nekovalente interakcije, torej hidrofobni efekt, Van der Waalsove interakcije in H-vezi.

Sekundarna struktura je stabilizirana le z intrapeptidnimi N-H $\cdot\cdot\cdot$ O=C H-vezmi, ki se tvorijo na nivoju glavna veriga - glavna veriga. Terciarno in kvartarno zvitje je stabilizirano s tvorbo H-vezi med dvema glavnima verigama, glavno verigo in stransko verigo in med dvema stranskima verigama. Dodatno je potrebno upoštevati tudi interakcije, ki se tvorijo med molekulami vode in glavno verigo oz. stransko verigo. Stranske verige s svojo pestro molekulsko strukturo lahko pri tvorbi H-vezi (tako kot molekule vode) nastopajo kot elektron donorske ali elektron akceptorske skupine.

3.1.1.1 Geometrija elementov sekundarne strukture: vijačnice, ravnine, zavoji oz. obrati (α-strukture, β-strukture in obrati)

Elementi sekundarne strukture so stabilizirani s tvorbo H-vezi med peptidnimi skupinami. Ker so peptidne skupine sočasno tako donorji kot akceptorji H-vezi, je proces tvorbe H-vezi kooperativen proces. Donorska in akceptorska skupina v peptidni vezi sta v *trans*–konformaciji in π-vezana (angl. π-conjugated), kar daje centralni C–N vezi značaj dvojne vezi. Pri tvorbi H-vezi N–H $\cdot\cdot\cdot$ O=C med dvema peptidnima skupinama se leta polarizira in posledično se centralna C–N vez skrajša in tako zavzame lastnosti dvojnih vezi in večjo togost. Poveča se tudi njen potencial za tvorbo dodatnih H-vezi kot posledica π-vezave.

Topologija vijačnic in β-ravnin se bistveno razlikuje v intra- in intermolekularnih interakcijah. Alfa vijačnica se tvori med zaporednim odsekom polipeptidne verige in je stabilizirana s serijo H-vezi $N_{(n+4)}$–H $\cdot\cdot\cdot$ O=$C_{(n)}$. Te lokalne interakcije lahko opišemo kot intramolekularne in jih primerjamo z intramolekularnimi interakcijami v manjših molekulah.

Nasprotno od α-vijačnic se β-ravnine tvorijo med različnimi segmenti polipeptidne verige. Ti segmenti so lahko bodisi sosednji in med seboj povezani z zavoji/obrati bodisi se nahajajo na popolnoma različnih predelih polipeptidne verige. Najmanjši osnovni gradnik β-ravnine sta dva β-trakova, med seboj orientirana paralelno oz. antiparalelno. Ker ima takšna β-ravnina na obeh robovih proste stranske verige, zmožne tvorbe dodatnih H-vezi, se lahko na teh robovih dodajajo dodatni β-trakovi in tako tvorijo kompleksnejše β-ravnine. Takšne ravnine se lahko delno zvijejo in tvorijo cilindrom

podobne strukture, imenovane β-sodčki (angl. β-barrel), in na tak način predstavljajo nekakšne neskončne β-ravnine. Vodikove vezi v β-ravninah opišemo kot intermolekularne.

V lokalnem minimumu Ramachandranovega (Φ/Ψ) diagrama (Slika 3.2 B), ki prikazuje strukture β-ravnine, sta možni dve konfiguraciji: paralena ali antiparalelna orientacija polipeptidnih trakov. Trakovi so med seboj povezani z intermolekularnimi N–H · · · O=C H-vezmi, ki se tvorijo na obeh straneh β-trakov in med paralelno in antiparalelno orientiranimi trakovi izražajo značajsko drugačne lastnosti. Beta ravnine posedujejo specifično stereokemijsko lastnost, saj se stranske skupine aminokislinskih enot izmenično orientirajo na nasprotnih straneh glavne verige. Stranske skupine na sosednjih trakovih med seboj sterično interagirajo in tako tvorijo desnosučni pregib [122, 123]. Z vstavljanjem dodatnega aminokislinskega ostanka se opisana organiziranost β-ravnin prestrukturira v tako imenovano β-izboklino (angl. β-bulge) [124].

Vijačne sekundarne strukture so stabilizirane z intramolekularnimi N–H · · · O=C H-vezmi, ki se vzpostavijo med posameznimi peptidnimi enotami. Vodikove vezi se tvorijo med različnimi peptidnimi enotami, kar omogoča nastanek različnih tipov vijačnih struktur. Tip vijačnice poimenujemo z dvema številoma v obliki X_n, pri čemer X predstavlja število aminokislinskih ostankov v enem obratu, n pa število kovalentnih vezi (vključno z N–H vezjo), ki se nahajajo v glavni verigi in so premoščene (angl. bridged) z vsako vijačno N–H · · · O=C H-vezjo.

Najožja oz. široka vijačnica, 2_7 oz. $4{,}4_{16}$ (π) vijačnica, sta v globularnih proteinih redki strukturi, saj sta za razliko od njiju njuna intermediata, vijačnici $3{,}6_{13}$ in 3_{10}, stabilnejši in zato v globularnih proteinih tudi pogosteje zastopani. Daleč najpogosteje opažena struktura je $3{,}6_{13}$ vijačnica, ki jo imenujemo tudi α-vijačnica. C=O · · · H–N H-vezi se v tem primeru tvorijo med karbonilno skupino C=O na *n*-ti peptidni skupini ter N–H na (n+4) peptidu vzdolž peptidne verige (skrajšano kot 1←5). Vodikove vezi potekajo praktično vzporedno, C=O skupine pa so rahlo nagnjene (angl. tilted) in odmaknjene (angl. displaced) od osi vijačnice.

Alfa vijačnice se raztezajo preko daljših odsekov polipeptidne verige. V nasprotju z njimi se 3_{10} vijačnice v globularnih proteinih pojavljajo le v kratkih segmentih. Pogosto v obliki enega samega obrata na karbonilnem koncu α-vijačnice ali kot oster zavoj, ki zasuče smer polipeptidne verige. 3_{10} vijačnica je v nasprotju z α-vijačnico gosteje zvita struktura, zaradi česar se C=O skupine močneje zamaknejo od osi vijačnice. Takšna geometrija je manj ugodna in vodi v tvorbo 1←4 H-vezi, ki se tvorijo med C=O skupino peptidnega ostanka (n) in N–H skupino (n+3) peptidne enote. Prav opisana struktura 3_{10} vijačnice je razlog za njeno slabšo stabilnost nasproti α-vijačnici.

Za vse vijačne strukture je značilna enosmerna orientiranost vseh atomskih skupin v glavni verigi, kot tudi H-vezi, glede na os vijačnice. Takšna orientacija ustvari značilen dipolni moment s pozitivnim polom v smeri amino konca. Potencial na razdalji 5 Å od N-konca 10 Å dolge α-vijačnice je bil ocenjen na približno 0,5 eV [125, 126].

Peptidna veriga smer svoje orientacije spremeni preko dobro okarakteriziranih zavojev/obratov v obliki 3_{10} vijačnice ali β-zavoja. En sam zavoj 3_{10} vijačnice v globularnih proteinih je pogost strukturni element, ki spremeni orientacijo glavne polipeptidne verige. Podobna interakcija med štirimi zaporednimi peptidnimi enotami je opazna tudi v drugem strukturnem elementu z enako funkcijo, β-zavoju [127]. Glede na torzijske kote aminokislinskih ostankov 2 in 3 ločimo tri tipe β-zavojev, tj. Tip I, II in III [120]. Tip III je zelo podoben zavoju 3_{10} vijačnice.

Ostali zavoji, v nativnem zvitju redkeje zastopani, so α-zavoji z 1←5 H-vezmi in predstavljajo en obrat α-vijačnice. γ-zavoj je naslednja redka oblika zavojev in se pojavlja v eni od dveh možnih enantiomernih oblik, tj. klasični oz. bolj pogost obrnjeni zavoj (angl. inverse turn). Tak zavoj sestavljajo trije aminokislinski ostanki, med katerimi se tvorijo 1←3 H-vezi. Gama zavoj je strukturno gledano bolj podoben zanki oz. pentlji kot

dejanskemu zavoju [128, 129]. Kljub ne precej pogosti zastopanosti γ-zavojev med elementi sekundarnih struktur pa najdemo precejšnje število teh elementov zaporedno vezanih v sekundarnih strukturah, ki jih poimenujemo 2.2_7-vijačnice [17].

3.1.1.2 Ramachandranov diagram

Konformacijo polipeptidne verige je s torzijskimi koti Φ in Ψ v zgodnjih šestdesetih letih prejšnjega stoletja pod mentorstvom G. N Ramachandrana prvi opisal njegov diplomant V. Sasisekharan [130]. Rahlo izboljšana verzija tako imenovanega Ramachandranovega oz. Φ, Ψ diagrama se v preteklih petdesetih letih praktično ni spremenila in ostaja pomembno orodje pri raziskavah proteinskih struktur [15].

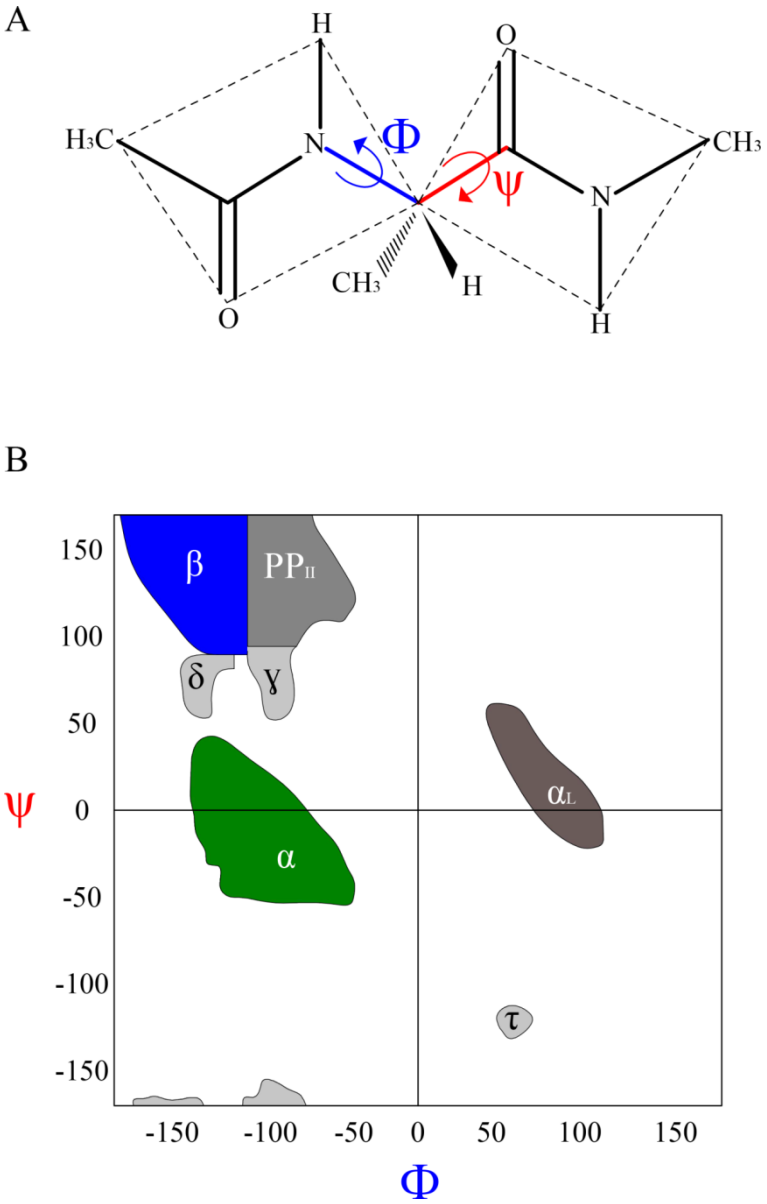
Ramachandranov diagram temelji na predpostavki, da atome obravnavamo kot enostavne, neprekrivajoče se sfere [15, 130]. Na podlagi te predpostavke in sebi lastnih torzijskih kotov Φ in Ψ lahko alaninu podobne aminokisline zavzamejo eno izmed treh glavnih strukturnih regij na Ramachandranovem diagramu (α-vijačnica, β-trak in PP_{II} vijačnica). Iz tega opisa sta zaradi svoje specifične narave izključeni aminokislini glicin in prolin. K glavnim trem regijam lahko dodamo dodatne regije, ki jih obravnavamo kot premostitvene regije (angl. bridge regions), saj premoščajo α in β-regije. Te premostitvene regije (Slika 3.2: δ, γ in τ) se pojavijo, ko atomom določimo najmanjše možne radije, ki jih še vedno lahko smatramo kot verjetne.

Kot lahko vidimo na Sliki 3.2, aminokisline ne zavzamajo vseh možnih konformacij v enakem deležu. Nagnjenost aminokislinskega ostanka k določeni konformaciji je pod vplivom stranske verige in konformacije sosednjih aminokislinskih ostankov [63]. Ta spoznanja so v nasprotju s Floryjevo hipotezo izoliranega para (angl. isolated pair hypothesis) [131], ki pravi, da je konformacija posameznega aminokislinskega ostanka neodvisna od kemijskih lastnosti in konformacij sosednjih aminokislinskih ostankov. Slednje sicer drži v primeru dipeptidnih enot, pri katerih intrinzične lastnosti glavne verige izhajajo zgolj iz konformacijskih preferenc dipeptidnih enot [61].

Ramachandranovi diagrami modelnih proteinov, ki smo jih uporabili pri študiranju vpliva hidratacije na sekundarno strukturo proteinskega zvitja, so predstavljeni v Dodatku 3.

Tabela 3.1: Predstavitev velikosti torzijskih kotov Φ in Ψ za običajne sekundarne strukture.

Sekundarna struktura	**Φ**	**Ψ**
α-vijačnica	-57°	-47°
Antiparalelna β-ravnina	-139°	135°
Vzporedna β-ravnina	-119°	113°
PP_{II}-vijačnica	-75°	145°
2.5_1-vijačnica	-130°	170°
γ-zavoj	70°	-60°
Obrnjeni γ-zavoj	-70°	60°



Slika 3.2: Predstavitev klasičnega Ramachandranovega diagrama, poimenovanega tudi Φ, Ψ diagram. (A) Konformacijo alanin dipeptida lahko opišemo s tremi torzijskimi koti, to so Φ, Ψ in ω. Peptidna vez (HN - C'O) izkazuje karakter dvojne vezi, kar vodi v njeno togost in posledično v praktično planarno ureditev atomov. Z izjemo prolina so ostale levosučne aminokisline bolj naklonjene *trans* konformaciji peptidne vezi, kar torzijskemu kotu ω določa velikost blizu 180°. Ker je vrednost torzijskega kot ω enaka med peptidnimi enotami kot tudi v vseh pogostejših elementih sekundarnih struktur, je na ta način torzijski kot ω kot konstanta izključen iz predstavitve v Ramachandranovem diagramu. Peptidno vez na obeh straneh centralnega ogljikovega atoma, C_α, lahko obravnavamo kot togi ravnini, ki rotirata okoli dihidralnih kotov Φ in Ψ. Kot Φ je v dipeptidni enoti definiran kot torzijski kot med C_{i-1}-N_i – $C_{\alpha i}$-C_i peptidnim delom, kot Ψ pa definira torzijski kot N_i-$C_{\alpha i}$ – C_i-N_{i+1}. (B) Shematski prikaz Ramachandranovega diagrama za primer alanin dipeptida in tipičnih regij, značilnih za glavne elemente sekundarnih struktur. Povzeto po referenci: [132].

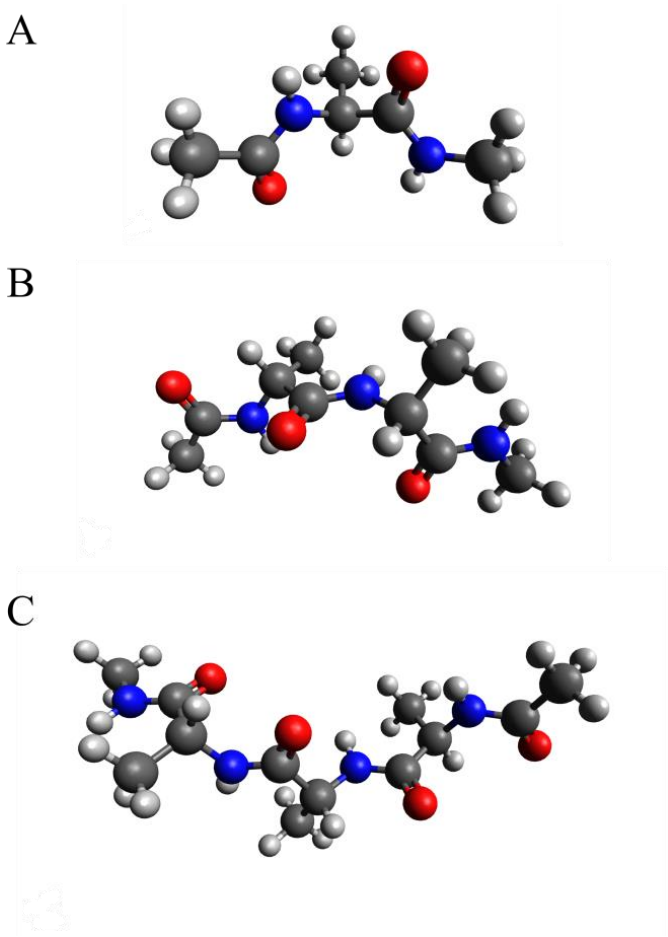
3.1.1.3 Konformacija majhnih peptidov v vodni raztopini

Najpreprostejšo peptidno verigo predstavljajo blokirani homopeptidi, saj ti že izražajo preferenčne konformacije [61, 133], ki jih imajo aminokislinski ostanki v večjih polipeptidnih sistemih [134-136]. Blokirani homopeptidi se imenujejo aminokisline, ki so na C koncu blokirane z CH_3–CO skupino in na N koncu z NH–CH_3 funkcionalno skupino. Torzijski koti peptidne vezi v blokiranem dipeptidu zavzamejo vrednosti, ki pripadajo PP_{II}, α in β-konformaciji [61, 62, 133]. Prisotnost preferenčnih konformacij v blokiranih homopeptidih razloži model elektrostatskega senčenja (ESM), ki opiše dipol - dipol interakcije v peptidni verigi. Hkrati razloži tudi senčenje dipol - dipol interakcije z molekulami vode, ki je odvisna od vrste stranske verige in topila. V inertni okolici (vakuum) je β-konformacija energetsko ugodnejša od α-konformacije. Beta konformacija je stabilizirana z antiparalelno orientacijo dipolov glavne peptidne verige, medtem ko paralelna ureditev dipolov destabilizira α-konformacijo. V polarnih topilih zaradi ugodnih interakcij s topilom prevladuje paralelna ureditev dipolov [135, 137].

3.2 Materiali in metode

3.2.1 Priprava vzorcev

Blokirani alanin peptidi (acetil-(Ala)n-N-metilamin, n=1,2,3), uporabljeni pri matrični izolaciji, so bili naročeni pri Bachem AG oz. so bili reblokirani iz metilestrov z uporabo metilamina.



Slika 3.3: Blokirani alanin peptidi, izrisani s programom Avogadro. (A) Ala dipeptid, (B) Ala_2 peptid in (C) Ala_3 peptid.

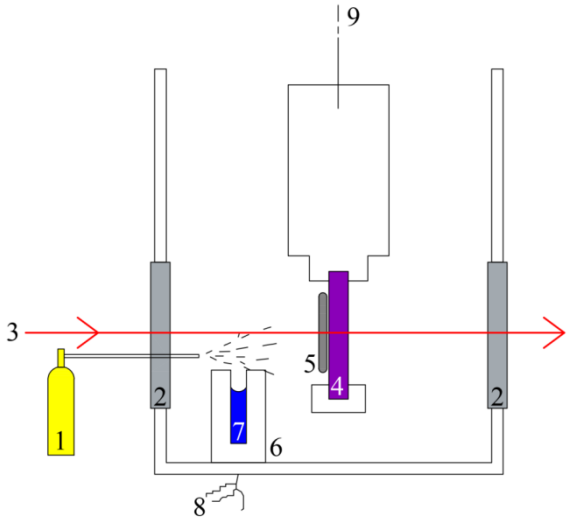
3.2.2 Snemanje in analiza FTIR spektrov

Spektri so bili posneti v laboratoriju prof. Marije Wierzejewske v Wrocławu na Poljskem (Novak, U., Wierzejewska, M. in Grdadolnik, J., članek v pripravi).

Pri snemanju spektrov je bil uporabljen Brukerjev spektrofotometer IF66 z vodno hlajenim izvorom srednjega IR območja, KBr delilnikom žarka (angl. beamsplitter) in DTGS (angl. deuterated triglycine sulphate) detektorjem.

Matrična izolacija peptidov predstavlja izjemno uporabno tehniko, ki omogoča simulacijo idealne plinske faze, tj. okolja prostega medsebojnih interakcij, saj inertni plin v popolnosti obdaja peptidne molekule (Slika 3.1). Pri matrični izolaciji kratkih peptidov alanina smo uporabili inertna plina argon in ksenon. Tako pripravljena zmes je bila ohlajena na 10 K v primeru argonove matrike in na 20 K v primeru ksenonove matrike. Ob kondenzaciji matrike na kriospektroskopsko okno (ohlajeno CsI okno) so kratki

homopeptidi postali od okolice izolirani. Shematska predstavitev opisane tehnike je prikazana na Sliki 3.4. Spektri so bili posneti med 4000 cm^{-1} in 400 cm^{-1}, končni spekter je bil povprečen iz 64 interferogramov. Spektri imajo zelo podobno medsebojno obliko ne glede na vrsto matrike.

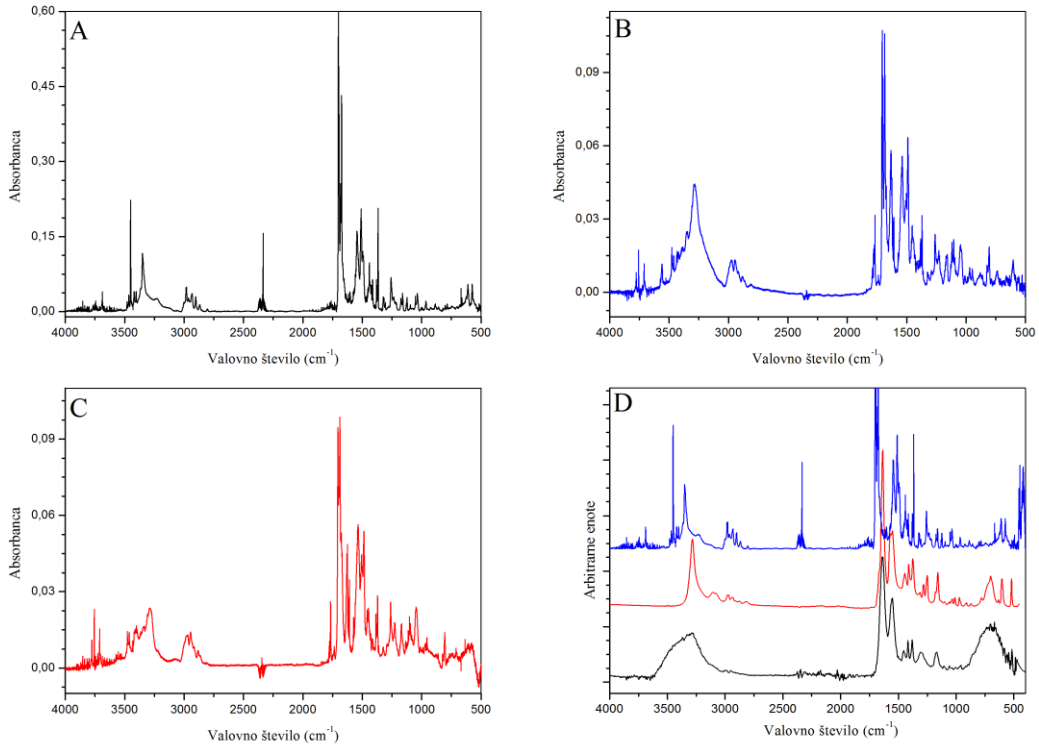


Slika 3.4: Shema matrične izolacije. (1) Žlahtni plin (argon oz. ksenon); (2) KBr okno; (3) Pot IR svetlobe; (4) Ohlajeno CSi kriospektroskopsko okno; (5) Matrica; (6) Ogrevalno oz. ohlajevalno telo; (7) Vzorec; (8) Regulator temperature; (9) Povezava do helijevega kompresorja.

Analizo NH valenčnega nihanja, amidnega I, amidnega II in amidnega III območja smo opravili v našem Laboratoriju za strukturo biomolekul na Kemijskem inštitutu. Analizo prekrivajočih se trakov v omenjenih spektralnih regijah smo opravili s programom Grams.

3.3 Rezultati

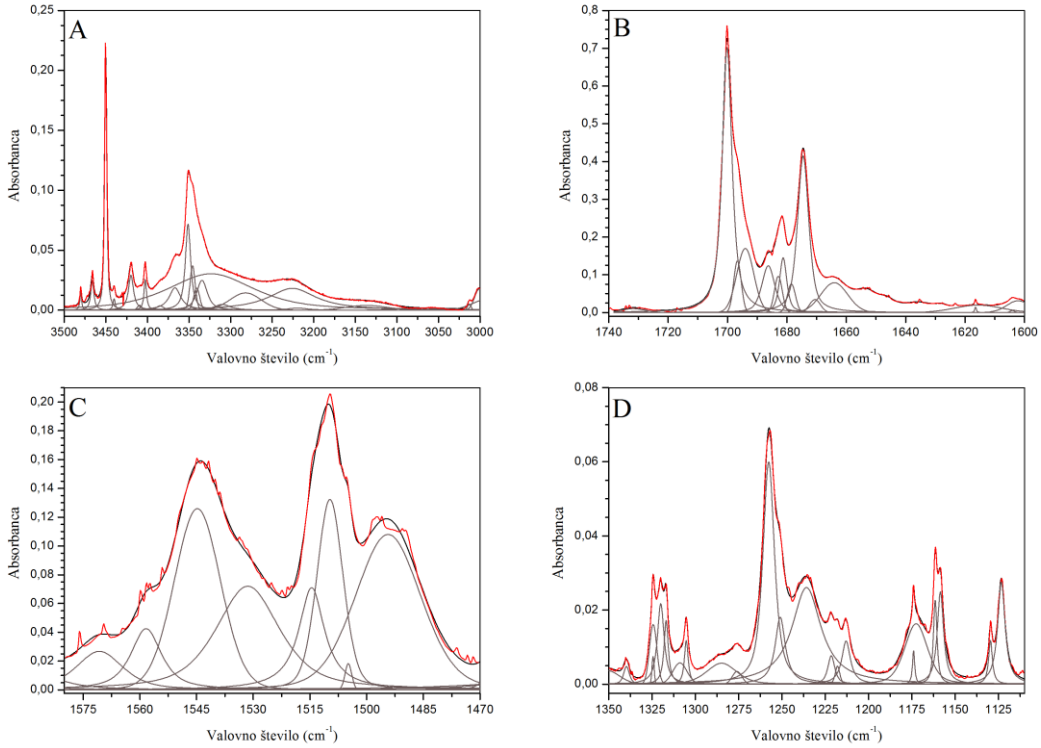
Na spodnji Sliki 3.5 so predstavljeni spektri Ala dipeptida, Ala_2 peptida in Ala_3 peptida v inertni atmosferi pri nizkih temperaturah. Večina absorpcijskih trakov je v primerjavi s spektri kondenzirane snovi precej ožjih, kar nam je olajšalo natančno določitev frekvenc in intenzitete modelnih trakov. Za primerjavo z običajnimi spektri predstavljamo na Sliki 3.5 spektra polikristaliničnega filma Ala dipeptida in raztopino Ala dipeptida v vodi, kjer smo predhodno odšteli spekter čiste vode. Posledica razširjenih trakov je intenzivno prekrivanje in s tem močno oteženo določanje njihovih pozicij in integralnih intenzitet.



Slika 3.5: Spektri alanin peptidov v interni okolici. (A) Ala dipeptid v Xe matriki pri T=20 K; (B) Ala_2 peptid v Ar matriki pri T=10 K; (C) Ala_3 peptid v Ar matriki pri T=10 K; (D) Infrardeči spekter Ala dipeptida v Xe matriki pri T=20 K (modri spekter), polikristalinični film (rdeči speketer) in vodne raztopine Ala dipeptida (črn spekter). Pri slednjem je spekter vode odštet.

3.3.1 Ala dipeptid

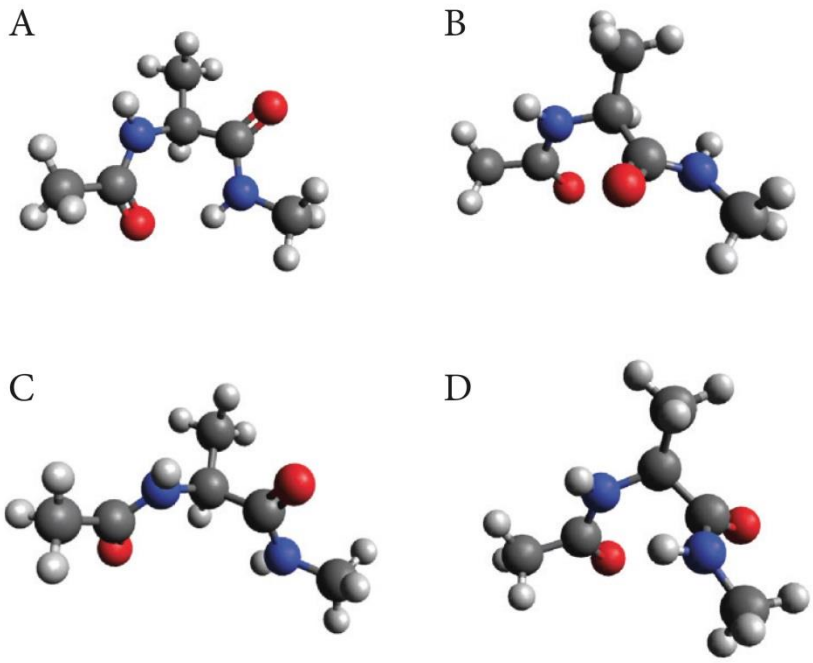
Najkrajši predstavnik merjenih alanin peptidov je Ala dipeptid. Ker je to najkrajši peptid z najmanjšim številom atomov, pričakujemo najpreprostejši matrični spekter. Kljub očitnim zožanjem absorbcijskih trakov smo za natančno analizo vseh štirih, za določanje konformacij pomembnih območij, morali uporabiti program za samousklajevanje modelnih trakov. Rezultati modeliranja so predstavljeni po posameznih karakterističnih nihanjih na Sliki 3.6 ter v Tabeli 3.2. Deleže posameznih konformacij smo pri vseh primerih kratkih alanin peptidov določili ob predpostavki veljavnosti Beer-Lambertovega zakona in izračuna, povzetega v Enačbi 5.2.



Slika 3.6: Dekompozicija spektralnih trakov za primer Ala dipeptidov v inertni okolici. (A) Območje NH valenčnega nihanja z modelnimi trakovi; (B) Območje amida I z modelnimi trakovi; (C) Območje amida II z modelnimi trakovi; (D) Območje amida III z modelnimi trakovi. Z rdečo barvo je predstavljen eksperimentalno posneti spekter in s črno izračunan spekter, ki predstavlja vsoto modelnih trakov. Modelni trakovi so predstavljeni s sivo barvo.

Tabela 3.2: Frekvence, integralna intenzitata in porazdelitev konformacij Ala dipeptida v Ar in Xe matriki.

Ala di-peptid	**Ar matrika**					**Brez H-vezi**	**Xe matrika**					**Brez H-vezi**
	(cm^{-1})	Površina	(%)	(%)	Asignacija	(%)	(cm^{-1})	Površina	(%)	(%)	Asignacija	(%)
Amid I	1700	3,99	32,5	32,5		32,5	1726	0,09	1,9			
	1696	0,43	3,5				1707	0,38	7,6			
	1694	1,22	9,9				1704	1,34	27,1	36,6		36,6
	1686	0,83	6,8				1699	0,214	4,3			
	1682	0,32	2,6				1687	0,97	19,8			
	1681	0,58	4,8				1685	0,031	0,6			
	1678	0,26	2,1				1681	0,27	5,4			
	1674	2,50	20,4				1678	0,59	12,0			
	1670	0,16	1,3				1674	0,12	2,4			
	1664	0,90	7,3				1663	0,45	9,2			
	1653	0,47	3,9				1650	0,23	4,7			
	1646	0,25	2,1				1647	0,10	2,0			
	1635	0,37	3,0				1632	0,14	2,9			
			100,0						100,0			
Amid II	1550	0,88	38,0				1586	0,22	3,0			
	1536	0,29	12,6				1570	0,51	6,9			
	1524	0,21	9,1				1558	0,58	7,8			
	1515	0,21	9,2				1544	1,98	26,9			
	1507	0,72	31,1	31,1		31,1	1531	1,87	25,4			
			100,0				1514	0,90	12,1			
							1509	1,27	17,2			
							1504	0,04	0,6	30,0		30,0
									100,0			
Amid III	1310	0,11	10,4				1309	0,10	5,7			
	1308	0,01	1,1	11,5	PP_{II}		1305	0,08	4,6	10,3	PP_{II}	
	1292	0,04	3,6	4,7	Alfa		1284	0,05	2,8	2,8	Alfa	
	1276	0,06	5,7	9,3	Beta	25,4	1275	0,15	8,9	8,9	Beta	22,0
	1261	0,15	14,6	20,3			1257	0,26	14,9			
	1257	0,28	27,8	42,4	C_7		1251	0,49	28,3	43,1	C_7	
	1232	0,37	36,8	36,8	Dimer, beta		1235	0,60	34,9	34,9	Dimer, beta	
			100,0						100,0			

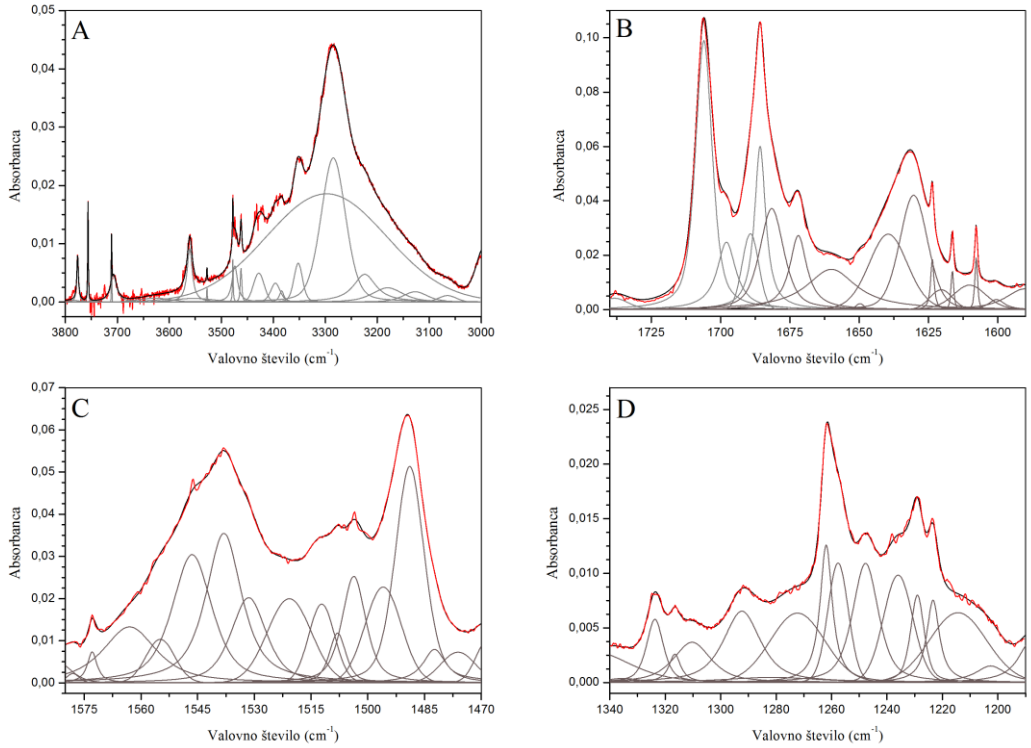


Slika 3.7: Konformacije Ala dipeptida: (A) α_R, (B) PP_{II}, (C) $C_5(\beta)$ in (D) C_7.

Razen NH valenčnega nihanja so ostali modelni trakovi okarakterizirani v Tabeli 3.2. Pri strukturni odvisnosti posameznih modelnih trakov v amidnih območjih smo upoštevali rezultate raziskav konformacij dipeptidov v vodi [61, 137] in poli-L-lizina v različnih topilih [20].

3.3.2 Ala_2 peptid

Na Sliki 3.8 so predstavljeni izračunani modelni trakovi v spektru Ala_2 peptidov, posnetem v inertni okolici. Tako kot v primeru Ala dipeptida (Slika 3.6) in Ala_3 peptida (Slika 3.9) so tudi na spodnji sliki z rdečo barvo predstavljeni eksperimentalno posneti spektri, s črno barvo pa spekter, ki predstavlja vsoto vseh modelnih trakov (predstavljeni s sivo barvo).

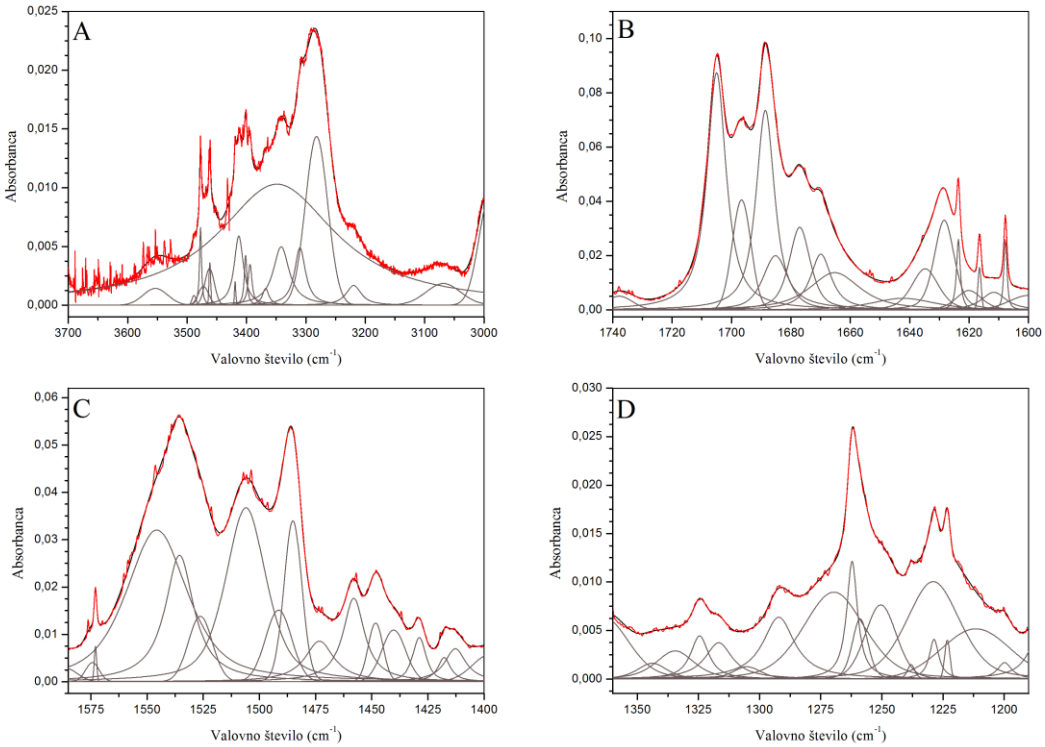


Slika 3.8: Dekompozicija spektralnih trakov za primer Ala_2 peptidov v inertni okolici. (A) Območje NH valenčnega nihanja z modelnimi trakovi; (B) Območje amida I z modelnimi trakovi; (C) Območje amida II z modelnimi trakovi; (D) Območje amida III z modelnimi trakovi.

Tabela 3.3: Frekvence, integralna intenzitata in porazdelitev konformacij Ala_2 peptida v argonski matriki.

Ala_2 peptid	**Ar matrika**					**Brez H-vezi**
	(cm^{-1})	Površina	(%)	(%)	Asignacija	(%)
Amid I	1706	0,938	29,5			
	1698	0,305	9,6			
	1697	0,0214	0,7			
	1689	0,209	6,6			46,3
	1686	0,444	13,9			
	1682	0,496	15,6			
	1672	0,307	9,6			
	1660	0,463	14,5			
			100,0			
Amid II	1563	0,284	8,5			
	1554	0,1	3,0			
	1546	0,49	14,7			
	1538	0,551	16,5			
	1531	0,289	8,7			
	1520	0,291	8,7			
	1512	0,163	4,9			
	1508	0,082	2,5			
	1504	0,249	7,5			
	1496	0,274	8,2			
	1489	0,559	16,8			39,8
			100,0			
Amid III	1310	0,077	8,0	8,0	PP_{II}	
	1292	0,139	14,4	14,4	Alfa	
	1281	0,026	2,7			
	1272	0,158	16,4	19,1	Beta	41,6
	1262	0,102	10,6			
	1258	0,105	10,9	21,5	C_7	
	1248	0,159	16,5	16,5		
	1236	0,135	14,0			
	1229	0,0616	6,4	20,4	Dimer, beta	
			100,0			

3.3.3 Ala_3 peptid



Slika 3.9: Dekompozicija spektralnih trakov za primer Ala_3 peptidov v inertni okolici. (A) Območje NH valenčnega nihanja z modelnimi trakovi; (B) Območje amida I z modelnimi trakovi; (C) Območje amida II z modelnimi trakovi; (D) Območje amida III z modelnimi trakovi.

Analizo kratkih peptidov smo zaključili s snemanjem spektrov Ala_3 peptidov. Dekompozicija spektralnih trakov v območju NH valenčnega nihanja, amidnega I, II in III (Slika 3.9) je tudi v tem primeru ponudila zadovoljivo ujemanje med eksperimentalno določenim spektrom (rdeča barva) in vsoto vseh modelnih trakov (črna barva). Valovna števila, integralne intenzitete in izračunane porazdelitve konformacij v Ala_3 peptidu za posamezni modelni trak so predstavljene v Tabeli 3.4.

Tabela 3.4: Frekvence, integralna intenzitata in porazdelitev konformacij Ala_3 peptida v argonski matriki.

Ala_3 peptid	**Ar matrika**					**Brez H-vezi**
	(cm^{-1})	Površina	(%)	(%)	Aasignacija	(%)
Amid I	1705	0,986	29,7			
	1697	0,319	9,6			39,2
	1689	0,785	23,6			
	1685	0,266	8,0			
	1677	0,341	10,3			
	1670	0,255	7,7			
	1665	0,373	11,2			
			100,0			
Amid II	1546	1,28	35,1			
	1536	0,606	16,6			
	1526	0,185	5,1			
	1506	1,01	27,7			
	1491	0,221	6,1			
	1485	0,347	9,5			43,2
			100,0			
Amid III	1305	0,021	1,9	1,9	PP_{II}	
	1292	0,148	13,5	13,5	Alfa	
	1270	0,308	28,0	28,0	Beta	
	1262	0,099	9,0			
	1259	0,056	5,1	14,1	C_7	
	1250	0,129	11,7	11,7		
	1238	0,007	0,6			
	1229	0,302	27,5			
	1228	0,0294	2,7	30,8	Dimer, beta	
			100,0			

3.4 Razprava

3.4.1 Ala dipeptid

Teoretične raziskave energetike Ala dipeptida v vakuumu [138] so pokazele, da C_7 konformacija poseduje najnižjo energijo. Ta konformacija je stabilizirana z intramolekularno H-vezjo med CO in NH skupino. Po energijah ji sledijo C_5, α_R in PP_{II} konformacije. Te konformacije res zasledimo v spektrih Ala dipeptida v inertni okolici (Tabela 3.2). Analiza območij, ki nam podajo informacije o obstoju H-vezi, med CO in NH skupinama pa nam podajo oceno, koliko je prostih in koliko vezanih proton akceptorskih in donorskih mest. Če sta deleža enaka, kar je razvidno iz Tabele 3.2, je pričakovati, da imamo večinsko vezavo med CO in NH skupinama. V matriki se namreč lahko nahajajo tudi molekule vode, ki lahko delujejo kot proton akceptor oz. proton donor. V visokofrekvenčnem delu imamo kar nekaj kandidatov, ki jim lahko pripišemo izvor v OH nihanju molekul vode. Glede na integralne intenzitete, te so približno primerljive le med širokimi trakovi (tvorba H-vezi močno poveča absorpcijski koeficient in Beer-Lambertov zakon ni več linearen), tj. med absorbcijskimi trakovi skupin, ki sodelujejo v približno enako močnih H-vezeh, sta glavna kandidata trakova pri 3225 cm^{-1} in 3282 cm^{-1}. Vendar prisotnost vode ravno zaradi primerljivosti števila NH in CO skupin, ki sodelujejo v H-vezi, ne moti eksperimenta.

Najširši trak v tem območju (3334 cm^{-1}) je tako posledica nihanja NH skupin, ki tvorijo H-vez. H-vezi lahko tvorijo vsaj na dva načina. Vzpostavijo lahko intramolekularno H-vez v C_7 konformaciji in intermolekularno vez v dimerizaciji. Teoretične raziskave so pokazale (Mirtič, A. in Grdadolnik J, neobjavljeno), da je energetsko najugodnejša dimerizacija dveh molekul Ala dipeptida, ki sta v β-konformaciji. Dimerizacije ostalih dveh konformer ne moremo izključiti. Prav tako ne moremo izključiti tvorbe večjih agregatov, je pa manj verjetna. V frekvenčnem območju NH valenčnega nihanja nad 3400 cm^{-1}, torej nad frekvenco, ki razmejuje proste in H-vezane NH skupine [139], najdemo kar nekaj zelo ozkih trakov. Visoka frekvenca in izjemna ožina trakov nam sugerirata, da je izvor teh nihanj v »prostih« NH skupinah. Kandidati za te »proste« NH skupine so peptidi, ki zasedajo konformacije brez H-vezi (β_R, α_R in PP_{II}). Zanimivo je, da ne zasledimo le enega traku, ki pripada »prostim« NH skupinam. Zato bi to skupino pravilneje opisali kot skupino zelo šibko vezanih in prostih NH skupin. NH skupine pri najvišjih valovnih številih (3480 cm^{-1} in 3466 cm^{-1}) so proste, medtem ko ostalim lahko pripišemo zelo šibko interakcijo znotraj peptida (kandidat za tako vrsto interakcije je β-konformacija) oz. z okolico (nastajanje neidealnih dimer in šibke interakcije z molekulami vode).

Celotna porazdelitev konformacijskih populacij je povsem drugačna, kot je določena za Ala dipeptid v vodi (61 % PP_{II}, 10 % α_R, 29 % β) [61, 137]. Najvišjo populacijo doseže C_7 konformacija (42 %), sledijo ji dimeri (37 %) in pa tri konformacije brez srednje močnih H-vezi: PP_{II} (12 %), β (9 %) in α_R (5 %).

3.4.2 Ala_2 peptid

Z daljšanjem alanin peptida se poveča tudi število možnih konformacij, predvsem pa možnosti tvorbe H-vezi med različnimi proton donorskimi in akceptorskimi skupinami. Za dodatno komplikacijo poskrbijo še molekule vode z dodatnimi mesti vezave. Kjub manj jasni konformacijski sliki kot v primeru Ala dipeptida lahko amidne modelne trakove razložimo na podoben način. Kljub številnim podobnostim s prej obravnavanim sistemom si najprej oglejmo razlike. Analizi amidnega I in II traku razkrijeta, da je pri Ala_2 kar 40

– 44 % CO in NH skupin prostih. Prav tako je drugačna porazdelitev konformacij teh prostih skupin. Znatno se poveča delež β-konformacije (19 %) in α_R-konformacije (14 %), zmanjša pa delež PP_{II} (8 %). Razlike so majhne, vendar večje, kot je zanesljivost metode. V amidnem II območju poleg ostalih trakov najdemo tudi komponenti, značilni za C_7 konformacijo, tj. konformacijo z eno intramolekularno H-vezjo. Delež te konformacije je znatno manjši kot v primeru Ala dipeptida, kar je razumljivo, saj imamo sedaj dva aminokislinska ostanka. Asignacija traku pri 1248 cm^{-1} ni znana. Kandidatov zanjo je kar nekaj. Od konformacije z dvojno intramolekularno H-vezjo (C_{10}, β-zavoj) do ene izmed oblik dimeriziranih molekul. Trakova, ki smo ju asignirali kot dimerni obliki Ala_2, sta pri najnižjih valovnih številih podobna kot v primeru dipeptida. Predstavljata ~20 % celotne populacije.

V območju NH valenčnega nihanja so »proste« NH skupine pri rahlo spremenjenih frekvencah. Najvišji trak se nahaja pri 3560 cm^{-1}. Sledi skupina trakov okrog 3470 cm^{-1}. Območje prostih NH valenčnih nihanj končuje trak pri 3427 cm^{-1}. V nižje frekvenčnem delu, značilnem za H-vezane NH skupine, zasledimo dva močna trakova, in sicer zelo širokega pri 3297 cm^{-1} in ožjega pri 3284 cm^{-1}. Tudi glavna trakova v tem delu spektra frekvenčno ne ustrezata popolnoma podobnim trakovom v spektru Ala dipeptida.

3.4.3 Ala_3 peptid

Infrardeči matrični spekter Ala_3 peptida je najkompleksnejši (Slika 3.9) predvsem zaradi velikega konformacijskega prostora. Analizirali smo ga podobno kot predhodna dva. Delež prostih skupin je ~40 %. Znatno se poveča delež β-konformacije (28 %) in zmanjša delež intramolekularnih H-vezi (~26 %). Populacija agregiranih monomernih oblik (30 %) se približa vrednosti za Ala dipeptid.

Za razliko od amidnih delov spektra je območje NH valenčnega nihanja (Slika 3.9 A) precej podobno spektru Ala_2 peptida (Slika 3.8 A). To velja tako za trakove prostih kot vezanih NH skupin.

3.5 Zaključki

Analiza »najpreprostejših« peptidov je pokazala uporabno vrednost predvsem dveh območij v njihovih infrardečih spektrih. To sta amidno I in amidno III območje. Kljub ozkim komponentam v analiziranih delih spektra smo morali uporabiti program za dekompozicijo spektralnih trakov. Pokazali smo, da je v inertni okolici v vseh monomernih sistemih C_7 prevladujoča konformacija. Rezulat je smiseln, saj je to edina konformacija, ki je stabilizirana s H-vezjo. Poleg C_7 konformacije smo določili tudi deleže ostalih treh, in sicer PP_{II}, β in α-konformacije. Populacije posameznih konformer so odvisne od dolžine peptida. Predstavljena raziskava matrično izoliranih krajših peptidov dopolnjuje znanje okoli strukturnih raziskav peptidov in proteinov z IR spektroskopijo, saj potrjuje hipotezo, da so modelni trakovi, ki se uporabljajo predvsem pri konformacijski analizi amidnega III traku, neodvisni od okolice in tako uporabni za določevanje populacij konformer v vseh sistemih ne glede na izbor topila. Prav tako lahko uporabimo to območje za določevanje agregacije peptidov, kar nam bo omogočalo spremljanje agregacije tudi v večjih sistemih, kot so proteini. Čeprav predstavlja C_7 energijsko najugodnejšo populacijo, smo pokazali, da peptidi zasedajo tudi ostale tri omenjene strukture, seveda s precej nižjimi deleži. Konformacijska variabilnost se izraža tudi v raznolikosti jakosti H-vezi. Analiza NH valenčnega območja pokaže na kar nekaj različnih populacij NH skupin, ki sodelujejo v H-vezeh z različno jakostjo. Zanimiva je medsebojna primerjava modelnih komponent. Izkaže se, da sta si spektra Ala_2 in Ala_3 v tem delu precej podobna, kar nakazuje, da imamo tudi precej podobno strukturo H-vezi glede na njihovo jakost. Odstopa spekter Ala dipeptida, kjer je edina možna intramolekularna H-vez v C_7 (γ-zavoj). Pri večanju peptida (Ala_2, Ala_3) postanejo možne tudi konformacije z dvojno intramolekularno vezjo (C_{10}, β-zavoj), kar seveda pomeni povsem novo porazdelitev H-vezi glede na njihovo jakost.

Poglavje 4

Hidratacija proteinskih filmov

4.1 Uvod

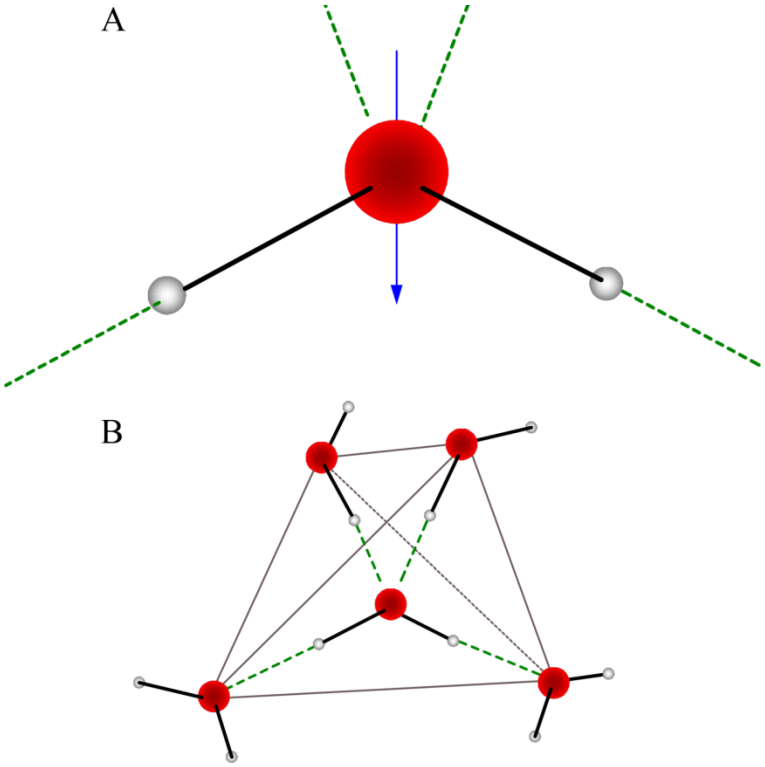
Voda je bistven deležnik pri stabilnosti, dinamiki, strukturi in funkciji proteinov ter drugih biomolekul. Gledano z vidika termodinamike spremembe v vodnih okoljih vplivajo na stabilnost biomolekul. S strukturnega vidika molekule vode kemično sodelujejo pri katalitičnih lastnostih proteinov in nukleinskih kislin in fizično v kolapsu polipeptidne verige v procesu zvitja [140]. Voda posreduje pri vzpostavljanju H-vezi v kompleksnih strukturah. Majhne vodne molekule preko interakcij s polipeptidnimi verigami narekujejo dinamiko proteinskih makromolekul.

Hidratacija je gonilna sila procesa proteinskega zvitja [6]. Da so biomolekule zmožne prevzeti svoje biološke funkcije, morajo zavzeti terciarno strukturo oz. tako imenovano nativno stanje. Globularni proteini so topni v vodi in se pod ustreznimi pogoji sami zvijejo do ustrezne nativne oblike. Nativna struktura je konformacijsko stanje, v katerem je prosta Gibbsova energija najnižja [1]. V nekaterih primerih je z namenom presežka kinetičnih pasti proces proteinskega zvitja kataliziran s proteini, ki jih imenujemo šaperoni [141]. Stabilnost in dinamika proteinov sta strogo povezani z lastnostmi vodnih raztopin [142-144]. V *in vitro* pogojih je stabilnost proteinov odvisna od določenih ionov, njihove koncentracije, majhnih kosolventov, t. i. osmolitov, sladkorjev itn. Stabilnost proteinov je nadalje odvisna od termodinamskih spremenljivk, kot sta temperatura in tlak [144]. Hidrofobne interakcije poleg H-vezi veljajo za gonilno silo proteinskega zvitja [6, 145]. Polipeptidna veriga v procesu zvitja sledi najmanj razgibani energijski pokrajini (Slika 1.1), preko katere se zvije v relativno kratki časovni skali, običajno v velikostnem redu od mikro- do milisekund [146, 147]. Omrežje H-vezi stabilizira sekundarno in terciarno proteinsko zvitje in vodi polipeptidno verigo preko procesa proteinskega zvitja do nativne strukture [13, 148]. Večina našega razumevanja procesa proteinskega zvitja izhaja iz študij, opravljenih na primeru modelnih sistemov, ki vključujejo peptide kot tudi večje proteinske strukture.

4.1.1 Voda

Molekula vode, H_2O, je ena izmed najenostavnejših in najstabilnejših molekul, ki pogosto nastopa kot produkt pri številnih kemijskih reakcijah. Je tudi zelo poznana molekula, edinstvena komponenta tekoče vode, ki jo v vsakodnevnem življenju pijemo in uporabljamo na številne načine. Vse to namiguje, da bi molekula vode morala biti dobro poznana in bolj kot ne inertna molekula. Naslednji odstavki bodo to domnevo prikazali kot nezanesljivo [149].

Molekula vode je polarna molekula z električnim dipolnim momentom, ki znaša 1,83 D in je usmerjen vzdolž osi simetrije. H-O-H kot znaša 104,5°, razdalja med kisikovim in vodikovim atomom pa 0,96 Å. Molekula vode ima za tvorbo H-vezi dve akceptorski in dve donorski mesti. Elektronsko strukturo kisikovega atoma sestavljata dve σ orbitali, ki tvorita dve kovalentni OH vezi in dve nevezni orbitali, od katerih sta obe zasedeni z dvema prostima elektronskima paroma. Štiri orbitale na kisikovem atomu so med seboj razporejene v obliki tetraedra (Slika 4.1). Dve OH skupini predstavljata donorja H-vezi, prosta elektronska para pa akceptorja H-vezi. Ta diskretna in komaj opazna lastnost se na prvi pogled zdi vsakdanja. V resnici pa molekulam vode ta struktura daje izjemne lastnosti in daljnosežne posledice, med katerimi izstopa ta, da življenje, kot ga poznamo, brez omenjenih lastnosti vodnih molekul ne bi obstajalo.



Slika 4.1: Shematična predstavitev molekule vode (A) in njena tetrahedralna ureditev v ledu (B). Molekula vode za tvorbo H-vezi poseduje dve donorski in dve akceptorski mesti.

Vsaka molekula vode lahko tvori štiri H-vezi. Kot vseprisotna molekula v bioloških sistemih lahko zavzame ustrezno konformacijo, ki ji omogoča tvorbo H-vezi z vsako sosednjo molekulo, z donorsko ali akceptorsko skupino. Molekule vode imajo edinstveno zmožnost vzpostavitve gostega omrežja H-vezi, ki predstavlja mozaik številnih, blizu ležečih in medsebojno interagirajočih H-vezi. Takšno omrežje H-vezi pri sobnih temperaturah zagotavlja stabilnost številnim pomembnim biološkim strukturam. Takšno omrežje omehča številne sterične ovire, ki nastopajo v bioloških procesih. Z današnjim razumevanjem omrežja H-vezi, ki ga lahko tvorijo le molekule vode, se zdi, da je prav to omrežje osnova za biološke reakcije in njihov uspešen razvoj.

4.1.1.1 Molekule vode in vodikove vezi z makromolekulami

Dolgo časa vezavi molekul vode z makromolekulami niso posvečali posebne pozornosti, predvsem zaradi mnenja, da je molekula vode inertna, brez posebnega vpliva na makromolekule [149]. John Maddox je takšno pasivnost poimenoval »škandal«, kar niti ni pretirano, če upoštevamo, da je voda prisotna tako rekoč vsepovsod in da še zdaleč ni inertna [150].

Zaradi svoje majhnosti in sebi lastne strukture (Poglavje 4.1.1) je molekula vode zelo mobilna, kar ji omogoča, da lahko vzpostavi H-vezi s hidrofilnimi skupinami, tako na površini kot tudi v notranjosti makromolekul. Preko H-vezi vezane molekule vode lahko močno spremenijo fizikalne lastnosti vezane makromolekule. Omrežje H-vezi se v makromolekulah lahko vzpostavi v različnih oblikah, kar se odraža z različnimi posledicami na makroskopskem nivoju. Število molekul vode, ki se preko H-vezi povežejo z makromolekulami, je zelo različno, od ene same, pa do velikega števila molekul, ki se lahko razporedijo okoli celotne makromolekule in na tak način tvorijo hidratacijski ovoj.

Razširjeno in gosto omrežje H-vezi, ki ga v makromolekulah vzpostavijo molekule vode, zagotavlja stabilnost nekaterim makromolekulam, predvsem biomakromolekulam. Proteini so takšne biomakromolekule, katerih sekundarna struktura je stabilizirana s H-vezmi. To omrežje H-vezi ni rigidna, temveč zelo dinamična struktura [151]. Dinamična struktura je posledica številnih iso energijskih stanj, ki jih lahko zavzamejo molekule vode. Zdi se, da strukturna prožnost ni edina posledica omrežja H-vezi. V zadnjem času odkrivamo še druge, morda celo bolj pomembne vloge molekul vode znotraj bioloških makromolekul. Ob odsotnosti vode se reaktivnost makromolekul ustavi ali je vsaj močno oslabljena. To lastnost opazimo tudi pri proteinih, predvsem pri razredu proteinov, ki ga imenujemo encimi. Aktivnost proteinov je močno oslabljena tudi v primeru, kadar jih prenesemo v druga organska topila, kar nakazuje, da molekule vode aktivno sodelujejo v bioloških reakcijah. Nobeno od ostalih organskih topil ne more razviti takšnega 3D omrežja H-vezi, kakršnega lahko vzpostavijo molekule vode.

Tudi ob zamenjavi molekul vode z najbolj podobnimi, kot so HDO ali D_2O, bi življenje, kot ga poznamo, težko obstajalo. Le nekaj zelo primitivnih organizmov, kot so nekatere alge, lahko razvije določeno stopnjo življenja, kadar so izpostavljeni D_2O. Njihov metabolizem je v tem primeru oslabljen do takšne mere, kot bi bil v običajnem vodnem mediju pri temperaturah, nižjih od 0 °C. Ker HDO in D_2O lahko vzpostavita enako omrežje H-vezi kot H_2O, lahko predpostavljamo, da H-vezi, ki jih vzpostavijo molekule vode, niso pomembne le za prožnost makromolekul, saj v nasprotnem primeru zamenjava H_2O medija s HDO ali D_2O ne bi imela tako velikega vpliva. Vse tri molekule imajo zelo podobne strukturne in termodinamske lastnosti. Razlike med običajno in težko vodo nastopijo v njihovih bioloških lastnostih. Bistvena razlika med molekulami je ta, da vodne molekule aktivno sodelujejo v centralnem mehanizmu bioloških reakcij, tj. prenosu vodikovih atomov. H in D atoma se bistveno razlikujeta v dinamiki prenosa [97, 152].

4.1.2 Postopna hidratacija proteinov

Spektroskopski podatki, pridobljeni pri preučevanju hidratacije bioloških makromolekul, so dolgo časa podajali zgolj kvalitativne informacije. Spodaj opisana metoda pa je bila zmožna zagotoviti tudi kvantitativne podatke.

Študija hidratacije makromolekul predstavlja opazovanje omrežja H-vezi, ki se vzpostavi znotraj makromolekule, ko ta preide iz suhega stanja do polno hidratiranega stanja. Eksperimentalno lahko ta prehod opazujemo, če povečujemo delež vodne pare v

okolici hidratirajoče makromolekule. Začetno stanje je popolnoma suha atmosfera v ravnotežju s suhim vzorcem. Končno stanje predstavlja atmosfera s 100 % vlažnostjo, tj. atmosfera, nasičena z vodno paro, ki je v ravnotežju s tekočo vodo v zadrževalnem rezervoarju. Prednost takšnega načina hidratacije je v definirani stopnji hidratacije s točnimi vrednostmi, ki jih imenujemo relativna vlažnost. Poleg najpogostejše metode za preučevanje hidratacijskega mehanizma, tj. termogravimetrije [153], je v zadnjem času nase opozorila zelo natančna IR spektrosopija. Ta metoda je natančneje opisana v Poglavju 4 (Materiali in metode).

4.1.2.1 Konfiguracijska interakcija molekul vode

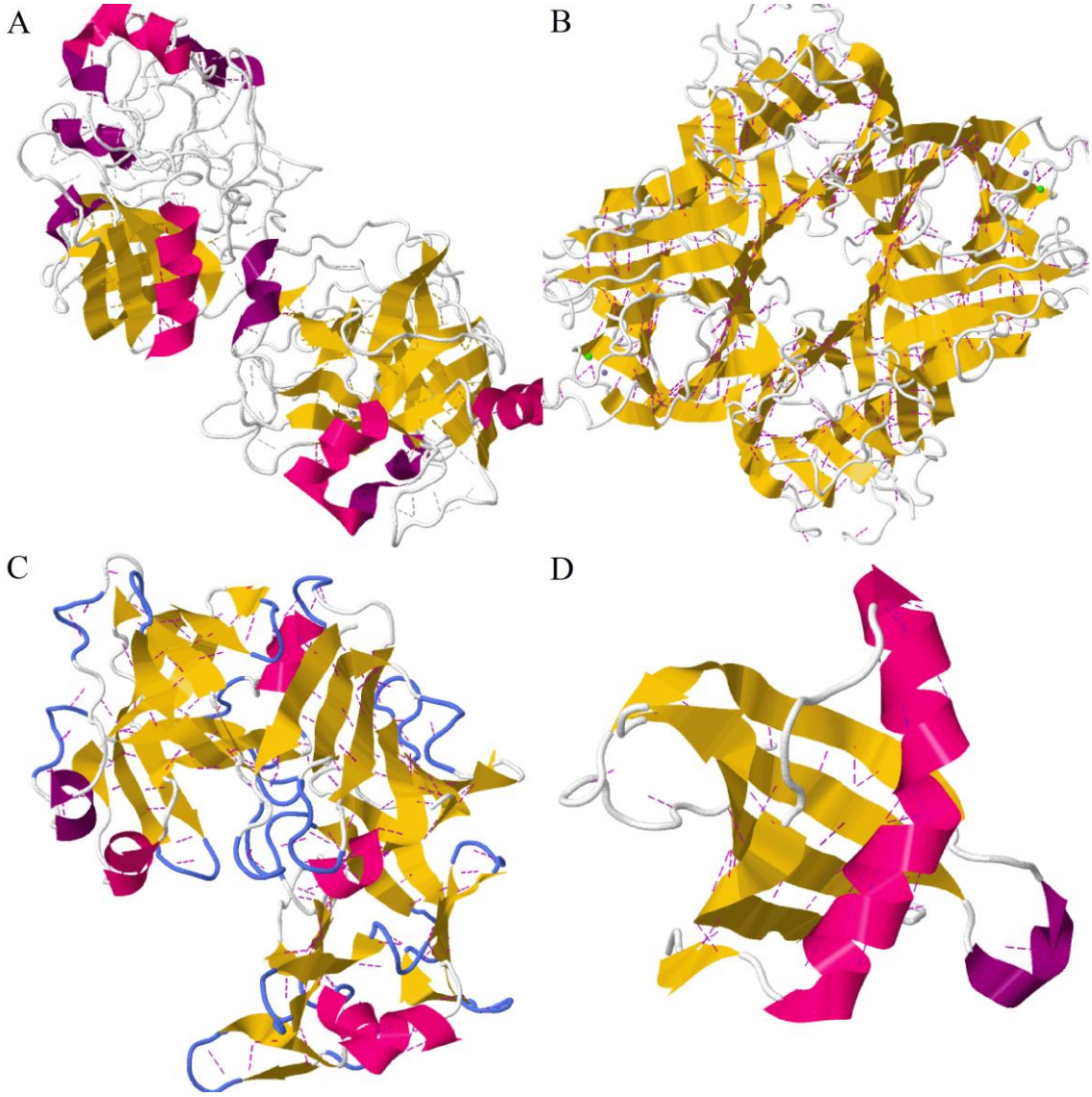
Svojevrstne lastnosti molekul vode izhajajo tudi iz dejstva, da je število H vezi, ki jih lahko tvorijo, enako številu kovalentnih vezi. Ta lastnost se najlažje izrazi v ledu, kjer se molekule vode razporedijo tako, da lahko vsaka molekula tvori dve H-vezi s sosednjima molekulama, hkrati pa preko dveh neveznih elektronskih parov sprejme dve H-vezi. Na tak način so štiri sosednje molekule razporejene v obliki tetratedra, kar je možno zaradi majhne distorcije H-vezi: Kot med H-O-H vezmi v običajnem ledu znaša 106°, medtem ko je vrednost istega kota v plinastem stanju 104.5°. Kot 106° v ledu omogoča tetraedrično razporeditev kisikovih atomov pod kotom 109,5°.

V povprečju je omrežje H-vezi v tekoči vodi enako tistemu v ledu. Prehod iz trdnega v tekoče stanje se ne zgodi zaradi porušitve H-vezi, kot je bilo dolgo časa mišljeno, temveč zaradi indukcije rotacije (libracije) posameznih vodnih molekul. Libracije so izvor fleksibilnosti omrežja H-vezi v tekoči vodi. Libracije so prisotne tudi v ledu, vendar imajo v primerjavo s tistimi v tekoči vodi majhne amplitude, ki ne porušijo kristalne strukture ledu. Tetrahedralna ureditev molekul vode s v ledu razteza v neskončnost, medtem ko so fluktacije okoli povprečne ckonfiguracije v tekoči vodi večje. Pri razdaljah večjih od 15 – 20 Å se spomin na tetrahedralno ureditev v tekoči vodi izgubi [97].

Omrežje H-vezi v ledu in tekoči vodi je zelo gosto in se razteza preko širokega območja. Vse molekule vode so del takšnega omrežja in skoraj vse med njimi so tetra koordinirane. To ne velja za molekule vode v makromolekulah, kjer je možno več različnih razporeditev glede na razporeditev hidrofilnih skupin na makromolekuli, kot tudi od stopnje hidratacije makromolekule, tj. števila molekul vode, ki so vezane na makromolekulo.

4.1.3 Modelni proteini za študij hidratacije

Konkanavalin A je lektinski protein, ki je bil prvič izoliran iz stročnice *Canavalia ensiformis*. Specifično se veže na določene strukture v različnih sladkorjih, glikoproteinih in glikolipidih, predvsem na D-glikozilne ali D-manozilne ostanke [154]. Konkanavalin A sestavlja 237 aminokislinskih ostankov, molekulska masa verige znaša 26.500 Da [155]. Približno 46 % sekundarne strukture predstavljata antiparalelni β-ravnini, med katerima je ena sestavljena iz šestih, druga pa iz sedmih β-trakov [156]. V sekundarnem zvitju najdemo tudi manjša območja z α-vijačnico [157]. Več informacij o konkanavalinu A se nahaja v Poglavju 5.1.3.



Slika 4.2: Tridimenzionalna predstavitev modelnih proteinov, na katerih smo študirali vpliv stopnje hidratacije na njihovo sekundarno strukturo. (A) Kimotripsenogen [158], (B) konkanavalin A (tetramer) [159], (C) pepsin [160] in (D) stefin B [161].

Kimotripsinogen je proteolitični encim trebušne slinavke in prekurzor (cimogen) prebavnega encima kimotripsina. Goveji kimotripsinogen A (v nadaljevanju komotripsinogen) sestavlja 245 aminokislinskih ostankov, povezanih v eno samo polipeptidno verigo, navzkrižno povezano s petimi disulfidnimi kovalentnimi vezmi [162]. Sedem vijačnic (35 AK) predstavlja 14 % celotnega sekundarnega zvitja. Beta sekundarno zvitje sestavlja 21 trakov (86 AK), tj. 35 % celotnega zvitja [158]. Tako kimotripsinogen kot tudi njegovi prekurzorji tvorijo agregate [163-165].

Proteaza pepsin je eden glavnih prebavnih encimov. Kot prekurzor pepsinogen se izloča iz žlez v steni želodca. Primarno strukturo pepsina gradi 326 AK ostankov. Sekundarno zvitje sestavlja 10 vijačnih enot (50 AK), tj. 15 % strukture ter 32 β-trakov (150 AK), kar predstavlja 46 % celotnega sekundarnega zvitja [160]. Pepsin pri nevtralni pH vrednosti in sobni temperaturi tvori amiloidne fibrile [166].

Tabela 4.1: Pregled deležev sekundarnih elementov v nativni strukturi modelnih proteinov: kimotripsinogena [158], konkanavalina A [157], pepsina [160] in stefina B [167]. Ramachandranovi diagrami so predstavljeni v Dodatku 3.

	Število AK	Delež α-strukture (%)	Delež β-strukture (%)	Preostali delež (%)
Kimotripsinogen	245	14	35	51
Konkanavalin A	237	0	60	40
Pepsin	326	15	46	39
Stefin B	98	19	39	42

Goveji serumski protein (BSA) je globularni protein in je najštevilčnejši predstavnik med serumskimi proteini. Gradi ga 583 AK ostankov, ki se v sekundarnem zvitju skoraj v večini zvijejo v α-vijačno strukturo (74 %, tj. 433 AK) [168]. K rigidnosti globularne in vijačne strukture pripomore 17 disulfidnih vezi. BSA deli 76 % sekvenčne homologije s človeškim serumskim albuminom (HSE). Poleg tega da se serumske albumine povezuje s procesom agregacije [169, 170], se jim pripisuje tudi aktivnost, podobna šaperonskim molekulam. To pomeni, da naj bi serumski albumini preprečevali napačno zvitje proteinov in njihovo agregacijo [171].

Stefin B (tudi cistatin B) pripada družini proteinov z α/β sekundarno strukturo. Stefin B sestavlja 98 aminokislin. Tri α-vijačne strukture predstavljajo 19 % celotnega sekundarnega zvitja, medtem ko 39 AK ostankov sestavlja 6 β-trakov, kar predstavlja 39 % sekundarnega zvitja [167]. Več podatkov o stefinu B se nahaja v Poglavju 5.1.4.

4.2 Materiali in metode

4.2.1 Merilni instrumenti

V Tabeli 4.2 so navedeni oprema in instrumenti, ki smo jih uporabili pri študiju vpliva stopnje hidratacije na sekundarno proteinsko zvitje. Opisana analiza je bila mogoča zaradi odlično zamišljene hidratacijske aparature, sklopljene s transmisijsko celico. Obe ključni komponenti sta bili izdelani v Laboratoriju za strukturo biomolekul na Kemijskem inštitutu.

Tabela 4.2: Seznam opreme s pripadajočimi modelnimi oznakami in proizvajalci.

Oprema	Model in proizvajalec
Nosilna stekelca za pripravo proteinskih filmov	Harrick, ZnSe 13×2
Tehtnica	Mettler Toledo, AX 205 Delta Range
Sušilnik, v katerem smo sušili proteinske filme	Binder, FP 115
Pipete z nastavki	Biohit
FTIR spektrometer	Perkin - Elmer 2000 FT-IR in Bruker Vertex 80
Stresalnik	Ika, MS 3 basic
Program za merjenje in obdelavo IR spektrov	Perkin Elmerjev Spectrum in Brukerjev Opus
Celica za merjenje transmisijskih spektrov	Izdelana v domačem laboratoriju
Aparatura za hidratacijo	Izdelana v domačem laboratoriju

4.2.2 Priprava proteinskih filmov

Liofiliziran vzorec konkanavalina A (C2010), izoliran iz *Canavalia ensiformis*, smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich. Pri pripravi proteinskih filmov smo 5 mg vzorca raztopili v 500 µl deionizirane vode. Tako raztopljen vzorec smo s kapalko nanesli na ZnSe ploščice, ki se uporabljajo pri merjenju valovnih dolžin, višjih od 500 cm^{-1}. Vzorec smo 30 min sušili v sušilniku pri 40 °C.

Na enak način smo pripravili tudi proteinske filme kimotripsinogena (C4879), pepsina (P6887) in stefina B. Liofilizirana vzorca kimotripsinogena in pepsina smo prav tako kupili pri podjetju Sigma-Aldrich, medtem ko so nam vzorec stefina B, raztopljenega v 0,05 M vodni raztopini NaCl, izolirali na oddelku Biokemija, molekularna in strukturna biokemija Inštituta ‘‘Jožef Stefan’’ [172, 173]. Raztopino stefina B smo liofilizirali na Kemijskem inštitutu.

4.2.3 Meritve FTIR spektrov

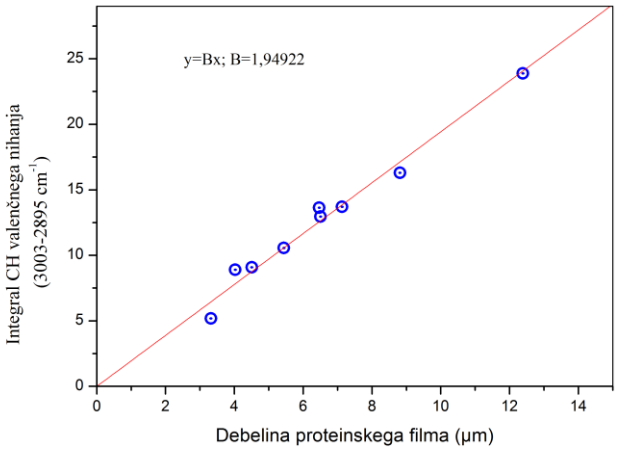
Meritve FTIR spektrov za primer konkanavalina A, kimotripsinogena in pepsina smo opravili na Perkin Elmer System 2000 FT-IR spektrometru z DTGS detektorjem. Končni spekter je bil povprečen iz 32 interferogramov. Vsi spektri so bili posneti v območju med 4000 cm^{-1} in 500 cm^{-1}.

FTIR spektre za primer stefina B smo posneli na Brukerjevem FT-IR spektrometru Vertex 80 z DTGS detektorjem. Končni spekter smo povprečili iz 128 interferogramov. Spektri so bili posneti v območju med 4000 cm^{-1} in 500 cm^{-1}. Spektralna resolucija je bila v vseh primerih 4 cm^{-1}.

4.2.4 Izračun debelin proteinskih filmov

Za določitev debeline naših proteinskih filmov smo uporabili umeritveno krivuljo, ki je bila pripravljena na podlagi različno debelih proteinskih filmov govejega serumskega albumina (Slika 4.3). Formula tako pripravljene umeritvene premice je naslednja:

$$y = 1{,}94922x \qquad \text{Enačba 4.1}$$



Slika 4.3: Umeritvena krivulja za določevanje debeline proteinskih filmov, ki je bila pripravljena na podlagi različno debelih filmov govejega serumskega albumina. Na sliki je prikazana odvisnost med površino traku, ki pripada CH valenčnemu nihanju (3003 cm^{-1} – 2895 cm^{-1}), in debelino proteinskega filma BSA [41, 59].

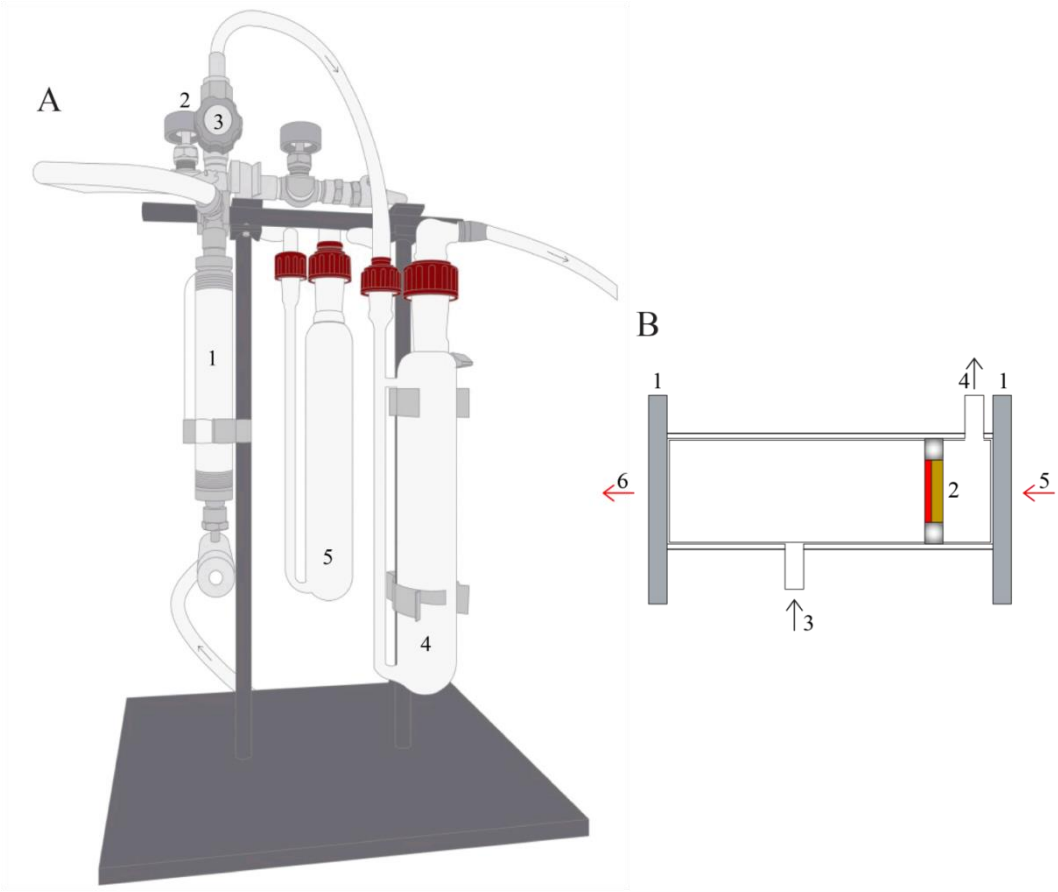
Debelino proteinskih filmov, iz katerih je bila pripravljena zgornja umeritvena krivulja (Slika 4.3), smo izračunali iz frekvence periodičnega nihanja, ki nastane zaradi interference med prepuščenim in dvakrat odbitim infrardečim žarkom. Najprej smo posneli FTIR spektre različno debelih proteinskih filmov. Nato smo s teflonsko spatulo odstranili proteinski film na sredini ZnSe okenca. Na tako pripravljeno ploščico smo položili novo ZnSe okence ter obe skupaj vpeli v transmisijsko celico (Dodatek 4). Posneli smo spekter periodičnega nihanja. Frekvenca periodičnega nihanja je obratno sorazmerna dvokratni debelini proteinskega filma.

$$d = \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{{}_{\Delta}\nu} \qquad \text{Enačba 4.2}$$

Umeritvena krivulja je pripravljena na podlagi integralnih vrednosti traku, ki pripada CH nihanjem v spektralnem območju med 3003 cm^{-1} in 2895 cm^{-1}. Ta nihanja niso odvisna od stopnje hidratiranosti proteinskega filma, zato je pripadajoči trak primeren marker za izračun debelin hidratiranih proteinskih filmov. Ker se aminokislinska sestava med proteini razlikuje, smo vpeljali korekcijski faktor, ki je upošteval delež CH skupin in delež prolinskih aminokislinskih ostankov v posameznem modelnem proteinu. Deleže smo izračunali s spletnim orodjem ProtParam [174].

4.2.5 Hidratacija proteinskih filmov

Za spremljanje sprememb med hidratacijo vzorcev smo uporabili proteinske filme, debele med 0,34 in 0,96 µm (Tabela 4.5). Najprej smo posneli ozadje s prazno transmisijsko celico in ZnSe stekelcem brez proteinskega filma. Nato smo v celico vpeli ZnSe stekelce, na katerem je bil pripravljen proteinski film. Vzorec smo najprej hidratirali, in sicer tako, da smo celico 12 h prepihovali s suhim dušikom, ki je predhodno prečkal rezervoar tekoče, deionizirane vode. Polno hidratiran vzorec smo nato sušili in med procesom sušenja snemali spektre proteinskega filma ob različni stopnji hidratacije. V začetni fazi smo vzorce sušili brez prepihovanja transmisijske celice s suhim dušikom, v naslednji fazi pa smo celico začeli zmerno prepihovati. Intenziteto prepihovanja smo s časom povečali. Po 20 h sušenja predhodno hidratiranega proteinskega filma smo posneli zadnji spekter, v tem primeru spekter popolnoma suhega proteinskega filma. Enak postopek smo uporabili pri vseh modelnih proteinih, poleg konkanavalina A še pri kimotripsinogenu, pepsinu in stefinu B. Aparatura za vlaženje suhega dušika je prikazana na Sliki 4.4.



Slika 4.4: (A) Shema hidratacijske aparature, s katero smo vlažili suhi dušik. Z navlaženim dušikom smo prepihovali transmisijsko celico, v kateri se je nahajal proteinski film. (1) Merilnik pretoka; (2) Mešalni ventil; (3) Zaporni ventil; (4) Zbiralnik z deionizirano vodo; (5) Zbiralnik s težko vodo. (B) Shema hidratacijske celice. (1) KBr okenci; (2) ZnSe okence (rumena barva) na katero je nanašen proteinski film (rdeča barva); (3) Vstop suhega dušika, ki je predhodno navlažen v hidratacijski aparaturi; (4) Izstop suhega dušika; (5) Vhod IR žarka; (6) Izstop IR žarka.

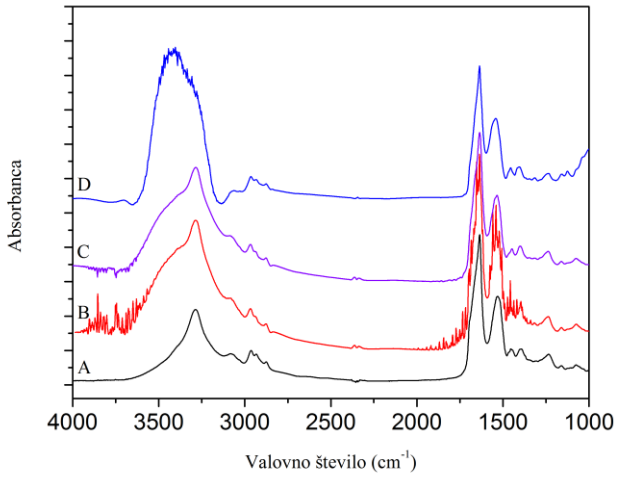
Pridobljeno serijo spektrov, s katero smo zajeli povsem hidratirano stanje proteinskih filmov in vmesna stanja do popolnoma osušenih proteinskih filmov, smo uporabili pri natančni analizi vpliva hidratacije na strukturo proteinskega zvitja, predvsem vpliva na njegovo sekundarno zvitje.

Glavno orodje pri preučevanju strukturnih sprememb, ki smo jim želeli slediti med procesom hidratacije, je predstavljala diferenčna spektroskopija, saj izniči trakove, ki so od procesa hidratacije neodvisni [175]. Po izračunu diferenčnih spektrov nam v njih ostanejo le trakovi, ki opišejo hidratacijsko odvisne strukturne spremembe. Odštevalni faktor smo določili na podlagi nihanj trakov CH, CH_2 in CH_3 skupin na aminokislinskih molekulskih skupinah, saj so te vibracije neodvisne od opazovanih konformacijskih sprememb. Strukturno odvisni proteinski trakovi, kot so amid A, amid I, amid II in amid III, so neodvisni od trakov, na podlagi katerih smo določili odštevalni faktor pri izračunu diferenčnih spektrov.

4.3 Rezultati

4.3.1 Določitev sekundarne strukture

Najbolj reprezentativni spektri iz serije spektrov, ki smo jih posneli med postopno hidratacijo proteinskega filma konkanavalina A, so prikazani na Sliki 4.5. Spektri se med seboj razlikujejo v količini vode, ki je vezana na sam protein. Spekter črne barve predstavlja posušen proteinski film, medtem ko je bil spekter rdeče barve posnet ob polni hidratiranosti. Vijolični spekter smo izračunali tako, da smo od rdečega spektra odšteli vodno paro, ki se nahaja v hidratacijski celici skupaj s proteinskim filmom. Na tak način smo izločili strukturne informacije, ki se ne dogajajo na samem proteinskem filmu. Z modro barvo je predstavljen spekter, posnet za primer raztopine konkanavalina A, od katerega smo že odšteli vso vodo, ki ni vezana na sam protein.



Slika 4.5: Predstavitveni spektri konkanavalina A. (A) Posušen proteinski film; (B) Polno hidratiran proteinski film; (C) Polno hidratiran proteinski film po tem, ko smo odšteli vodno paro; (D) Spekter konkanavalin A v vodni raztopini po odštevanju čiste vode (angl. bulk water).

Najprej so nas zanimale od stopnje hidratacije odvisne konformacijske spremembe v konkanavalinu A. Zaradi močnega prekrivanja trakov, ki izvirajo iz različnih sekundarnih struktur, smo združili analizo v amidnem I in v amidnem III traku. Tehnike in aplikacije za izboljšanje spektralne resolucije, kot so metoda modelnih trakov, Fourierjeva dekonvolucija in drugi odvod, znatno zmanjšajo razmerje med signalom in šumom (Slika 5.8). Vzporedna obravnava dveh neodvisnih spektralnih območij signifikantno izboljša natančnost napovedovanja sekundarne strukture in posledično morebitnih konformacijskih sprememb. Število modelnih trakov, njihovo približno lokacijo in relativno intenziteto v amidni I in amidni III regiji smo določili s Fourierjevo dekonvolucijo in metodo odvajanja spektrov. Rezultati so predstavljeni v Tabeli 4.3.

Tabela 4.3: Valovna števila modelnih trakov v amidni I in amidni III regiji spektra konkanavalina A, ki smo jih pridobili iz dekonvoliranega spektra, drugega odvoda in metode samousklajevanja trakov.

	Dekonvolucija	**Drugi odvod**	**Samousklajevanje**	**Asignacija traku**
Amid I	1731	1732	1730	COOH stranskih verig
	1696	1696	1696	β-ravnina
	1664	1666	1665	Neurejena struktura
	-	-	1640	δH_2O
	1634	1633	1634	β-ravnina
Amid III	1310	1308	1310	PP_{II} konformacija
	1282	1284	1282	α-konformacija
	1262	1263	1262	β-konformacija
	1232	1230	1232	β-ravnina

Asignacija dvojnega traku (dubleta) v amidni I regiji ni zahtevna. Trakova pripadata valenčnim nihanjem C=O skupin v β-ravninah. Asignacija preostalih trakov v amidni I regiji je zahtevnejša. COOH valenčno nihanje stranskih skupin najdemo pri valovnem številu okoli 1730 cm^{-1}. Preostala trakova se nahajata pri približno 1665 cm^{-1} in 1640 cm^{-1}. Asignacija traku pri 1665 cm^{-1} ni enoznačna. Trak lahko pripada α-vijačnici kot tudi PP_{II} vijačnici ali neurejeni konformaciji. Razlog za oteženo asignacijo izhaja iz močnega prekrivanja trakov, zaradi česar je hkratna analiza drugega, neodvisnega spektralnega območja toliko pomembnejša. Manj problematično je ovrednotenje traku pri 1640 cm^{-1}, ki pripada deformacijskim nihanjem hidratirajočih molekul vode (δH_2O).

Zdi se, da je struktura amidnega III traku neskladna s strukturo amidnega I traku. Število modelnih trakov v amidnem I območju se razlikuje od števila modelnih trakov v amidnem III območju. Nedavne konformacijske študije na kratkih homopeptidih [61, 133] so pokazale, da amidno III področje izkazuje podrobnejše informacije o konformaciji polipeptidne verige. Trakovi v amidni III regiji ne izvirajo le iz različnih sekundarnih struktur glavne polipeptidne verige, temveč tudi iz različne porazdelitve dihedralnih kotov Φ in Ψ v posameznih aminokislinskih ostankih.

Najbolj razločen trak v amidni III regiji se nahaja pri 1230 cm^{-1} in ustreza karakterističnim vibracijam β-ravnine. Pojavnost in relativna intenziteta tega traku ustreza trakovoma, ki pripadata β-ravninam v amidni I regiji. Takšna določitev sovpada z rezultati, pridobljenimi z rentgensko difrakcijo [176]. Sekundarna struktura konkanavalina A je v večini sestavljena iz β-sekundarnega zvitja. Preostale aminokisline, ki niso del β-struktur, gradijo zavoje, ki med seboj povezujejo sosednje β-ravnine. V tem dejstvu lahko najdemo razlog, zakaj trak pri 1665 cm^{-1} ne more pripadati α in/ali PP_{II} vijačnicam. Tako moramo izvor tega traku v amidni I regiji in preostalih trakov v amidni III regiji (pri 1310 cm^{-1}, 1282 cm^{-1} in 1262 cm^{-1}) iskati v aminokislinah, ki povezujejo predele v β-sekundarnem zvitju. Za asignacijo modelnih trakov v amidni III regiji smo uporabili podatke, pridobljene pri študiju konformacijskih lastnosti dipeptidov [61, 62, 177] in poli-L-lizina v vodni raztopini [20]. Omenjene študije korelirajo frekvenčno odvisnost amidnih III trakov glede na konformacijo posameznih aminokislinskih ostankov z ozirom na njihove dihedralne kote Φ in Ψ. Natančna analiza spektra dipeptidov namiguje, da tri komponente amidnega III traku z valovnimi števili 1310 cm^{-1}, 1282 cm^{-1} in 1262 cm^{-1} pripadajo aminokislinskim komponentam z dihedralnimi koti Φ in Ψ, značilnimi za PP_{II}, α in β-konformacijsko območje Ramachandranovega diagrama. Na podlagi te asignacije smo trakove pri 1310 cm^{-1}, 1282 cm^{-1} in 1262 cm^{-1} dodelili PP_{II}, α in β-konformacijam aminokislinskih ostankov v predelih polipeptidne verige, ki povezujejo področja z β-ravninami. Trak v amidni I regiji, ki je komplementaren omenjenim trem v amidni III regiji, se nahaja pri 1665 cm^{-1}, kar zopet potrjuje domnevo, da je frekvenca

amidnega I traku v primeru različnih konformer posameznih aminokislinskih ostankov podobna. Frekvenčna odvisnost, opazna pri različnih sekundarnih strukturnih elementih, pa je tako posledica kooperativnega efekta, ko imamo zaporedje aminikoslinskih ostankov z isto konformacijo.

Opisano določitev modelnih trakov in njihove izračunane integralne intenzitete v amidni I in amidni III regiji lahko uporabimo pri spremljanju strukturnih sprememb, ki nastanejo kot posledica različne stopnje hidratiranosti proteinskega filma. Med seboj smo primerjali konformacije konkanavalina A v treh različnih hidratacijskih stanjih: v suhem proteinskem filmu, polno hidratiranem proteinskem filmu in vodni raztopini konkanavalina A. Spekter tako imenovanega suhega proteinskega filma smo posneli po 12-urnem prepihovanju s suhim dušikom pri sobni temperaturi. Kljub temu da tak film poimenujemo kot suh, je nanj še vedno vezanih nekaj molekul vode.

Spektri proteinskih filmov ne potrebujejo posebne spektralne obdelave in so bili pri nadaljnji analizi uporabljeni v obliki, kot so bili posneti. V nasprotnem primeru pa moramo spekter vodne raztopine konkanavalina A pred nadaljnjo analizo preračunati, saj smo v nasprotju s proteinskimi filmi, ki so bili posneti v transmisijski tehniki, spekter raztopine posneli v ATR tehniki. Spekter, posnet v ATR tehniki, ima poleg absorpcijskega spektra tudi nekaj refleksijskih lastnosti. Če želimo pridobiti spekter, primerljiv s tistimi, ki so bili posneti v transmisijski tehniki, ga moramo preračunati s Kramers-Krönigovo metodo [178]. Pred vsako spektralno obdelavo in analizo spektra raztopine konkanavalina A smo od njega odšteli spekter čiste vode.

Z metodo samousklajevanja modelnih trakov smo optimizirali modelne trakove na primeru popolnoma suhega proteinskega filma, polno hidratiranega proteinskega filma in za primer konkanavalina A, raztopljenega v vodi. Zastopanost posameznih konformacij smo izračunali na osnovi integralnih intenzitet pripadajočih modelnih trakov (Enačba 5.2). Dobljene vrednosti so zapisane v Tabeli 4.4.

Tabela 4.4: Izračunana porazdelitev sekundarnih struktur v konkanavalinu A na primeru posušenega, polno hidratiranega proteinskega filma, kot tudi konkanavalina A v vodni raztopini. Populacije posameznih konformer so izračunane na podlagi integralnih intenzitet pripadajočih modelnih trakov.

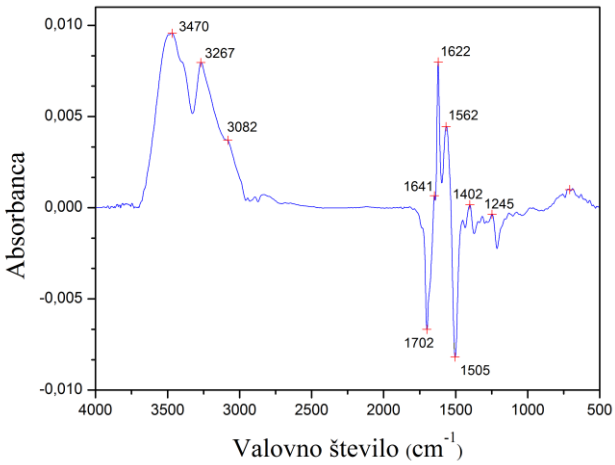
	Amid I		Amid III			
	β-ravnina	**ostalo**	**β-ravnina**	**β**	**α**	**PP_{II}**
Posušen film	53 %	47 %	52 %	16 %	24 %	9 %
Polno hidratiran film	55 %	45 %	56 %	11 %	24 %	9 %
Vodna raztopina	60 %	40 %	61 %	8 %	17 %	14 %

Iz podatkov, navedenih v Tabeli 4.4, je jasno, da dehidracija (sušenje) zmanjša populacijo β-ravnin iz 60 – 61 % v vodni raztopini konkanavalina A do 52 – 53 % v posušenem filmu konkanavalina A. Delež populacije β-ravnin, izračunan za primer vodne raztopine, se dobro sklada z rezultati, pridobljenimi z metodo sipanja rentgenskih žarkov na primeru kristalov konkanavalina A, tj. 61 – 64 % pri resoluciji 2,0 Å [157, 179, 180]. Na nasprotni strani dehidracija za enak delež zviša delež aminokislinskih ostankov v β-konformaciji. Na podlagi teh rezultatov bi lahko sklepali, da dehidracija prekine intermolekularne H-vezi, ki so značilne za β-ravnine. Zdi se, da aminokislinski ostanki, ki so bili ob polni hidratiranosti del β-ravnin, ob prekinitvi intermolekularnih vezi ostanejo v β-konformaciji (Φ in Ψ torzijska kota ostaneta enaka). Rezultati, pridobljeni z metodo samousklajevanja modelnih trakov, ki se nanašajo na delež α in PP_{II} konformacij v

sekundarnem zvitju konkanavalina A, so v dobrem ujemanju z rezultati, pridobljenimi z rentgensko difrakcijo. Slednja metoda predvideva po 30 aminokislinskih ostankov v obeh konformacijah, kar ustreza 13 % vseh aminokislinskih ostankov v konkanavalinu A.

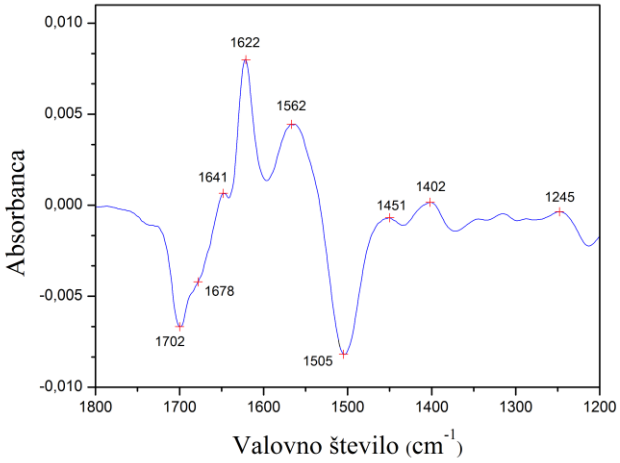
4.3.2 Diferenčni hidratacijski spektri

Predstavljena metoda dekompozicije spektralnih trakov je primerna za spremljanje glavnih konformacijskih sprememb, ki nastanejo kot posledica hidratacije proteinskega filma. Zaradi negotovosti pri določevanju pozicije in predvsem pri določevanju števila modelnih trakov metoda dekompozicije spektralnih trakov oteži opazovanje manjših spektralnih sprememb, ki nastanejo kot posledica postopne hidratacije. Za opazovanje takšnih manjših konformacijskih sprememb uporabimo diferenčno spektroskopijo, s katero analiziramo spekter, ki ga izračunamo kot razliko med dvema spektroma, posnetima ob različni stopnji hidratacije (Slika 4.6). Za razliko od metode samousklajevanja trakov nam diferenčna spektroskopija ne ponuja kvantitativne analize, nam pa omogoča podroben kvalitativen vpogled v proces hidratacije proteinskih filmov. Prednost diferenčne metode je v tem, da diferenčni spekter vsebuje le trakove, ki niso skupni obema izhodnima spektroma. Trakove v diferenčnem spektru lahko opredelimo kot odziv določenih vibracijskih stanj na spremembe v stopnji hidratiranosti. Osnovni namen vpeljave diferenčne spektroskopije je v poenastavitvi infrardečega spektra. Samo trakovi, ki po izračunu diferenčnega spektra ostanejo v njem, so neposredno povezani s strukturnimi spremembami, ki nastanejo kot posledica hidratacije. Poenastavitev IR spektra ni edina prednost diferenčne spektroskopije. Medsebojno odštevanje dveh spektrov, posnetih ob različni stopnji hidratacije, poda diferenčni spekter, kjer z integracijo traku, ki pripada valenčnemu nihanju OH skupin (3000 cm^{-1} – 3600 cm^{-1}), pridobimo približno, vendar pomembno informacijo o razliki količine vezane vode. Če od spektra hidratiranega proteinskega filma odštejemo spekter suhega proteinskega filma, lahko tudi kvantitativno določimo število na protein vezanih molekul vode. Integracija celotnega traku med 3000 cm^{-1} in 3600 cm^{-1} je možna zaradi majhnih sprememb v valenčnem nihanju NH skupin, ki ne prispevajo pomembnega deleža k celokupni integracijski vrednosti tega traku. Diferenčna spektroskopija nam ponuja možnost študija strukture traku OH valenčnega nihanja in vpliva teh molekul vode na strukturo proteinskega zvitja, saj ponuja dobro korelacijo med procesom hidratacije v smislu frekvence in oblike traku OH valenčnega nihanja in med spremembami v sekundarni proteinski strukturi.



Slika 4.6: Tipičen diferenčni spekter dveh različno hidratiranih proteinskih filmov. Od spektra delno hidratiranega proteinskega filma konkanavalina A smo odšteli spekter suhega proteinskega filma. Največje spremembe se nahajajo v območju OH valenčnega nihanja, tj. med 3000 cm^{-1} in 3600 cm^{-1}. Spremembe nastopijo kot posledica absorpcije molekul vode iz vlažne atmosfere s strani proteinskega filma.

Vse diferenčne spektre smo izračunali kot razliko med spektri, posnetimi ob različnih stopnjah hidratacije, in spektrom suhega proteinskega filma. Tako pozitivni trakovi v diferenčnem spektru pripadajo hidratiranemu proteinskemu filmu, negativni trakovi pa spektru suhega proteinskega filma.



Slika 4.7: Diferenčni spekter v območju med 1800 cm^{-1} in 1200 cm^{-1}. Od spektra delno hidratiranega proteinskega filma konkanavalina A smo odšteli spekter suhega proteinskega filma.

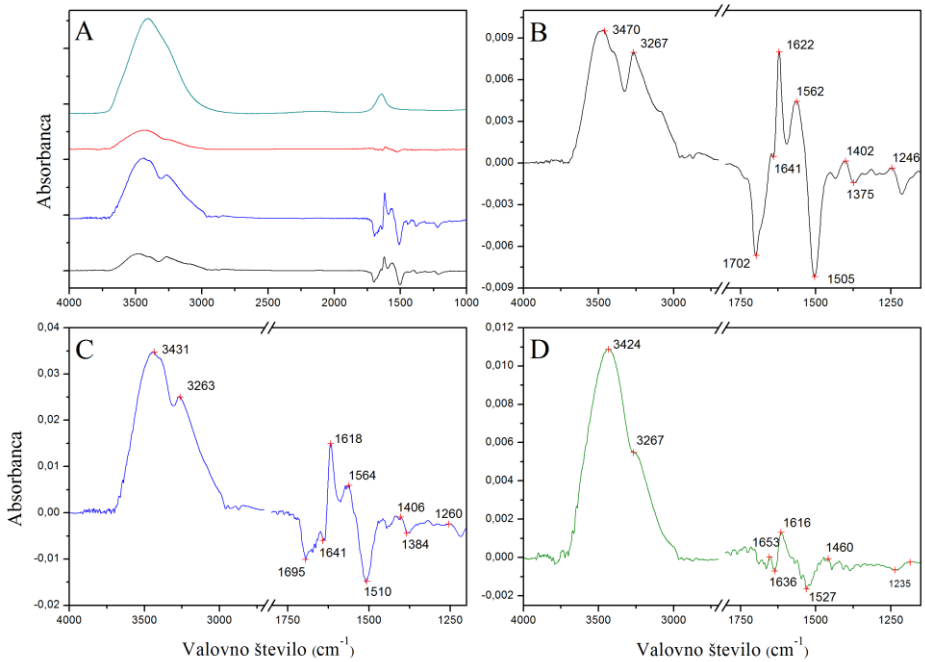
Z znano asignacijo trakov (Tabela 1.2), ki pripadajo posameznim skupinam v molekuli proteina, lahko natančno sledimo strukturnim spremembam, ki se zgodijo tekom hidratacije proteinskega filma. Zdi se (Slika 4.6), da se največje spremembe v diferenčnem spektru nahajajo v območju amidnega I in amidnega II traku, sledijo jim spremembe v spektralnem območju, značilnem za nihanja COO^- skupin na stranskih verigah

aminokislin, in spremembe v amidnem III območju. Spremembe, ki jih opazujemo v amidnem I in amidnem III območju, nastanejo kot posledica konformacijskih sprememb v sekundarnem proteinskem zvitju, ki so odvisne od stopnje hidratacijskega procesa. V tem območju smo omenjenim spremembam že sledili ob dekompoziciji amidnega I in amidnega III traku v suhem in polno hidratiranem proteinskem filmu, kot tudi v spektru konkanavalina A v vodni raztopini.

Povišanje deleža β-struktur v odvisnosti od stopnje hidratiranosti lahko opazimo s pojavom pozitivnega traku v amidni I regiji pri 1620 cm^{-1} (Slika 4.7), kot tudi traku v amidni III regiji pri 1250 cm^{-1}. Oba omenjena trakova pri nižjih valovnih številih v pripadajoči amidni regiji sta značilna za elemente proteinskih β-sekundarnih struktur. V območju višjih valovnih števil (3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1}) opazimo skupino trakov, ki v večini pripadajo OH valenčnim nihanjem molekul vode, ki so udeležene v hidratacijskem procesu (Slika 4.6). Na ta način diferenčni spekter neposredno povezuje valovna števila, intenziteto in obliko trakov, ki pripadajo molekulam vode z valovnimi števili, intenziteto in obliko trakov, ki pripadajo molekulskim skupinam na polipeptidni verigi, na katere se vežejo molekule vode. Intenziteto traku OH valenčnega nihanja pri visokih valovnih številih smo uporabili za kvantitativno določitev stopnje hidratiranosti, njegovo obliko in valovna števila pa za določitev tipa interakcij med molekulami vode in proteinskimi skupinami.

4.3.2.1 Interakcija molekul vode z molekulami konkanavalina A v proteinskem filmu

Molekula proteina poseduje veliko mest, na katere se lahko veže molekula vode. Vezavna mesta predstavljajo številne proton donorske in proton akceptorske skupine proteinske molekule. Proton akceptorsko skupino na glavni verigi predstavljajo C=O skupine, medtem ko proton donorska mesta predstavljajo NH skupine. Obe omenjeni proteinski skupini, prosti ali delno vezani z ostalimi proteinskimi skupinami, vodnim molekulam predstavljata potencialna vezavna mesta. Preostala pomembna vezavna mesta vodnih molekul so COO^- skupine stranskih verig. Te stranske skupine so zanimive tudi zato, ker imajo v IR spektru intenzivne trakove. Karakteristični trak nevtralne oblike, COOH, se nahaja med 1740 cm^{-1} in 1700 cm^{-1}. Valovno število je odvisno od interakcij z okoliškimi proteinskimi skupinami. Če COOH skupina sodeluje pri vzpostavitvi H-vezi, bo valovno število pripadajočega traku v IR spektru pri nižjih vrednostih. Prenos protona pomakne nihanja COO^- skupin k občutno nižjim valovnim številom. V tem primeru opazimo dve značilni nihanji COO^- skupin, asimetrično pri približno 1570 cm^{-1} in simetrično pri približno 1400 cm^{-1}. Tudi v tem primeru sta valovni števili obeh nihanj močno odvisni od okolice.



Slika 4.8: Karakteristični diferenčni spektri konkanavalina A, ki predstavljajo različne stopnje hidratacije. (A) Črn spekter z začetka hidratacije, moder spekter s sredine in rdeč spekter s konca hidratacije. Zelen spekter predstavlja spekter tekoče vode. (B) Diferenčni spekter z začetka hidratacije s pripadajočimi valovnimi števili. (C) Diferenčni spekter s srednje stopnje hidratacije s pripadajočimi valovnimi števili. (D) Zadnja stopnja hidratacije, predstavljena z diferenčnim spektrom in značilnimi valovnimi števili.

Spektra (Slika 4.8), ki predstavljata začetek (B) in sredino (C) hidratacijskega procesa, sta si precej podobna. Spremembe v proteinski strukturi, ki jih opazujemo med 1700 cm^{-1} in 1200 cm^{-1}, so zelo podobne. Oba spektra se razlikujeta predvsem v integralni vrednosti traku OH valenčnega nihanja (3000 cm^{-1} – 3600 cm^{-1}) v razmerju do intenzitet diferenčnih trakov v proteinskem delu spektra (1700 cm^{-1} – 1200 cm^{-1}). V začetni stopnji opazimo predvsem vezavo molekul vode na določene predele proteinskih molekul. V srednji stopnji hidratacije se poleg vezave molekul vode na proteinske skupine opazi tudi tvorba vezi med prostimi molekulami vode in tistimi, ki so že vezane na proton donorske in proton akceptorske proteinske skupine. Medsebojno povezovanje med prostimi molekulami vode in že na proteinske skupine vezanimi molekulami vode postane prevladujoč tip vezave v zadnji stopnji hidratacije (D). V tej stopnji hidracija nima več velikega vpliva na strukturo sekundarnega proteinskega zvitja. Zaradi tega so diferenčni trakovi v proteinskem delu (1700 cm^{-1} – 1200 cm^{-1}) neintenzivni v primerjavi s trakom OH valenčnega nihanja (3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1}).

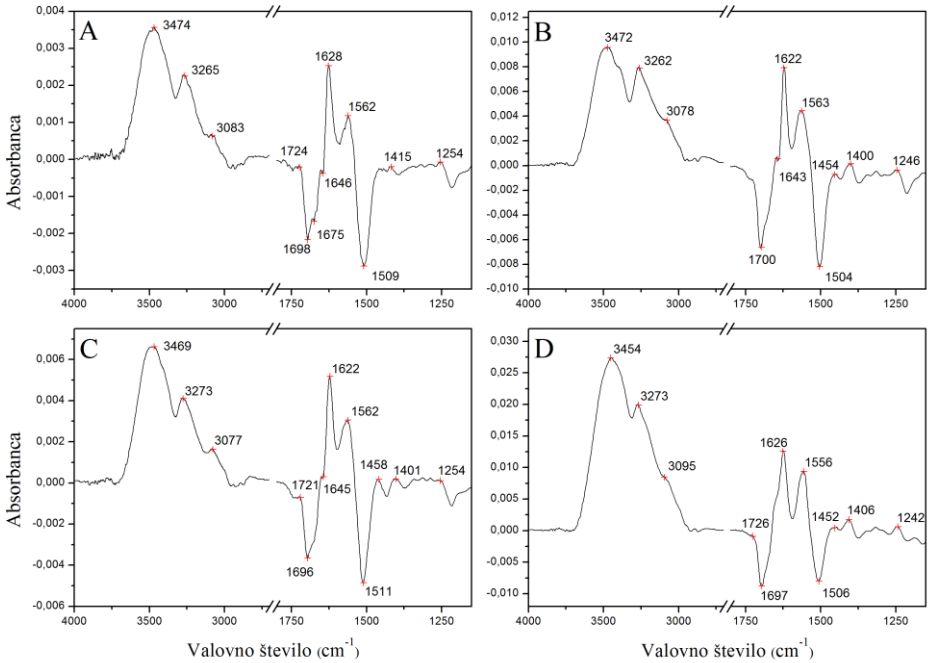
Analiza začetne stopnje hidratacije pokaže, da absorbirane molekule vode prekinejo NH · · · O=C H-vezi in jih nadomestijo z novimi, v katerih se molekule vode vrinejo med obe proteinski skupini (NH · · · OH_2 · · · O=C). Molekule vode se v začetni stopnji hidratacije večejo tudi na proste in šibko H-vezane NH in CO skupine. V tej stopnji je prisotna tudi hidratacija stranskih verig, predvsem COOH in COO^- stranskih skupin. Tvorba novih H-vezi z vrivanjem med že vzpostavljene se nadaljuje tudi v naslednji hidratacijski stopnji.

S primerjavo intenzitet trakov OH valenčnega nihanja med začetnima stopnjama hidratacijskega procesa pokaže, da je vrivanje molekul vode v že vzpostavljeno omrežje H-vezi pogostejše v začetnem delu. V drugem delu poleg procesa vrivanja molekul vode v vzpostavljene H-vezi prihaja tudi do vezanja prostih molekul vode na predhodno vezane molekule vode. Ta slednji tip povezav med molekulami vode postane prevladujoč pojav v zadnji stopnji hidratacije.

4.3.2.2 Primerjava diferenčnih spektrov hidratacije konkanavalina A z ostalimi modelnimi proteini

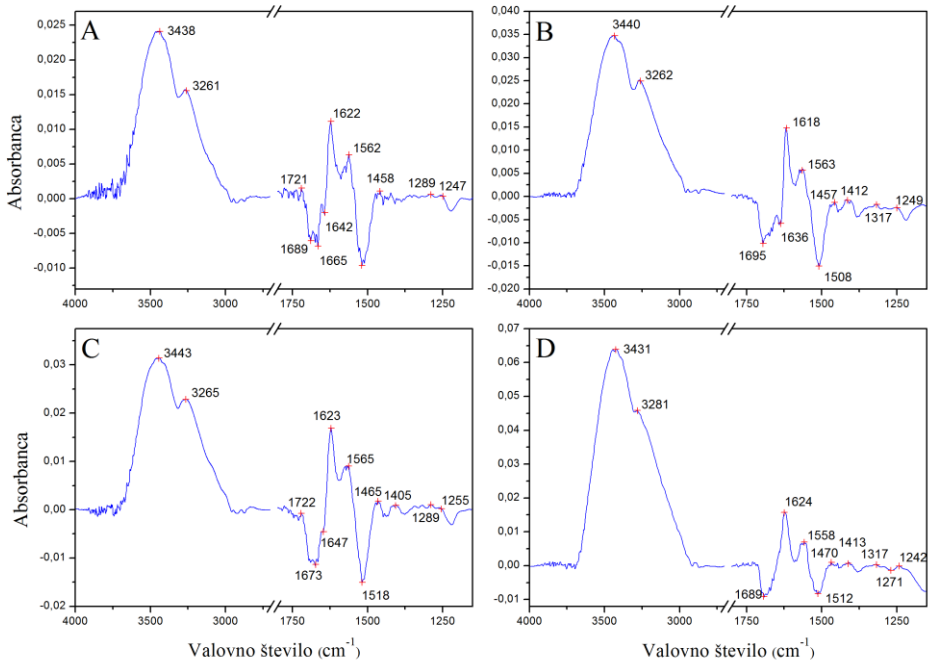
Študijo hidratacije proteinskega filma konkanavalina A smo nadgradili s študijo proteinskih filmov kimotripsinogena, pepsina in stefina B. Vsi našteti proteini v svojem sekundarnem zvitju posedujejo β-sekundarno zvitje. V nasprotju s konkanavalinom A preostali študirani modelni proteini vsebojejo tudi manjši delež α-sekundarnega zvitja (Tabela 4.1). Primerjalno študijo smo opravili z diferenčno spektroskopijo. Z integracijo diferenčnega traku OH valenčnega nihanja (3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1}) na spektrih, kjer smo od spektrov različno hidratiranih filmov odšteli spekter suhega filma, smo lahko določili, kateri stopnji pripadajo posamezni hidratacijski spektri (Dodatek 7).

Na Sliki 4.9 so prikazani izračunani diferenčni spektri za začetno stopnjo hidratacijskega procesa. Vsi diferenčni spektri proteinskih filmov (A) kimotripsinogena, (B) konkanavalina A, (C) pepsina in (D) stefina B so si medseboj podobni. Molekule vode, ki se vežejo na proton donorske in proton akceptorske skupine proteinske glavne verige, kot tudi na proton donorska in proton akceptorska mesta stranskih verig, imajo v začetni stopnji hidratacije velik vpliv na sekundarno strukturo proteinskega zvitja. Pri vseh opazimo pojavljanje traku pri približno 1625 cm^{-1} v amidni I regiji kot tudi pojavljanje komplementarnega traku v amidni III regiji pri okoli 1250 cm^{-1}. Oba trakova pripadata β-strukturam. Pri vseh študiranih modelnih proteinih lahko v začetni stopnji hidratacije opazujemo tvorbo H-vezi s prostimi ali šibko H-vezanimi NH in C=O skupinami (Slika 4.12). Prisotno je tudi vrivanje molekul vode med že vzpostavljene $NH \cdot \cdot \cdot O{=}C$ H-vezi in tvorbo novih ($NH \cdot \cdot \cdot OH_2 \cdot \cdot \cdot O{=}C$).



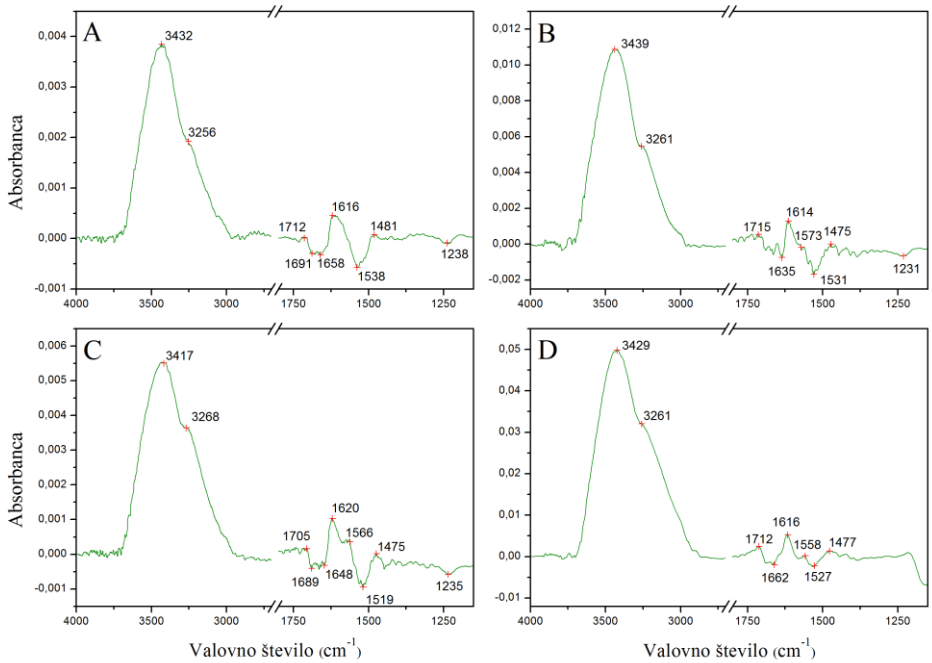
Slika 4.9: Začetna stopnja hidratacije. Diferenčni spektri, ki povzemajo konformacijske spremembe v sekundarnem zvitju proteinske molekule, ki nastanejo ob začetku hidratacije: (A) kimotripsinogen; (B) konkanavalin A; (C) pepsin in (D) stefin B.

Srednja stopnja hidratacije in pripadajoči diferenčni spektri (Slika 4.10) imajo podobne spektralne trakove, kot smo jih opazili v diferenčnih spektrih, ki pripadajo začetnemu delu hidratacijskega procesa (Slika 4.9). Glavna razlika med diferenčnimi spektri iz začetka hidratacijskega procesa in srednjega dela hidratacije je v relativni vrednosti integrala traku OH valenčnega nihanja napram integralnim vrednostim trakov, ki pripadajo nihanjem proteinskih skupin. Razlika med obema področjema je v srednjem delu hidratacije občutno večja. Poleg vezave molekul vode na molekulske skupine proteinskih verig se molekule vode v srednjem delu hidratacijskega procesa vežejo tudi na že vezane molekule vode. Tudi v tem delu opazimo medsebojno podobnost med diferenčnimi spektri različnih modelnih proteinov. Hkrati opazimo tudi povečevanje deleža β-sekundarnih struktur. Tako v začetnem delu kot tudi v srednjem delu hidratacijskega procesa opazimo, da se diferenčni spekter stefina B (slika D na Sliki 4.9 in Sliki 4.10) od preostalih razlikuje v večji integralni intenziteti OH valenčnega nihanja (3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1}) v primerjavi z intenzitetam v proteinskem delu diferenčnega spektra (1700 cm^{-1} – 1200 cm^{-1}).

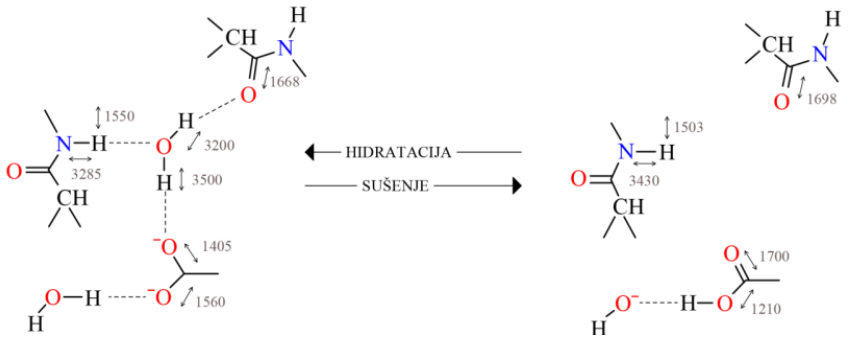


Slika 4.10: Vmesna stopnja hidratacije. Diferenčni spektri, ki povzemajo konformacijske spremembe v sekundarnem zvitju proteinske molekule, ki nastanejo v vmesni stopnji hidratacijskega procesa: (A) kimotripsinogen; (B) konkanavalin A; (C) pepsin in (D) stefin B.

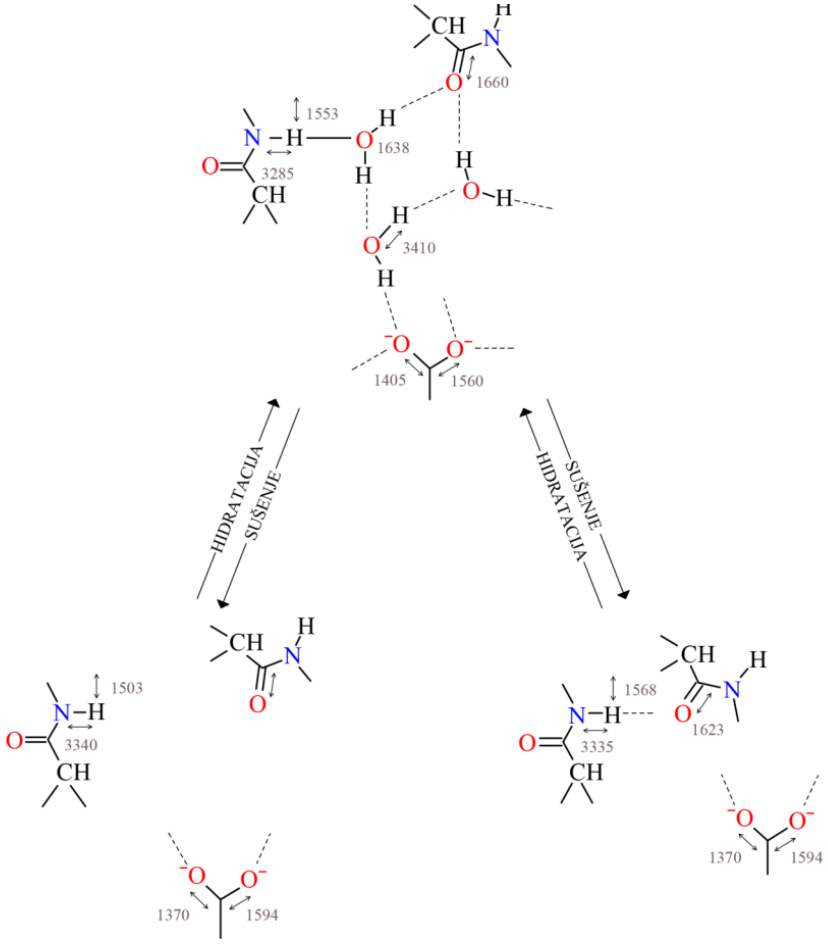
V zadnji stopnji hidratacije so intenzitete proteinskih trakov (1700 cm^{-1} – 1200 cm^{-1}) manjše od intenzitet v prvih dveh stopnjah. Za razliko od proteinskih trakov se intenzitete OH valenčnega nihanja v tej stopnji povečajo. Spektri iz zadnje stopnje hidratacijskega procesa so predstavljeni na Sliki 4.11. Kot rečeno, intenziteta proteinskih trakov v tej stopnji ni velika, zato lahko pričakujemo, da molekule vode na strukturo proteinskega zvitja nimajo več velikega vpliva. Molekule vode se v tej stopnji vežejo predvsem na molekule vode, ki so bodisi vezane na sam protein bodisi na molekule vode, ki so preko H-vezi, vezane na molekule vode, že vezane na proton donorska in proton akceptorska mesta proteinskih struktur. V zadnji stopnji se na opisan način okoli proteinskih molekul tvori hidratacijski plašč vode. Sicer neintenzivni, a še vedno prisotni trakovi, ki pripadajo β-strukturam, se v zadnji stopnji pojavijo pri nižjih valovnih številih (>1620 cm^{-1}) kot v primeru prve in druge hidratacijske stopnje. Predvidevamo, da v tej stopnji β-strukture postanejo kompaktnejše.



Slika 4.11: Končna stopnja hidratacije. Diferenčni spektri, ki povzemajo konformacijske spremembe v sekundarnem zvitju proteinske molekule, ki nastanejo v končni stopnji hidratacije proteinskega filma: (A) kimotripsinogen; (B) konkanavalin A; (C) pepsin in (D) stefin B.



Slika 4.12: Shematski oris hidratacije COOH in COO^- stranskih aminokislinskih verig.



Slika 4.13: Grafična predstavitev procesa hidratacije glavne verige proteinske molekule.

Zaradi kompleksnosti proteinskih verig smo se pri asignaciji in grafični predstavitvi mehanizma hidratacije proteinskih filmov omejili na nihanja glavne verige (Slika 4.13) in nihanja COO^- in COOH skupin stranskih aminokislinskih verig (Slika 4.12).

4.3.3 Določevanje števila vezanih molekul vode

IR spektroskopija nam poleg sledenja strukturnim spremembam znotraj procesa hidratacije proteinskih filmov omogoča tudi kvantitativno oceno števila na protein vezanih molekul vode v odvisnosti od stopnje hidratiranosti.

Predpostavimo, da je hidratirani film idealna mešanica tekoče vode in proteinskih molekul. Za obe snovi poznamo gostoti in molski masi, vemo pa tudi, da je intenziteta v infrardečem spektru linearno odvisna od števila absorbirajočih molekul. Tako je masa proteinskega filma, ki je bil posnet v IR spektrometru, enaka:

$$m_{prot.} = \rho_{prot.} \times S \times d_{prot.} \qquad \text{Enačba 4.3}$$

ρ_{prot} predstavlja gostoto proteinskega filma, d debelino proteinskega filma in S površino filma, ki jo zajame IR žarek. Podoben izraz zapišemo za vodo in tako izračunamo, koliko molekul vode ustreza eni proteinski molekuli pri debelini 1 µm. Površina filma oz. premer

IR žarka je pri obeh primerih enak in zato nepomemben podatek. Za gostoto proteinskega filma smo uporabili vrednost 1,37 g/ml [181]. Da določimo, koliko molekul vode je ob določeni stopnji hidratacije vezanih na eno molekulo proteina (n_W), moramo od diferenčnih spektrov, izračunanih tako, da smo od spektra pri določeni stopnji hidratacije odšteli spekter suhega proteinskega filma, odšteti spekter mikronske vode. Dobljeni faktor odštevanja mikronske vode (k_h) pomnožimo z razmerjem med množino vode in množino proteinske molekule, ki smo jo izračunali za posamezen proteinski film. Dobljena vrednost (n_W) predstavlja število molekul vode, ki so ob trenutni stopnji hidratacije vezane na eno molekulo proteina. Opisan izračun je povzet spodaj (Enačba 4.4).

$$n_W = \frac{\frac{\rho_{H_2O} \times d_{H_2O}}{M_{H_2O}}}{\frac{\rho_{prot.} \times d_{prot.}}{M_{prot.}}} \times k_h \qquad \text{Enačba 4.4}$$

V Tabeli 4.5 so navedene izračunane vrednosti debelin proteinskih filmov, ki smo jih pridobili iz umeritvene krivulje, pripravljene na primeru filmov govejega serumskega albumina (Slika 4.3) in integralnih vrednosti trakov CH nihanj, na katere proces hidratacije nima velikega vpliva. Korekcijski faktor smo vpeljali tako, da smo preračunali razmerje med deležem CH vezi v govejem serumskem albuminu in posameznim modelnim proteinom. Delež je odvisen od deleža posameznih stranskih verig in od deleža prolinskih aminokislinskih ostankov, ki ne prispevajo $C_\alpha H$ vezi (Dodatek 8).

Tabela 4.5: Izračunane debeline hidratiranih proteinskih filmov in pripadajoča razmerja med molekulami vode v mikronski vodi in eno polipeptidno verigo.

	M_r proteina (g/mol)[a]	Integral (3003 – 2895 cm^{-1})[b]	$d_{prot.\ filma}$ (μm)[c]	N_W za 1μm H_2O[d]	k_h[e]	$d_{prot.\ filma}'$ (μm)[f]	N_W' za 1μm H_2O[g]
Kimotrisinogen	51372,4	0,616	0,316	6591,995	1,0838	0,343	6082,136
Konkanavalin A	25691,5	0,772	0,396	2630,512	1,0655	0,422	2468,777
Pepsin	34594,7	0,954	0,489	2866,348	1,1117	0,544	2578,424
Stefin B	11139,5	1,852	0,950	475,436	1,0117	0,961	469,944

[a]Molekulska masa proteina.

[b]Integralna vrednost traku CH nihanj (3003 cm^{-1} - 2895 cm^{-1}), iz katerih smo iz umeritvene krivulje (Slika 4.3) določili debelino proteinskih filmov.

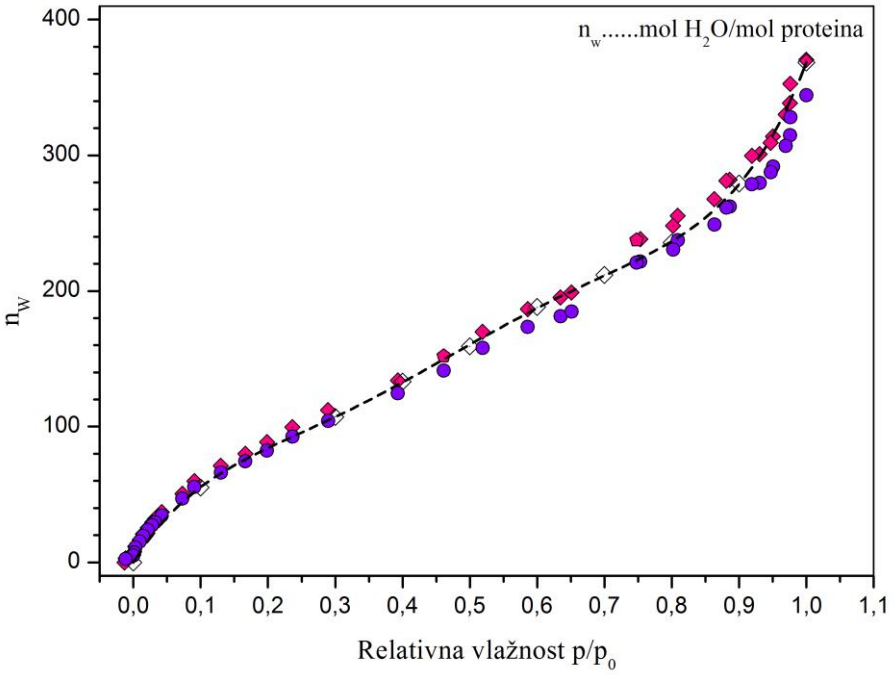
[c]Debelina proteinskih filmov v mikrometrih.

[d]Izračunano razmerje med številom molekul vode v mikronskem vodnem filmu in molekulami proteina.

[e]Korekcijski faktor, izračunan iz razmerja med deleži CH vezi v govejem serumskem albuminu in modelnimi proteini.

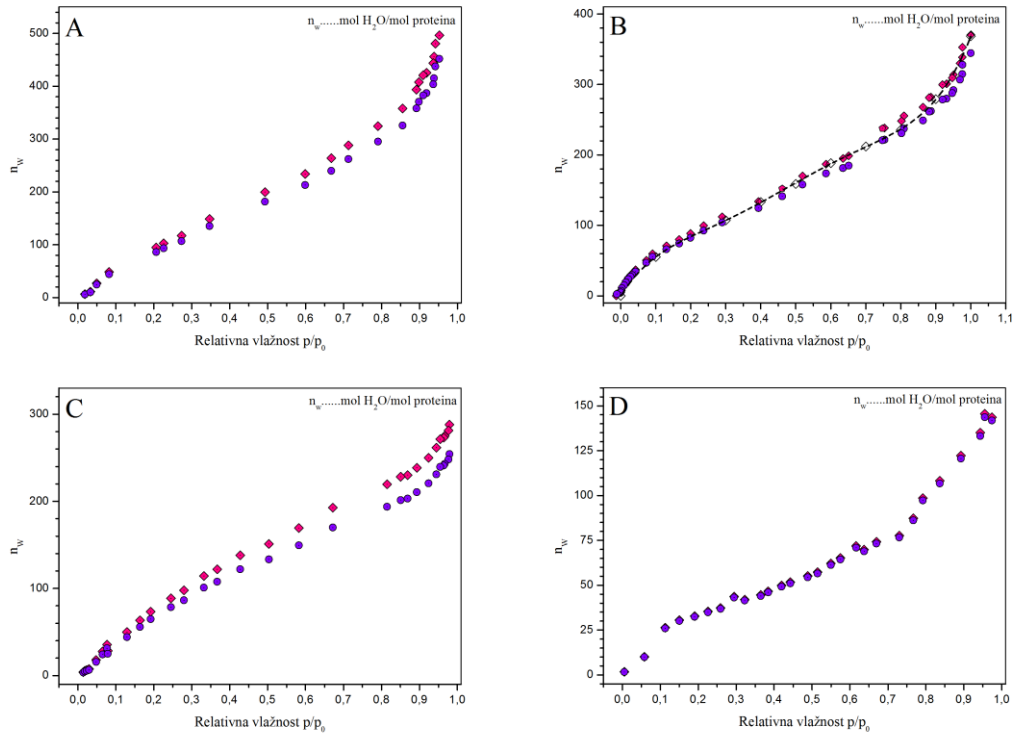
[f]Vpeljana korekcija za izračun debeline proteinskih filmov. Korekcijski faktor smo izračunali iz razmerja med številom C-H vezi v govejem serumskem albuminu in številom CH vezi v naših modelnih proteinih.

[g]Ponovno izračunano razmerje med številom molekul vode v mikronskem vodnem filmu napram molekuli proteina z uporabo popravljenih debelin proteinskih filmov.



Slika 4.14: Sorpcijska izoterma na primeru postopne hidratacije konkanavalina A. S črno črtkano črto je predstavljena sorpcijska izoterma, ki smo jo dobili z gravimetrijo. Z roza (brez korekcije) in vijolično (s korekcijo) barvo so predstavljeni rezultati določanja števila vezanih molekul vode na molekulo proteina, ki smo jih pridobili s FTIR spektroskopijo.

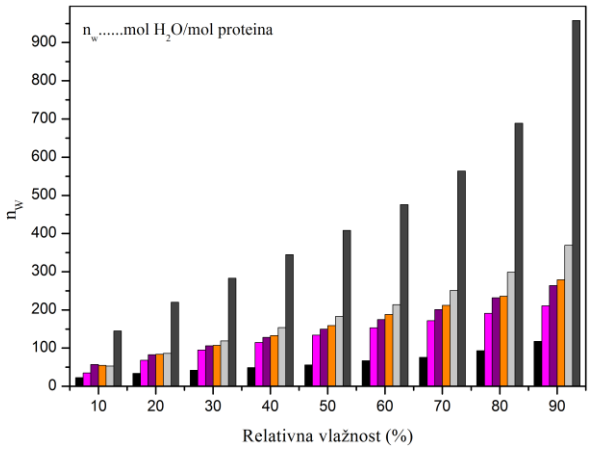
Na Sliki 4.14 so predstavljeni rezultati določevanja števila vezanih molekul vode na molekulo proteina skozi proces hidratacije proteinskega filma. Z roza barvo so predstavljeni rezultati brez korekcije, z vijolično pa rezultati, pri čemer smo upoštevali razliko v deležu CH vezi v govejem serumskem proteinu in konkanavalinu A. Isotermna krivulja (črtkana krivulja črne barve), ki ustreza prosojnim karo simbolom, je bila pridobljena z gravimetrijo, s katero smo preverili ustreznost metode določevanja števila vezanih molekul vode z vibracijsko spektroskopijo.



Slika 4.15: Število vezanih molekul vode na molekulo proteina, določeno s FTIR spektroskopijo. (A) Kimotripsinogen; (B) konkanavalin A, (C) pepsin in (D) stefin B. Roza barve so rezultati, kjer nismo upoštevali razlike v deležu aminokislinske sestave napram aminokislinski sestavi govejega serumskega albumina. Pri rezultatih v vijolični barvi smo razliko upoštevali.

Rezultat določanja števila vezanih molekul vode na preostale modelne proteine so grafično prikazani na Sliki 4.15. Pri vseh so z roza barvo orisani rezultati pred korekcijo in z vijolično rezultati, kjer smo upoštevali delež CH vezi. Stefin B poseduje zelo podoben delež CH vezi v primerjavi z govejim serumskim albuminom, zaradi česar se rezultati pred in po korekciji ne razlikujejo veliko. Nasprotno od stefina B pepsin izraža največjo razliko v deležu CH skupin, kar je razvidno tudi iz korekcijskega faktorja (Tabela 4.5).

Za lažjo primerjavo števila vezanih molekul vode med študiranimi modelnimi proteini ob določeni relativni vlažnosti hidratirajoče atmosfere smo pripravili Sliko 4.16. Stolpci črne barve ustrezajo številu molekul vode, vezanih na stefin B, roza barve tistim, vezanim na pepsin, vijolične na konkanavalin A, svetlo sive na komotripsinogen in temno sive na goveji serumski albumin. Na podlagi Slike 4.16 lahko sklepamo, da se absolutno na stefin B veže najmanj molekul vode, nato pa se število preko pepsina, konkanavalina A in kimotripsinogena povečuje do govejega serumskega albumina [41, 59], kamor se veže največ molekul vode. Oranžni stolpci ustrezajo številu molekul vode, vezanih na konkanavalin A, ki smo ga določili z gravimetrično metodo.



Slika 4.16: Pregled števila vezanih molekul vode na molekulo proteina ob določeni relativni vlažnosti: stefin B (črna), pepsin (roza), konkanavalin A (vijolična), konkanavalin A-gravimetrija (oranžna), kimotripsinogen (svetlo siva) in goveji serumski albumin (temno siva).

V Tabeli 4.6 so izpisane vrednosti števila vezanih molekul vode v odvisnosti od relativne vlažnosti hidratirajoče atmosfere.

Tabela 4.6: Število molekul vode, ki so vezane na molekulo modelnega proteina ob določeni relativni vlažnosti. Podatki, pridobljeni s FTIR spektroskopijo (razen za Kon A-gravi., kjer smo podatke pridobili z gravimetrijo).

Relativna vlažnost (%)	n_w (mol H_2O/mol proteina)					
	BSA[a]	**Kon A**	**Kon A-gravi.**[b]	**Kimotripsinogen**	**Pepsin**	**Stefin B**
10	145	57	55	53	35	23
20	220	83	84	86	68	34
30	283	106	107	119	95	42
40	345	128	133	154	115	49
50	408	150	159	183	134	56
60	476	175	188	214	153	67
70	564	201	212	251	172	76
80	689	232	236	299	191	93
90	958	264	279	369	211	118

[a] [41, 59]

[b] Podatki, pridobljeni z gravimetrijo.

Vsi rezultati, predstavljeni na Slikah 4.14, 4.15, 4.16 in Tabeli 4.6, so absolutni in ne upoštevajo velikosti modelnega proteina oz. velikosti površine, na katero se molekule vode lahko vežejo. Da bi rezultate lahko lažje primerjali, smo z aplikacijo PDBePISA izračunali površino modelnih proteinov, ki je na razpolago vezavi molekulam vode [182]. Pri izračunu smo molekule vode obravnavali kot sfere s premerom 1,4 Å.

Tabela 4.7: Pregled izračuna celokupnega števila atomov in aminokislinskih ostankov v sami strukturi in na površini nativnega modelnega proteina. Površina nativnih modelnih proteinov, ki je dostopna vodnim molekulam, in prosta energija solvatacije med proteinskim zvitjem [182].

		Struktura		Površina			
Modelni protein	**PDB oznaka**	**$N_{at.}$[a]**	**$N_{res.}$[b]**	**$^{S}N_{at.}$[c]**	**$^{S}N_{res.}$[d]**	**Površina (Å²)[e]**	**ΔG (kcal/mol)[f]**
BSA	3v03	4378	580	2608	550	27103,2	-449,4
Konkanavalin A	3cna	1807	237	1062	220	10944,4	-218,6
Kimotripsinogen	2cga	1799	245	979	228	10718,6	-232,3
Pepsin	4pep	2433	326	1245	294	13433,6	-310,9
Stefin B	1stf	789	98	476	94	6063,9	-82,4

[a]Vsota vseh atomov v pripadajoči strukturi.
[b]Vsota vseh aminokislinskih ostankov v pripadajoči strukturi.
[c]Število vseh atomov na površini pripadajoče strukture.
[d]Število vseh aminokislinskih ostankov, ki so izpostavljeni površini pripadajoče strukture.
[e]Vrednost predstavlja površino strukture v Å², ki je izpostavljena topilu. Algoritem, ki izračuna topilu dostopno površino, deluje na principu prostorske diskretizacije, zaradi česar je rezultat malenkostno odvisen od orientiranosti molekule.
[f]Prosta energija solvatacije/hidratacije med proteinskim zvitjem za pripadajočo strukturo v kcal/mol.

Kot lahko vidimo (Tabela 4.7), ima protein, na katerega se veže največ molekul vode, tj. BSA, tudi največjo površino in posledično največ vezavnih mest. Govejemu serumskemu albuminu po velikosti površine sledijo pepsin, konkanavalin A, kimotripsinogen in stefin B. Tudi število atomov, na površini proteinske 3D strukture, je največje pri BSA. Število atomov na površini proteinskega zvitja je tudi pri preostalih modelnih proteinih v linearni odvisnosti od vrednosti njihovih površin.

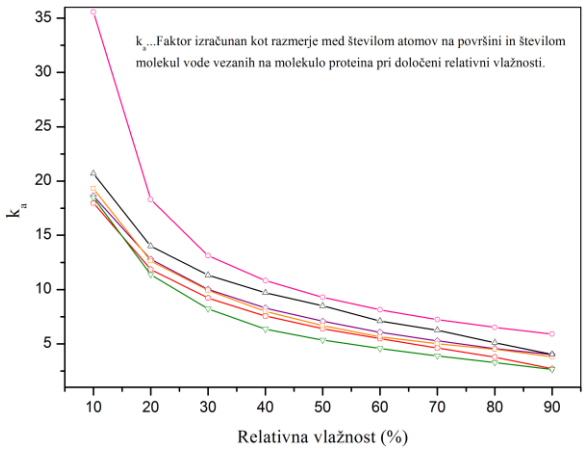
Do sedaj smo govorili le o absolutnih vrednostih števila vezanih molekul vode, kar nam ne podaja realne ocene, kako hidrofilen oz. hidrofoben je preučevani modelni protein. Za nekoliko realnejšo oceno smo pripravili Tabelo 4.8, kjer smo izračunali faktorje, ki opisujejo razmerje med številom vezanih molekul vode in razpoložljivimi atomi oz. aminokislinskimi ostanki na površini proteinske strukture kot tudi razmerje med vezanimi molekulami vode in celokupno površino 3D proteinskega zvitja v Å².

Na podlagi izračunanih faktorjev (Tabela 4.8) lahko sklepamo, da najmanjšo afiniteto do vezave molekul vode izkazuje pepsin. Vsi trije faktorji, izračunani za primer pepsina, imajo najvišje vrednosti. Nekoliko večjo afiniteto do vezave molekul vode imata stefin B in konkanavalin A. Najbolj hidrofilni proteinski molekuli sta v našem primeru kimotripsinogen in goveji serumski albumin.

Tabela 4.8: Relativne vrednosti, ki opredeljujejo razmerje med številom vezanih molekul vode in razpoložljivimi atomi ter aminokislinskimi ostanki na površini določenega proteinskega zvitja, kot tudi razmerje med številom vezanih molekul vode in celokupno površino 3D proteinskega zvitja.

Modelni protein	**$n_w^{90\%}$** [a]	**$^SN_{at.}$** [b]	**k_a** [c]	**$^SN_{res.}$** [d]	**k_b** [e]	**Površina (Å²)** [f]	**k_c** [g]
BSA	958	2608	2,72	550	0,57	27103,2	28,3
Konkanavalin A	264	1062	4,02	220	0,83	10944,4	41,5
Kimotripsinogen	369	979	2,65	228	0,61	10718,6	29,1
Pepsin	211	1245	5,90	294	1,39	13433,6	63,7
Stefin B	118	476	4,03	94	0,80	6063,9	51,4

[a]Število molekul vode, vezanih na molekulo proteina pri 90 % relativni vlažnosti.
[b]Število vseh atomov na površini pripadajočega 3D proteinskega zvitja.
[c]Faktor, izračunan kot razmerje med številom atomov na površini in številom molekul vode, vezanih na molekulo proteina pri 90 % relativni vlažnosti: $^SN_{at.}/n_w^{90\%}$.
[d]Število vseh aminokislinskih ostankov na površini pripadajočega 3D proteinskega zvitja.
[e]Faktor, izračunan kot razmerje med številom aminokislinskih ostankov na površini dotične proteinske molekule in številom molekul vode, vezanih na molekulo proteina pri 90 % relativni vlažnosti: $^SN_{res.}/n_w^{90\%}$.
[f]Vrednost predstavlja površino strukture v Å², ki je izpostavljena topilu. Algoritem, ki izračuna topilu dostopne površine, deluje na principu prostorske diskretizacije, zaradi česar je rezultat malenkostno odvisen od orientiranosti molekule.
[g]Faktor, izračunan kot razmerje med površino proteinskega zvitja in številom molekul vode, vezanih na molekulo proteina pri 90 % relativni vlažnosti: Površina/$n_w^{90\%}$.



Slika 4.17: Graf, ki predstavlja razmerje med številom atomov na površini nativno zvite polipeptidne verige in številom vezanih molekul vode ob določeni relativni vlažnosti (10 % – 90 %). Stefin B (črna), pepsin (roza), konkanavalin A (vijolična), konkanavalin A-gravimetrija (oranžna), kimotripsinogen (zelena) in goveji serumski albumin (rdeča).

Za lažjo predstavo podatkov, prikazanih v Tabeli 4.8, smo pripravili graf odvisnosti med številom atomov na površini nativno zvite polipeptidne verige in številom vezanih molekul vode ob določeni relativni vlažnosti (10 % – 90 %) (Slika 4.17). Podobne grafe dobimo tudi za preostala razmerja med številom AK ostankov na površini proteinskega zvitja oz. celokupno površino, ki je na voljo vezavi molekulam vode in številom vezanih molekul vode ob določeni relativni vlažnosti.

4.4 Razprava

Študija vpliva stopnje hidratacije na sekundarno strukturo modelnih proteinov se je pričela s pripravo podmikronskih filmov. Njihovo debelino smo določili iz umeritvene krivulje, ki je bila pripravljena za primer proteinskih filmov govejega serumskega albumina [41, 59]. Podmikronska debelina je pomembna z dveh vidikov. Prvi je ta, da se s takšno debelino izognemo nasičenju absorbcije IR svetlobe, kar bi vodilo do popačenja spektralnih trakov. Drugi razlog je v tem, da tanjši proteinski filmi med postopkom hidratacije omogočajo boljši približek idealni mešanici molekul vode in proteinskih makromolekul. Debelino smo iz umeritvene krivulje določili z integracijo traku, ki pripada nihanjem CH vezi. Ker ta nihanja niso odvisna od stopnje hidratacije proteinskih filmov, predstavljajo idealno spektralno območje za določanje debeline proteinskih filmov v okviru veljavnosti Beer-Lambertovega absorpcijskega zakona. Za vsak posamezen proteinski film smo vpeljali korekcijske faktorje, ki so upoštevali razliko v deležu CH vezi med govejim serumskim albuminom in našimi modelnimi proteini. Debelina proteinskih filmov, ki smo jih kasneje hidratirali, je znašala med 0,3 µm in 1 µm (Tabela 4.5).

Sekundarno strukturo konkanavalina A smo določili s podrobno analizo amidnih trakov I in III. Število modelnih trakov v omenjenih spektralnih regijah smo izračunali s Fourierjevo dekonvolucijo in drugim odvodom. Podatke, pridobljene z omenjenima metodama, smo uporabili pri nadaljnjem izračunu modelnih trakov. Za vsak modelni trak smo optimizirali parameter ε, ki definira delež krivulje Lorentzove oblike v posameznem modelnem traku. Poleg tega smo za vsak posamezni trak optimizirali lego, intenziteto in njegovo širino. Vse parametre smo optimizirali do točke, ko smo dobili zadovoljivo ujemanje med eksperimentalnim in izračunanim spektrom. Izračunan spekter predstavlja vsoto vseh optimiziranih modelnih trakov. Da bi bila optimizacija čim uspešnejša, smo optimizirali modelne trakove za obe, strukturno neodvisni, amidni regiji. Rezultati, ki smo jih dobili v posamezni regiji, so med seboj skladni (Tabela 4.4).

Asignacija modelnih trakov v amidni I regiji ni bila zahtevna, medtem ko je bila v amidni III regiji zahtevnejša tudi zaradi narave amidnega III traku. V obeh amidnih regijah prevladujejo modelni trakovi, ki pripadajo nihanjem C=O skupin v β-ravninah. Večjo kompleksnost amidnega III traku smo poizkušali razložiti s strukturo konkanavalina A, določeno z metodo sipanja rentgenskih žarkov [156]. Ti podatki so nam omogočili asignirati modelne trakove v amidni III regiji, ki pripadajo aminokislinskim ostankom v predelih polipeptidne verige, ki povezujejo področja z β-ravninami. Dejstvo, da aminokislinski ostanki v omenjenih predelih polipeptidnih verig ne tvorijo urejenih struktur, lahko dokažemo s pripadajočimi frekvencami modelnih trakov, ki so povsem atipične za urejene strukture.

Kvantitativno smo deleže posameznih sekundarnih elementov določili z izračunom integralnih intenzitet pripadajočih modelnih trakov. Na ta način smo lahko spremljali konformacijske spremembe na nivoju sekundarne strukture na različnih stopnjah hidratiranosti konkanavalina A: v suhem proteinskem filmu, popolnoma hidratiranem proteinskem filmu in v vodni raztopini konkanavalina A. Rezultati, ki smo jih dobili za posamezno amidno regijo, se med seboj razlikujejo za manj kot 2 % (Tabela 4.4). V obeh amidnih regijah se delež β-sekundarnih struktur z višanjem stopnje hidratiranosti povečuje in doseže največji delež pri vodni raztopini konkanavalina A. Rezultati so v dobrem ujemanju z rezultati, pridobljenimi s standardno metodo za določanje proteinskih struktur, metodo rentgenske difrakcije [157, 179]. Amidna III regija in njeni modelni trakovi poleg večanja deleža β-struktur z višanjem stopnje hidratiranosti razkrivajo tudi, da se skoraj za enak delež zmanjša število aminokislin z β-konformacijo. Na podlagi

podatkov, pridobljenih v amidni III regiji, bi lahko sklepali, da molekule vode aktivno sodelujejo pri tvorbi intermolekularnih H-vezi, ki tvorijo β-ravnine. Natančneje, molekule vode med procesom hidratacije sodelujejo pri tvorbi 8 % β-ravnin. Poleg omenjenih konformacijskih sprememb v deležu β-konformacij in β-struktur se med hidratacijo spremeni tudi delež α in PP_{II} konformacij. Delež PP_{II} konformacij se z višanjem stopnje hidratacije zvišuje, medtem ko se delež α-konformacij znižuje. Sklepamo, da so omenjene spremembe posledica sprememb v zamreženosti intermolekularnih H-vezi, odvisnih od stopnje hidratiranosti proteinskih molekul.

Zaradi negotovosti pri določanju pozicije in števila modelnih trakov pri metodi dekompozicije spektralnih trakov predstavljena metoda ne ponuja idealnega orodja pri preučevanju manjših konformacijskih sprememb. V procesu hidratacije proteinskih filmov v sekundarnem zvitju modelnih proteinov ne pričakujemo večjih strukturnih perturbacij, zato smo natančnejšo analizo izvedli z diferenčno spektroskopijo. Njena glavna prednost je v poenostavitvi IR spektrov na način, da v končnem diferenčnem spektru ostanejo prisotni le trakovi konformacijskih struktur, na katere vpliva proces hidratacije. Poleg poenostavitve hidratacijskih spektrov nam IR spektroskopija omogoča oceno števila vezanih molekul vode v odvisnosti od stopnje hidratiranosti proteinskih filmov. Ocena temelji na integraciji visokofrekvenčnega območja med 3600 cm^{-1} in 3000 cm^{-1}, ki predstavlja valenčno nihanje OH skupin. Na takšen način lahko integralno intenziteto traku OH valenčnega nihanja uporabimo za določanje stopnje hidratiranosti proteinskih filmov, oblika in valovno število trakov v tem območju pa nam pomagata pri določevanju tipa interakcij med molekulami vode in proteinskimi skupinami. Diferenčno spektroskopijo smo pri spremljanju konformacijskih sprememb med procesom hidratacije uporabili na primeru konkanavalina A, kimotripsinogena, pepsina in stefina B.

Zaradi lažje določitve vezavnih mest molekul vode na proteinskih skupinah smo za vse primere pripravili tipične diferenčne spektre za začetno, srednjo in končno stopnjo hidratacije. Pri asignaciji tako pripravljenih spektrov smo se osredotočili na skupine glavne polipeptidne verige in nihanja aminokislinskih ostankov z COO^- in COOH skupinami (Asp in Glu).

Če se najprej osredotočimo na diferenčne spektre, pripravljene za primer proteinskih filmov konkanavalina A, opazimo, da sta si diferenčna spektra iz začetka in sredine hidratacijskega procesa med seboj podobna. Medsebojno podobnost izkazujejta predvsem v predelu s trakovi, ki pripadajo strukturnim spremembam. Spektra se razlikujeta v visokofrekvenčem predelu, natančneje v integralni intenziteti traku OH valenčnega nihanja. Razlika izhaja iz predpostavke, da se v začetni stopnji molekule vode vežejo neposredno na same proteinske skupine, medtem ko tem vezavam v srednji stopnji sledijo tudi vezave molekul vode na tiste molekule vode, ki so se v prvi hidratacijski stopnji že vezale na določene proteinske skupine. V tretji, zadnji stopnji hidratacijskega procesa trakovi, ki nosijo informacijo o strukturnih spremembah v proteinskem sekundarnem zvitju, niso več tako intenzivni. V nasprotju z njimi je integralna intenziteta OH valenčnega nihanja v visokofrekvenčnem predelu IR spektra največja. Molekule vode se v tej stopnji vežejo predvsem na že vezane molekule vode, kar je razlog za zmanjšan vpliv njihove vezave na strukturo proteinskega zvitja. Ta vpliv ni več neposreden, temveč se prenaša preko omrežja H-vezi, kar lahko razloži majhne intenzitete strukturno odvisnih trakov.

V prvih dveh stopnjah hidratacijskega procesa prevladuje vrivanje molekul vode med $NH \cdots O{=}C$ H-vezi in nastanek $NH \cdots OH_2 \cdots O{=}C$ H-vezi. V obeh stopnjah poteka tudi vezava molekul vode na stranske skupine aminokislinskih ostankov, predvsem na COO^- in COOH skupine asparaginske in glutaminske kisline kot tudi na proste oz. šibko H-vezane CO in NH skupine. Ti tipi vezave molekul vode so najintenzivnejši v začetni

stopnji hidratacije. V naslednjih stopnjah intenzivnost prevzema vezava vode na že vezane molekule vode, s čimer se okoli proteinske molekule tvori hidratacijski plašč. Intenzivnost vpliva molekul vode na strukturo proteinskega zvitja z višanjem stopnje hidratacije upada. Diferenčna spektroskopija nam kvalitativno podaja tudi informacijo o razmerju deleža β-sekundarnih elementov v odvisnosti od stopnje hidratacije, in sicer se delež β-struktur zvišuje. To smo potrdili tudi kvantitativno z dekompozicijo modelnih trakov v amidni I in amidni III regiji. Diferenčni spekter, izračunan za srednji del hidratacijskega procesa, razkriva, da je v tej stopnji nekoliko intenzivnejša hidratacija COOH skupin na stranskih verigah pripadajočih aminokislinskih ostankov (Asp in Glu).

Z razumevanjem karakterističnih diferenčnih spektrov na primeru proteinskih filmov konkanavalina A smo lahko spremljali tudi vpliv vezave molekul vode na kimotripsinogen, pepsin in stefin B. Tudi za omenjene tri modelne proteine smo pripravili karakteristične diferenčne spektre za začetek, sredino in konec hidratacijskega procesa (Slika 4.9, Slika 4.10 in Slika 4.11).

V začetni stopnji (Slika 4.9) vsi diferenčni spektri za primer hidratacije konkanavalina A, kimotripsinogena, pepsina in stefina izkazujejo podobne konformacijske spremembe. Vezava molekul vode ima v tej stopnji hidratacije največji vpliv na samo sekundarno proteinsko zvitje. Razlog je v tem, da se hidratirajoče molekule preko H-vezi vežejo na proton donorska in proton akceptorska mesta stranskih verig kot tudi na skupine glavne verige. Pri vseh modelnih proteinih v začetni stopnji lahko v amidni I regiji opazimo povečanje deleža β-struktur, tudi na račun neurejenih sekundarnih struktur.

Diferenčni spektri iz sredine hidratacijskega procesa (Slika 4.10) so podobni tistim iz začetka. Spektri se razlikujejo v razmerju med relativno intenziteto trakov v visokofrekvenčnem predelu IR območja in trakovi v nižjefrekvenčnem območju, to so trakovi, ki pripadajo strukturnim spremembam polipeptidne verige. Molekule vode se tudi v tej stopnji še neposredno vežejo na ustrezne funkcionalne skupine polipeptidne verige, poleg teh vezav pa opazimo tudi vzpostavljanje novih H-vezi med prostimi molekulami vode in tistimi, ki so že vezane na protein. V tej stopnji opazimo tvorbo nekoliko kompaktnejših β-struktur. Zmanjšuje se delež aminokislinskih ostankov z neurejeno strukturo.

Najočitnejša razlika med diferenčnimi spektri prvih dveh hidratacijskih stopenj in zadnje hidratacijske stopnje (Slika 4.11) je v intenziteti diferenčnih trakov v nizkofrekvenčnem območju, tj. med 1700 cm^{-1} in 1200 cm^{-1}. V zadnji stopnji je intenziteta treh trakov zelo majhna, medtem ko se intenziteta traku OH valenčnega nihanja v primerjavi s prvima dvema stopnjama zelo poveča. Molekule vode v tej fazi hidratacije okoli proteinskih molekul tvorijo hidratacijski plašč z vzpostavljanjem H-vezi z molekulami vode, ki že tvorijo omrežje H-vezi na površini proteinskega zvitja. Vezave vode v tej stopnji ne povzročajo velikih strukturnih sporememb, ki so kljub majhni intenziteti podobne strukturnim spremembam v prvih dveh hidratacijskih stopnjah. Zdi se, da so β-strukture v tej stopnji najkompaktnejše.

S primerjavo diferenčnih spektrov iz posameznih hidratacijskih faz na primeru proteinskih filmov konkanavalina A, kimotripsinogena, pepsina in stefina B opazimo med seboj podobne strukturne spremembe. Proces hidratacije ne izzove velikih strukturnih sprememb, kljub temu pa molekule vode aktivno sodelujejo pri vzpostavljanju β-sekundarnih struktur.

Analizo vpliva stopnje hidratacije na konformacijo proteinskega zvitja smo zaključili s kvantitativno določitvijo števila vezanih molekul vode v odvisnosti od relativne vlažnosti. Takšna ocena je možna ob predpostavki, da je hidratiran proteinski film idealna mešanica vode in poteinskih molekul. Faktor odštevanja spektra vode z debelino 1 mikrona smo

pridobili z odštevanjem tega spektra od diferenčnih spektrov, ki smo jih pripravili tako, da smo od spektra proteinskih filmov ob različni stopnji hidratacije odšteli spekter suhega proteinskega filma. Tako izračunani diferenčni spektri v območju OH valenčnega nihanja vsebujejo le nihanja hidratirajoče vode, saj smo nihanja proteinskih OH skupin odšteli. Zanesljivost določanja odštevalnega faktorja v spektralnem območju OH valenčnega nihanja smo preverili tudi z določevanjem istega faktorja v nizkofrekvenčnem spektralnem območju (~700 cm^{-1}), kjer je prisoten trak libracijskih nihanj molekul vode. Prednost tega traku je, da v tem območju ne prihaja do prekrivanja nihanj molekul vode in proteinskih skupin. Slabost območja je, da se pojavlja na robu našega spektralnega območja, kar pomeni, da je na spektrih prisoten le dvotretinjski delež traku, kar nekoliko otežuje natančno določevanje odštevalnega faktorja. Kljub temu so odštevalni faktorji, ki smo jih določili v območju libracijskih nihanj molekul vode, podobni tistim v visokofrekvenčnem spektralnem območju.

Kot je bilo omenjeno na začetku razprave, smo debelino naših proteinskih filmov določili iz umeritvene krivulje, pripravljene na primeru proteinskih filmov govejega serumskega albumina (Slika 4.3). Za vsak posamezen proteinski film smo vpeljali korekcijski faktor, ki upošteva razliko v deležih CH vezi med našimi modelnimi proteini in deležem CH vezi v govejem serumskem albuminu (Dodatek 8). Natančnost uporabljene metode za določevanje števila molekul vode, vezanih na molekulo proteina v odvisnosti od relativne vlažnosti, smo želeli preveriti z gravimetrično metodo. Gravimetrija je uveljavljena metoda pri določevanju sorpcije vodne pare s strani proteinskih molekul. Uporabili smo jo pri določanju vezave molekul vode na primeru konkanavalina A (Slika 4.14). Pridobljeni podatki se dobro ujemajo z rezultati, pridobljenimi z metodami vibracijske spektroskopije. Za primer kimotripsinogena, pepsina in stefina B smo število vezanih molekul vode v odvisnosti od relativne vlažnosti hidratirajoče atmosfere določili z IR spektroskopijo (Slika 4.16). Z absolutnega vidika je najbolj hidrofilen kimotripsinogen, sledijo mu konkanavalin A, pepsin in stefin B.

Absolutne vrednosti so zavajajoče, saj ne upoštevajo velikosti posameznih modelnih proteinov. Da bi pridobili realnejše vrednosti, ki bi opisale hidrofilnost modelnih proteinov, smo izračunali faktorje, ki upoštevajo število aminokislinskih ostankov oz. število atomov na površini proteinskega zvitja. Faktor smo izračunali tudi v razmerju s površino proteinskega zvitja, ki je na voljo vezavi molekuli vode, če jo obravnavamo kot sfero s premerom 1,4 Å. Število aminokislinskih ostankov in število atomov na površini proteinskega zvitja govejega serumskega albumina, kimotripsinogena, konkanavalina A, pesina in stefina B, kot tudi vrednost površine njihove nativne strukture smo izračunali z spletno aplikacijo PDBePISA [182]. Največjo površino, ki je na voljo vezavam molekul vode, poseduje BSA, sledijo pepsin, konkanavalin A, kimotripsinogen in stefin B. Enak vrstni red velja tudi v primeru števila aminokislinskih ostankov in števila atomov na površini nativnega zvitja (Tabela 4.8). Izračunani faktorji podajajo realnejšo oceno o hidrofilnosti preučevanih modelnih proteinov. Največjo afiniteto do tvorbe H-vezi z molekulami vode izkazujeta goveji serumski albumin in kimotripsinogen. Najnižjo afiniteto do vezave molekul vode ima na podlagi izračunanih faktorjev pepsin. Konkanavalin A in stefin B izražata vmesno afiniteto do tvorbe H-vezi z molekulami vode.

4.5 Zaključki

V tem poglavju smo z vibracijsko spektroskopijo preučili vpliv hidratacije na sekundarno strukturo konkanavalina A, kimotripsinogena, pepsina in stefina B. Prav tako smo z metodami vibracijske spektroskopije želeli določiti število vezanih molekul vode in njihova vezavna mesta na omenjenih modelnih proteinih.

Integracija traku, ki pripada CH nihanju, in vpeljava korekcijskega faktorja, ki upošteva razliko v deležu CH vezi med določenim modelnim proteinom in govejim serumskim albuminom, je uspešen način za določanje debeline proteinskih filmov na podlagi umeritvene krivulje, pripravljene na primeru različno debelih proteinskih filmov BSA.

Diferenčna spektroskopija je primernejša metoda za spremljanje konformacijskih sprememb v sekundarnem zvitju modelnih proteinov kot metoda dekompozicije spektralnih trakov. Kljub temu da diferenčna spektroskopija v primerjavi z metodo dekompozicije spektralnih trakov ne ponuja kvantitativne analize, je njena občutljivost na opazovane strukturne spremembe večja. Predvidevamo, da bo metoda dekompozicije spektralnih trakov uporabnejša pri spremljanju večjih strukturnih sprememb, kakršne pričakujemo pri spremljanju agregacije konkanavalina A in stefina B.

Vsi štirje modelni proteini v karakterističnih stopnjah hidratacije izkazujejo podobne strukturne spremembe. V začetni stopnji se molekule vode vežejo direktno na proton donorska in proton akceptorska mesta molekulskih skupin polipeptidne verige. Vezava molekul vode poveča delež β-struktur na račun neurejenih konformacij. V drugi stopnji hidratacijskega procesa se molekule vode vežejo na enaka mesta kot v prvi stopnji. Poleg tega molekule vode tvorijo tudi H-vezi z že vezanimi molekulami vode. Ta slednji način vezave je prevladujoč v zadnji stopnji hidratacije, kjer na novo vezane molekule vode nimajo več velikega vpliva na sekundarno proteinsko zvitje. Največje konformacijske spremembe se pod vplivom hidratacije zgodijo v prvi stopnji hidratacije.

Število vezanih molekul vode v odvisnosti od relativne vlažnosti (od 10 % do 90 %) smo določili za vse štiri modelne proteine. Z absolutnega vidika največ molekul vode veže kimotripsinogen, sledijo mu konkanavalin A, pepsin in stefin B. Največjo afiniteto do vezave molekul vode (ob upoštevanjem površine posameznega modelnega proteina, števila atomov in števila AK ostankov na površini proteinskega zvitja, ki so na voljo vezavi molekulam vode) izkazuje kimotripsinogen, sledita mu stefin B in konkanavalin A, najmanjšo afiniteto pa izraža pepsin.

Poglavje 5

Agregacija modelnih proteinov

5.1 Uvod

Proteinska agregacija je pomemben dejavnik v številnih procesih, vključno z boleznimi, ki nastanejo kot posledica tvorbe amiloidnih plakov, kot tudi pri študijah proteinskega zvitja, stabilnosti bioloških zdravil in industrijski pripravi proteinov. Razumevanje zgodnjih dogodkov v procesu amiloidne agregacije je izrednega pomena, če želimo bolje razumeti oz. spoznati mehanizme, ki vodijo k taki vrsti agregacije. Poznavanje teh mehanizmov bo v veliko pomoč pri načrtovanju strategij za preprečitev procesov, ki vodijo v različne amiloidoze. Kljub zavedanju, kako pomembno je natančno poznavanje procesa tvorbe amiloidnih fibril, je naše znanje na omenjenem področju pomanjkljivo.

Med številnimi boleznimi, ki so posledica nepravilnega zvitja in agregacije, so morda najbolj razširjene nevrodegenerativne bolezni [183]. Kljub temu pa vse bolezni, ki nastanejo kot posledica nepravilnega proteinskega zvitja, ne prizadenejo le centralnega živčnega sistema. Primeri takšnih bolezni bi bili cistična fibroza, diabetes tipa II in rakasta bolezen, poznana kot diseminirani plazmocitom (DP) [184]. V obeh primerih napačno proteinsko zvitje sovpada s spremembami v njegovi sekundarni strukturi.

Glede na dejstvo, da je tvorba amiloidnih fibril generična lastnost vseh proteinov [32], se v namen raziskav mehanizma agregacije uporabljajo različni modelni proteini. Zaradi izrazito dinamične narave procesov, kot sta proteinsko zvitje in njihova agregacija, je izjemno pomembno zajemanje strukturnih informacij v okviru izredno majhnih časovnih enot, tj. pikosekund (10^{-12} s). Vibracijska spektroskopija je ena izmed redkih vplivnih metod na področju strukturne biologije, ki je zmožna zaznati strukturne spremembe v tako kratkem času (detektira lahko spremembe v omenjeni časovni skali). Pogoj za popolno uporabnost podatkov, pridobljenih z vibracijsko spektroskopijo, je zanesljiva in natančna določitev spektralnih trakov.

Nepravilno zvite proteinske molekule lahko tvorijo tri morfološko različne agregate: oligomere, amiloidne fibrile in amorfne agregate. Čeprav lahko vse vrste agregatov pod določenimi pogoji tvori enaka proteinska molekula, je odnos med navedenimi vrstami agregatov nejasen. Najpomembnejše vprašanje, ki se poraja med preučevanjem odnosa med zvrstmi agregatov, je, ali so amorfni agregati, vključno z oligomeri in protofibrili, intermediati na poti do tvorbe amiloidnih fibril ali so to končni produkti stranske poti (angl. off-pathway) agregacije.

5.1.1 Napačno zvitje in amiloidne bolezni

Proteinsko zvitje je proces, preko katerega proteinska molekula zavzame sebi lastno strukturo in posledično sebi lastno funkcijo. Kljub številnim celičnim mehanizmom, ki regulirajo, nadzorujejo in asistirajo pri procesu proteinskega zvitja, se vseeno pripetijo primeri, v katerih v različnih tkivih prihaja do akumulacije nepravilno zvitih proteinov. Takšna akumulacija lahko vodi do celične smrti in posledično do degeneracije tkiv.

Nepravilno zvitje proteina skoraj vedno vodi do njegove agregacije, mnogokrat do pravilno urejenih β-struktur, ki se ovijajo okrog osi amiloidnega fibrila (vlakna). Agregacija proteinov je vzrok za številna patološka stanja v človeškem telesu ter s tem nastanka različnih bolezni, kot so Alzheimerjeva in Huntingtonova bolezen, diabetes tipa 2, Parkinsonova bolezen ter številne druge, ki jih s skupnim imenom imenujemo amiloidoze. Vse omenjene bolezni so karakterizirane na podlagi amorfnih ali fibrilarnih izvenceličnih depozitov, ki jih najdemo v različnih tkivih in imajo specifične lastnosti. V zadnjem času prevladuje hipoteza, da so za celice, vključno z nevroni, toksični predvsem znotrajcelični agregati in oligomeri, ki so topni. Lastnosti amiloidnih fibril so: dolga in razmeroma ravna morfologija, difrakcijski vzorec prečnih β-ravnin, specifična obarvanost z barvili kongo rdeče in tioflavinom T, vezavne lastnosti in rigidna struktura jedra. Tvorba amiloidnih fibril izzove strukturno prerazporeditev nativnega proteina v konformacijo z velikim deležem β-ravnin [23, 25].

Nativno zviti proteini niso najstabilnejše strukture. Celica pri 37 °C za nativno zvit protein predstavlja močno reaktivno okolje, v katerem spontano in konstantno prihaja do denaturacij in kemijskih modifikacij proteinskih molekul (npr.: oksidacija, izomerizacija, glikozilacija ...). Pogostost omenjenih reakcij se lahko močno poveča med izpostavitvijo celic bolj stresnemu okolju s povišano temperaturo, večjo koncentracijo kisikovih prostih radikalov in težkih kovin. Manj stabilni polipeptidi s povečano nagnjenostjo do napačnega zvitja so lahko posledica mutacij, ki preprečujejo običajno zvitje ali vezavo polipeptidne verige z ostalimi podenotami oz. kofaktorji. Ker ima lahko akumulacija nezvitih proteinov škodljive vplive na delovanje celice, celice namenijo velik del svoje bazalne energije za pravilno ekspresijo in zvitje proteinov ter za njihovo pravilno porazdelitev po celičnih razdelkih.

Tabela 5.1: Napačno zviti proteini se v celici nenehno razgrajujejo s proteolitskimi sistemi [185].

Tip napačnega zvitja	Razlog
Nepopolni proteini	Nesmiselne mutacije, vezava puromicina na ribosom, prezgodnja terminacija, proteolitična cepitev
Drugačno-smiselni protein	Mutacija, vključitev aminokislinskih analogov, biosintezne napake
Proste podenote multimernih kompleksov	Presežek sintetiziranih podenot
Poškodbe proteinov po njihovi sintezi	Prosti kisikovi radikali, znotrajcelična denaturacija
Genski inženiring	Fuzija genov, premik bralnega okvirja, nepravilna lokalizacija
Napačno zvitje proteinov	

Povišana temperatura, oksidativni stres, težke kovine in določeni antibiotiki, kot je bilo omenjeno, lahko povzročijo resne poškodbe v celicah. Tekom evolucije so se v celicah vzpostavili mehanizmi, ki jim omogočajo boljše prilagajanje zaostrenim fiziološkim razmeram. Celice se na te potencialno toksične spremembe odzovejo z indukcijo močno konzervativnih genov, ki kodirajo za proteine toplotnega šoka (*ang. Heat shock proteins*,

Hsps). Ta set proteinov predstavlja glavno celično obrambo pred akumulacijo okvarjenih ali mutiranih proteinov. Med različnimi proteini temperaturnega šoka v evkariontskih celicah najdemo molekulske šaperone, ki upočasnjujejo denaturacijo in agregacijo proteinov, številne antioksidativne encime, ki zmanjšujejo oksidativni stres, ter komponente ubikvitin-proteasomske poti [186-188], ki katalizirajo selektivno razgradnjo abnormalnih proteinov v jedru in citosolu [189, 190].

Kljub številnim celičnim obrambnim mehanizmom, ki preprečujejo nepravilno zvitje in agregacijo, trenutno pri človeku poznamo več kot 40 različnih bolezni, ki jih lahko povežemo s tvorbo zunajceličnih fibrilarnih agregatov ali s strukturno podobnimi znotrajceličnimi fibrilarnimi agregati [65]. Ti agregati niso vzrok le nevrodegenerativnih bolezni, temveč tudi sistemskih in lokaliziranih amiloidoz. Za številne bolezni obstajajo dokazi za vidno vlogo fibril ali njihovih oligomernih prekurzorjev pri patogenezi [191].

Kljub obsežnim raziskavam amiloidoze ostajajo slabo razumljene predvsem na področju proteinskega zvitja in mehanizma fibrilacije. Vedno novi dokazi namigujejo, da pri iniciaciji fibrilacije prekurzično vlogo odigrajo razvite oz. napačno zvite polipeptidne verige. Razlogi za njihovo napačno zvitje so različni, od specifičnih mutacij, napačnega procesiranja (angl. misprocessing phenomena), napačnih interakcij s kovinskimi ioni, sprememb v okolju (pH, temperatura) do kemijskih modifikacij (oksidacija, proteoliza) [26-28].

V zadnjih petih letih so bile na področju amiloidne agregacije pridobljene številne nove informacije, ki nam odpirajo nov pogled na samo fibrilacijo in njeno toksičnost. Rezultati raziskav kažejo, da agregati proteinov, ki niso značilni predstavniki nevrodegenerativnih bolezni, vplivajo na celične funkcije v enaki meri kot agregati proteinov pri nevrodegenerativnih boleznih. Izkazalo se je, da so »odrasle« fibrile občutno manj toksične v primerjavi s predfibrilarnimi agregati oz. njihovimi prekurzorji. Toksičnost slednjih agregatov verjetno izhaja iz njihovih intrinzičnih lastnosti, ki jim omogočajo interakcijo s celičnimi membranami. Omenjene interakcije povzročijo povečanje oksidativnega stresa ter zvišajo koncentracijo prostih Ca^{2+} ionov, kar posledično vodi do apoptozne oz. nekrozne celične smrti. Ta nov pogled na toksičnost fibril oz. njihovih prekurzorjev nam odpira nov pogled na ostale degenerativne pogoje, ki bi lahko imeli podoben osnovni izvor kot amiloidoze. Izgleda, da imajo celični zaščitni mehanizmi, kot so šaperoni in proteini, v poti razgradnje poglavitno vlogo pri preprečevanju bolezni v normalno delujočih živih organizmih. Prav tako se pojavljajo novi faktorji (hidrofobnost, celokupni naboj polipeptidne verige, povečano nagnjenje k tvorbi β-trakov, zvišanje koncentracije nepopolno zvitih polipeptidnih verig ...), ki bi lahko imeli pomembno vlogo pri evoluciji bioloških molekul in mehanizmih, ki urejajo njihovo delovanje [192].

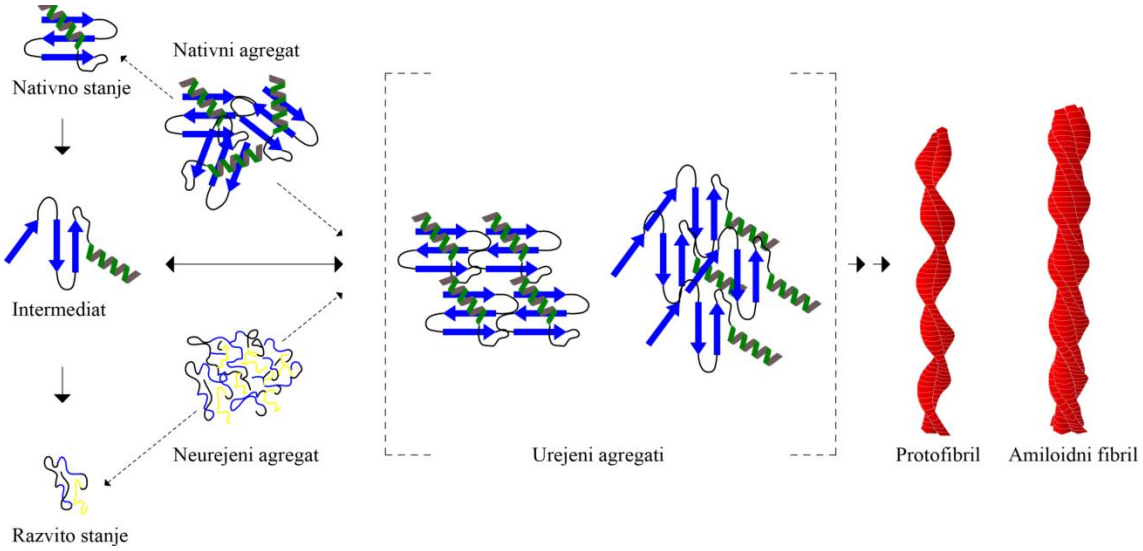
5.1.2 Agregacija proteinov

5.1.2.1 Mehanizem fibrilacije

Izhodiščna struktura za tvorbo amiloidnih fibril je delno razvita proteinska veriga, nekoliko podobna strukturi delno razrahljanega klobčiča (angl. pre-molten globule)[193]. Pri fibrilaciji proteinov z več domenami se mora delno razviti le domena, ki je neposredno vključena v proces agregacije. Za razliko od nativno zvitih proteinov, ki se morajo delno razviti, da lahko tvorijo amiloidne fibrile, se morajo INP proteini delno zviti, da so zmožni amiloidne fibrilacije. Zaradi omenjenih pogojev okolje z nizko pH vrednostjo,

visoko temperaturo in majhno vsebnostjo denaturantov pospeši tvorbo omenjenih agregatov.

V začetni stopnji agregacije se delno razviti monomeri združujejo v oligomere [194, 195], znotraj katerih proteinske molekule tvorijo metastabilne konformacije z β-ravninami. Sčasoma se te metastabilne konformacije preoblikujejo v z β-ravninami bogate strukture [196, 197].



Slika 5.1: Kaskada proteinske agregacije. Povzeto po referenci: [198].

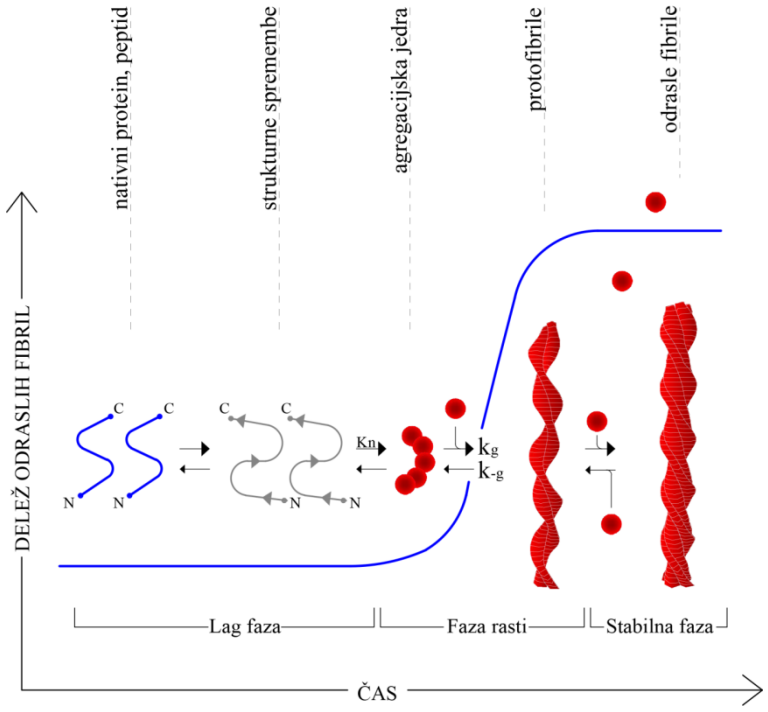
Po formaciji stabilnih oligomernih struktur te delujejo kot nukleacijska mesta za pretvorbo monomernih enot v fibrile oz. druge oligomerne strukture. Najpomembnejša nukleacijska mesta so konci oz. robovi fibril, njihovo število pa se poveča s procesom fragmentacije odraslih amiloidnih fibril. Fragmenti amiloidnih fibril oz. hčerinske fibrile imajo običajno enako terciarno strukturo kot materinske fibrile. Kljub temu lahko med razraščanjem fibril pride tudi do konformacijskih sprememb. Te konformacijske spremembe so lahko posledica redkih spontanih strukturnih sprememb v samih fibrilah ali so posledica zmanjšanja natančnosti replikacijskega procesa (angl. replication process) [199-201]. Fragmentacija termodinamsko stabilnih fibril ni intenziven proces, saj je proces tvorbe amiloidnih fibril obratno sorazmeren z njihovo termodinamsko stabilnostjo [197, 202, 203].

Modele, ki kvantitativno opišejo fibrilacijo proteinov, lahko klasificiramo v tri skupine: (a) šabloniranje in nukleacija (angl. templating and nucleation); (b) linearno, koloidnim strukturam podobno sestavljanje sferičnih oligomerov (angl. linear, colloid-like assembly of spherical oligomers); in (c) menjava domen (angl. domain swapping) [38]. Eksperimentalno opaženo kinetiko fibrilacije pri številnih amiloidogenih proteinih lahko običajno opišemo z polimerizacijskim modelom [39], ki temelji na nukleaciji in ga lahko okarakteriziramo v treh stopnjah [40]:

I. Počasna nukleacijska faza oz. lag faza: V tej fazi je proteinska molekula podvržena seriji konformacijskih sprememb in neugodnim združitvam, kar vodi v nastanek delno urejenih oligomernih struktur, ki kasneje v procesu fibrilacije služijo kot nukleacijska mesta. To počasno stopnjo v procesu tvorbe amiloidnih fibril se lahko zaobide z vpeljavo zunanjih nukleacijskih jeder.

II. Faza rasti: V tej fazi strukture iz prve faze naglo rastejo in tvorijo prefibrilarne strukture, ki se končno zvijejo v odrasle fibrile. Preureditev protofibril v končne fibrile vključuje strukturne spremembe tako na inter- kot tudi na intrafibrilarnem nivoju [204, 205]. Začetek faze rasti je pogojen z zadostno koncentracijo delno urejenih oligomernih struktur, ki nastanejo v lag fazi.

III. Stabilna faza: V tej fazi opazimo dinamično ravnotežje med urejenimi agregati in monomernimi enotami. V procesu dozorevanja amiloidnih fibril, ki poteka v stabilni fazi, se konci fibril združujejo med seboj, kar vodi do podaljševanja odraslih fibril [206].



Slika 5.2: Shema nukleacijsko odvisnega mehanizma tvorbe fibril. V začetni fazi opazimo strukturne spremembe na peptidnih enotah, ki vodijo v ravnotežje med neugodnimi proteinskimi združki (K_n). Tej fazi sledi ugodno ravnotežje (k_g), ki vodi v tvorbo odraslih amiloidnih fibril. Povzeto po referenci: [207].

5.1.2.2 Strukturne lastnosti amiloidnih fibril

Proteinske agregate lahko glede na strukturo razdelimo v tri razrede: amiloidne fibrile, oligomere in amorfne agregate.

5.1.2.2.1 Amiloidne fibrile

Amiloidne fibrile so ponavljajoče, z β-ravninami bogate strukture. Njihova velika termodinamska in kinetična stabilnost izhaja iz zvitja številnih polipeptitnih molekul v stabilno prečno β-strukturo. Izhodne strukture amiloidnih fibril so bodisi nativno zviti proteini bodisi INP proteini. Da te strukture tvorijo amiloidne fibrile, se morajo organizirati na treh nivojih: (1) β-trakovi se naložijo v β-ravnine, (2) β-ravnine med seboj tvorijo intermolekularne vezi in se s tem povezujejo v protofilamente in (3) protofilamenti se nalagajo oz. zvijejo okoli drug drugega in tako tvorijo amiloidno fibrilo [208, 209].

Prva stopnja organizacije amiloidnega fibrila je nalaganje posameznih β-trakov sosednjih polipeptidnih molekul v skupno β-ravnino. Gonilna sila omenjene interakcije so H-vezi, ki se tvorijo med amidnimi skupinami posameznih polipetidnih verig. Beta ravnine so glede na orientiranost sosednjih trakov bodisi paralelne bodisi antiparalelne. V amiloidnih fibrilah, ki jih tvorijo daljše polipeptidne verige, običajno najdemo paralelno orientirane β-ravnine [208, 210].

Druga stopnja organizacije amiloidnih fibril vključuje interakcije med dvema β-ravninama. Prepletanje stranskih verig med sosednjimi peptidnimi verigami je pogoj za nastanek visoko urejenih struktur, ki jih imenujemo steričnе zadrge (angl. steric zippers) [208]. Te steričnе zadrge se nalagajo okoli osi same fibrile. Med njihovo tvorbo prihaja do izpodrivanja molekul vode, ki se prvotno nahajajo med β-trakovi. Gonilna sila tvorbe steričnih zadrg so Van der Waalsove interakcije in tvorba H-vezi med stranskimi verigami polipeptidnih verig. Tvorba steričnih zadrg je posledica nalaganja β-trakov pravokotno na os fibrile, ti trakovi pa lahko potekajo bodisi vzporedno bodisi nasprotno glede na sosednji trak. Pri takšni razporeditvi se stranske verige enega β-traku nahajajo med stranskimi verigami sosednjega β-traku. Glede na njihovo strukturo steričnе zadrge delimo na osem razredov. Ti razredi se med seboj razlikujejo glede na orientiranost β-trakov znotraj β-ravnin (paralelno/antiparalelno), medsebojno orientiranost sosednjih β-ravnin (paralelno/anti-paralelno) in glede na koriščenje svoje površine (zgornja/spodnja) za nalaganje β-ravnin eno na drugo [208].

Ista polipeptidna veriga lahko tvori steričnе zadrge iz različnih razredov, odvisno od eksperimentalnih pogojev, pri katerih se steričnе zadrge tvorijo. Pomembno funkcijo pri stabilizaciji steričnih zadrg zaradi močnih medsebojnih Van der Waalsovih vezi prevzamejo stranske verige z aromatskimi skupinami [211, 212]. Pomemben vir polimorfizma fibrilnih struktur se nahaja prav v različnih strukturah steričnih zadrg, ki so jih zmožna tvoriti amiloidogena zaporedja polipeptidnih verig [213].

Tretja stopnja organizacije amiloidnih fibril je sestavljanje protofilamentov v samo fibrilo. Interakcije med posameznimi protofilamenti so dokaj šibke. Struktura protofilamentov določa, ali se fragmenti med seboj združujejo z nalaganjem drug na drugega in tako tvorijo ploščate trakove (angl. flat ribbons) ali se zvijajo drug okoli drugega in na ta način tvorijo fibrile v obliki spirale. V obeh primerih proces združevanja

fibril dodatno zaščiti hidrofobne regije in hkrati pripomore k raznolikosti morfologije agregiranih struktur.

Omenili smo že, da INP proteini tvorijo amiloidne fibrile s predhodnim delnim ali popolnim zvitjem prej neurejene strukture v z β-strukturami bogato formacijo. Za razliko nativno zviti proteini tvorijo fibrile preko popolnega razvitja ali preko le delne konformacijske spremembe [214]. Inzulin, čigar sekundarna struktura je bogata z α-vijačnicam, tvori amiloidne fibrile preko razvitja svoje nativne strukture in ponovnega zvitja v z β-ravninami bogato strukturo. Fibrile, ki se tvorijo preko popolnega razvitja nativne strukture, so primarno stabilizirane s H-vezmi med glavnimi verigami. Interakcije med sosednjimi stranskimi skupinami niso tako intenzivne. Za razliko od opisanega mehanizma tvorbe amiloidnih fibril na primeru inzulina, proteini, ki posedujejo z β-strukturami bogato sekundarno strukturo, ne potrebujejo popolnega razvitja, da bi lahko tvorili amiloidne agregate. Zadostuje že minimalna konformacijska sprememba, ki izpostavi prej nedostopne regije. Ta, na novo izpostavljena regija, lahko nadalje interagira s površinami sosednjih makromolekul in tako tvori amiloidne fibrile brez večjih perturbacij v sami nativni strukturi. Fibrile se običajno tvorijo preko (A) direktnega nalaganja izpostavljenih regij (npr. TTR in superoksid dismutaza) [215, 216], (B) zamenjave dveh z β-ravninami bogatih domen sosednjih monomernih enot na način, da tvorita prečne β-strukture (npr. Sup35 in β2 mikroglobulin) [209, 217], ali (C) zamenjave β-trakov med sosednjimi monomerami (npr. serpin) [218]. Fibrile, ki se tvorijo po opisanem mehanizmu, v večini ohranjajo nativno strukturo začetnih monomer in jo spreminjajo le v manjšem obsegu.

5.1.2.2.2 Oligomerne strukture

Poleg fibril se v procesu fibrilizacije pogosto opazijo tudi strukture, ki jih imenujemo amiloidni oligomeri. V nekaterih primerih so ti oligomeri pravzaprav kratki fragmenti fibril in tako v procesu tvorbe samih fibril predstavljajo intermediate. Nekatere oligomerne strukture so izredno nestabilne in se lahko enostavno pretvorijo v stabilnejše fibrile oz. večje oligomerne strukture. V večini primerov se oligomeri, ki smo jih zmožni opaziti oz. izolirati, od fibril razlikujejo v strukturi in imajo vsaj delno kinetično stabilnost. Prav zaradi njihove kinetične (ne)stabilnosti so informacije o strukturi oligomer dokaj skope. V večini primerov poznamo le sekundarno strukturo oligomernih enot, ki so običajno bogate z β-ravninami, lahko pa variirajo od primarno neurejenih [219] do struktur, podobnih tistim v fibrilah [220, 221]. Kljub šibkemu znanju o strukturah oligomerov pa poznamo tudi nekaj njihovih 3D struktur [222-225]. Podobno kot različne nativne strukture tvorijo strukturno podobne fibrile, tako tudi strukturno podobni oligomeri izhajajo iz različnih amiloidogenih peptidov in proteinov [223, 226].

Kinetično razmerje med oligomeri in amiloidnimi fibrili je dokaj kompleksno. Kljub temu da oligomeri posedujejo z β-strukturami bogato zvitje, večina oligomerov ni na neposredni poti, ki vodi v tvorbo fibril. Prav nasprotno, tvorba oligomerov pogosto zavira tvorbo fibril [83, 220]. Oligomeri so visoko dinamične strukture, kar se kaže tudi v tem, da so oligomeri različnih velikosti v medsebojnem ravnotežju. V nekaterih primerih so oligomeri celo v ravnotežju z monomernimi enotami, v drugih primerih pa med obema formacijama obstaja velika energijska barijera. Takšna pregrada preprečuje razpad oligomer na lastne monomerne enote. Strukturna heterogenost oligomernih enot se izraža preko konformacijsko specifičnih protiteles, ki pogosto prepoznajo le majhen delež oligomernih podstruktur (angl. subpopulations) [226-228]. Opisana kompleksnost

agregacije polipeptidnih verig je razlog za strukturno pestrost konformacij v agregiranem stanju.

Iz opisanega lahko povzamemo, da so za stabilne agregate, ki se med seboj strukturno in morfološko razlikujejo, pomembne intermolekularne interakcije znotraj agregiranega stanja. Amiloidne fibrile so primarno sestavljene iz skladovnice β-ravnin, že majhne variacije v nalaganju β-ravnin (angl. β-sheet packing) lahko rezultirajo v tvorbi drugačnih vlaken oz. fibril z občutno medsebojno razliko v morfologiji in lastnostih. Oligomeri so strukturno bolj raznoliki od amiloidnih fibril, kljub temu pa običajno prevzemajo enake intermolekularne interakcije, ki potekajo med sosednjimi β-ravninami.

5.1.2.2.3 Amorfni agregati

Za razliko od opisanih urejenih struktur, ki nastanejo v procesu agregacije proteinskih molekul, amorfni agregati predstavljajo različne tipe združkov, ki ne posedujejo urejenih struktur, ki bi jih tvorile molekule proteina. Takšni agregati so skupni večini proteinskih molekul, pravzaprav jih tvorijo tudi amiloidogeni proteini, kadar se ne uspejo zviti v amiloidne strukture. Tako kot amiloidne strukture povezujemo s številnimi bolezenskimi stanji, tudi amorfnim agregatom pripišemo odgovornost za nekatere resne bolezni [229], kot je recimo katarakta (amorfni agregati so prokurzorji te bolezni). Vzrok za to bolezen, bolj poznano kot siva mrena, so amorfni agregati α-kristalina (angl. α-Crystallin) [230]. Tudi številni drugi proteini, ki niso direktno povezani z določeno boleznijo, lahko v *in vitro* pogojih tvorijo tako amiloidne kot amorfne agregate [64, 231]. V procesu pridobivanja proteinov in njihovega čiščenja velikokrat opazimo amorfne agregate. Ali inkluzijska telesca vsebujejo samo amorfne agregate ali čiste amiloidne strukture ali pa zmes obeh oblik, ostaja odprto vprašanje [232, 233]. Kljub opisani različni morfologiji med amorfnimi in amiloidnimi agregati je običajno težko enostavno razlikovati med obema tipoma, zato se v eksperimentalnih in teoretičnih študijah pogosto obravnavata skupaj [234].

V zadnjih letih je bil na področju razumevanja amiloidne agregacije narejen velik korak naprej, sami mehanizmi amorfne agregacije pa ostajajo slabo raziskani. Zelo verjetno je, da je proces amorfne agregacije sklopljen s procesom denaturacije proteinskih struktur, saj se med tem procesom okolici izpostavijo njihove, za proces agregacije bolj dovzetne, hidrofobne regije.

Razmerje med amiloidnimi fibrili, amorfnimi agregati in oligomeri še ni do potankosti pojasneno [235, 236]. Eno izmed glavnih odprtih vprašanj pri razumevanju proteinske agregacije je, ali oligomeri in amorfni agregati predstavljajo intermediate na poti, ki vodi do fibrilarnega zvitja, ali so to končni produkti stranskih poti amiloidne agregacije. V veliko pomoč pri razumevanju amorfne in amiloidne agregacije, so modeli, ki opisujejo kristalizacijo in steklasti prehod (angl. glass-transition) [74, 237, 238]. Da bi proces proteinskega zvitja postal kooperativen in hiter, bi morala biti temperatura steklastega prehoda občutno nižja od temperature prehoda med razvito in nativno obliko. Le na ta način je možno oblikovati gladek tunel zvitja (angl. folding funnel) z minimalnim številom lokalnih minimumov.

5.1.3 Konkanavalin A

Konkanavalin A je bil v tej študiji uporabljen kot modelni protein. Je lektinski protein, ki je bil prvič izoliran iz stročnice *Canavalia ensiformis*. Specifično se veže na določene strukture v različnih sladkorjih, glikoproteinih in glikolipidih, predvsem na D-glikozilne ali D-manozilne ostanke [154]. Konkanavalin A sestavlja 237 aminokislin (AK), molekulska masa verige znaša 26.500 Da [155]. Približno 60 % sekundarne strukture predstavljata dve antiparalelni β-ravnini, med katerimi je ena sestavljena iz šestih, druga pa iz sedmih β-trakov. Konkanavalin A zaradi opisanega sekundarnega zvitja spada med β-proteine (angl. all β-protein) [156]. Za vezavno aktivnost protein potrebuje dva kovinska iona, izmed katerih je en Ca^{2+} ion, drugi pa prihaja iz vrst kovin prehoda, običajno je to Mn^{2+} [239]. Pri pH vrednosti 7,0 je konkanavalin A tetramer, sestavljen iz štirih enakih podenot. Pod pH 6,0 tetramer disociira na dimere [240], verjetno zaradi protonacije imidazolnih skupin His127 in His51, ki se nahajata na stiku obeh dimer [179, 180].

Pri bazičnih pH vrednostih (stran od pI vrednosti za konkanavalin A) se tvorijo dolge in tanke amiloidom podobne strukture. Vzporedno s tem procesom potekajo tudi strukturne spremembe, med katerimi pride do tvorbe intermolekularnih β-ravnin [241]. Pri pH vrednostih, ki so bližje pI točki proteina (to je pri pH 5), je opazna tvorba amorfnih agregatov [231]. Ti rezultati namigujejo, da povprečen naboj na molekulo vpliva na pot agregacije in specifično morfologijo njenih produktov. Pri kislih pH vrednostih sta kovinska iona (Ca^{2+} in Mg^{2+}) vezana na konkanavalin A, kar bi lahko dodatno stabiliziralo njegovo strukturo in tako preprečilo tvorbo amiloidnih agregatov [242].

Konkanavalin A ni pomemben modelni protein samo zaradi svoje enostavne izolacije, temveč tudi zaradi nekaterih svojih pomembnih lastnosti. Konkanavalin A ima nekatere neobičajne biološke lastnosti, ki so posledica njegove zmožnosti, da veže številne ogljikovodike. Sodeluje tudi pri obarjanju glikogenov, dekstrinov, glikoproteinov in substanc krvnih skupin [243-246]. Konkanavalin A inducira transformacijo limfocitov z reverzibilno vezavo na specifična vezavna mesta na celični membrani [247, 248], hkrati pa inhibira fagocitozo, ki jo vršijo polimorfonuklearni levkociti [249]. Konkanavalin A je odgovoren tudi za aktivacijo agregacije rakastih celic [250]. Njegova struktura je izredno podobna strukturni komponenti človeškega serumskega amiloida P (angl. Human serum amyloid P component), sestavini skoraj vseh znanih amiloidnih depozitov. Konkanavalin A naj bi bil preko navzkrižnega povezovanja specifičnih membranskih receptorjev zmožen inducirati programirano celično smrt v kortikalnem nevronu (kortikalni nevron vodi iz talamusa do velikih možganov) [251]. Ta mehanizem je podoben mehanizmu programirane celične smrti, ki jo inducira amiloid β-protein [252]. Preučevanje proteinov z visokim deležem β-sekundarne strukture je zanimivo tudi zaradi opažanj, da je jedro amiloidnega vlakna sestavljeno predvsem iz β-trakov. Poleg tega tudi kratki peptidi, ki izražajo visoko nagnjenost po β-sekundarnih strukturah, izkazujejo visoko tendenco po tvorbi amiloidnih fibril [253].

5.1.4 Stefin B

Človeški stefin B (poimenovan tudi cistatin B) pripada družini proteinov z α/β sekundarno strukturo. Stefin B, sestavljen iz 98 aminokislin, se v celici nahaja tako v citoplazmi kot tudi v lizosomih in v jedru. Svojo nativno topologijo, sestavljeno iz petih β-trakov, ki obdajajo centralno α-vijačnico (t. i. hotdog zvitje, angl. Hotdog motif), si deli z ostalimi cistatini [254]. Zvita struktura nima disulfidnih vezi. Skupaj z ostalimi stefini deluje kot inhibitor cisteinskih proteaz [255, 256]. Inhibicija katepsinov, natančneje inhibicija katepsina B, bi lahko delno razložila regulativno vlogo stefina B v procesu apoptoze [257, 258] in rakastih obolenj [259]. Vedno več dokazov tej majhni proteinski molekuli dodeljuje alternativne funkcije. Stefin B nastopa kot del multiproteinskega kompleksa, ki ga najdemo v malih možganih [260]. Z gensko ekspresijo so določili čezmerno izražen stefin B pri amiotrofični lateralni sklerozi (ALS) [261] kot tudi pri primarnem imunskem odgovoru [262]. Patološka stanja, ki jih opazimo pri miši, ki ji primanjkuje stefina B, so apoptoza živčnih celic v malih možganih, ataksija kot tudi mioklonus [257]. Novejše genetske študije stefin B povezujejo s progresivno mioklonsko epilepsijo tipa ena (EPM1) [263, 264].

Stefin B je uveljavljen modelni protein pri preučevanju stabilnosti in mehanizma zvitja proteinov [265, 266] kot tudi pri spremljanju proteinske agregacije in amiloidne fibrilacije [38, 267-269]. Človeški stefin B v *in vitro* pogojih tvori amiloidne fibrile [270]. Fibrile stefina B posedujejo vse lastnosti, ki jih pripišemo vsem amiloidnim fibrilam, to so dolga in razmeroma ravna morfologija, prečni β-difrakcijski vzorec, specifična obarvanost z barvili kongo rdeče in fluorescenčnim barvilom tioflavinom T, vezavne lastnosti in rigidna struktura jedra. V dolgi lag fazi se tvorijo granularni agregati, ki jih lahko opazimo s transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) in dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS) [267, 270, 271]. Takšni oligomeri, pod pogoji kromatografije z ločevanjem po velikosti (SEC) [272], disociirajo na dimere. Čas lag faze se lahko pospeši s povišanjem temperature, z dodatkom 2,2,2-trifluoroetanola (TFE) ali z dodajanjem nukleacijskih jeder [273]. V fazi rasti, ki sledi lag fazi, so bile opažene različne morfologije, vendar morfologija agregatov v najbolj strmi fazi rasti še ni povsem razjasnjena [269]. Kljub strukturni podobnosti stefina B s svojim homologom, stefinom A, slednji težje tvori amiloidne fibrile. Novejše raziskave namigujejo, da bi razlog za razliko v kinetiki tvorbe amiloidnih struktur med obema homologoma lahko iskali v β-trakovih stefina B [274]. Oba homologa se razlikujeta tudi v (ne)prisotnosti solnih mostičkov, ki jih najdemo le pri stefinu A.

5.2 Materiali in metode

5.2.1 Priprava vzorcev za FTIR spektroskopijo

5.2.1.1 Konkanavalin A

Liofiliziran vzorec konkanavalina A (MW = 25692 Da), izoliranega iz *Canavalia ensiformis*, smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich (C2010). Vzorec smo raztopili v 0,1 M fosfatnem pufru tako, da je končna koncentracija znašala 20 mg/ml. pH vrednost končne raztopine smo uravnali na pH 5 in pH 9, tako da smo ustrezno zmešali 0,1 M raztopino KH_2PO_4 in 0,1 M raztopino K_2HPO_4. Pred začetkom meritev smo vzorec prefiltrirali skozi 0,2 mikronski filter (Iso-Disc™ s PTFE membrano), s čimer smo odstranili morebitne agregate, ki bi se lahko tvorili med pripravo vzorcev. Vzorce smo pred meritvijo hranili na ledu.

5.2.1.2 Stefin B

Rekombinantni človeški stefin B (C3S, E31Y) je bil izražen v *E. Coli* na oddelku Biokemija, molekularna in strukturna biokemija Inštituta ''Jožef Stefan'' [172, 173]. Stefin B je bil po končani izolaciji raztopljen v 0,05 M raztopini NaCl. Pred nadaljnjo uporabo smo vzorec liofilizirali. Končna koncentracija v 0,1 M fosfatnem pufru raztopljenega liofiliziranega vzorca je znašala 40 mg/ml. Pripravili smo tri paralelne raztopine z različnimi pH vrednostmi: pH 3, pH 5, pH 7,5 in pH 9. pH vrednosti končnih raztopin s pH vrednostjo 5, 7,5 in 9 smo uravnali z ustreznim mešanjem 0,1 M raztopine KH_2PO_4 in 0,1 M razopine K_2HPO_4. Raztopino s pH 3 smo dodatno okisali z raztopino HCl. Pred začetkom meritev smo vzorec prefiltrirali skozi 0,2 mikronski filter (Iso-Disc™ s PTFE membrano), s čimer smo odstranili morebitne agregate, ki bi se lahko tvorili med pripravo vzorcev. Vzorce smo pred meritvijo hranili na ledu.

5.2.2 FT infrardeča spektroskopija

5.2.2.1 Konkanavalin A in Stefin B

FTIR spektri so bili posneti na Brukerjevem FTIR spektrometru Vertex 80. Da smo presegli omejitve IR spektroskopije, ki nastopijo zaradi visoke absorpcije IR svetlobe v vodnih medijih, smo uporabili ATR celico Golden gate podjetja Specac [116]. ATR celica je opremljena z diamantnim kristalom, ki je povezan s temperaturnim regulatorjem. Vsi spektri so bili posneti v spektralnem območju med 4000 cm^{-1} in 500 cm^{-1} s spektralno resolucijo 4 cm^{-1}. Vsak končni spekter je bil povprečen iz 64 interferogramov. Pred spektralno analizo smo od posnetih spektrov odšteli spekter čiste vode.

Diferenčna spektroskopija nam je omogočila razčlenitev prekrivajočih se trakov. Prav zaradi svoje velike občutljivosti na majhne spremembe v spektralnih trakovih je diferenčna metoda pomembno orodje pri analizi FTIR spektrov [175]. Majhne spremembe v obliki trakov, ki nastanejo kot posledica motenj v okolici, so na splošno zelo težko opazne. Diferenčna spektroskopija med seboj odšteje dele trakov, na katere zunanje motnje nimajo vpliva. Posledično ostanejo vidni le trakovi, na katere so vplivali zunanji

pogoji, kot sta recimo temperatura in čas. Poenostavitev spektrov z diferenčno spektroskopijo je orodje, ki omogoča natančno analizo sprememb, ki so posledica dogodkov v okolici. Pred računanjem diferenčnih spektrov smo izhodne spektre normalizirali na način, da smo najintenzivnejšemu traku v proteinski regiji (amid I) vrednost absorbance preračunali na vrednost 2. S tem smo si olajšali računanje diferenčnih spektrov.

Odštevalni faktor je bil določen na način, da so se trakovi vibracij, ki pripadajo vibracijam CH, CH_2 in CH_3 skupin na stranskih verigah med seboj odšteli, saj so te vibracije neodvisne od opazovanih konformacijskih sprememb. Poleg tega pa od strukture odvisni proteinski trakovi, kot so amid A, amid I, amid II in amid III, ne interagirajo s trakovi, ki pripadajo topilu (Dodatek 9).

Poleg diferenčne spektroskopije smo za analizo prekrivajočih se trakov uporabili program Grams, s katerim smo lahko dodatno analizirali notranjo strukturo amidnega I in amidnega III traku. Število modelnih trakov v območju amidnega I in amidnega III nihanja smo določili z uporabo Fourierove dekonvolucije in metode odvajanja spektrov. Podatke o legi in približni relativni intenziteti modelnih trakov, ki jo prav tako lahko dobimo iz dekonvoliranega spektra, smo uporabili za začeten set parametrov pri optimizaciji oblike, lege in intenzitete modelnih trakov. Obliko modelnih trakov smo aproksimirali z vsoto Gaussove in Lorentzove oblike:

$$a_i(\tilde{\nu}) = \varepsilon_i L(\tilde{\nu}) + (1-\varepsilon_i) G(\tilde{\nu}) \qquad \text{Enačba 5.1}$$

Simbol ε predstavlja delež Lorentzove oblike krivulje v i-tem modelnem traku. Za vsak modelni trak smo optimizirali parameter ε, lego, intenziteto, širino in delež Lorentzove funkcije v obliki modelnega traku. Optimizacija parametrov je potekala, dokler nismo dobili zadovoljivega ujemanja med eksperimentalnim spektrom in vsoto vseh modelnih trakov.

5.2.2.1.1 Termično gnan proces: konkanavalin A in stefin B

Spektri pripravljenih vzorcev so bili posneti v temperaturnem območju med 25 °C in 80 °C, s temperaturnim intervalom 5 °C. Da smo se izognili trakovom, ki nastanejo kot posledica absorpcije kristala, smo spektre prazne celice posneli pred vsako meritvijo pri določeni temperaturi. Analiza strukturno občutljivih trakov v amidni I, II in III regiji je temeljila na predhodnih študijah blokiranih dipeptidov [61], raztopin proteinskih molekul z znano strukturo [20] in občutljivosti posameznih nihaj, ki smo jih določili iz hidratacijskih meritev (glej Poglavje 4).

5.2.2.1.2 Časovno odvisen proces: konkanavalin A

Fibrilacijo konkanavalina A, raztopljenega v fosfatnem pufru (pH 9), smo vzpodbudili z gretjem vzorca na 42 °C. Po iniciaciji fibrilacije smo vzorec inkubirali s termalnim stresalnikom Eppendorf Thermomixer pri temperaturi 42 °C in mešali pri 600 rpm. Pred vsako meritvijo smo posneli spekter ozadja, čiste vode in pufra.

5.2.3 Transmisijska elektronska mikroskopija, TEM

5.2.3.1 Konkanavalin A

Sveže pripravljeni vzorec konkanavalina A, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru (pH 5 in pH 9), smo filtrirali skozi 0,2 mikronski filter (Iso-Disc™ s PTFE membrano). Vzorec, čigar koncentracija je znašala 0,5 mg/ml, smo segreli na 42 °C in ga pri tej temperaturi inkubirali 40 min oz. 20 h. Preden smo 100-krat redčen vzorec nanesli na bakreno mrežico proizvajalca Agar Scientific, smo posneli FTIR spekter, s katerim smo preverili stopnjo in vrsto agregacije. Po nanosu vzorca na bakreno mrežico, ki je bila predhodno prevlečena s Formvar folijo in naparjena z ogljikom, smo pustili, da se vzorec absorbira. Po treh minutah smo vzorec sprali in obarvali z 1 % (w/v) kontrastnim sredstvom (uranilacetat). Presežek kontrastnega sredstva smo takoj po barvanju odstranili s filtrirnim papirjem. Tako pripravljeni vzorec smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom Philips CM 100. Uporabljena pospeševalna napetost mikroskopa je znašala 80 kV. Pri slikanju vzorcev smo delali s povečavami od ×10.000 do ×130.000. Slike smo posneli z Gatan Orius SC200 CCD kamero in Digital Micrograph programsko opremo (verzija 3.3; Gatan Inc., Pleasanton, Washington DC, USA, 1998).

5.2.3.2 Stefin B

Liofiliziran vzorec stefina B (ta vzorec ni bil izoliran istočasno kot tisti, ki smo ga uporabili pri snemanju FTIR spektrov) smo raztopili v 0,1 M fosfatnem pufru pri pH vrednosti 5 in 7,5 tako, da je koncentracija stefin B znašala 1 mg/ml. Sveže pripravljen vzorec smo prefiltrirali skozi 0,2 mikronski filter (Iso-Disc™ s PTFE membrano). Prefiltrirani vzorec smo 96 h inkubirali pri temperaturi 50 °C in 300 rpm. Na bakreno mrežico proizvajalca Agar Scientific smo po 96 h nanesli neredčen vzorec po protokolu, ki je opisan za primer konkanavalina A (glej Podnaslov: 5.2.3.1 Konkanavalin A).

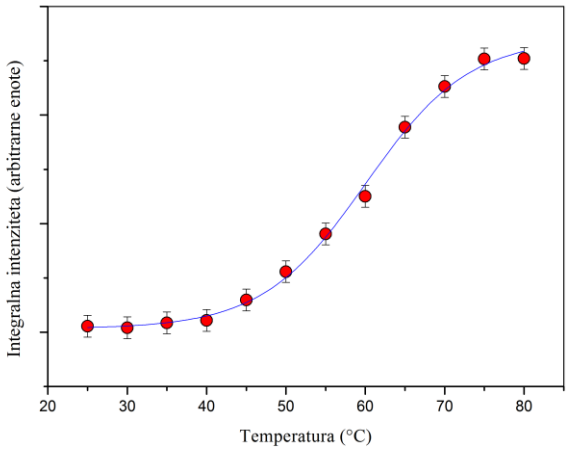
5.3 Rezultati

5.3.1 Konkanavalin A

5.3.1.1 Termično gnana agregacija

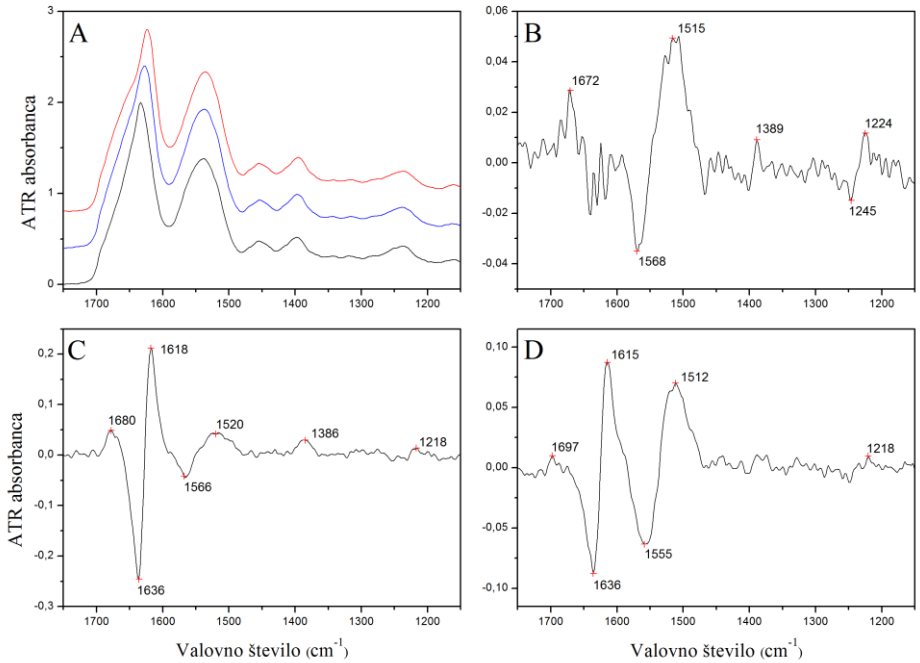
Proces termično gnane agregacije konkanavalina A smo najprej spremljali z diferenčno spektroskopijo. Ta metoda je občutljiva na konformacijske spremembe v nativni strukturi konkanavalina A, ki nastanejo kot posledica zvišanja temperature.

Aplikativnost diferenčne spektroskopije smo najprej preverili pri spremljanju stopnje amiloidne fibrilacije kot funkcije temperature. pH vrednost konkanavalina A, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru, je bila umerjena na 5 v prvem in na 9 v drugem primeru. Na podlagi asignacije modelnih trakov (Tabela 1.2) smo diferenčni trak med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} pripisali amiloidnim strukturam. Kot lahko vidimo, so valovna števila karakteristična za agregirane β-ravnine občutno nižja kot za preostale konformacije. Z integracijo omenjenega diferenčnega traku lahko v odvisnosti od temperature spremljamo sigmoidno povečanje njegove integralne vrednosti (Slika 5.3).



Slika 5.3: Konkanavalin A pri pH 9. Sprememba integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} kot funkcija temperature. T_m=60,0 °C.

Proteinski spektri, posneti pri različnih temperaturah, od katerih smo odšteli spekter topila, so prikazani na Sliki 5.4 A. Brez vpeljave diferenčne spektroskopije iz surovih spektrov težko razberemo morebitne konformacijske spremembe, ki nastanejo kot posledica temperaturnih sprememb. Na Slikah 5.4 B, C in D so prikazani tipični diferenčni spektri, ki povzemajo termično gnano fibrilacijo konkanavalina A pri pH 9.



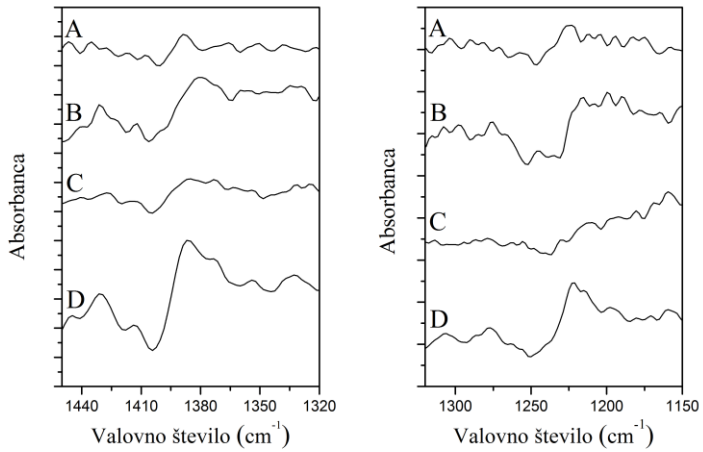
Slika 5.4: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu fibrilacije konkanavalina A pri pH 9. (A) FTIR spektri raztopine konkanavalina A, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 35 °C; moder pri 60 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 35 °C-15 °C; (C) 65 °C-35 °C in (D) 80 °C-65 °C.

Prvi diferenčni spekter je izračunan za začetni del opazovanega procesa. Od spektra, posnetega pri temperaturi 35 °C, smo odšteli spekter, posnet pri 15 °C (Slika 5.4 B). Ta diferenčni spekter je precej drugačen od naslednjih dveh (Slika 5.4 C in D). Pri slednjih diferenčnih spektrih je najočitnejša sprememba opazna v amidni I regiji, medtem ko je v prvem diferenčnem spektru najočitnejša sprememba prisotna v amidnem II traku.

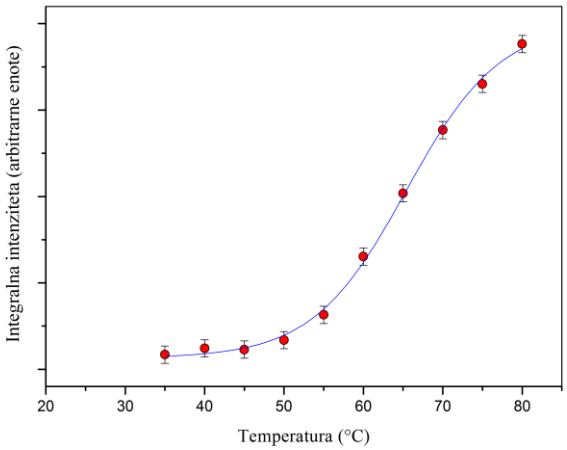
Negativni trak pri višjih frekvencah se pod vplivom segrevanja premakne k nižjim frekvencam. Osrednji prispevek k amidnemu II traku prispevajo NH deformacije. Trakovi, ki jih vidimo v amidnem II traku (Slika 5.4 B) nastanejo kot posledica oslabitve H-vezi, kjer NH skupine na stranskih verigah nastopajo kot proton donorske skupine. Spremembe v amidnem I in amidnem III traku so manj opazne. Kljub temu v amidnem III traku že lahko opazimo komponento pri nižjih frekvencah. Njena prisotnost nakazuje strukturne spremembe, ki izhajajo iz procesa proteinske agregacije. Strukturne spremembe, ki jih bomo podrobneje opisali kasneje, postanejo izrazitejše v naslednjih dveh stopnjah (Slika 5.4 C in D).

Drugi diferenčni spekter smo izračunali kot razliko med spektrom, posnetim pri 65 °C in 35 °C (Slika 5.4 C). Ta diferenčni spekter povzema strukturne spremembe, ki nastanejo v eksponentni fazi rasti amiloidnih fibril (Slika 5.3). Diferenčni spekter, ki povzema stabilno fazo amiloidne fibrilacije konkanavalina A, je bil izračunan tako, da smo spekter, posnet pri 65 °C, odšteli od spektra, ki smo ga posneli pri 80 °C (Slika 5.4 D).

Na Sliki 5.5 so prikazani diferenčni spektri, ki smo jih izračunali iz spektrov, posnetih za raztopino konkanavalina A pri pH 9. Povečani sta dve spektralni območji, in sicer leva slika prikazuje območje antisimetričnega COO^- valenčnega nihanja, medtem ko desna slika prikazuje amidno III regijo. Mehanizem, ki smo ga že opisali za primer amidnega II področja, tudi v tem območju v odvisnosti od višje temperature pomakne trak antisimetričnega valenčnega nihanja COO^- skupin k nižjim frekvenčnim vrednostim. Zvišanje temperature oslabi omrežje H-vezi. Na desni strani Slike 5.5 so prikazane diferenčne spremembe v amidnem III območju, kjer opazimo podobne spremembe v obliki in intenziteti trakov, kot jih najdemo v območju asimetričnega valenčnega nihanja COO^- skupin stranskih verig. Kompleksna struktura diferenčnih trakov v amidni III regiji potrjuje konformacijske spremembe, ki so povzete v Tabeli 1.2.



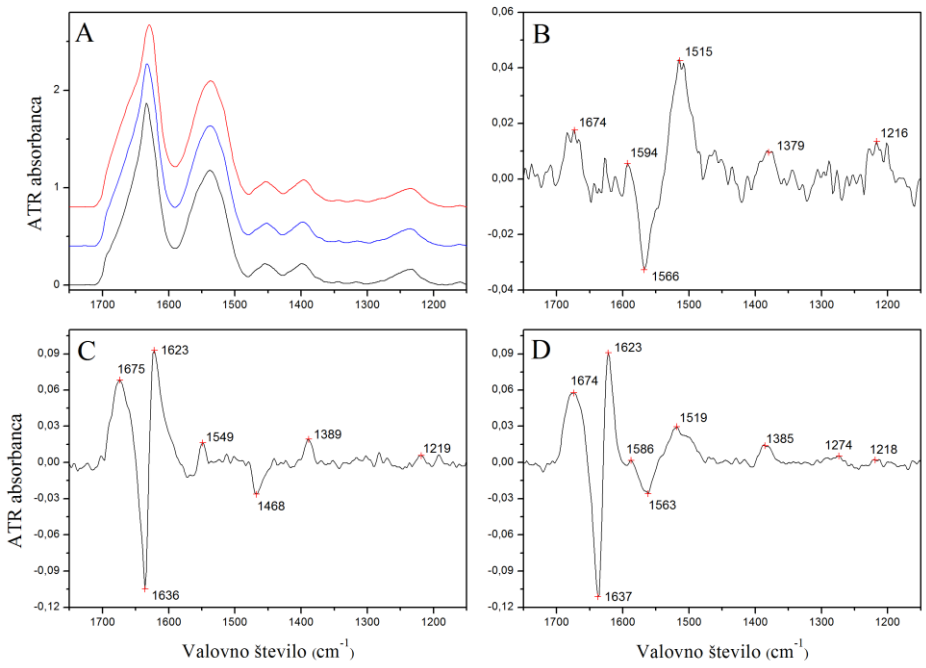
Slika 5.5: Povečava diferenčnih spektrov, izračunanih iz spektrov, posnetih za raztopino konkanavalina A pri pH vrednosti 9. (Leva slika) Diferenčni spekter v ν_s COO^- spektralni regiji. (A) 35 °C-15 °C; (B) 60 °C-35 °C; (C) 75 °C-60 °C in (D) 75 °C-15 °C. (Desna slika) Diferenčni spektri v amidni III regiji: (A) 35 °C-15 °C; (B) 60 °C-35 °C; (C) 75 °C-60 °C in (D) 75 °C-15 °C.



Slika 5.6: Odvisnost intenzitete diferenčnega traku pri 1625 cm^{-1} od temperature za konkanavalin A, raztopljenega v 0,1 M raztopini fosfatnega pufra pri pH 5. T_m=65,4 °C.

Enak protokol dela smo izvedli na primeru konkanavalina A, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru s pH vrednostjo 5. Pri tej pH vrednosti, v primerjavi s pH 9, kjer smo opazovali tvorbo amiloidnih fibril, pričakujemo tvorbo amorfnih agregatov [231]. Karakteristični spektri in pripadajoči diferenčni spektri so prikazani na Sliki 5.7.

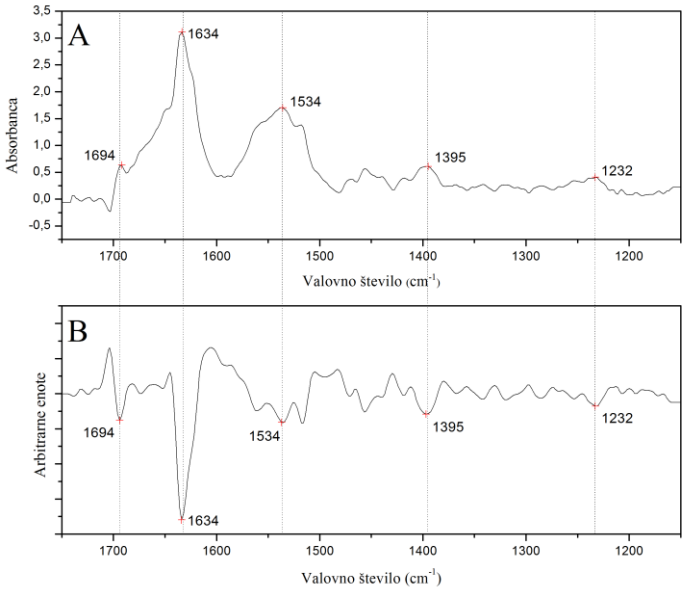
Spektri, posneti pri 35 °C (črn), 60 °C (moder) in 75 °C (rdeč), so prikazani na Sliki 5.7 A. Začetni del agregacije je prikazan z diferenčnim spektrom na Sliki 5.7 B. Spekter, posnet pri 30 °C, smo odšteli od spektra, posnetega pri 50 °C. Od spektra, posnetega pri 65 °C, smo odšteli spekter, posnet pri 50 °C, in tako povzeli informacije, ki konformacijsko opišejo osrednji del tvorbe amorfnih agregatov (Slika 5.7 C). Zadnji diferenčni spekter je bil izračunan kot razlika med spektrom, posnetim pri 80 °C, in spektrom, posnetim pri 65 °C (Slika 5.7 D).



Slika 5.7: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu fibrilacije konkanavalina A pri pH 5. (A) FTIR spektri raztopine konkanavalina A, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 35 °C; moder pri 60 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 50 °C-30 °C; (C) 65 °C-50 °C in (D) 80 °C-65 °C.

Diferenčna spektroskopija nam je ponudila prvi vpogled v konformacijske spremembe, ki nastanejo, ko segrevamo konkanavalin A, raztopljen v fosfatnem pufru s pH vrednostjo 5 oz. 9. Tako pridobljene informacije smo izkoristili pri metodi dekompozicije modelnih trakov, s katero lahko konformacijske spremembe tudi kvantitativno ocenimo.

Kvantitativno analizo smo pričeli z uporabo Fourierove dekonvolucije in metode odvajanja spektrov. Obe tehniki izboljšata ločljivost spektralnih območij in tako močno pripomoreta pri določevanju števila in lege modelnih trakov v amidnem I in amidnem III območju. Na Sliki 5.8 sta prikazana dekonvolirani spekter (A) in drugi odvod spektra (B), posnetega za primer konkanavalina A, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru s pH vrednostjo 9 in pri temperaturi 15 °C.



Slika 5.8: (A) Dekonvoliran spekter raztopine konkanavalina A pri 15 °C in pH 9. Parametra dekonvolucije sta γ=13,5 in glajenje 71 %. (B) Drugi odvod istega spektra.

Primer začetnega seta lege modelnih trakov za amidno I in amidno III območje, ki smo jih izračunali z dekonvolucijo in drugim odvodom, je podan v Tabeli 5.2. Te podatke smo uporabili pri usklajevanju oblike, lege in intenzitete modelnih trakov, katerih obliko smo optimizirali z vsoto krivulj Gaussove in Lorentzove oblike (Enačba 5.1). Dekonvolirane spektre in njihove druge odvode smo uporabili pri izračunih modelnih trakov za naslednje primere:

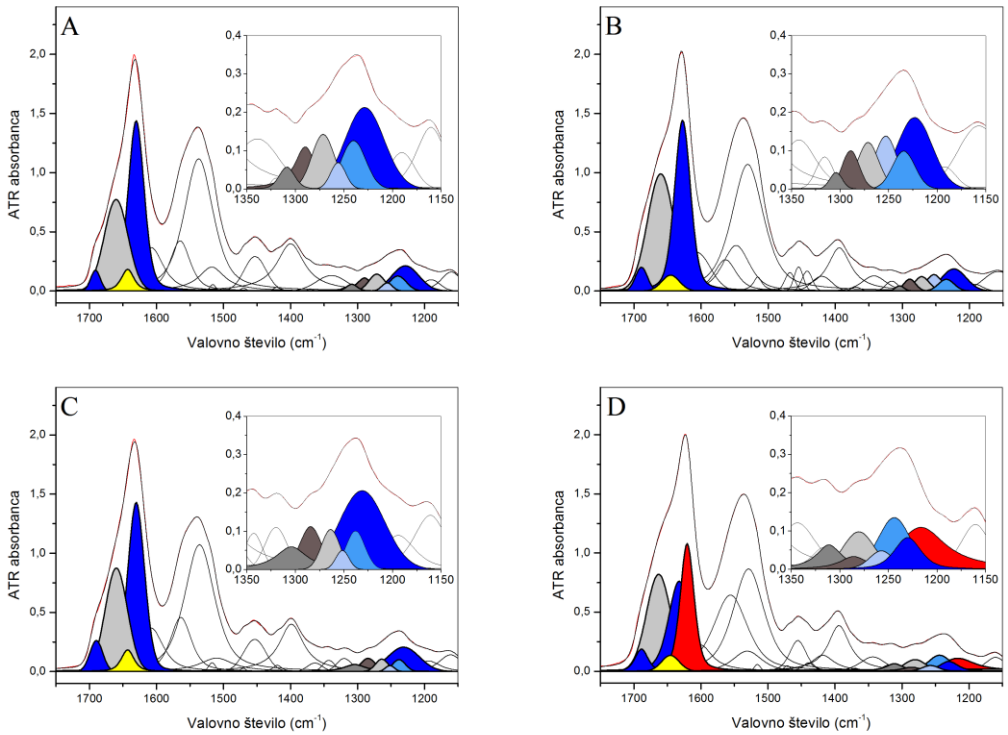
- konkanavalin A, raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 9 pri temperaturi 15 °C;
- konkanavalin A, raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 9 pri temperaturi 75 °C;
- konkanavalin A, raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 5 pri temperaturi 15 °C;
- konkanavalin A, raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 5 pri temperaturi 75 °C.

Dekonvolirani spektri in izračunani odvodi ter začetni seti, pridobljeni iz njih, niso prikazani za zadnje tri zgoraj navedene primere.

Tabela 5.2: Lega modelnih trakov, izračunana z dekonvolucijo in drugim odvodom spektra raztopine konkanavalina A, posnetega pri pH 9 in temperaturi 15 °C.

	Valovno število (cm^{-1})	
	Dekonvolucija	**Drugi odvod**
Amid I	1704	1703
	1694	1694
	1658	1662
	1647	1645
	1634	1634
	1624	-
Amid III	1309	1309
	1297	1297
	1285	1286
	1268	1264
	1253	1253
	1232	1232
	1220	1220

Shematska predstavitev uspešne optimizacije modelnih trakov na primeru termično gnane agregacije konkonavalina A je prikazana na Sliki 5.9. Predstavljeno je območje med 1750 cm^{-1} in 1150 cm^{-1}. Z rdečo bravo je predstavljen realni, posneti spekter, medtem ko spekter črne barve predstavlja vsoto vseh modelnih trakov, tj. izračunani spekter. S kraljevsko modro barvo sta v amidnem I območju predstavljena modelna trakova, ki pripadata β-sekundarnim strukturam. V istem območju je trak sive barve karakterističen za nestrukturiran del, rdeče barve pa trak, ki smo ga pripisali agregirani β-strukturi. Poleg opisanih trakov se v tem območju nahaja tudi trak rumene barve, ki pripada deformacijskim nihanjem na protein vezanih molekul vode. Tudi v amidnem III območju smo trakove temno modrih odtenkov pripisali β-strukturam. Svetlo moder in svetlo siv trak pripadata deležu aminokislin, ki zavzamejo β-konformacijo, niso pa del β-struktur. Sivorjav trak pripada aminokislinam z α-konformacijo, siv trak pa predstavlja aminokisline, ki posedujejo PP_{II} konformacijo. Tako kot v amidnem I smo tudi v amidnem III območju agregirano β-strukturo predstavili z rdečo barvo. Analizo amidnega II področja, ki je sicer zelo občutljivo na tvorbo H-vezi med NH skupinami glavne verige in različnimi proton akceptorskimi skupinami, otežujejo nihanja različnih molekulskih skupin stranskih verig. Ker so ta nihanja v tem območju zelo intenzivna, je natančna analiza amidnega II področja zelo otežena in nezanesljiva. Slednje je razlog, da analize tega območja nismo naredili.



Slika 5.9: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri (A) KonA (pH 5) pri T=15 °C; (B) KonA (pH 5) pri T=75 °C; (C) KonA (pH 9) pri T=15 °C in (D) KonA (pH 9) pri T=75 °C.

Izračun zastopanosti posamezne konformacije oz. sekundarne strukture je z znano asignacijo posameznih modelnih trakov preprost. Predpostavimo, da velja Beer-Lambertov zakon, kar navezuje sorazmerno odvisnost med zastopanostjo posamezne strukturne komponente z njeno integralno vrednostjo. V tej aproksimaciji velja:

$$\chi_i = \frac{\int a_i(\tilde{\nu})d\tilde{\nu}}{\sum_i \int a_i(\tilde{\nu})d\tilde{\nu}} * 100 \qquad \text{Enačba 5.2}$$

χ_i predstavlja zastopanost v % i-te strukture. Izraz $\int a_i(\tilde{\nu})d\tilde{\nu}$ predstavlja integralno intenziteto posamezne strukturne komponente.

V Tabeli 5.3 so predstavljeni izračunani deleži za posamezne konformacije, ki smo jih izračunali za začetek in konec termično gnane amorfne (pH 5) oz. amiloidne (pH 9) agregacije. Skupaj z deleži so navedena tudi valovna števila, pri katerih se nahaja pripadajoči modelni trak. Asignacija modelnih trakov je bila narejena na podlagi asignacije valovnih števil v Tabeli 1.2.

Tabela 5.3: Povzetek konformacijskih sprememb v amidnem I in amidnem III področju, ki smo jih določili z metodo dekompozicije spektralnih trakov. Konformacijske spremembe so posledica termično odvisne agregacije konkanavalina A pri pH 5 in 9.

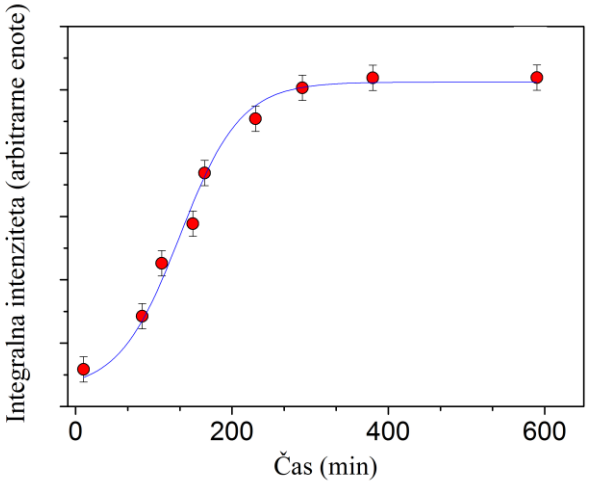
	Amorfna agregacija pH=5				Konformacija	Amiloidna fibrilacija pH=9			
Trak		T=15 °C	T=75 °C				T=15 °C	T=75 °C	
	(cm^{-1})	(%)	(%)	(cm^{-1})		(cm^{-1})	(%)	(%)	(cm^{-1})
Amid I	1691	4	4	1689	β-ravnina	1690	7	5	1689
	1660	40	48	1660	obrat, zavoj	1660	40	34	1663
	1630	56	48	1628	β-ravnina	1630	53	31	1632
	1626	0	0	1620	prečna β-st.	1620	0	30	1620
Amid III	1309	5	3	1304	PP_{II}	1304	13	10	1311
	1290	17	10	1289	α	1284	14	6	1286
	1272	16	16	1271	β_{120}	1264	10	14	1280
	1256	5	19	1253	β_{150}	1252	3	6	1257
	1240	16	13	1235	β-trak	1238	10	22	1244
	1228	42	39	1223	β-ravnina	1231	49	11	1230
	1220	0	0	1216	prečna β-st.	1220	0	31	1216

5.3.1.2 Časovno gnana agregacija

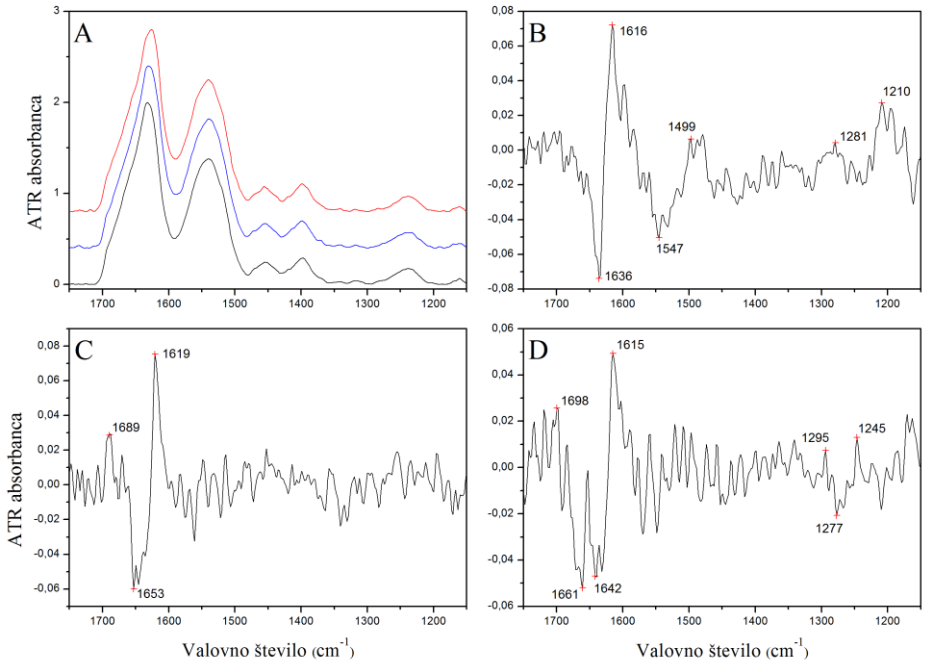
Podobno metodologijo dela, kot smo jo uporabili pri obdelavi spektrov, posnetih med termično gnano agregacijo konkanavalina A pri pH vrednostih 5 in 9, smo uporabili tudi za spremljanje časovno odvisne agregacije konkanavalina A pri pH vrednosti 9.

Iz diferenčnih spektrov, ki smo jih izračunali tako, da smo od spektrov, posnetih pri določenem času, odšteli spekter, posnet ob času nič, smo integrirali diferenčni trak med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1}. Sigmoidna odvisnost integralne intenzitete v odvisnosti od časa je prikazana na Sliki 5.10.

Podrobnejšo analizo smo tako kot v primeru termično gnane agregacije pričeli z izračunom diferenčnih spektrov. Izračunali smo diferenčne spektre za začetni del agregacije, fazo rasti in stabilno fazo. Spektre, iz katerih smo pripravili diferenčne spektre, smo določili na podlagi sigmoidne odvisnosti integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} od časa (Slika 5.10). Karakteristični spektri, posneti ob času 10 min, 150 min in 380 min, so prikazani na Sliki 5.11 A. Na Slikah 5.11 B, C in D so prikazani izračunani diferenčni spektri za posamezno agregacijsko stopnjo. Diferenčni spekter na Sliki 5.11 B predstavlja začetno stopnjo agregacije. Izračunali smo ga kot razliko med spektrom, posnetim ob času 85 min, in spektrom, posnetim ob času 110 min. Vmesni del agregacije opiše diferenčni spekter, izračunan kot razlika med spektroma, posnetima po 165 in 110 minutah od začetka iniciacije agregacije (Slika 5.11 C). Stabilno fazo predstavlja zadnji diferenčni spekter (Slika 5.11 D), izračunan tako, da smo od spektra, posnetega pri 380 min, odšteli spekter, posnet pri 165 min.



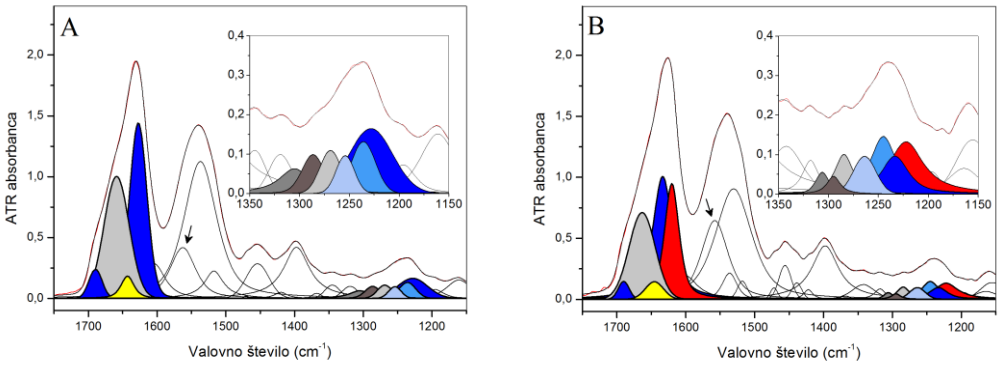
Slika 5.10: Sprememba integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} kot funkcija časa. Spektri so bili posneti pri T=42 °C.



Slika 5.11: Aplikacija diferenčne spektroskopije na primeru spremljanja časovno odvisnih konformacijskih sprememb za primer fibrilacije konkanavalina A pri 42 °C. (A) FTIR spektri raztopine konkanavalina A, posneti ob različnih časih (črn pri 10 min; moder pri 165 min in rdeč pri 380 min). Spekter topila je odštet. (B) 85 min-110 min; (C) 165 min-110 min in (D) 380 min-165 min.

Informacije o konformacijskih spremembah, ki smo jih pridobili z diferenčnimi spektri (Slika 5.11), smo s pridom izkoristili pri kvantitativnem opisu časovno odvisnih strukturnih sprememb. Tako kot smo to storili na primeru termično gnanih agregacij s

konkanavalinom A (pH 5 in 9), smo tudi v tem primeru za kvantitativno analizo uporabili metodo samousklajevanja modelnih trakov. Poleg diferenčne spektroskopije smo potreben set informacij (lego in relativno intenziteto) pridobili z dekonvolucijo in drugim odvodom (podatki niso prikazani). Z vsemi opisanimi podatki smo pripravili kvantitativno analizo strukturnih sprememb, ki nastanejo kot posledica časovno odvisne agregacije konkanavalina A pri 42 °C in pH vrednosti 9. Shematska predstavitev je prikazana na Sliki 5.12. Začetno (nativno) stanje konkanavalina A pri 42 °C, pH vrednosti 9 in času 0 min je predstavljeno na Sliki 5.12 A. Shematska ponazoritev modelnih trakov, ki smo jih samouskladili za spekter konkanavalina A pri pH vrednosti 9, temperaturi 42 °C in času 380 min, je prikazana na Sliki 5.12 B. Barve posameznih modelnih trakov pripadajo enakim konformacijam, kot smo jih uporabili na primeru modelnih trakov za termično gnan proces agregacije. V amidnem I traku smo modelne trakove, ki pripadajo β-strukturam, obarvali z modro barvo. Sive barve je trak, ki pripada neurejeni konformaciji, rumene pa trak, karakterističen za deformacijska nihanja hidratirajoče vode. V amidni I regiji (Slika 5.12 B) opazimo tudi trak rdeče barve, ki ponazarja agregirano β-konformacijo. V amidni III regiji si modelni trakovi od leve proti desne (od višjih proti nižjim valovnim številom) sledijo v naslednjem vrstem redu: trak temno sive barve pripada PP_{II} konformaciji, trak sivorjave barve α-konformacijam, trakova svetlo sive in svetlo modre barve pripadata aminokislinam, ki posedujejo β-konformacijo, ne pripadajo pa β-strukturam. Preostala dva trakova modre barve predstavljata β-konformacijo (β-trakove in β-ravnine). Tudi v amidnem III spektralnem območju je modelni trak rdeče barve pripisan agregiranim β-strukturam.



Slika 5.12: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri (A) KonA (pH 9) v lag fazi (t=10 min) in (B) KonA (pH 9) v stabilni fazi (t=380 min).

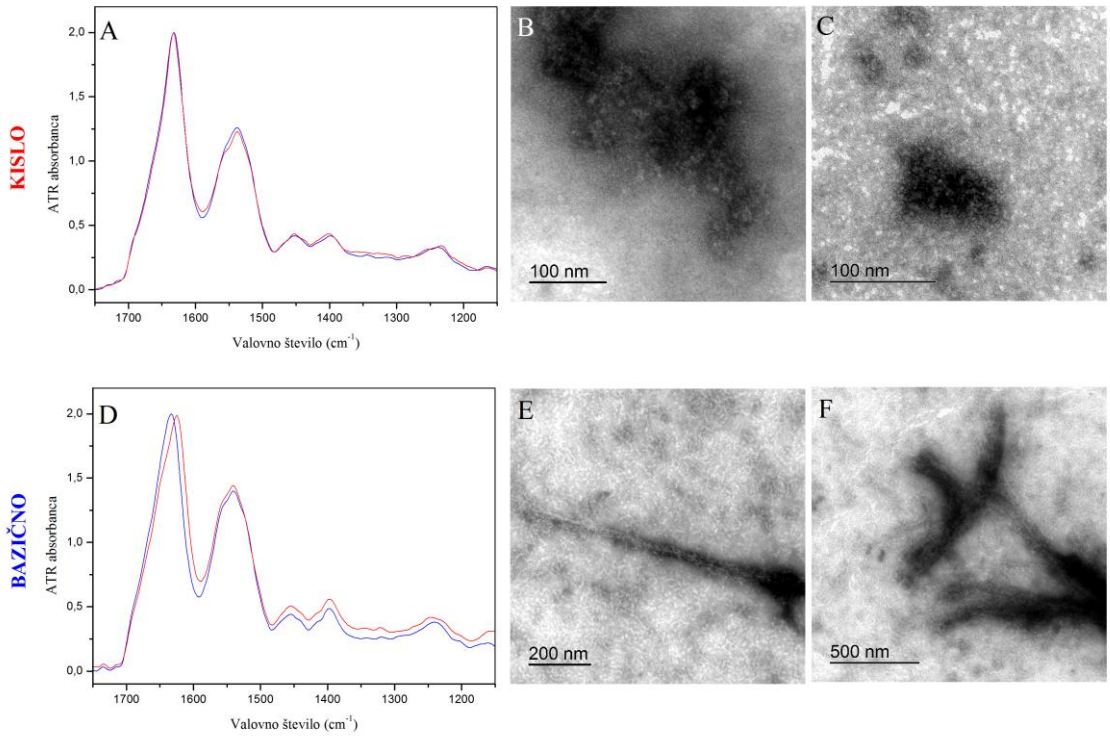
Na Sliki 5.12 je s puščico prikazan modelni trak v amidni II regiji z valovno dolžino okrog 1560 cm^{-1}. Njegova integralna intenziteta se tekom agregacije poveča, kar nakazuje na zvišanje populacije NH skupin z močno H-vezjo.

Zastopanost posamezne konformacije oz. sekundarne strukture, izračunana na podlagi znane asignacije posameznih modelnih trakov in Beer-Lambertovega zakona, je prikazana v Tabeli 5.4. Izračun je bil narejen na podlagi Enačbe 5.2. Poleg izračunanih deležev posameznih konformacij v začetni (t=10 min) in stabilni (t=380 min) fazi so v Tabeli 5.4 navedena tudi valovna števila, ki pripadajo posameznim modelnim trakovom.

Tabela 5.4: Povzetek konformacijskih sprememb časovno odvisnega procesa amiloidne agregacije konkanavalina A v amidnem I in amidnem III področju.

	Začetna faza		Konformacija	Stabilna faza	
	(cm^{-1})	t=10 min		(cm^{-1})	t=380 min
Amid I	1689	4	β-ravnina	1687	6
	1664	40	obrat, zavoj	1661	34
	1631	40	β-ravnina	1633	31
	1625	17	prečna β-st.	1620	28
Amid III	1305	12	PP_{II}	1312	14
	1291	4	α	1288	4
	1280	15	β_{120}	1281	13
	1265	9	β_{150}	1260	6
	1255	21	β-trak	1248	0
	1237	24	β-ravnina	1239	36
	1217	15	prečna β-st.	1219	27

5.3.1.3 Transmisijska elektronska mikroskopija



Slika 5.13: Rezultati transmisijske elektronske mikropskopije. (A) Spekter iz začetka (modra) in s konca (rdeča, 20 h) agregacijskega procesa v kislem okolju. (B) Amorfni agregati, ki nastanejo v termično gnanem procesu pri pH vrednosti 5 po 40 min od začetka iniciacije in (C) po 20 h od začetka iniciacije. Vidijo se posamezne monomerne enote, ki nimajo jasnih robov. (D) Spekter iz začetka (modra) in konca (rdeča, 20 h) agregacijskega procesa v bazičnem okolju. (E) Amiloidne fibrile, končni produkt agregacije konkanavalina A v bazičnem okolju (pH 9) po 40 min od začetka iniciacije in po 20 h od začetka iniciacije. Premer posamezne fibrile znaša približno 5 nm.

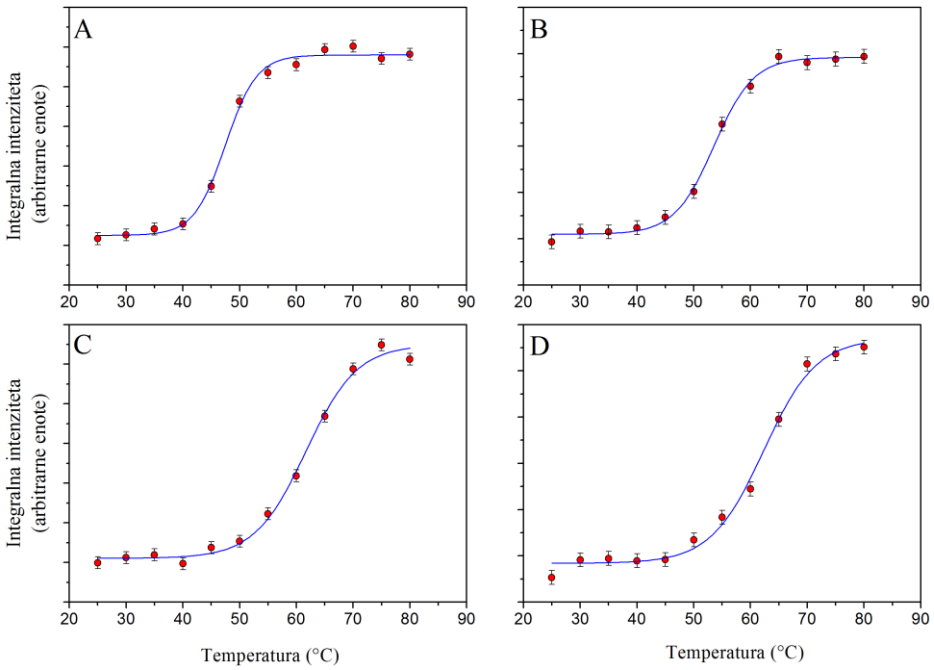
Agregati konanavalina A, ki se tvorijo pri različnih pH vrednostih, posedujejo različne morfološke oblike. Pri kislih pH vrednostih s transmisijsko elektronsko mikroskopijo opazimo amorfne agregate (Slika 5.13 B in C), v katerih lahko še vedno opazimo posamezne monomerne enote, katerih robovi se med seboj prepletajo oz. zlivajo. V bazičnem okolju konkanavalin A tvori amiloidne fibrile. Premer ene fibrile znaša približno 5 nm. Po 40 min od iniciacije amiloidne agregacije že opazimo podolgovate strukture (Slika 5.13 E), poleg katerih se nahaja še veliko monomernih enot. Po 20 h od začetka iniciacije je monomernih enot oz. manjših agregatov manj. Zdi se, da se podolgovate strukture združujejo v večje snope (Slika 5.13 F), kar bi lahko pomenilo, da se protofilamenti združujejo med seboj v amiloidne fibrile. Potrebno je poudariti, da tudi po 20 h od začetka agregacijskega procesa v bazičnem okolju še vedno opazimo strukture, ki niso podolgovatih oblik. Spominjajo na manjše agregate monomernih enot, vendar te strukture v našem vzorcu ne prevladujejo.

5.3.2 Stefin B

5.3.2.1 Termično gnana agregacija

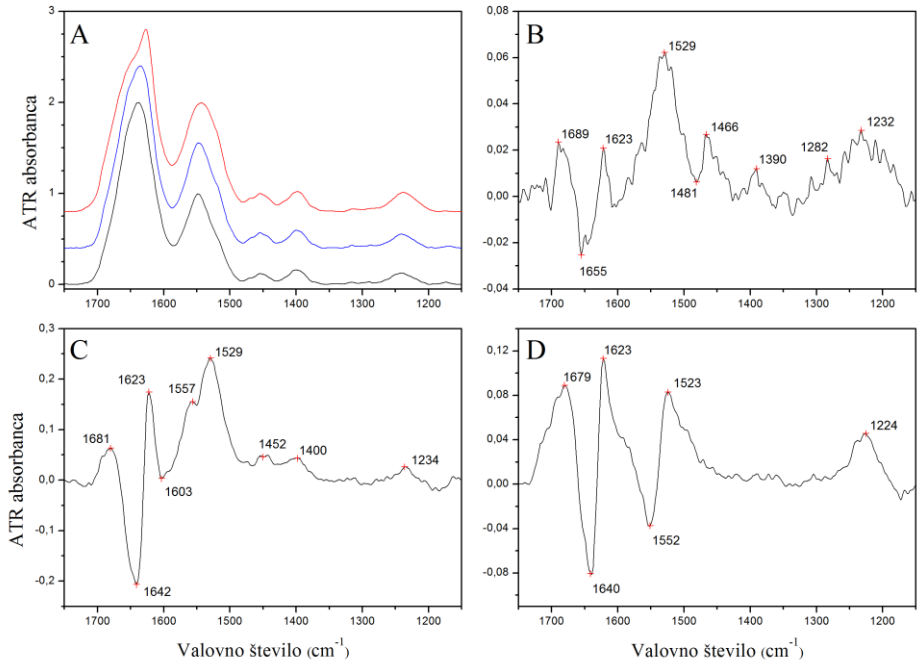
Znanje, ki smo ga pridobili pri spremljanju agregacijskega mehanizma na primeru konkanavalina A, smo želeli razširiti tudi na protein, ki ga direktno povezujemo z amiloidozami. Stefin B smo raztopili v 0,1 M fosfatnem pufru in mu pH uravnali na naslednje vrednosti: 3, 5, 7,5 in 9. Spremljali smo termično gnano agregacijo. Sprememba integralne intenzitete traku med 1600 cm^{-1} in 1627 cm^{-1} v odvisnosti od temperature pri posamezni pH vrednosti je prikazana na Sliki 5.14: (A) pH=3; (B) pH=5; (D) pH=7,5 in (D) pH=9.

Temperatura prehoda (T_m) se pri različnih pH vrednostih razlikuje. Najnižja je pri pH vrednosti 3, tj. 47 °C. 54 °C je temperatura prehoda pri pH vrednosti 5, medtem ko je pri pH 7,5 in pH 9 najvišja in znaša 62 °C.



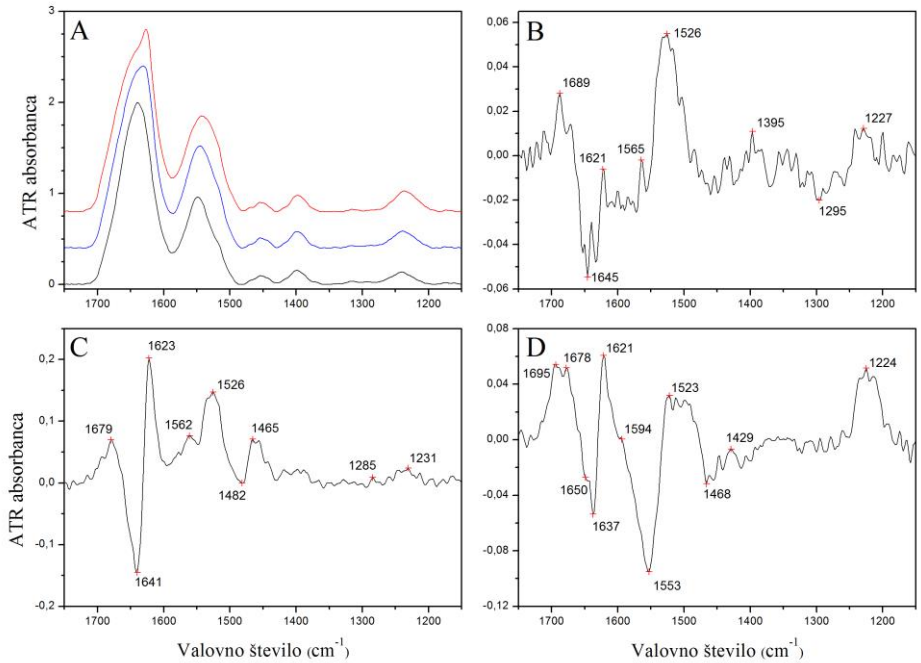
Slika 5.14: Sprememba integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1} kot funkcija temperature. (A) pH 3, T_m=47 °C; (B) pH 5, T_m=54 °C; (C) pH 7,5, T_m=62 °C in (D) pH 9, T_m=62 °C.

Na podlagi pripravljenih isotermnih krivulj smo za posamezno pH vrednost izračunali diferenčne spektre za vsako izmed treh karakterističnih območij: lag fazo, fazo rasti in stabilno fazo. Spektre, iz katerih smo izračunali diferenčne spektre za posamezno fazo agregacije, smo določili na podlagi že omenjenih isotermnih krivulj, iz katerih lahko določimo, v kateri fazi agregacije se pri določeni temperaturi in pH vrednosti nahaja posneti spekter.



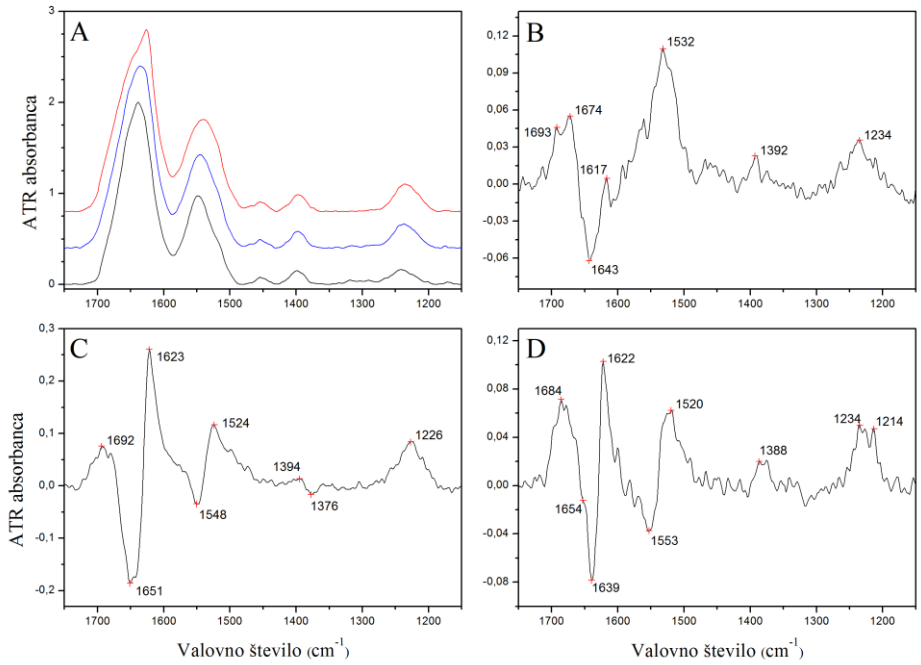
Slika 5.15: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 3. (A) FTIR spektri raztopine stefina B, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 30 °C; moder pri 45 °C in rdeč pri 65 °C). Spekter topila je odštet. (B) 40 °C-30 °C; (C) 50 °C-40 °C in (D) 65 °C-50 °C.

Na Sliki 5.15 A so prikazani karakteristični spektri termično gnanega procesa agregacije stefina B pri pH vrednosti 3. Lag fazo predstavlja spekter črne barve, ki je bil posnet pri 30 °C (Slika 5.15 B). Fazo rasti predstavlja spekter modre barve, posnet pri 45 °C (Slika 5.15 C), rdeče barve pa je spekter stabilne faze, posnet pri 65 °C (Slika 5.15). Diferenčni spekter, ki povzame konformacijske spremembe v lag fazi, smo izračunali kot razliko med spektrom, posnetim pri 40 °C, in tistim, ki smo ga posneli pri 30 °C. Razlika med spektroma, posnetima pri temperaturah 50 in 40 °C, prikaže konformacijske spremembe, ki se zgodijo v fazi rasti, medtem ko razlika med spektroma, ki sta bila posneta pri 65 in 50 °C, povzame strukturne spremembe v stabilni fazi.



Slika 5.16: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 5. (A) FTIR spektri raztopine stefina B, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 30 °C, moder pri 55 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 40 °C-20 °C; (C) 60 °C-50 °C in (D) 75 °C-60 °C.

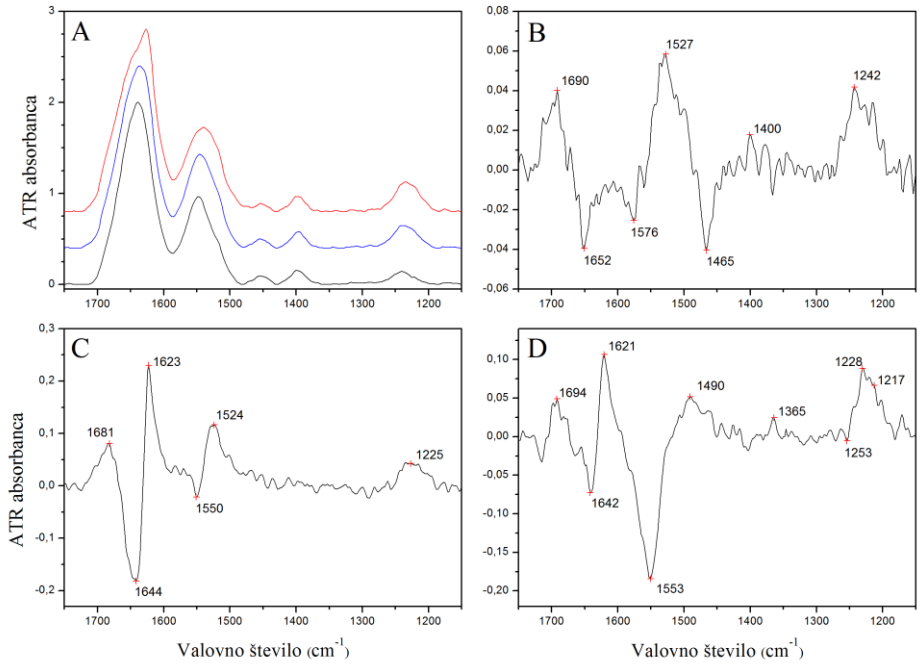
Na zgornji Sliki 5.16 A so prikazani spektri, ki smo jih posneli med značilnimi fazami agregacijskega procesa stefina B pri pH 5. Agregacijski proces smo spremljali kot funkcijo segrevanja. Črni spekter je predstavnik spektrov, posnetih v stabilni fazi, tj. pri 30 °C, spekter modre barve je značilen za fazo rasti in je bil posnet pri 55 °C. Zadnjo fazo opazovanega procesa predstavlja spekter rdeče barve, posnet pri 75 °C. Prvi diferenčni spekter smo izračunali z odštevanjem spektra, posnetega pri 40 °C, in tistega, ki smo ga posneli pri 20 °C (Slika 5.16 B). Fazo rasti in konformacijske spremembe, ki se zgodijo v njej, predstavlja razlika med spektroma, posnetima pri 60 in 50 °C (Slika 5.16 C). Zadnjo fazo, fazo, ki jo imenujemo tudi stabilna faza, in konformacijske spremembe v njej povzema diferenčni spekter, izračunan iz spektrov, posnetih pri 75 in 60 °C (Slika 5.16 D).



Slika 5.17: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 7,5. (A) FTIR spektri raztopine stefina B, posneti pri različnih temperaturah (črn pri 35 °C; moder pri 60 °C in rdeč pri 75 °C). Spekter topila je odštet. (B) 45 °C-30 °C; (C) 65 °C-50 °C in (D) 80 °C-65 °C.

Značilni spektri termično gnanega procesa agregacije pri pH 7,5 so predstavljeni na Sliki 5.17 A. Posneti so bili pri 35 °C (črne barve), 60 °C (modre barve) in 75 °C (rdeče barve). Prvi diferenčni spekter je bil izračunan kot razlika med spektrom, posnetim pri 45 °C, in tistim, ki smo ga posneli pri 30 °C. Tako izračunan spekter nosi informacije o konformacijskih spremembah, ki jih opazujemo v lag fazi (Slika 5.17 B). Strukturne spremembe, ki se zgodijo v fazi rasti, predstavlja razlika med spektroma, posnetima pri 65 in 50 °C (Slika 5.17 C). Zadnji diferenčni spekter (Slika 5.17 D) je bil izračunan kot razlika med spektroma, posnetima pri 80 in 65 °C.

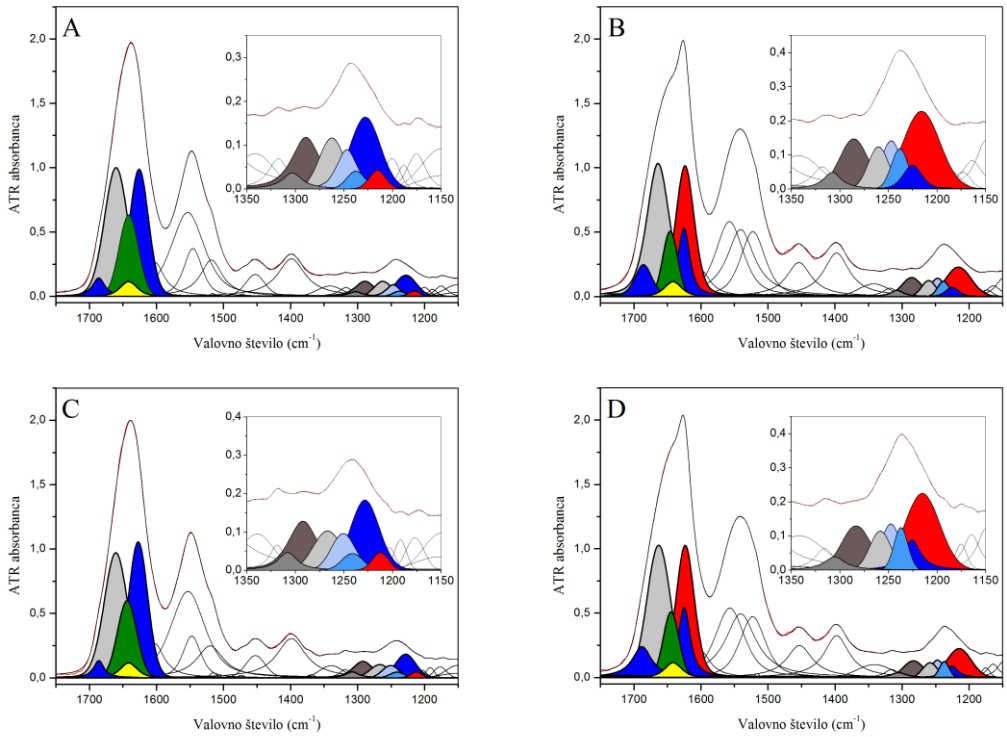
Na Sliki 5.18 prikazujemo značilne spektre stefina B (A) in diferenčne spektre (B, C in D) za temperaturno odvisen proces agregacije stefina B pri pH vrednosti 9. Karakteristični spektri so bili posneti pri 30 °C (črn), 45 °C (moder) in 65 °C (rdeče barve). Za območje lag faze smo diferenčni spekter izračunali kot razliko med spektroma, posnetima pri 40 in 30 °C (Slika 5.18 B). Fazo rasti in strukturne spremembe, ki se zgodijo v njej, predstavlja razlika med spektrom, ki smo ga posneli pri 50 °C, in tistim, ki smo ga posneli pri 40 °C (Slika 5.18 C). Zadnji diferenčni spekter povzema zadnji del termično odvisne agregacije stefina B pri pH 9. Izračunan je bil z odštevanjem spektra, posnetega pri 50 °C, od tistega, ki smo ga posneli pri 65 °C (Slika 5.18 D).



Slika 5.18: Aplikacija diferenčne spektroskopije za primer spremljanja konformacijskih sprememb v termično gnanem procesu agregacije stefina B pri pH 9. (A) FTIR spektri raztopine stefina B posneti pri različnih temperaturah (črn pri 30 °C; moder pri 45 °C in rdeč pri 65 °C). Spekter topila je odštet. (B) 40 °C-30 °C; (C) 50 °C-40 °C in (D) 65 °C-50 °C.

Postopek, ki smo ga uporabili pri nadaljnji analizi agregacijskega procesa stefina B, odvisnega od segrevanja, je enak tistemu pri konkanavalinu A. Poleg diferenčnih spektrov smo za začetek in konec agregacijskih procesov pri vseh pH vrednostih izračunali tudi dekonvolirane spektre in spektre drugega odvoda. Tako pridobljeni podatki (niso prikazani) so nam skupaj z informacijami, pridobljenimi iz diferenčnih spektrov, služili pri kvantitativnem določanju opazovanih sprememb. Te spremembe smo ovrednotili z dekompozicijo modelnih trakov v amidni I in amidni III regiji. Shematska predstavitev je prikazan na Sliki 5.19 (za pH 3 in pH 5) in na Sliki 5.20 (za pH 7,5 in pH 9). Deleže smo izračunali na osnovi znane asignacije modelnih trakov (Tabela 1.2) in ob predpostavki veljavnosti Beer-Lambertovega zakona (aproksimacija je podana v Enačbi 5.2). Izračunani deleži se za primer stefina B pri pH 3 in pH 5 nahajajo v Tabeli 5.5, za pH vrednosti 7,5 in 9 pa v Tabeli 5.6.

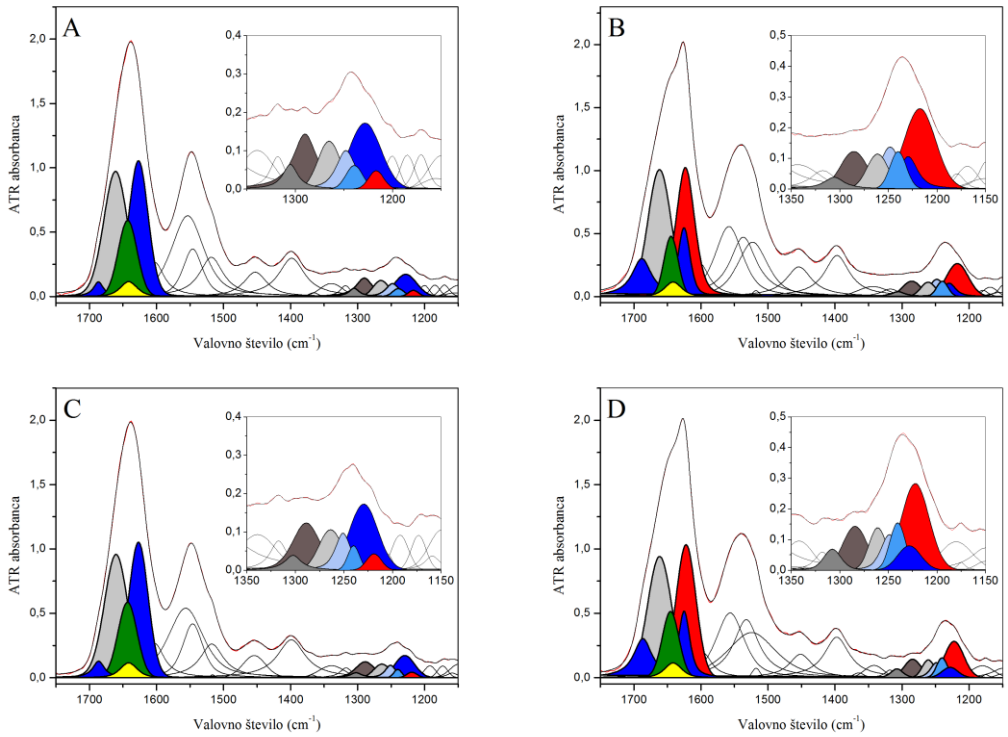
Vse modelne trakove (Sliki 5.19 in 5.20) smo obarvali po enakem protokolu, kot smo to storili na primeru konkanavalina A. V amidni I regiji so z modro obarvani trakovi β-struktur, z zeleno α-struktur, s sivo neurejenih struktur, z rdečo agregiranih β-struktur. Z rumeno je obarvan trak, ki pripada vibracijam vezanih molekul vode. Tudi v amidni III regiji smo trakove temno modrih odtenkov pripisali β-strukturam. Svetlo moder in svetlo siv trak pripadata deležu aminokislin, ki zavzamejo β-konformacijo, niso pa del β-struktur. Sivorjav trak pripada aminokislinam z α-konformacijo, siv trak pa predstavlja aminokisline, ki posedujejo PP_{II} strukturo. Tako kot v amidnem I smo tudi v amidnem III območju agregirano β-strukturo predstavili z rdečo barvo.



Slika 5.19: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri: (A) stefinu B (pH 3) pri T=35 °C; (B) stefin B (pH 3) pri T=70 °C; (C) stefin B (pH 5) pri T=25 °C in (D) stefin B (pH 5) pri T=75 °C.

Tabela 5.5: Povzetek konformacijskih sprememb v amidnem I in amidnem III področju, ki smo jih določili z metodo dekompozicije spektralnih trakov. Konformacijske spremembe so posledica termično odvisne agregacije stefina B pri pH 3 in 5.

	pH=3				Konformacija	pH=5			
Trak		T=35 °C	T=70 °C				T=25 °C	T=75 °C	
	(cm^{-1})	(%)	(%)	(cm^{-1})		(cm^{-1})	(%)	(%)	(cm^{-1})
Amid I	1686	4	7	1686	β-ravnina	1686	3	9	1688
	1660	41	39	1664	obrat, zavoj	1661	41	35	1663
	1641	21	11	1646	α-vijačnica	1644	20	12	1645
	1626	34	12	1625	β-ravnina	1627	36	13	1625
	1620	0	31	1623	prečna β-st.	1620	0	31	1623
Amid III	1303	6	6	1308	PP_{II}	1308	7	5	1305
	1289	26	19	1286	α	1292	26	17	1283
	1262	17	11	1260	β_{120}	1267	16	11	1258
	1247	13	16	1247	β_{150}	1251	12	15	1248
	1238	5	8	1238	β-trak	1241	5	8	1237
	1228	29	6	1225	β-ravnina	1228	30	9	1226
	1215	4	35	1216	prečna β-st.	1212	4	35	1215

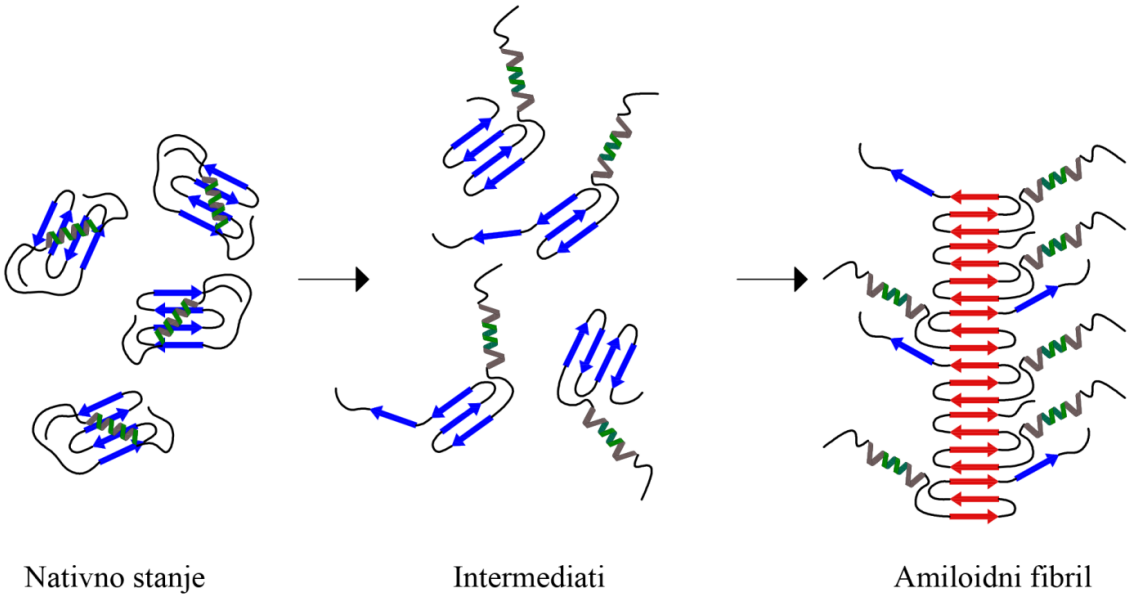


Slika 5.20: Dekompozicija amidnega I, II in III traku pri: (A) stefinu B (pH 7,5) pri T=35 °C; (B) stefin B (pH 7,5) pri T=75 °C; (C) stefin B (pH 9) pri T=30 °C in (D) stefin B (pH 9) pri T=75 °C.

Tabela 5.6: Povzetek konformacijskih sprememb v amidnem I in amidnem III področju, ki smo jih določili z metodo dekompozicije modelnih trakov. Konformacijske spremembe so posledica termično odvisne agregacije stefina B pri pH 7,5 in 9.

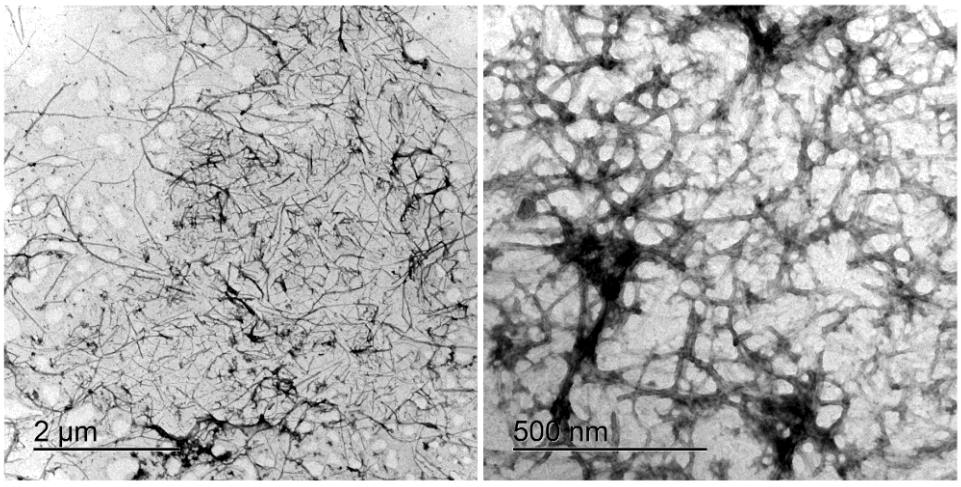
	pH=7,5				Konformacija	pH=9			
Trak		T=35 °C	T=75 °C				T=30 °C	T=75 °C	
	(cm^{-1})	(%)	(%)	(cm^{-1})		(cm^{-1})	(%)	(%)	(cm^{-1})
Amid I	1687	3	12	1688	β-ravnina	1686	4	12	1687
	1661	41	34	1662	obrat, zavoj	1660	41	34	1662
	1643	19	10	1645	α-vijačnica	1643	19	13	1645
	1627	37	12	1625	β-ravnina	1627	36	11	1625
	1620	0	32	1623	prečna β-st.	1620	0	31	1622
Amid III	1305	8	5	1306	PP_{II}	1302	6	6	1308
	1290	26	14	1285	α	1289	25	16	1284
	1265	15	11	1261	β_{120}	1264	16	11	1261
	1248	13	13	1248	β_{150}	1251	13	11	1249
	1239	5	9	1240	β-trak	1240	5	11	1240
	1228	29	11	1230	β-ravnina	1230	32	9	1228
	1217	4	36	1218	prečna β-st.	1219	4	36	1222

Po končani analizi modelnih trakov, določitvi njihovih integralnih vrednosti in njihovi asignaciji smo pripravili shemo modela agregacije stefina B, ki bi lahko povzel način tvorbe amiloidnih fibril stefina B.



Slika 5.21: Predlagani model tvorbe amiloidnih fibril stefina B, ki je bil pripravljen na podlagi rezultatov, pridobljenih s FTIR spektroskopijo. Nativno stanje smo predstavili s štirimi β-trakovi, ki se združujejo v eno β-ravnino in eno α-vijačnico. Tak motiv sekundarnega zvitja poimenujemo tudi »hot-dog« motiv. Natančnejša predstavitev sekundarnega zvitja stefina B se nahaja v Dodatku 6. Intermediati so delno razvite sekundarne strukture, v katerih prihaja do delne porušitve α-vijačnih sekundarnih struktur in prekinitev H-vezi med molekulskimi skupinami glavnih verig. V zadnji stopnji smo z rdečo barvo predstavili β-trakove, ki v procesu amiloidne fibrilacije tvorijo prečne β-strukture.

5.3.2.2 Transmisijska elektronska mikroskopija



Slika 5.22: Slike amiloidnih agregatov stefina B po 96 h od iniciacije agregacijskega procesa. Stefin B, raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru pri pH 5, smo pri 50 °C inkubirali 96 h.

Pri slikanju amiloidnih agregatov stefina B s transmisijsko elektronsko mikroskopijo smo imeli težave s stabilnostjo vzorca v primeru, ko smo stefin B raztopili v 0,1 M fosfatnem pufru pri pH 7,5. Pri tej pH vrednosti smo v vzorcu zasledili prisotnost bakterij, ki so verjetno metabolizirale naš vzorec (Dodatek 10). Teh problemov pri pH vrednosti 5 nismo zasledili v takšni meri. Razlog je verjetno prav v pH vrednosti, ki odstopa od fiziološke in preprečuje bakterijski metabolizem stefina B. Pri stefinu B, raztopljenem v 0,1 M fosfatnem pufru s pH vrednostjo 5, smo po 96 h opazili dolge razvejane aggregate, ki morfološko ustrezajo amiloidnim fibrilom (Slika 5.22).

5.4 Razprava

Konkanavalin A in stefin B sta zaradi svojih lastnosti zanimiva modelna proteina za preučevanje agregacijskih procesov. V tem delu smo z infrardečo spektroskopijo želeli najprej slediti strukturnim spremembam v sekundarnem zvitju konkanavalina A, ki nastanejo v procesu tvorbe agregiranih struktur. V rahlo bazičnem okolju (pH 9) konkanavalin A tvori amiloidne fibrile, medtem ko v rahlo kislem okolju (pH 5) tvori amorfne agregate [231, 241]. Čeprav gre za dve različni morfologiji, je z večino metod težko jasno ločevati med obema tipoma, zato se oba tipa agregatov tako v eksperimentalnih kot teoretičnih študijah pogosto obravnavata skupaj [234]. Zanimalo nas je, ali smo z metodami vibracijske spektroskopije zmožni razlikovati med obema tipoma agregacije. Poleg sposobnosti razlikovanja med obema potema agregacije so nas zanimale strukturne spremembe med procesom agregacije na sekundarnem nivoju.

5.4.1 Konkanavalin A

5.4.1.1 Termično gnana agregacija

Pri določanju konformacijskih sprememb, ki nastanejo kot posledica hidratacije proteinskih filmov z metodo dekompozicije spektralnih trakov (Poglavje 4), smo ugotovili, da zaradi negotovosti pri določanju pozicije in števila modelnih trakov ta metoda ne predstavlja idealnega orodja pri preučevanju manjših konformacijskih sprememb. Zato smo analizo strukturnih sprememb v procesu agregacije pričeli z diferenčno spektroskopijo. Ker v procesu agregacije pričakujemo večje konformacijske spremembe, kot smo jih opazili v procesu hidratacije proteinskih filmov, smo metodo dekompozicije spektralnih trakov uporabili pri kvantifikaciji sekundarnih elementov v začetnih in končnih strukturah procesa proteinske agregacije. Podatki, pridobljeni z diferenčno spektroskopijo, so nam služili kot kažipot pri računanju modelnih trakov.

Kot smo to storili pri študiju vpliva stopnje hidratiranosti proteinskih filmov na strukturo proteinskega zvitja, smo tudi v tem primeru analizo posnetih FTIR spektrov pričeli z diferenčno spektroskopijo. Pri raztopini konkanavalina A pri pH 9 smo od spektrov, posnetih pri določeni temperaturi, odšteli spekter nativne oblike konkanavalina A. Z integralnimi vrednostmi diferenčnega traku pri približno 1620 cm^{-1} v odvisnosti od temperature, pri kateri je bil zmanjševalni spekter posnet, smo pripravili krivuljo, ki povzema termično odvisnost tvorbe amiloidnih agregatov (Slika 5.3). Temperatura prehoda znaša 60,0 °C. S to krivuljo smo pripravili tipične diferenčne spektre za začetno (lag) fazo, fazo rasti in stabilno fazo. Vsi diferenčni spektri so bili izračunani tako, da je bil odštevalni spekter tisti spekter, ki je bil posnet pri višji temperaturi. Na tak način so pozitivni trakovi pripadali spektru, posnetem pri višji temperaturi, negativni trakovi pa spektru, posnetem pri nižji temperaturi.

Diferenčni spekter, ki povzema začetek agregacijskega procesa, se bistveno razlikuje od diferenčnih spektrov faze rasti in stabilne faze. Za razliko od spektrov v stabilni fazi in fazi rasti, kjer se glavni trakovi pričakovano nahajajo v amidni I regiji, so glavni trakovi v začetni fazi prisotni v amidni II regiji. V prvem diferenčnem spektru opazimo, kako se negativni trak z začetka agregacijskega procesa prelije iz višjih valovnih števil v pozitivni trak pri nižjih valovnih številih. Glavna nihanja, ki prispevajo k amidnemu II traku, so deformacijska nihanja NH skupin na glavni polipeptidni verigi. Opazovani diferenčni spekter z začetka agregacijskega procesa opisuje oslabitev tistih H-vezi, kjer NH skupine nastopajo kot proton donorska mesta. Trakovi v amidni I in amidni III regiji so v

diferenčnem spektru z začetka agregacijskega procesa manj intenzivni. Kljub temu lahko v amidnem III območju že opazimo pozitiven trak pri nižjih valovnih številih, ki je jasen znak začetka strukturnih sprememb v procesu proteinske agregacije.

Diferenčna spektra iz faze rasti in stabilne faze sta si, kot rečeno, med seboj podobna. Glavni diferenčni trakovi se nahajajo v amidni I regiji, kjer tudi pričakujemo največje intenzitete diferenčnih trakov. Jasen indikator tvorbe amiloidnih fibril je pozitiven trak pri nizkih valovnih številih amidnega I traku, tj. pri približno 1620 cm^{-1}. Tudi v teh dveh stopnjah je prisoten pozitiven trak v amidni II regiji, ki priča o slabitvi H-vezi, ki jih tvorijo NH skupine glavne polipeptidne verige. Oslabitev teh H-vezi nastopi kot posledica segrevanja raztopine. Kljub manjši intenziteti opazimo tudi trak pri približno 1400 cm^{-1}, ki potrjuje informacijo iz amidne II regije na primeru COO^- skupin stranskih verig. Zaradi oslabitve H-vezi, ki jih v polipeptidnem zvitju tvorijo COO^- stranske skupine aminokislinskih ostankov, se trak z višjih valovnih števil s segrevanjem premakne k nižjim valovnim številom. V obeh fazah se napram prvi fazi poveča intenziteta traku v amidni III regiji (1220 cm^{-1}), ki predstavlja komplementarno informacijo traku pri 1620 cm^{-1} v amidni I regiji. Tudi ta trak pripada prečnim β-strukturam, karakterističnemu elementu amiloidnih fibril. Valovno število tega traku se v zadnji fazi agregacije nahaja pri nižjem valovnem številu kot v srednji fazi, kar lahko pomeni, da se v zadnji fazi agregacije v bazičnem okolju β-strukture zvijejo v še nekoliko kompaktnejšo zvitje.

Na začetku primera termično gnane agregacije konkanavalina A, raztopljenega v 0,1 M pufru s pH vrednostjo 5, smo pripravili krivuljo, ki povzema tvorbo agregatov v odvisnosti od temperature. Tako kot smo to storili na primeru termično gnane amiloidne fibrilacije pri pH vrednosti 9, smo tudi tukaj krivuljo (Slika 5.6) pripravili na podlagi diferenčnih spektrov, ki smo jih izračunali tako, da smo od spektra, posnetega pri določeni temperaturi, odšteli spekter nativnega proteina. Temperatura prehoda znaša 65,4 °C. Tako pripravljeni diferenčni spektri se na primeru kisle raztopine konkanavalina A razlikujejo od tistih, izračunanih za primer bazične raztopine. Glavna razlika je v traku pri nizkih valovnih številih v amidnem I območju. Diferenčni trak je pri kisli raztopini za razliko od tistega pri bazični širši in se nahaja pri višjih valovnih številih. Maksimum diferenčnega traku, ki ga integriramo za pripravo krivulje odvisnosti stopnje agregacije od temperature, je pri raztopini s pH vrednostjo 9 pri 1616 cm^{-1}, medtem ko se pri raztopini s pH vrednostjo 5 maksimum karakterističnega traku agregacije nahaja pri približno 1625 cm^{-1}. Ker so diferenčni trakovi, ki pričajo o stopnji agregacije pri pH vrednosti 5, širši, v tem primeru za pripravo krivulje nismo izračunali integralnih vrednosti za pripadajoče trakove, temveč smo izmerili njihove intenzitete. Že na tej stopnji analize lahko opazimo prvo razliko med obema tipoma agregacije. V primeru, ko pričakujemo tvorbo amiloidnih fibril (pH 9), je diferenčni trak, ki ga asigniramo kot trak prečne β-strukture, ožji in se nahaja pri občutno nižjih valovnih številih amidnega I traku v primerjavi z diferenčnim trakom, ki opisuje tvorbo amorfnih agregatov (pH 5).

Analizo agregacijskega procesa in z njim povezanih konformacijskih sprememb smo nadaljevali s pripravo značilnih diferenčnih spektrov za posamezno fazo agregacijskega procesa. Diferenčne spektre smo izračunali na podlagi sigmoide, ki povezuje intenziteto diferenčnega traku v nizkofrekvenčnem območju amidnega I traku in temperaturo (Slika 5.6), in sicer za začetno fazo, fazo rasti in stabilno fazo (Slika 5.7). Stabilna faza pri amorfni agregaciji ni zelo očitna (Slika 5.6).

Diferenčni spektri, ki povzemajo značilne stopnje agregacije kisle raztopine konkanavalina A, se na prvi pogled ne razlikujejo veliko od tistih, pripravljenih za primer agregacije konkanavalina A v bazičnem pufru. Podrobnejši pogled razkrije pomembne razlike, ki ločijo agregacijska procesa v pufrih z različno pH vrednostjo. Prvi diferenčni spekter, ki povzema začetno fazo agregacije pri pH 5, se bistveno ne razlikuje od tistega,

ki povzema začetno fazo agregacije pri pH 9. Glavni razliki postaneta opazni v naslednjih dveh fazah. Prva razlika je, da je pri kisli agregaciji integralna intenziteta traku, ki pripada neurejenim strukturam v amidni I regiji (1675 cm^{-1}), večja od integralne intenzitete istega traku pri diferenčnem spektru agregacije v bazičnem okolju. To lahko razložimo s tem, da se v srednji fazi agregacije v kislem okolju vzpostavi večji delež neurejenih struktur napram enaki fazi agregacije v bazičnem okolju. Enako informacijo dobimo tudi v amidni II fazi, kjer trak pri 1549 cm^{-1} v diferenčnem spektru kisle agregacije pripada neurejenim strukturam. Traku pri tem valovnem številu v diferenčnem spektru iz srednje faze agregacije v bazični raztopini ne opazimo. Tudi pri slikah, posnetih s transmisijsko elektronsko spektroskopijo, opazimo (Slika 5.13 B in C), da se pri amorfni agregaciji kljub delnemu razvitju ohranjajo jedra monomernih enot, keterih robovi so nejasni in bi lahko vsebovali nestrukturirane predele agregiranih molekul konkanavalina A. Na TEM slikah amiloidne agregacije (Slika 5.13 E in F) ne opazimo tako izrazite razlike med strukturiranimi in nestrukturiranimi predeli, kar bi lahko govorilo v prid manjšemu deležu neurejenih struktur v amiloidnih agregatih, ki se tvorijo v bazičnem okolju. Druga razlika je v valovnih številih trakov v nizkofrekvenčnem območju amidnega I traku. Pri kisli agregaciji se trak, ki priča o tvorbi kompaktnih β-struktur, nahaja pri 1623 cm^{-1}, medtem ko se soroden trak pri bazični agregaciji nahaja pri nižjem valovnem številu (1618 cm^{-1}). Beta strukture, ki se tvorijo v bazičnem okolju, so kompaktnejše od tistih, ki se tvorijo v kislem okolju, kar zopet namiguje, da opazujemo dva različna tipa agregacije. Podobne razlike v diferenčnih spektrih, ki smo jih opisali za srednjo fazo agregacijskega procesa, opazimo tudi v zadnji stopnji, fazi rasti. Agregirane strukture v kislem okolju posedujejo večji delež neurejenih struktur, hkrati pa njihove β-strukture niso tako kompaktne kot tiste na koncu agregacijskega procesa v bazičnem okolju. Pri obeh tipih agregacije z naraščanjem temperature v amidnem II traku spremljamo večanje intenzitete traku pri nižjih valovnih številih (med 1512 cm^{-1} in 1520 cm^{-1}), ki nastane kot posledica slabitve H-vezi (med NH skupinami glavnih verig) z višanjem temperature.

Z diferenčno spektroskopijo lahko poglobljeno sledimo konformacijskim spremembam, ki nastanejo kot posledica segrevanja. Žal so pridobljeni podatki zgolj kvalitativne narave. Za kvantitativno analizo smo kljub nekaterim njenim pomanjkljivostim uporabili metodo dekompozicije modelnih trakov. Za uspešno aplikacijo omenjene metode so nujni podatki, pridobljeni z diferenčno spektroskopijo.

Kvantitativno smo želeli konformacijskim spremembam slediti z analizo notranje strukture amidnega I in amidnega III traku. S hkratno obravnavo obeh strukturno neodvisnih spektralnih območij smo želeli zmanjšati napako napovedane sekundarne strukture. Število modelnih trakov v območju amidnega I in amidnega III nihanja smo določili z uporabo Fourierove dekonvolucije in metode odvajanja spektrov (Slika 5.8). Iz slike je razvidno, da nam obe tehniki, ki izboljšata ločljivost spektralnih območij, zelo pomagata pri določevanju števila in lege modelnih trakov v obeh amidnih območjih. Te podatke smo vnesli v program za samousklajevanje trakov. Začetni set modelnih trakov je podan v Tabeli 5.2.

Z metodo dekompozicije modelnih trakov smo samousklajevali modelne trakove za spektra, posneta na začetku (15 °C) in koncu (75 °C) agregacijskega procesa. Spekter, posnet pri 15 °C, je enak tistemu, ki smo ga kot kontrolo posneli pri 5 °C. Predpostavimo, da se protein pri tej temperaturi nahaja v svoji nativni obliki oz. je njegova struktura zelo podobna nativnemu zvitju. Pri samousklajevanju modelnih trakov v začetnem stanju smo se močno oprli na podatke, pridobljene z metodo rentgenskega sipanja (Dodatek 5). Modelnim trakovom smo modelirali njihovo intenziteto, širino in

valovno število toliko časa, da smo dobili zadovoljivo ujemanje med eksperimentalnim in izračunanim spektrom. Deleže za posamezne sekundarne elemente smo določili z integriranjem pripadajočih modelnih trakov. Za obe začetni stopnji v kisli in bazični raztopini konkanavalina A smo dobili dobro ujemanje med deleži sekundarnih elementov, določenih z vibracijsko spektroskopijo, in deleži, določenimi z rentgenskim sipanjem. Hkrati se deleži ujemajo tudi med strukturno neodvisnima IR območjema, amidnim I in amidnim III spektralnim področjem. Opazimo, da so deleži sekundarnih elementov konkanavalina A v kisli in bazični raztopini na začetku agregacijskega procesa med seboj primerljivi (Tabela 5.3). Ob uspešni kvantitativni določitvi deležev sekundarnih elementov v začetni stopnji proteinske agregacije smo z metodo dekompozicije modelnih trakov določili tudi deleže sekundarnih elementov v zadnji stopnji agregacije. Izhajali smo iz podatkov, ki smo jih z dekompozicijo modelnih trakov pripravili v začetni fazi agregacije. Nato smo konformacijskim spremembam tekom agregacijskega procesa v odvisnosti od temperature sledili na podlagi diferenčnih spektrov, ki smo jih pripravili za posamezno fazo agregacije (Slika 5.4 in Slika 5.7). Podatki, pridobljeni z diferenčno spektroskopijo, so bili ključni pri samousklajevanju modelnih trakov v spektrih končnih agregiranih struktur. Zopet smo modelne trakove optimizirali do stopnje, ko se je njihova vsota ujemala z eksperimentalnim spektrom. Shematična predstavitev modelnih trakov po uspešni dekompoziciji spektrov iz začetne in končne stopnje agregacijskega procesa v kisli in bazični raztopini je predstavljena na Sliki 5.9. Izračunane vrednosti deležev za posamezno konformacijo sekundarnega zvitja s pripadajočim valovnim številom modelnega traku, iz površine katerega smo določili omenjeni delež, so podane v Tabeli 5.3.

Rezultati, ki smo jih dobili z diferenčno spektroskopijo, so nam dali slutiti, da sta si procesa agregacije v kislem in bazičnem okolju različna. Tudi rezultati dekompozicije modelnih trakov nakazujejo, da opazujemo dva med seboj različna si procesa. Že iz predstavitve modelnih trakov (Slika 5.9) opazimo glavno razliko med agregacijo pri pH vrednosti 5 in tisto pri pH vrednosti 9. Glavna razlika je v prisotnosti modelnega traku rdeče barve, ki se nahaja v zadnji stopnji agregacije pri pH vrednosti 9. Asignacija tega modelnega traku pri valovnem številu 1620 cm^{-1} pripada prečnim β-strukturam, glavni komponenti amiloidnih fibril. Trak enake barve na tem istem spektru opazimo tudi v amidnem III območju pri 1216 cm^{-1}. Traku rdeče barve ni med modelnimi trakovi spektra končne faze agregacije v kislem okolju, kar bi lahko razložili s tem, da pri tej pH vrednosti ne opazujemo amiloidne agregacije, temveč amorfen tip agregacije. Strukturne spremembe, ki nastanejo med termično gnanim procesom, se med obema tipoma agregacije bistveno razlikujejo na dveh ravneh. Najlažje tem spremembam sledimo v Tabeli 5.3. Prvo razliko smo že omenili, in sicer v modelnem traku, ki pripada prečnim β-strukturam, elementom amiloidnih fibril. Prečne β-strukture se med agregacijo tvorijo na račun nativnih β-struktur in na račun neurejenih elementov. Delež neurejenih elementov se skozi proces amiloidne agregacije zniža za približno 5 %, medtem ko delež prečnih β-struktur v amiloidnih agregatih znaša 30 %. Med procesom amorfne agregacije konkanavalina A, ki poteka pri pH vrednosti 5, se zniža delež nativnih β-struktur, in sicer za približno 7 %. Na ta račun se poviša delež neurejenih struktur. Čeprav produkti amorfne agregacije ne posedujejo sebi lastnih strukturnih elementov, se trak β-ravnin, ki se v nativnem stanju v amidni I regiji nahaja pri 1630 cm^{-1}, v spektru končnih produktov amorfne agregacije nahaja pri nekoliko nižjih valovnih številih (1628 cm^{-1}). Ta razlika v premiku valovnih števili je še očitnejša v amidni III regiji, kjer se komplementaren trak prestavi z 1228 cm^{-1} v začetni stopnji na 1223 cm^{-1} v končni stopnji. Zdi se, da so elementi β-struktur v amorfnih agregatih nekoliko kompaktnejši od tistih v nativnem stanju, kljub vsemu pa ne dosegajo kompaktnosti prečnih β-struktur v amiloidnih agregatih. Poleg kompaktnejših β-struktur, ki pa ne dosegajo prečnih β-struktur, pri

amorfni agregaciji konkanavalina A opazimo tudi povečanje deleža neurejenih struktur napram β-strukturam. Povečanje deleža neurejenih struktur pri amorfni agregaciji konkanavalina A znaša 8 %.

O približnih vrednostih, za katere se med agregacijo spremenijo deleži posameznih elementov sekundarnih struktur, govorimo, ker primerjamo rezultate iz dveh strukturno neodvisnih amidnih regij. Deleži za posamezen element sekundarne strukture, ki jih izračunamo iz posameznih amidnih regij, se med seboj razlikujejo v okviru 2 %.

5.4.1.2 Časovno gnana agregacija konkanavalina A

Zgoraj smo opisali termično gnana procesa agregacije v kislem in bazičnem okolju. Videli smo, da produkti amiloidne agregacije konkanavalina A, ki poteka v nekoliko bazičnem okolju, posedujejo sebi lasten modelni trak (1620 cm^{-1} in 1216 cm^{-1}). Ta trak smo pripisali prečnim β-strukturam, karakterističnemu elementu amiloidnih fibril. Ker je ta trak v obeh amidnih območjih zelo očiten, saj se nahaja pri občutno nižjih valovnih številih kot trakovi β-struktur v nativnem stanju, predstavlja dober marker za spremljanje stopnje amiloidne agregacije. Njegovo uporabnost pri detektiranju stopnje amiloidne agregacije smo želeli preveriti na primeru časovno odvisne agregacije konkanavalina A v 0,1 M fosfatnem pufru s pH vrednostjo 9. Temperatura, pri kateri smo inkubirali bazično raztopino konkanavalina A, je znašala 42 °C. Protokol dela je bil enak tistemu pri študiranju termično gnanega agregacijskega procesa.

Najprej smo pripravili krivuljo odvisnosti integralne vrednosti diferenčnega traku pri 1620 cm^{-1} v odvisnosti od časa, pri katerem smo posneli zmanjševalni spekter (Slika 5.10). Odštevali smo spekter, posnet na začetku agregacijskega procesa. Opazimo, da je lag faza v opazovanem procesu agregacije kratka. Sledi ji eksponentna faza rasti, ki se konča po dobrih 200 min od iniciacije amiloidne fibrilacije. Zadnji spekter smo posneli po 600 min od trenutka, ko smo bazično raztopino konkanavalina A segreli na 42 °C. Izračunani diferenčni spektri (Slika 5.11), ki predstavljajo posamezno fazo opazovanega procesa, se delno razlikujejo od tistih, ki smo jih pripravili za komplementaren proces termično gnane agregacije. Na prvi pogled v teh spektrih opazimo več šuma. Kljub temu lahko iz njih izluščimo podobne informacije, kot smo jih pri temperaturno odvisni agregaciji. Te informacije zadostujejo za pripravo kvantitativnih izračunov sprememb v deležih sekundarnih elementov med začetno in končno fazo agregacije. Rezultate metode samousklajevanja modelnih trakov v obliki izračunanih deležev sekundarnih elementov v začetni in stabilni fazi časovno odvisne agregacije konkanavalina A smo predstavili v Tabeli 5.4.

V začetni fazi, ki jo predstavlja spekter, posnet po 10 min od iniciacije časovno odvisne agregacije, že opazimo prisotnost prečnih β-struktur. Njihov delež znaša približno 16 % celotnega proteinskega zvitja. Te strukture se tvorijo predvsem na račun nativnih β-struktur, saj delež neurejenih struktur znaša 40 %, kar predstavlja tudi delež neurejenih struktur v nativnem stanju konkanavalina A [156]. Če primerjamo rezultate iz stabilne faze časovno odvisne agregacije pri 42 °C s tistimi, ki smo jih dobili pri analizi stabilne faze v termično odvisnem procesu, ugotovimo, da končni agregati v obeh procesih vsebujejo podobne deleže posameznih sekundarnih elementov. Tudi pri časovno odvisni agregaciji končni delež prečnih β-struktur v stabilni fazi predstavlja slabih 30 % celotne strukture. Delež neurejenih struktur se iz začetnih 40 % v začetni fazi zmanjša na približno 33 % v stabilni fazi. Razliko v deležih sekundarnih elementov v stabilni fazi med obema tipoma agregacijskega procesa zasledimo v modelnih trakovih amidne III regije, in sicer v modelnih trakovih, ki zastopajo elemente β-sekundarnega zvitja. Ti

modelni trakovi predstavljajo β-trakove (~1243 cm^{-1}), β-ravnine (~1230 cm^{-1}) in prečne β-strukture (~1218 cm^{-1}). Pri termično gnanem procesu smo lahko določili deleže za β-trakove (22 %), β-ravnine (11 %) in prečne β-strukture (31 %), medtem ko smo pri časovno gnanem procesu določili delež prečnih β-struktur (27 %) in še trak pri 1239 cm^{-1}, ki v tem primeru predstavlja vsoto nihanj aminokislinskih ostankov v β-trakovih in β-ravninah. Ta trak predstavlja 36 % celotnega proteinskega zvitja.

V amidni II regiji lahko, pri časovno gnani agregaciji konkanavalina A, spremljamo spremembo integralne intenzitete traku, ki nosi informacijo o deležu NH skupin z močno H-vezjo. Delež takšnih NH skupin se tekom agregacije poveča.

Kljub temu da smo lahko zadovoljivo spremljali časovno odvisen proces agregacije konkanavalina A, pa kvaliteta spektrov in posledično rezultatov ni na nivoju tistih, ki smo jih dobili pri termično odvisnih agregacijah. Glavni razlog za omenjeno razliko bi lahko iskali v celokupnem času, ki ga potrebujemo za izvedbo posamezne meritve. Čas, potreben za spremljanje časovno odvisne agregacije, je v okviru faktorja 10 večji od časa eksperimenta temperaturno odvisne agregacije. Ker eksperiment pri časovno odvisni agregaciji poteka skozi daljše časovno obdobje, je tudi težje nadzorovati stabilnost okolja, kot sta relativna vlažnost in temperatura. Glede na zadovoljivo ujemanje med kvantitativnimi podatki, pridobljenimi pri obeh tipih agregacije, in njihovo boljšo kvaliteto pri termično gnanih procesih lahko zaključimo, da analiza termično odvisne agregacije ponuja učinkovit vpogled v strukturne oz. konformacijske spremembe v proteinskem zvitju med procesom tvorbe amorfnih ali amiloidnih agregatov.

5.4.1.3 Transmisijska elektronska spektroskopija

Podatke, pridobljene z opisanimi metodami vibracijske spektroskopije, smo želeli podkrepiti z rezultati transmisijske elektronske mikroskopije (Slika 5.13). Mikroskopija potrdi, da pri različnih pH vrednostih v procesu agregacije nastajajo morfološko gledano različni agregati. Pri pH vrednosti 5 nastajajo neurejene strukture (Slika 5.13 B in C). V agregatih opazimo monomerne enote, zato predvidevamo, da monomerne enote v teh agregatih posedujejo precejšen delež svojega nativnega sekundarnega zvitja. Ker robovi samih monomernih enot na slikah, posnetih s transmisijsko elektronsko mikroskopijo, niso povsem jasni, bi lahko na površini monomernih enot med procesom amorfne agregacije prišlo do delnega razvitja nativne oblike, jedro pa ohrani svojo nativno strukturo. Takšna razlaga bi se ujemala z rezultati, ki smo jih pridobili z IR spektroskopijo in so opisani zgoraj.

Morfološka oblika agregatov se pri agregaciji konkanavalina A, ki poteka v rahlo bazičnem okolju, razlikuje od morfološke oblike agregatov, ki nastanejo v kislem okolju. Agregati pri pH vrednosti 9 so podolgovate oblike. Na slikah, ki so bile posnete po 20 h od pričetka agregacijskega procesa, opazimo, da se posamezne podolgovate strukture med seboj združujejo v večje snope (Slika 5.13 F). Poleg opisanih struktur tudi v tej fazi agregacije še vedno opazimo manjše (ne)urejene agregate, katerih delež pa ni velik. Ti manjši agregati prispevajo h končnemu spektru, ki je bil posnet z IR spektroskopijo, zato je možno, da je delež prečnih β-struktur v amiloidnih strukturah večji, kot smo ga določili z dekompozicijo modelnih trakov (Tabela 5.3).

5.4.2 Stefin B

Študij agregacije na primeru modelnega proteina konkanavalina A je prinesel razumevanje metodologije dela za uspešno analizo strukturnih sprememb v polipetidnem zvitju, ki nastopijo med procesom agregacije. Pridobljeno znanje smo uporabili pri študiju termično odvisnih agregacijskih procesov stefina B.

Termično gnan proces agregacije stefina B smo opazovali pri štirih različnih pH vrednostih: pH 3, pH 5, pH 7,5 in pH 9. Na osnovi integralne intenzitete diferenčnega traku med 1627 cm^{-1} in 1600 cm^{-1}, čigar glavni izvor predstavlja valenčno nihanje C=O skupin aminokislinskih ostankov v prečnih β-strukturah, smo pripravili temperaturno odvisnost stopnje tvorbe amiloidnih agregatov (Slika 5.14). Vsi primeri agregacijskega procesa pri različnih pH vrednostih izkazujejo značilne stopnje: lag fazo, fazo rasti in stabilno fazo. Pri vseh pH vrednostih smo določili temperaturo prehoda (T_m). Pri pH 3 znaša temperatura prehoda 47 °C, pri pH 5 je njena vrednost 54 °C, medtem ko pri pH vrednostih 7,5 in 9 temperatura prehoda naraste na 62 °C. Zdi se, da je tvorba amiloidnih fibril najhitrejša v najbolj kisli raztopini fosfatnega pufra in se upočasni z višanjem pH vrednosti. To opažanje se sklada z ostalimi študijami kinetike amiloidne fibrilacije stefina B [267, 268, 275]. Te študije se niso opirale na metode vibracijske spektroskopije, temveč v večini primerov na metode, med katerimi so transmisijska elektronska spektroskopija, flouroscenca tioflavina T, mikroskopija na atomsko silo (AFM, angl. Atomic force microscopy) in cirkularni dikroizem (angl. Circular dichroism, CD). Kljub številnim prednostim uporabe navedenih metod (enostavna razlaga in obdelava rezultatov, enoznačnost rezultatov) za preučevanje amiloidne agregacije te metode ne ponujajo vpogleda v konformacijske spremembe, ki v tem procesu potekajo na sekundarnem nivoju proteinskega zvitja. Analizo konformacijskih sprememb, ki nastanejo v odvisnosti od povišanja temperature, smo za vse štiri raztopine stefina B pričeli z diferenčno spektroskopijo.

Za vse štiri raztopine smo izračunali karakteristične spektre za začetno oz. lag fazo, fazo rasti in stabilno fazo. Temperaturna območja in pripadajoče spektre posameznih faz smo določili iz že omenjenih krivulj, ki ponazarjajo tvorbo amiloidnih agregatov v odvisnosti od temperature. Če najprej pogledamo karakteristične spektre amiloidne agregacije stefina B pri pH 3, opazimo, da v začetni fazi intenzitete trakov niso velike. V tej fazi ne prihaja do velikih strukturnih sprememb v proteinskem zvitju. Glavni trak se nahaja v amidni II regiji pri 1527 cm^{-1}. Glavno komponento tega traku predstavljajo NH deformacijska nihanja glavne verige. V tem primeru je trak posledica oslabitve H-vezi med glavnimi verigami. Informacija iz amidne II regije sovpada s trakom antisimetričnega valenčnega nihanja COO^- skupin pri 1390 cm^{-1}, ki nakazuje prekinitve H-vezi, ki se tvorijo s COO^- skupinami stranskih verig. V začetni fazi že opazimo nizkofrekvenčne trakove tako v amidni I kot tudi v amidni III regiji, ki nastanejo kot posledica tvorbe β-ravnin. Njihovo valovno število še ne ustreza kompaktnejšim prečnim β-strukturam. Informacija iz amidne II regije se ponovi in ojača v fazi rasti in stabilni fazi. Intenzivnejši postanejo trakovi, ki pripadajo novonastalim β-strukturam, ki v teh dveh fazah prehajajo v svojo kompaktnejšo obliko, prečno β-strukturo. V teh dveh fazah z diferenčno spektroskopijo opazimo tudi zmanjševanje deleža α-struktur. Največje intenzitete diferenčnih trakov zasledimo v fazi rasti, kar je pričakovano, saj v tej fazi prihaja do največjih konformacijskih sprememb. V stabilni fazi sicer prihaja do podobnih strukturnih sprememb, kot smo jih opazovali v fazi rasti, vendar je intenziteta teh sprememb občutno nižja.

Diferenčni spektri, ki povzemajo karakteristične faze tvorbe amiloidnih fibril stefina B pri pH 5, pH 7,5 in pH 9 (Slike 5.16, 5.17 in 5.18), so podobni opisanim diferenčnim

spektrom na primeru raztopine stefina B pri pH vrednosti 3. Diferenčna spektroskopija nam je podala začetne informacije o strukturnih spremembah, ki nastopijo med procesom termično odvisne agregacije stefina B. Na podlagi analize diferenčnih spektrov se zdi, da opazujemo amiloidno agregacijo pri vseh pH vrednostih. Da bi natančneje okarakterizirali te spremembe, smo nadaljnjo analizo vibracijskih spektrov opravili z metodo dekompozicije spektralnih trakov. Kako pridobiti začeten set informacij o številu modelnih trakov, njihovi relativni intenziteti in legi, smo opisali že na primeru hidratacije proteinskih filmov konkanavalina A kot tudi na primeru agregacije konkanavalina A. Protokol dela je bil tudi na primeru stefina B enak že opisanemu.

Z metodo dekompozicije spektralnih trakov smo določili modelne trakove za začetne in končne strukture amiloidne agregacije stefina B pri vseh pH vrednostih. Glavna oporna točka določanju modelnih trakov v začetnih stanjih stefina B so bili podatki, pridobljeni z metodo sipanja rentgenskih žarkov (Dodatek 6) [161, 167]. Vsa štiri začetna stanja predstavljajo spektri, ki se nahajajo v začetni fazi. Ti spektri so izredno podobni spektrom sveže pripravljenih in filtriranih raztopin stefina B pri 5 °C. Vsi štirje omenjeni spektri in posledično integralne intenzitete izračunanih modelnih trakov se med seboj razlikujejo v okviru napake. Karakteristični diferenčni spektri so nam bili glaven kažipot pri računanju modelnih trakov v spektrih končnih struktur. Na podlagi teh spektrov in na podlagi informacij, pridobljenih z računanjem dekonvoliranih spektrov in odvodov drugega reda (podatki niso prikazani), smo določili in samousklajevali modelne trakove v spektrih končnih struktur do točke, kjer smo dobili zadovoljivo ujemanje med eksperimentalnimi spektri in vsoto vseh modelnih trakov.

V amidni I regiji (Slika 5.19 in Slika 5.20) je prisotnih pet trakov. Trak zelene barve ni bil prisoten pri dekompoziciji spektralnih trakov konkanavalina A. Razlog je v tem, da trak pripada aminokislinskim ostankom v α-vijačnicah. Alfa vijačne strukture niso prisotne v nativnem zvitju konkanavalina A (oz. je njihov delež tako majhen, da sovpada z napako metode). Komplementaren trak α-strukturam iz amidne I regije se v amidnem III območju nahaja pri približno 1285 cm^{-1}. Trakova nista povsem komplementarna, saj trak v amidni III regiji pripada aminokislinskim ostankom, ki so del α-vijačnice, kot tudi aminokislinskim ostankom, ki niso del α-vijačnic, posedujejo pa α-konformacijo. Aminokislinski ostanki z dihedralnimi koti α-konformacije v amidni I regiji prispevajo k traku neurejenih sekundarnih struktur (~1660 cm^{-1}). V strukturi stefina B v začetni fazi agregacije pri vseh pH vrednostih v amidni I regiji ne zasledimo rdečega traku prečnih β-struktur. Zasledimo ga v amidni III regiji, in sicer je delež aminokislinskih ostankov, ki bi že lahko posedovali prečne β-strukture, okoli 4 %. Delež α-vijačnic v začetni fazi znaša približno petino celotnega zvitja, medtem ko delež aminokislin v α-konformaciji znaša četrtino vseh aminokislin. Slabih 40 % aminokislinskih ostankov tvori β-strukture, večina katerih se nahaja v β-ravninah, manjši delež v β-trakovih in, kot že rečeno, v prečnih β-strukturah. 40 % aminokislinskih ostankov stefina B tvori tudi neurejene predele proteinskega zvitja.

Strukturne spremembe, ki jih opazujemo med agregacijo, so si pri vseh pH vrednostih podobne oz. se izračunani deleži nahajajo znotraj same napake metode. Glavna strukturna sprememba je nastanek prečnih β-struktur. Med agregacijo se za ~10 % zmanjša delež aminokislinskih ostankov v α-vijačnici. Za zelo podoben delež se zmanjša tudi delež aminokislin, katerih dihedralni koti jih okarakterizirajo kot aminokisline z dihedralnimi koti v α-konformaciji. Delež aminokislin v prečnih β-strukturah na koncu agregacijskega procesa znaša približno 35 % celotnega proteinskega zvitja. Te strukture so posledica zmanjševanja števila aminokislin v nativni β-strukturi, v manjšem delu pa tudi iz aminokislin v neurejenih predelih. Lahko bi rekli, da je razmerje med prispevkom h končnim prečnim β-strukturam med aminokislinskimi ostanki v nativnih β-strukturah in aminokislinskimi ostanki v neurejenih predelih proteinskega zvitja 2 proti 1. Zdi se, da

je končni delež prečnih β-struktur najmanjši pri pH vrednosti 3. V literaturi zasledimo, da so agregati stefina B pri tej pH vrednosti bolj podobni protofibrilarnim agregatom kot odraslim fibrilam, ki se tvorijo pri višjih pH vrednostih [267], kar bi lahko razložilo manjši delež prečnih β-struktur v produktih agregacije stefina B pri pH 3.

Na podlagi naših rezultatov menimo, da v agregacijskem procesu stefina B ne prihaja do popolnega razvitja polipeptidne verige in tvorbe le prečnih β-struktur. Poleg tega menimo, da se v začetni fazi agregacije destabilizirajo H-vezi v nativnem stanju, kar omogoči delno prestukturiranje strukture stefina B na način, da se lahko tvorijo glavne komponente amiloidnih fibril, prečne β-strukture. Glavni prispevek k prečnim β-strukturam prispevajo aminokislinski ostanki, ki v nativnem stanju tvorijo β-sekundarno zvitje. Možno je tudi, da je prispevek teh aminokislin k tvorbi prečnih β-struktur celo večinski in da prej neurejeni aminokislinski ostanki v agregiranem stanju tvorijo β-strukture. Delež aminokislinskih ostankov v neurejenih strukturah se med agregacijo zmanjša za približno 10 %. Stefin B v svojem nativnem stanju poseduje eno α-vijačno strukturo. Delež te nativne oblike se med agregacijo zmanjša za slabo polovico. Ker termično gnano agregacijo spremlja oslabitev omrežja H-vezi, menimo, da se intramolekularne vezi v α-vijačnici med agregacijo prekinejo na samih koncih te strukture. Aminokisline, ki so bile v nativnem stanju del α-vijačnice, tako pripadajo neurejenim aminokislinskim ostankom, verjetno tistim z dihedralnimi koti α-konformacije. Naš pogled na potek agregacijskega procesa stefina B ni v nasprotju z rezultati Garetha J. Morgana, ki je s sodelavci predvidel tvorbo amiloidnega jedra, iz katerih so izključene α-vijačnice [254].

Tvorbo amiloidnih fibril stefina B smo za primer stefina B, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru s pH vrednostjo 5, potrdili s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (Slika 5.22). Zdi se, da je bil vzorec stefina B, ki smo ga uporabili pri pripravi vzorcev za slikanje s transmisijsko elektronsko mikroskopijo, kontaminiran z bakterijami (Dodatek 10). Pri kislih pH vrednostih te bakterije niso imele takšnega vpliva na potek agregacije kot pri bolj fiziološki pH vrednosti (pH 7,5). Transmisijska elektronska mikroskopija razkrije tudi razliko med amiloidnimi agregati, ki se tvorijo na primeru konkanavalina A (Slika 5.13) in stefina B (Slika 5.22). Pri konkanavalinu A se fibrile povezujejo v večje snope, medtem ko ta povezava pri stefinu B ni tako izrazita.

Na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili z različnimi metodami vibracijske spektroskopije, smo pripravili možen model amiloidne agregacije stefina B (Slika 5.21). Strukturo stefina B smo poenostavljeno prikazali s štirimi β-trakovi in eno α-vijačnico (natančnejša struktura: Dodatek 6). Jedro amiloidnega vlakna sestavljajo prečne β-strukture. Domnevamo, da vsaka molekula stefina B v to jedro prispeva tri β-trakove. Zadnji β-trak in α-vijačnica se nahajata izven osi amiloidnega fibrila in bi lahko služila kot povezovalna elementa pri spajanju amiloidnih fibril. Glede na to, da delež prečnih β-struktur v končnih strukturah po naših metodah znaša okoli 36 % celotnega zvitja, bi lahko k jedru amiloidnega vlakna vsaka molekula prispevala od 3 do 4 β-trakove.

5.5 Zaključki

Znanje, ki smo ga pridobili med študijem hidratacije proteinskih filmov, smo želeli uporabiti pri spremljanju agregacije konkanavalina A in stefina B. Strukturne spremembe, ki vodijo do agregatov, smo želeli tudi kvantitativno okarakterizirati.

Uporabnost metode dekompozicije spektralnih trakov je zahtevnejša pri preučevanju manjših strukurnih sprememb, kakršne smo opazovali pri hidrataciji proteinskih filmov. Njena uporabnost je večja pri spremljanju večjih strukturnih sprememb, kakršnim smo priča med procesom agregacije.

Analizo konformacijskih sprememb med termično odvisno agregacijo konkanavalina A in stefina B smo pričeli z diferenčno spektroskopijo, ki ponuja poenostavitev spektrov na način, da v njih ostajajo le trakovi, ki opisujejo strukturne spremembe med procesom agregacije. Podatki, pridobljeni z diferenčno spektroskopijo, so bili nepogrešljivi pri kvantifikaciji konformacijskih sprememb pri računanju modelnih trakov.

Temperatura prehoda termično odvisne agregacije konkanavalina A pri pH 9 je 60,0 °C. V začetni fazi agregacije z diferenčno spektroskopijo opazimo slabitev H-vezi, medtem ko se naslednji dve stopnji (faza rasti in stabilna faza) od prve stopnje razlikujeta, saj poleg slabitve H-vezi opazimo predvsem tvorbo prečnih β-struktur.

Temperatura prehoda od temperature odvisne agregacije konkanavalina A pri pH 5 je 65,4 °C. Diferenčni spekter iz začetka agregacijskega procesa pri pH 5 je podoben tistemu pri agregaciji konkanavalina A v bazičnem okolju. Diferenčna spektra iz faze rasti in stabilne faze se od sorodnih pri pH 9 razlikujeta v dveh bistvenih točkah. Prva je ta, da imajo diferenčni trakovi, ki pripadajo neurejenim strukturam, pri pH 5 večjo integralno intenziteto od tistih pri pH 9. Druga bistvena razlika nastopi v nizkofrekvenčnem območju amida I. Diferenčni trak, ki ga pripišemo agregiranim strukturam, se pri pH 5 nahaja pri višjih valovnih številih (1623 cm^{-1}) kot pri agregaciji konkanavalina A v bazičnem okolju (1618 cm^{-1}).

Kvantitativno smo strukturne spremembe ovrednotili s hkratno analizo notranje strukture amidnega I in amidnega III traku. Hkratna obravnava strukturno neodvisnih trakov zmanjša napako napovedanih strukturnih sprememb. Za obe začetni stopnji v kisli in bazični raztopini konkanavalina A smo dobili dobro ujemanje med deleži sekundarnih elementov, določenih z vibracijsko spektroskopijo v amidni I in amidni III regiji, in deleži sekundarnih elementov, določenimi z rentgenskim sipanjem. Zastopanost posameznih sekundarnih elementov konkanavalina A v kisli in bazični raztopini na začetku agregacijskega procesa je med seboj primerljiva. Metoda dekompozicije spektralnih trakov v spektrih iz konca agregacijskega procesa pri obeh pH vrednostih razkrije spektralne markerje, ki ločijo med amorfnim in amiloidnim tipom agregacije. Tipična spektralna markerja amiloidne agregacije sta trakova v nizkofrekvenčnem območju amidnega I (1620 cm^{-1}) in amidnega III traku (1216 cm^{-1}). Oba omenjena trakova pričata o tvorbi prečnih β-ravnin, bistvenem strukturnem elementu amiloidnih fibril. Teh trakov pri amorfnem tipu agregacije ne zasledimo.

Prečne β-ravnine se med agregacijo konkanavalina A pri pH 9 tvorijo na račun nativnih β-struktur in na račun neurejenih AK ostankov. Delež neurejenih sekundarnih elementov se skozi proces amiloidne agregacije, ki poteka pri pH 9, zmanjša za 5 %. Delež prečnih β-struktur v amiloidnih agregatih znaša 30 % celotnega zvitja. Med procesom amorfne agregacije konkanavalina A pri pH 5 se zniža delež nativnih β-struktur, in sicer za 7 %. Tudi na ta račun se poviša delež neurejenih struktur, in sicer za 8 %. Kljub temu, da pri amorfni agregaciji ne zasledimo modelnih trakov v nizkofrekvenčnem območju amidnega I in amidnega III območja, značilnih za amiloidno agregacijo, opazimo

premik modelnih trakov, ki pripadajo nativnim β-ravninam iz 1630 cm^{-1} oz. 1228 cm^{-1} k nižjim valovnim dolžinam, in sicer k 1628 cm^{-1} v amidnem I območju in 1223 cm^{-1} v amidni III regiji. Ti premiki dajejo slutiti, da so elementi β-struktur v amorfnih agregatih nekoliko kompaktnejši od tistih v nativnem stanju, kljub vsemu pa ne dosegajo kompaktnosti prečnih β-struktur v produktih amiloidne agregacije.

Spremljali smo tudi časovno odvisno amiloidno agregacijo konkanavalina A pri pH vrednosti 9 in temperaturi 42 °C. Tako diferenčna spektroskopija kot tudi rezultati dekompozicije spektralnih trakov podajajo podobne rezultate, kot smo jih dobili pri spremljanju termično odvisne agregacije. Kljub temu se kakovost spektrov in posledično rezultatov pri časovno odvisni agregaciji ne more primerjati s tistimi, ki so bili pridobljeni pri študiju temperaturno odvisne agregacije. Glede na zadovoljivo ujemanje med kvantitativnimi podatki, pridobljenimi pri obeh tipih agregacije, in njihovo boljšo kvaliteto pri termično gnanih procesih lahko sklepamo, da analiza termično odvisne agregacije ponuja učinkovit vpogled v strukturne oz. konformacijske spremembe v proteinskem zvitju med procesom amorfne in/ali amiloidne agregacije.

Metodologijo dela, ki smo jo razvili pri spremljanju termično gnane agregacije konkanavalina A, smo uporabili pri študiju temperaturno odvisne agregacije stefina B pri pH vrednostih 3, 5, 7,5 in 9. Stefin B pri vseh naštetih pogojih tvori amiloidne agregate. Temperatura prehoda narašča s pH vrednostjo, in sicer pri pH 3 znaša 47 °C, pri pH 5 54 °C in 62 °C pri pH 7,5 ter 9. Diferenčni spektri, ki opisujejo začetno fazo, fazo rasti in stabilno fazo, so si pri vseh štirih pH vrednostih med seboj podobni. V začetni fazi ne opazimo velikih strukturnih sprememb, opazimo le slabitev omrežja H-vezi, ki so vzpostavljene med molekulskimi skupinami glavne verige. V naslednjih dveh stopnjah opazimo intenzivno tvorbo prečnih β-struktur in hkratno zmanjševanje deleža α-struktur. Do največjih strukturnih sprememb prihaja v fazi rasti. Strukturne spremembe, ki smo jim z diferenčno spektroskopijo sledili preko procesa amiloidne agregacije, smo okvantificirali z metodo dekompozicije spektralnih trakov. Okarakterizirane spremembe so si med posameznimi pH vrednostmi med seboj podobne oz. se nahajajo znotraj eksperimentalne napake. Med procesom tvorbe amiloidnih agregatov se za 10 % zmanjša delež aminokislinskih ostankov v α-vijačnici. Za enak delež se zmanjša število AK ostankov z dihedralnimi koti v α-konformaciji. Na koncu agregacijskega procesa 35 % celotnega zvitja predstavljajo prečne β-strukture. Na njihov račun se zmanjša delež nativnih β-struktur, ki jih tvorijo štirje β-trakovi. V manjši meri se zmanjša tudi delež neurejene sekundarne strukture. Najmanjši delež prečnih β-struktur zasledimo pri agregacijskem procesu, ki poteka pri pH 3.

Na osnovi rezultatov spremljanja agregacije stefina B z različnimi metodami vibracijske spektroskopije smo predlagali model tvorbe amiloidnih fibril (Slika 5.21). Model v procesu agregacije ne predvideva popolnega razvitja polipeptidne verige, temveč le delno prestrukturiranje na način, da je omogočena tvorba prečnih β-struktur, ki tvorijo os amiloidnega fibrila. Vsaka molekula stefina B iz svoje nativne strukture k amiloidnemu jedru prispeva 3 oz. 4 β-trakove.

Tvorbo amiloidnih fibril smo na primeru stefina B, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru s pH vrednostjo 5, potrdili s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (Slika 5.22).

Poglavje 6

Zaključki

Predstavljeno delo smo pričeli s študijem kratkih peptidnih verig alanina v inertni okolici (Poglavje 3), nadaljevali s preučevanjem konformacijskih sprememb v proteinskih filmih modelnih proteinov med procesom hidratacije (Poglavje 4) in pridobljeno znanje uporabili pri študiju agregacije konkanavalina A in stefina B (Poglavje 5). Podrobnejši zaključki so predstavljeni pod pripadajočimi poglavji, tukaj pa povzemam glavna spoznanja.

- Spektralna analiza majhnih peptidov razkrije uporabno vrednost amidne I in amidne III regije pri spremljanju in določanju konformacijskih sprememb.
- V inertni okolici v vseh monomernih sistemih nastopa C_7 konformacija kot prevladujoča konformacija, PP_{II}, β in α-konformacije pa v manjših deležih.
- Raziskava matrično izoliranih krajših peptidov potrjuje hipotezo, da so modelni trakovi, ki se uporabljajo predvsem pri konformacijski analizi amidnega III traku, od okolice neodvisni in tako uporabni za določevanje populacij konformer v vseh sistemih ne glede na topilo.

- Diferenčna spektroskopija je primernejša metoda za spremljanje majhnih konformacijskih sprememb v sekundarnem zvitju modelnih proteinov (kakršne zasledimo pri hidrataciji proteinskih filmov) kot metoda dekompozicije spektralnih trakov.
- Vsi štirje modelni proteini (konkanavalin A, kimotripsinogen A, pepsin in stefin B) v karakterističnih stopnjah hidratacije izkazujejo podobne strukturne spremembe. Vezava molekul vode poveča delež β-struktur na račun neurejenih konformacij.
- Z upoštevanjem števila atomov in števila AK ostankov na površini posameznih modelnih proteinov ter površine, ki je na voljo vezavi molekulam vode, največjo afiniteto do vezave molekul vode izkazuje kimotripsinogen A, sledita mu stefin B in konkanavalin A, najmanjšo afiniteto pa izraža pepsin.

- Temperatura prehoda termično odvisne agregacije konkanavalina A pri pH 9 je 60,0 °C, medtem ko je temperatura prehoda od temperature odvisne agregacije konkanavalina A pri pH 5 65,4 °C.
- Hkratna obravnava strukturno neodvisnih trakov amidnega I in amidnega III območja zmanjša napako napovedanih strukturnih sprememb.
- Tipična spektralna markerja amiloidne agregacije sta trakova v nizkofrekvenčnem območju amidnega I (1620 cm^{-1}) in amidnega III traku (1216 cm^{-1}). Teh trakov pri amorfnem tipu agregacije ne zasledimo.
- Delež neurejenih sekundarnih elementov se skozi proces amiloidne agregacije, ki poteka pri pH 9, zmanjša za 5 %. Delež prečnih β-struktur v amiloidnih agregatih

znaša 30 % celotnega zvitja. Med procesom amorfne agregacije konkanavalina A pri pH 5 se zniža delež nativnih β-struktur, in sicer za 7 %. Tudi na ta račun se poviša delež neurejenih struktur, in sicer za 8 %.

- Stefin B pri vseh pH vrednostih (pH 3, pH 5, pH 7,5 in pH 9) tvori amiloidne agregate. Temperatura prehoda narašča s pH vrednostjo, in sicer je pri pH 3 47 °C, pri pH 5 54 °C in 62 °C pri pH 7,5 ter 9.
- Med procesom tvorbe amiloidnih agregatov se za 10 % zmanjša delež aminokislinskih ostankov v α-vijačnici. Za enak delež se zmanjša število AK ostankov z dihedralnimi koti v α-konformaciji. Na koncu agregacijskega procesa 35 % celotnega zvitja predstavljajo prečne β-strukture. Na njihov račun se zmanjša delež nativnih β-struktur, ki jih tvorijo štirje β-trakovi. V manjši meri se zmanjša tudi delež neurejene sekundarne strukture.
- Najmanjši delež prečnih β-struktur zasledimo pri agregacijskem procesu, ki poteka pri pH 3.
- Na osnovi rezultatov spremljanja agregacije stefina B z različnimi metodami vibracijske spektroskopije smo predlagali model tvorbe amiloidnih fibril (Slika 5.21).

Vibracijska spektroskopija s svojimi metodami ponuja močno orodje pri spremljanju in določevanju konformacijskih sprememb v proteinskem zvitju bodisi pri majhnih peptidnih sistemih bodisi v velikih polipeptidnih verigah. Verjamemo, da s tem delom prispevamo k boljšemu razumevanju opisanih procesov, hkrati pa to znanje odpira nove možnosti za razvoj še učinkovitejših metod, ki bi v prihodnosti pripomogle k jasnejši sliki proteinskega zvitja.

Dodatek A

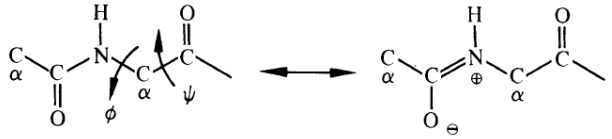
Dodatek k uvodu

A.1 Kratki homopeptidi v inertni atmosferi

Proteine sestavlja 20 naravnih aminokislin (Dodatek 2), med katerimi le glicin nima stranske verige. Stranske verige ostalih devetnajstih aminokislin imajo različne karakterje, od hidrofobnih do hidrofilnih. Stranske verige asparaginske in glutamisnke kisline, lizina, arginina in histidina (pod pH 7) so nabite. Stranska veriga prolina je ciklična, zaradi česar dušik v peptidni vezi ni zmožen donirati H vezi. S povezovanjem posameznih aminokislinskih enot preko peptidnih vezi se tvori primarna struktura. Pozitivno nabit amino (N) konec polipeptidne verige predstavlja njen začetek, negativno nabit karboksilni del (C) predstavlja njen konec.

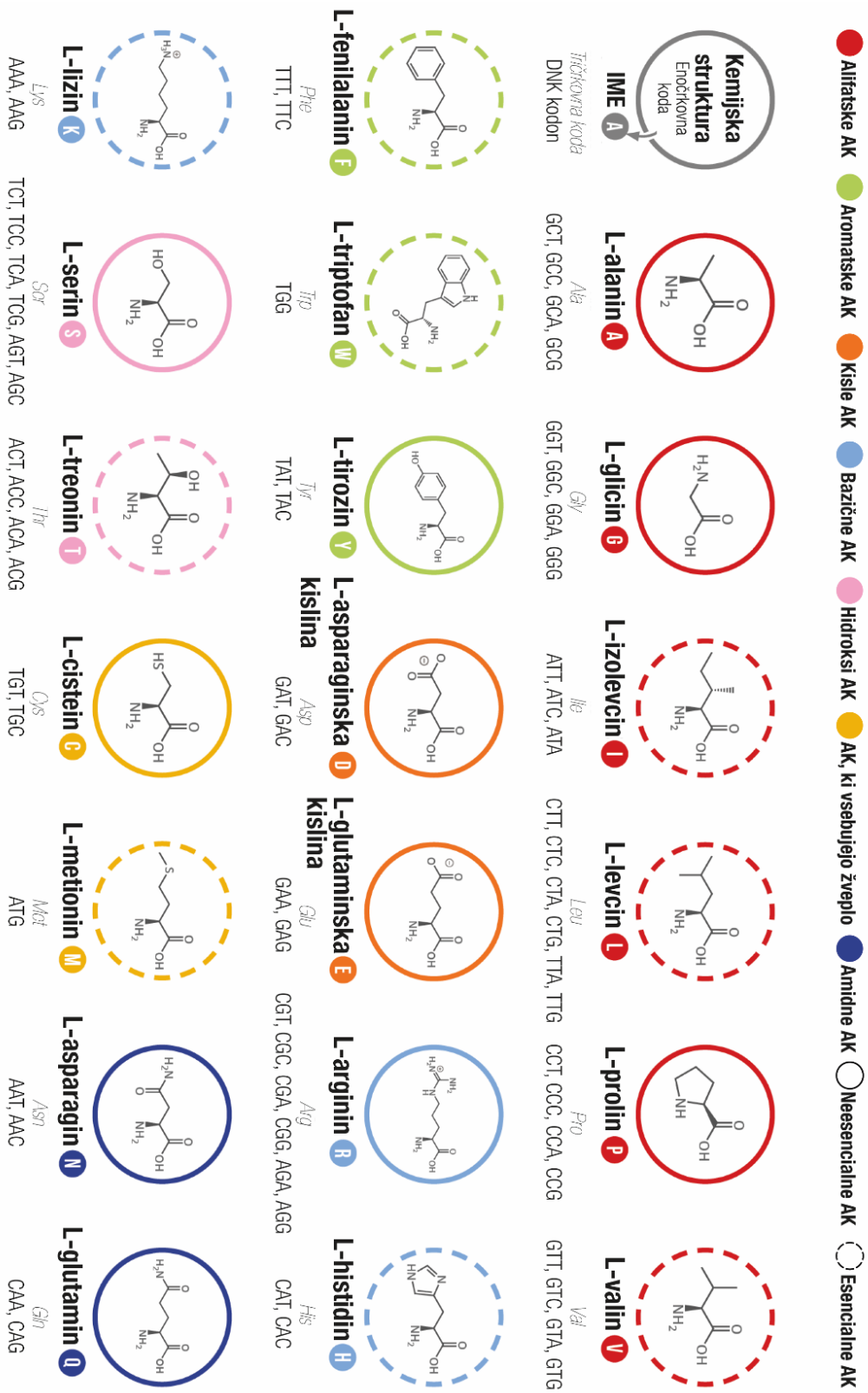
C–N vez v peptidni skupini zaradi π-konjugacije izraža karakter dvojne vezi.

Stranske skupine v peptidni vezi se razporedijo v *trans* konformaciji, kar pomeni, da sta donorska (N–H) in akceptorska (C=O) skupina H vezi nasprotno ležeči, kot sta tudi C_α atoma na zaporednih aminokislinskih skupinah:



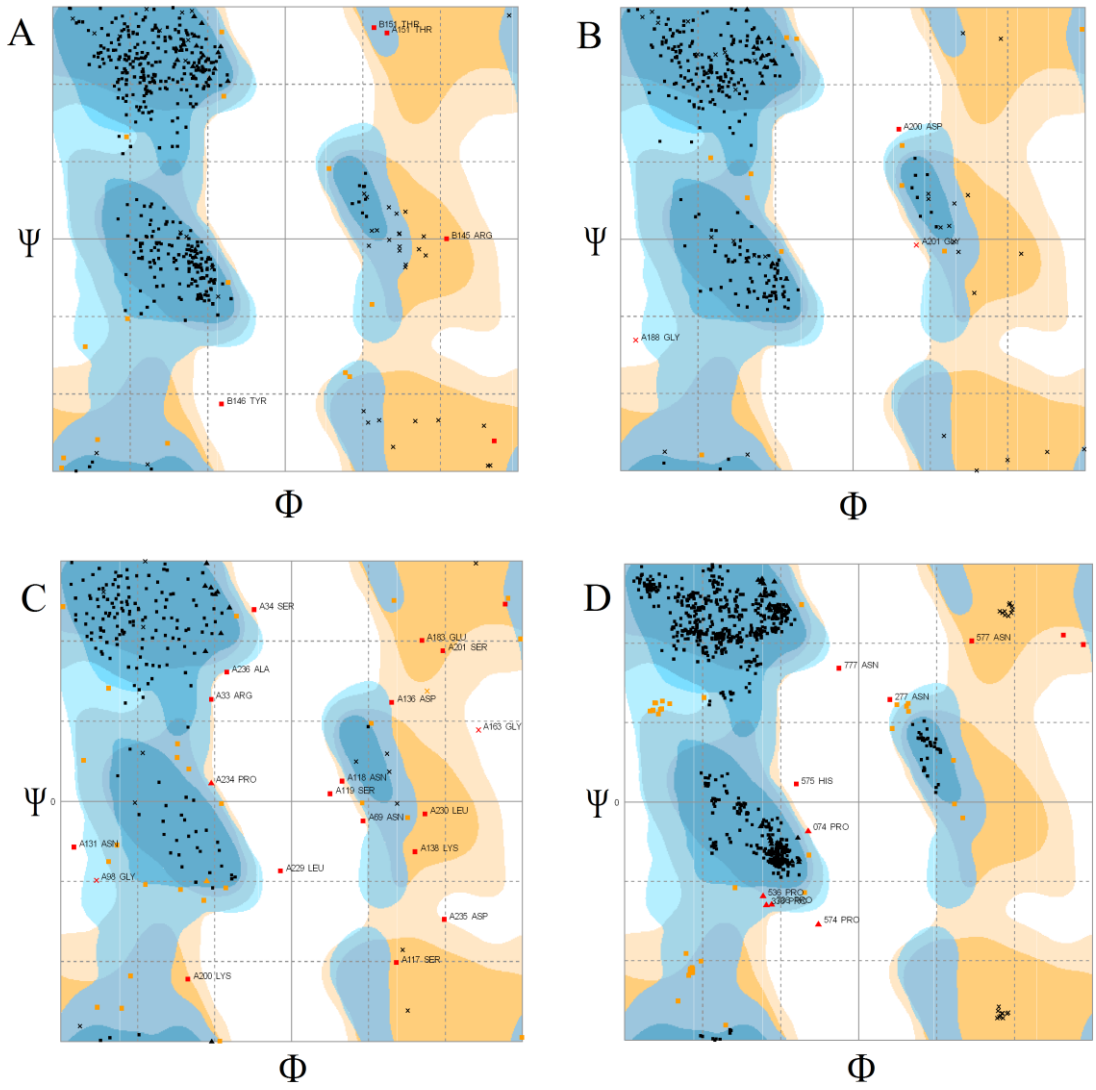
Takšna konformacija polipeptidne verige omejuje rotacije N–C_α in C_α–C vezi s pripadajočimi torzijskimi koti Φ (C–N–C_α–C) in Ψ (N–C_α–C–N). Konformacijo polipeptidne verige dodatno omejujejo energijski minimumi torzijskih kotov Φ in Ψ, ki ponavadi predstavljajo sekundarne elemente, kot so α-vijačnice, β-ravnine in PP_{II} zitje. Sekundarna struktura je stabilizirana s H vezmi, ki se tvorijo izključno med peptidnimi skupinami glavne polipeptidne verige. Zvitje elementov sekundarne strukture in neurejenih predelov polipeptidne verige v prostoru imenujemo terciarna struktura.

Dodatek 1: Aminokisline, peptidna vez in struktura polipeptidne verige [152].

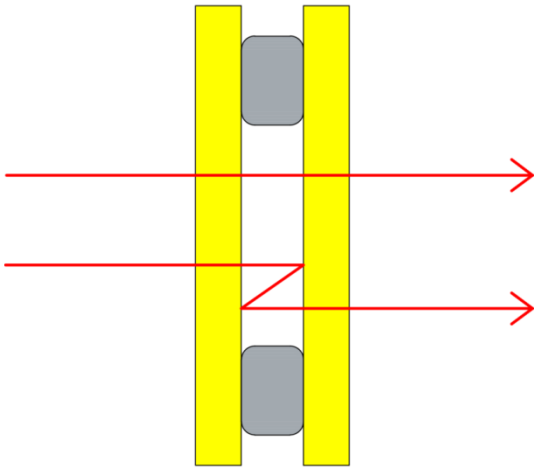


Dodatek 2: Strukture, tričrkovne in enočrkovne oznake dvajsetih aminokislin, ki so kodirane v genetskem kodu. Povzeto po: http://www.compoundchem.com (junij 2016).

A.2 Hidratacija proteinskih filmov

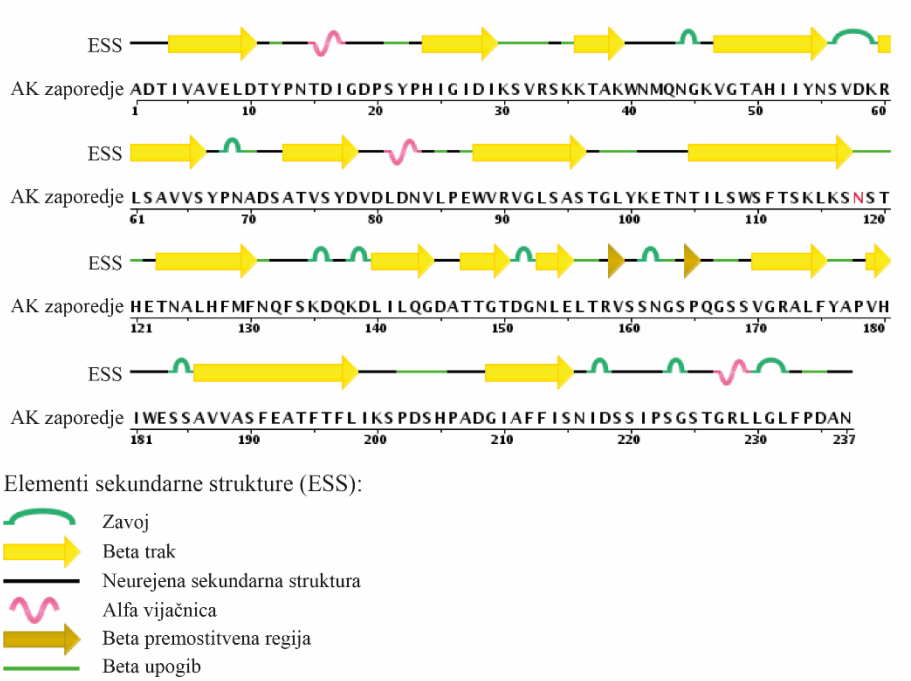


Dodatek 3: Ramachandranovi diagrami modelnih proteinov. (A) Kimotripsinogen [158], (B) konkanavalin A [156], (C) pepsin [160] in (D) stefin B [167].

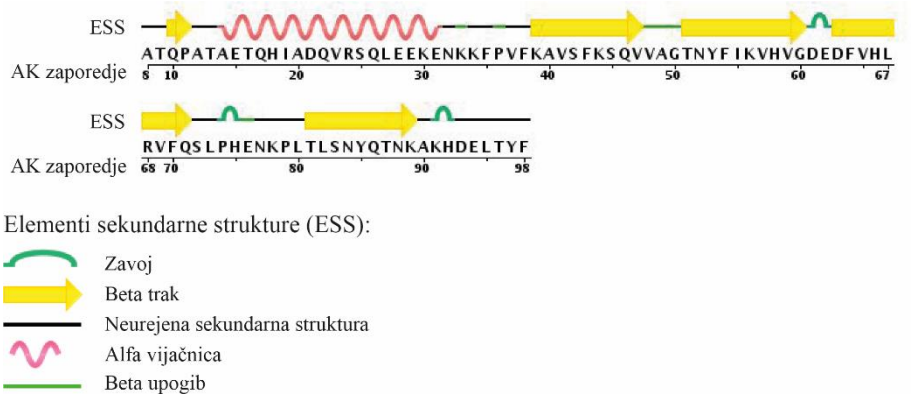


Dodatek 4: Merjenje debeline proteinskih filmov na podlagi interference infrardečih žarkov. Na sliki je z rdečo barvo prikazan prepuščen ter dvakrat odbit žarek. Z rumeno barvo sta predstavljeni ZnSe stekelci, s sivo pa preostanek proteinskega filma po odstranjevanju filma iz sredine stekelca s teflonsko spatulo.

A.3 Agregacija konkanavalina A in stefina B



Dodatek 5: Aminokislinsko zaporedje konkanavalina A s pripadajočimi elementi sekundarnih struktur [159].

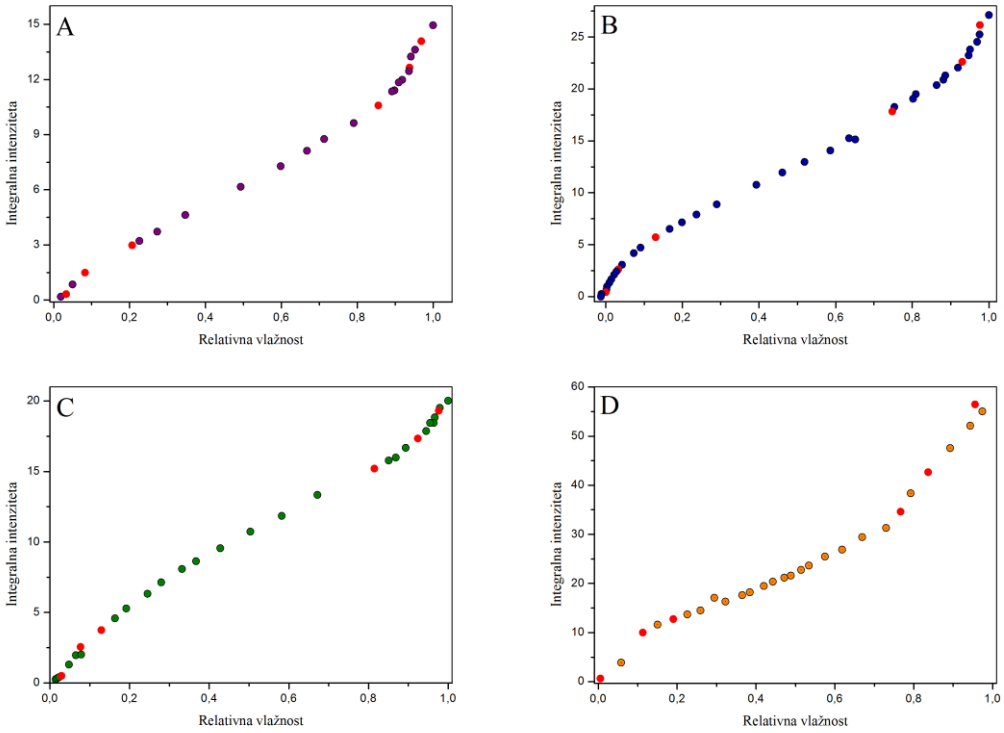


Dodatek 6: Aminokislinsko zaporedje stefina B s pripadajočimi elementi sekundarnih struktur [161].

Dodatek B

Dodatek k rezultatom

B.1 Hidratacija proteinskih filmov

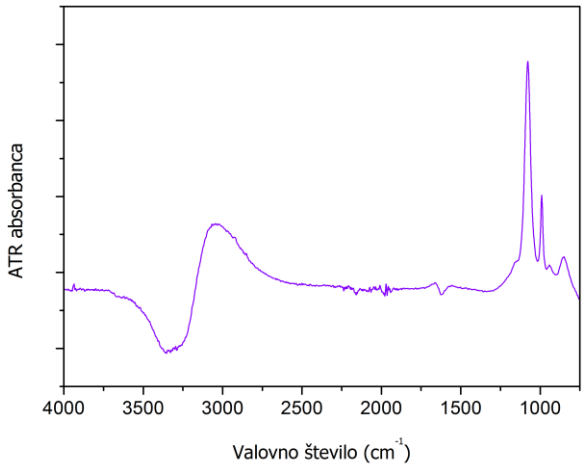


Dodatek 7: Odvisnost integralne intenzitete traku OH valenčnega nihanja (3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1}) od relativne vlažnosti. (A) Kimotripsinogen; (B) konkanavalin A, (C) pepsin in (D) stefin B. Z rdečo so označeni spektri, iz katerih smo za posamezno stopnjo hidratacije izračunali diferenčne spektre.

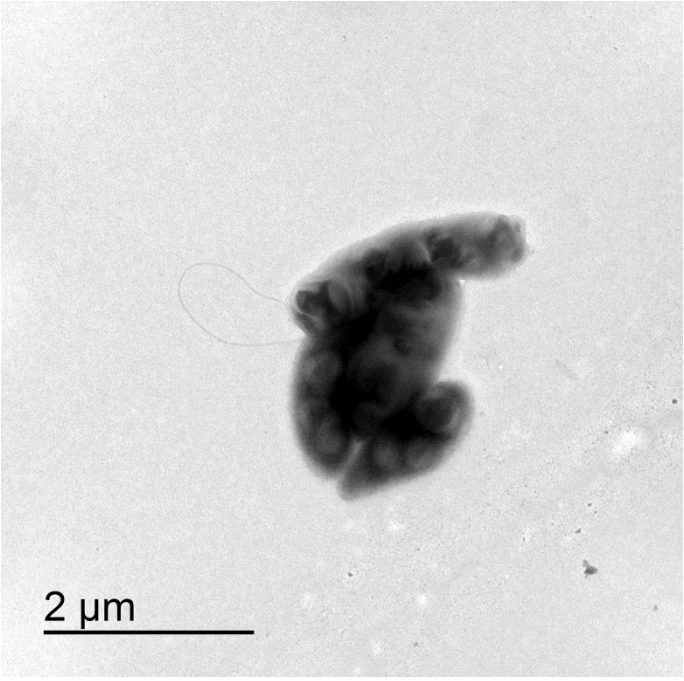
		Delež zastopanosti posameznih AK					Število CH vezi v stranskih verigah				
AK	**N_{CH}**	**BSA**	**KonA**	**Kim**	**Pep**	**sB**	**BSA_N_{CH}**	**KonA_N_{CH}**	**Kim_N_{CH}**	**Pep_N_{CH}**	**sB_ N_{CH}**
Ala (A)	3	8,1	7,7	9,2	4,9	8,2	24,3	23,1	27,6	14,7	24,6
Arg (R)	6	3,9	1,3	0,8	0,6	2	23,4	7,8	4,8	3,6	12
Asn (N)	2	2,4	6	5,4	4	5,1	4,8	12	10,8	8	10,2
Asp (D)	2	6,9	7,7	3,8	8,9	4,1	13,8	15,4	7,6	17,8	8,2
Cys (C)	2	6	0	4,2	1,8	1	12	0	8,4	3,6	2
Gln (Q)	4	3,4	2,1	4,2	4	7,1	13,6	8,4	16,8	16	28,4
Glu (E)	4	10,1	3	2,1	4	7,1	40,4	12	8,4	16	28,4
Gly (G)	2	2,7	6,8	9,6	10,7	3,1	5,4	13,6	19,2	21,4	6,2
His (H)	4	2,9	2,6	0,8	0,3	5,1	11,6	10,4	3,2	1,2	20,4
Ile (I)	9	2,4	6,4	4,2	7,7	2	21,6	57,6	37,8	69,3	18
Leu (L)	9	10,5	7,7	7,9	8	6,1	94,5	69,3	71,1	72	54,9
Lys (K)	8	10,1	5,1	5,8	0,3	9,2	80,8	40,8	46,4	2,4	73,6
Met (M)	7	0,7	0,9	0,8	1,2	2	4,9	6,3	5,6	8,4	14
Phe (F)	7	4,6	4,7	2,5	4,3	7,1	32,2	32,9	17,5	30,1	49,7
Pro (P)	5	4,8	4,7	3,8	4,6	5,1	24	23,5	19	23	25,5
Ser (S)	2	4,8	13,2	11,3	13,5	6,1	9,6	26,4	22,6	27	12,2
Thr (T)	4	5,7	8,1	9,2	8	7,1	22,8	32,4	36,8	32	28,4
Trp (W)	8	0,3	1,7	3,3	1,5	0	2,4	13,6	26,4	12	0
Tyr (Y)	6	3,4	3	1,7	4,9	3,1	20,4	18	10,2	29,4	18,6
Val (V)	7	6,2	7,3	9,6	6,7	9,2	43,4	51,1	67,2	46,9	64,4
∑							505,9	474,6	467,4	454,8	499,7
Faktor							**1**	**1,06**	**1,08**	**1,11**	**1,01**

Dodatek 8: Izračun faktorjev, ki določijo razmerje med številom CH vezi v govejem serumskem albuminu in preostalimi modelnimi proteini. N_{CH} predstavlja število CH vezi v stranskih verigah. Prolin ima v svoji stranski verigi 6 CH vezi, vendar smo v tej tabeli zapisali 5 CH vezi, saj za razliko od ostalih AK v polipeptidni verigi ne prispeva $C_\alpha H$ vezi. Vse preostale $C_\alpha H$ vezi smo iz tega računa izključili, saj je delež pri vseh polipeptidnih verigah enak.

B.2 Agregacija konkanavalina A in stefina B



Dodatek 9: Spekter fosfatnega pufra pri pH vrednosti 7,5 in temperaturi 25 °C. Spekter čiste vode je odštet. Ta pufer smo pri spremljanju agregacije konkanavalina A in stefina B izbrali zaradi dejstva, da v območju proteinskega prstnega odtisa (med 1750 cm^{-1} in 1150 cm^{-1}) nima intenzivnih trakov, ki bi se prekrivali z amidnimi regijami.



Dodatek 10: Slika štirih bakterij, posneta s transmisijsko elektronsko mikroskopijo, ki smo jih našli v vzorcu stefina B, raztopljenega v 0,1 M fosfatnem pufru pri pH vrednosti 7,5. Menimo, da so bakterije v dokaj ugodnih fizioloških pogojih metabolizirale stefin B.

Literatura

[1] C. B. Anfinsen, "Principles that Govern the Folding of Protein Chains," *Science,* zv. 181, str. 223-230, 1973.

[2] M. Y. Sherman in A. L. Goldberg, "Cellular Defenses Against Unfolded Proteins: A Cell Biologist Thinks About Neurodegenerative Diseases," *Neuron,* zv. 29, str. 15-32, 2001.

[3] Y. Klemes, J. D. Etlinger, in A. L. Goldberg, "Properties of Abnormal Proteins Degraded Rapidly in Reticulocytes. Intracellular Aggregation of the Globin Molecules Prior to Hydrolysis," *J. Biol. Chem.,* zv. 256, str. 8436–8444, 1981.

[4] W. F. Prouty in A. L. Goldberg, "Fate of Abnormal Proteins in *E. Coli*: Accumulation in Intracellular Granules Before Catabolism," *Nature New Biol.,* zv. 240, str. 147-150, 1972.

[5] K. A. Dill, "Dominant Forces in Protein Folding," *Biochemistry,* zv. 29, str. 7133-7155, 1990.

[6] W. Kauzmann, "Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation," v *Advances in Protein Chemistry.* zv. 14, C. B. Anfinsen, M. L. Anson, K. Bailey, in T. E. John, Ur.: Academic Press, 1959, str. 1-63.

[7] F. Avbelj in J. Moult, "Role of Electrostatic Screening in Determining Protein Main Chain Conformational Preferences," *Biochemistry,* zv. 34, str. 755-764, 1995.

[8] D. A. Brant in P. J. Flory, "The Role of Dipole Interactionsin Determining Polypeptide Conformation," *JACS,* zv. 87, str. 663-664, 1965.

[9] M. F. Perutz, "Electrostatic Effects in Proteins," *Science,* zv. 201, str. 1187-1191, 1978.

[10] M. H. Klapper, "On the Nature of the Protein Interior," *Biochim. Biophys. Acta,* zv. 229, str. 557-566, 1971.

[11] F. M. Richards, "Areas, Volumes, Packing and Protein Structure," *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.,* zv. 6, str. 151-176, 1977.

[12] J. A. Schellman, "The Stability of Hydrogen-Bonded Peptide Structures in Aqueous Solution," *C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser Chim.,* zv. 29, str. 230-259, 1955.

[13] D. F. Sticke, L. G. Presta, K. A. Dill, in G. D. Rose, "Hydrogen Bonding in Globular Proteins," *J. Mol. Biol.,* zv. 226, str. 1143-1159, 1992/08/20 1992.

[14] R. Gregory, *Protein-Solvent Interactions*: CRC Press, 1995.

[15] G. N. Ramachandran in V. Sasisekharan, "Conformation of Polypeptides and Proteins," v *Adv. Protein Chem.* zv. 23, C.B. Anfinsen, M. L. Anson, J. T. Edsall, in M. R. Frederic, Ur.: Academic Press, 1968, str. 283-437.

[16] M. Kuemin, S. Schweizer, C. Ochsenfeld, in H. Wennemers, "Effects of Terminal Functional Groups on the Stability of the Polyproline II Structure: A Combined Experimental and Theoretical Study," *JACS,* zv. 131, str. 15474-15482, 2009/10/28 2009.

[17] E. J. Milner-White, "Situations of Gamma-turns in Proteins: Their Relation to Alpha-helices, Beta-sheets and Ligand Binding Sites," *J. Mol. Biol.,* zv. 216, str. 385-397, 1990.

[18] F. Eker, K. Griebenow, in R. Schweitzer-Stenner, "Stable Conformations of Tripeptides in Aqueous Solution Studied by UV Circular Dichroism Spectroscopy," *JACS,* zv. 125, str. 8178-8185, Jul 9 2003.

[19] Z. Liu, K. Chen, A. Ng, Z. Shi, R. W. Woody, in N. R. Kallenbach, "Solvent Dependence of PII Conformation in Model Alanine Peptides," *JACS,* zv. 126, str. 15141-15150, Nov 24 2004.

[20] A. Mirtic in J. Grdadolnik, "The Structure of Poly-L-Lyzine in Different Solvents," *Biophys. Chem.,* zv. 175-176, str. 47-53, 2013.

[21] L. M. Luheshi in C. M. Dobson, "Bridging the Gap: From Protein Misfolding to Protein Misfolding Diseases," *FEBS Lett.,* zv. 583, str. 2581-6, 2009.

[22] C. A. Ross in M. A. Poirier, "Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease," *Nature Med.,* zv. 10, str. 10-17, Jul 2004.

[23] J. D. Sipe, *The β-Pleated Sheet Conformation and Protein Folding: A Brief History.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

[24] V. N. Uversky, "Mysterious Oligomerization of the Amyloidogenic Proteins," *FEBS J.,* zv. 277, str. 2940-2953, Jul 2010.

[25] M. Ramirez-Alvarado, J. S. Merkel, in L. Regan, "A Systematic Exploration of the Influence of the Protein Stability on Amyloid Fibril Formation *In Vitro.*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 97, str. 8979-8984, 2000.

[26] A. L. Horwich in J. S. Weissman, "Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease," *Cell,* zv. 89, str. 499-510, May 16 1997.

[27] P. T. Lansbury, "Inhibition of Amyloid Formation: A Strategy to Delay the Onset of Alzheimer's Disease," *Curr. Opin. Chem. Biol.,* zv. 1, str. 260-267, 1997.

[28] K. A. Conway, J. D. Harper, in P. T. Lansbury, "Accelerated *In Vitro* Fibril Formation by a Mutant α-Synuclein Linked to Early-Onset Parkinson Disease," *Nature Med.,* zv. 4, str. 1318-20, Nov 1998.

[29] M. Sunde in C. Blake, "The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction," *Adv. Protein Chem.,* zv. 50, str. 123-159, 1997.

[30] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, in C. C. Blake, "Common Core Structure of Amyloid Fibrils by Synchrotron X-Ray Diffraction," *J. Mol. Biol.,* zv. 273, str. 729-39, Oct 31 1997.

[31] M. Stefani, "Protein Folding and Misfolding, Relevance to Disease, and Biological Function," v *Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases*, Boca Raton: CRC Press, 2007, str. 1-66.

[32] C. M. Dobson, "Protein Misfolding, Evolution and Disease," *Trends Biochem. Sci.,* zv. 24, str. 329-32, Sep 1999.

[33] M. Fandrich, M. A. Fletcher, in C. M. Dobson, "Amyloid Fibrils from Muscle Myoglobin," *Nature,* zv. 410, str. 165-6, Mar 8 2001.

[34] K. F. DuBay, A. P. Pawar, F. Chiti, J. Zurdo, C. M. Dobson, in M. Vendruscolo, "Prediction of the Absolute Aggregation Rates of Amyloidogenic Polypeptide Chains," *J. Mol. Biol.,* zv. 341, str. 1317-1326, 2004.

[35] J. I. Guijarro, M. Sunde, J. A. Jones, I. D. Campbell, in C. M. Dobson, "Amyloid Fibril Formation by an SH3 Domain," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 95, str. 4224-4228, Apr 14 1998.

[36] E. Žerovnik, "Amyloid-Fibril Formation," *Eur. J. Biochem.,* zv. 269, str. 3362-3371, 2002.

[37] P. T. Lansbury, "Evolution of Amyloid: What Normal Protein Folding May Tell Us About Fibrillogenesis and Disease," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 96, str. 3342-3344, Mar 30 1999.

[38] E. Zerovnik, V. Stoka, A. Mirtic, G. Guncar, J. Grdadolnik, R. A. Staniforth*, in sod.*, "Mechanisms of Amyloid Fibril Formation - Focus on Domain-Swapping," *FEBS J.,* zv. 278, str. 2263-2282, Jul 2011.

[39] J. W. Kelly, "Mechanisms of Amyloidogenesis," *Nature Struct. Biol.,* zv. 7, str. 824-6, Oct 2000.

[40] J. T. Jarrett in P. T. Lansbury, Jr., "Seeding "One-Dimensional Crystallization" of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie?," *Cell,* zv. 73, str. 1055-1058, Jun 18 1993.

[41] J. Grdadolnik in Y. Marechal, "Bovine Serum Albumin Observed by Infrared Spectrometry. II. Hydration Mechanisms and Interaction Configurations of Embedded H_2O Molecules," *Biopolymers,* zv. 62, str. 54-67, 2001.

[42] R. Loris, U. Langhorst, S. De Vos, K. Decanniere, J. Bouckaert, D. Maes*, in sod.*, "Conserved Water Molecules in a Large Family of Microbial Ribonucleases," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 36, str. 117-134, 1999.

[43] U. Langhorst, J. Backmann, R. Loris, in J. Steyaert, "Analysis of a Water Mediated Protein−Protein Interactions within RNase T1," *Biochemistry,* zv. 39, str. 6586-6593, 2000/06/01 2000.

[44] S. Kiihne in R. G. Bryant, "Protein-Bound Water Molecule Counting by Resolution of 1H Spin-Lattice Relaxation Mechanisms," *Biophys. J.,* zv. 78, str. 2163-2169, 4// 2000.

[45] M. Tarek in D. J. Tobias, "Environmental Dependence of the Dynamics of Protein Hydration Water," *JACS,* zv. 121, str. 9740-9741, 1999/10/01 1999.

[46] H. G. Nagendra, N. Sukumar, in M. Vijayan, "Role of Water in Plasticity, Stability, and Action of Proteins: The Crystal Structures of Lysozyme at Very Low Levels of Hydration," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 32, str. 229-240, 1998.

[47] J. Janin, "Wet and Dry Interfaces: The Role of Solvent in Protein–Protein and Protein–DNA Recognition," *Structure,* zv. 7, str. R277-R279, 1// 1999.

[48] A. Palomer, J. J. Pérez, S. Navea, O. Llorens, J. Pascual, L. García*, in sod.*, "Modeling Cyclooxygenase Inhibition. Implication of Active Site Hydration on the

Selectivity of Ketoprofen Analogues," *J. Med. Chem.,* zv. 43, str. 2280-2284, 2000/06/01 2000.

[49] A. J. Scheidig, C. Burmester, in R. S. Goody, "The Pre-hydrolysis State of p21(Ras) in Complex with GTP: New Insights into the Role of Water Molecules in the GTP Hydrolysis Reaction of Ras-like Proteins," *Structure,* zv. 7, str. S1-S2, 1999.

[50] A. Bizzarri, A. Paciaroni, C. Arcangeli, in S. Cannistraro, "Low-Frequency Vibrational Modes in Proteins: A Neutron Scattering Investigation," *Eur. Biophys. J.,* zv. 30, str. 443-449, 2001// 2001.

[51] V. P. Denisov in B. Halle, "Protein Hydration Dynamics in Aqueous Solution: A Comparison of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Ubiquitin by Oxygen-17 Spin Relaxation Dispersion," *J. Mol. Biol.,* zv. 245, str. 682-697, 1995/02/03 1995.

[52] K. Wuthrich, M. Billeter, P. Guntert, P. Luginbuhl, R. Riek, in G. Wider, "NMR Studies of the Hydration of Biological Macromolecules," *Faraday Discuss.,* zv. 103, str. 245-253, 1996.

[53] G. Careri, A. Giansanti, E. Gratton, in Snamprogetti, "Lysozyme Film Hydration Events: An IR and Gravimetric Study," *Biopolymers,* zv. 18, str. 1187-1203, 1979.

[54] J. Grdadolnik in D. Hadži, "Conformational Effects of Metal Salt Binding to the Polar Head of Phosphatidylcholines Investigated by FTIR Spectroscopy," *Chem. Phys. Lipids,* zv. 65, str. 121-132, 1993/06/01 1993.

[55] J. Grdadolnik, J. Kidric, in D. Hadzi, "Hydration of Phosphatidylcholine Reverse Micelles and Multilayers - An Infrared Spectroscopic Study," *Chem. Phys. Lipids,* zv. 59, str. 57-68, 1991/08/01 1991.

[56] J. Grdadolnik, J. Kidrič, in D. Hadži, "An FT-IR Study of Water Hydrating Dipalmitoylphosphatidylcholine Multibilayers and Reversed Micelles," *J. Mol. Struct.,* zv. 322, str. 93-102, 1994/06/16 1994.

[57] Y. Maréchal, "Hydrogen Bonding - Experimental and Theoretical Studies Interaction Configurations of H_2O Molecules in a Protein (Stratum Corneum) by Infrared Spectrometry," *J. Mol. Struct.,* zv. 416, str. 133-143, 1997/10/20 1997.

[58] Y. Marechal, "Configurations Adopted by H_2O Molecules: Results from IR Spectroscopy," *Faraday Discuss.,* zv. 103, str. 349-361, 1996.

[59] J. Grdadolnik in Y. Maréchal, "Bovine Serum Albumin Observed by Infrared Spectrometry. I. Methodology, Structural Investigation, and Water Uptake," *Biopolymers,* zv. 62, str. 40-53, 2001.

[60] N. Nandi, K. Bhattacharyya, in B. Bagchi, "Dielectric Relaxation and Solvation Dynamics of Water in Complex Chemical and Biological Systems," *Chem. Rev.,* zv. 100, str. 2013-2046, 2000/06/01 2000.

[61] J. Grdadolnik, V. Mohacek-Grosev, R. L. Baldwin, in F. Avbelj, "Populations of the Three Major Backbone Conformations in 19 Amino Acid Dipeptides," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 108, str. 1794-1798, Feb 1 2011.

[62] F. Avbelj, S. G. Grdadolnik, J. Grdadolnik, in R. L. Baldwin, "Intrinsic Backbone Preferences are Fully Present in Blocked Amino Acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 103, str. 1272-1277, 2006.

[63] F. Avbelj, "Solvation and Electrostatics as Determinants of Local Structural Order in Unfolded Peptides and Proteins," v *Protein and Peptide Folding, Misfolding, and Non-Folding*: John Wiley & Sons, Inc., 2012, str. 131-158.

[64] C. M. Dobson, "Protein Folding and Misfolding," *Nature,* zv. 426, str. 884-890, 2003.

[65] F. Chiti in C. M. Dobson, "Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease," *Annu. Rev. Biochem.,* zv. 75, str. 333-366, 2006.

[66] A. N. Alexandrova, D. Rothlisberger, D. Baker, in W. L. Jorgensen, "Catalytic Mechanism and Performance of Computationally Designed Enzymes for Kemp Elimination.," *JACS,* zv. 130, str. 15907-15915, 2008.

[67] J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St.Clair*, in sod.*, "Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction.," *Science,* zv. 329, str. 309-313, 2010.

[68] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, in J. F. H. White, "The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 47, str. 1309-1314, 1961.

[69] L. Breydo in V. N. Uversky, "Molecular Mechanisms of Protein Misfolding," v *Bio-nanoimaging*, V. N. Uversky in Y. L. Lyubchenko, Ur., 1st Boston: Academic Press, 2014, str. 1-14.

[70] C. Levinthal, "Are There Pathways for Protein Folding?," *J. Chem. Phys.,* zv. 65, str. 44-45, 1968.

[71] C. Levinthal, "How to Fold Graciously," presented at the Mössbauer Spectroscopy in biological Systems 1969.

[72] M. Karplus in D. L. Weaver, "Protein-Folding Dynamics," *Nature,* zv. 260(5550), str. 404-6, 1976.

[73] M. Karplus in D. l. Weaver, "Protein Folding Dynamics: The Diffusion-Collision Model and Experimental Data," *Protein Sci.,* zv. 3(4), str. 650-68, 1994.

[74] J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, in P. G. Wolynes, "Funnels, Pathways, and the Energy Landscape of Protein Folding: A Synthesis," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 21, str. 167-195, 1995.

[75] J. Sabelko, J. Ervin, in M. Gruebele, "Observation of Strange Kinetics in Protein Folding," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 96, str. 6031-6036, 1999.

[76] M. M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J. M. Sanchez-Ruiz, in V. Munoz, "Experimental Identification of Downhill Protein Folding," *Science,* zv. 298, str. 2191-2195, 2002.

[77] W. Y. Yang in M. Gruebele, "Folding at the Speed Limit," *Nature,* zv. 423, str. 193-197, 2003.

[78] S. J. DeCamp, A. N. Naganathan, S. A. Waldauer, O. Bakajin, in L. J. Lapidus, "Direct Observation of Downhill Folding of Lambda-Repressor in a Microfluidic Mixer," *Biophys. J.,* zv. 97, str. 1772-1777, 2009.

[79] J. K. Myers in C. N. Pace, "Hydrogen Bonding Stabilizes Globular Proteins," *Biophys. J.,* zv. 71, str. 2033-2039, 1996.

[80] J. M. Richardson, M. M. Lopez, in G. I. Makhatadze, "Enthalpy of Helix–Coil Transition: Missing Link in Rationalizing the Thermodynamics of Helix-Forming

Propensities of the Amino Acid Residues," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 102, str. 1413-1418, February 1, 2005 2005.

[81] J. M. Scholtz, S. Marqusee, R. L. Baldwin, E. J. York, J. M. Stewart, M. Santoro*, in sod.*, "Calorimetric Determination of the Enthalpy Change for the Alpha-helix to Coil Transition of an Alanine Peptide in Water," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 88, str. 2854-2858, April 1, 1991 1991.

[82] P. Hammarstrom, R. L. Wiseman, E. T. Powers, in J. W. Kelly, "Prevention of Transthyretin Amyloid Disease by Changing Protein Misfolding Energetics.," *Science,* zv. 299, str. 713-716, 2003.

[83] I. V. Baskakov, G. Legname, M. A. Baldwin, S. B. Prusiner, in F. E. Cohen, "Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid," *J. Biol. Chem.,* zv. 277, str. 21140-21148, 2002.

[84] J. D. Sipe in A. S. Cohen, "Review: History of the Amyloid Fibril," *J. Struct. Biol.,* zv. 130, str. 88-98, 2000.

[85] F. Chiti, P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi*, in sod.*, "Designing Conditions for *In Vitro* Formation of Amyloid Protofilaments and Fibrils.," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 96, str. 3590-3594, 1999.

[86] K. Yutani, G. Takayama, S. Goda, Y. Yamagata, S. Maki, K. Namba*, in sod.*, "The Process of Amyloid-like Fibril Formation by Methionine Aminopeptidase from a Hyperthermophile, Pyrococcus Furiosus.," *Biochemistry,* zv. 39, str. 2769-2777, 2000.

[87] T. Konno, "Multistep Nucleus Formation and a Separate Subunit Contribution of the Amyloidogenesis of Heat-Denatured Monellin.," *Protein Sci.,* zv. 10, str. 2093-2101, 2001.

[88] V. A. Iconomidou, G. Vriend, in K. Hamodrakas, "Amyloid Protects the Silk Moth Oocyte and Embryo," *FEBS Lett.,* zv. 479, str. 141-145, 2000.

[89] M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. s. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar*, in sod.*, "Role of *Escherichia coli* Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation," *Science,* zv. 295, str. 851-855, 2002.

[90] J. E. Podrabsky, J. E. Carpenter, in S. C. Hand, "Survival of Water Stress in Annual Fish Embryos: Dehydration Avoidance and Egg Envelope Amyloid Fibers," *Am. J. Physiol.,* zv. 280, str. R123-R131, 2001.

[91] J. W. Kelly, "The Alternative Conformations of Amyloidogenic Proteins and Their Multi-Step Assembly Pathways," *Curr. Opin. Struct. Biol.,* zv. 8, str. 101-106, 1998.

[92] J. L. Jimenez, E. J. Nettleton, M. Bouchard, C. V. Robinson, C. M. Dobson, in H. Saibil, "The Protofilament Structure of Insulin Amyloid Fibrils," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 99, str. 9196-9201, 2002.

[93] J. L. Jimenez, J. I. Guijarro, E. Orlova, J. Zurdo, C. M. Dobson, M. Sunde*, in sod.*, "Cryo-Electron Microscopy Structure of an SH3 Amyloid Fibril and Model of the Molecular Packing," *EMBO J.,* zv. 18, str. 815-821, 1999.

[94] I. V. Baskakov, G. Legname, S. B. Prusiner, in F. E. Cohen, "Folding of Prion Protein to Its Native α-Helical Conformation is under Kinetic Control.," *J. Biol. Chem.,* zv. 276, str. 19687-19690, 2001.

[95] R. Khurana, J. R. Gillespie, A. Talapatra, L. J. Minert, C. Ionescu-Zanetti, I. Millett*, in sod.*, "Partially Folded Intermediates as Critical Precursors of Light Chain Amyloid Fibrils and Amorphous Aggregates," *Biochemistry,* zv. 40, str. 3525-3535, 2001.

[96] F. Chiti, N. Taddei, M. Bucciantini, P. White, G. Ramponi, in C. M. Dobson, "Mutational Analysis of the Propensity for Amyloid Formation by a Globular Protein.," *EMBO J.,* zv. 19, str. 1441-1449, 2000.

[97] Y. Maréchal, *The Hydrogen Bond and the Water Molecule*, 1 izd. Amsterdam: Elsevir B.V., 2007.

[98] A. Barth, "Infrared Spectroscopy of Proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics,* zv. 1767, str. 1073-1101, 9// 2007.

[99] A. Barth in W. Mäntele, "ATP-Induced Phosphorylation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase: Molecular Interpretation of Infrared Difference Spectra," *Biophys. J.,* zv. 75, str. 538-544, 7// 1998.

[100] A. Barth, "Phosphoenzyme Conversion of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase: Molecular Interpretation of Infrared Difference Spectra," *J. Biol. Chem.,* zv. 274, str. 22170-22175, 1999.

[101] A. Barth, W. Mäntele, in W. Kreutz, "Infrared Spectroscopic Signals Arising from Ligand Binding and Conformational Changes in the Catalytic Cycle of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics,* zv. 1057, str. 115-123, 1991/03/01 1991.

[102] N. B. Colthup, L. H. Daly, in S. E. Wiberley, 3rd izd. San Diego: Academic Press, 1990.

[103] M. Bauscher in W. Maentele, "Electrochemical and Infrared-Spectroscopic Characterization of Redox Reactions of P-Quinones," *J. Phys. Chem.,* zv. 96, str. 11101-11108, 1992/12/01 1992.

[104] H. Deng in R. Callender, "Raman Spectroscopic Studies of the Structures, Energetics, and Bond Distortions of Substrates Bound to Enzymes," v *Methods Enzymol.* zv. 308, 1999, str. 176-201.

[105] M. Nara, H. Torii, in M. Tasumi, "Correlation between the Vibrational Frequencies of the Carboxylate Group and the Types of Its Coordination to a Metal Ion: An ab Initio Molecular Orbital Study," *J. Phys. Chem.,* zv. 100, str. 19812-19817, 1996/01/01 1996.

[106] M. Mizuguchi, M. Nara, K. Kawano, in K. Nitta, "FT-IR Study of the Ca^{2+}-Binding to Bovine α-Lactalbumin," *FEBS Letters,* zv. 417, str. 153-156, 1997.

[107] G. Maes, A. Smolders, P. Vandevyvere, L. Vanderheyden, in T. Zeegers-Huyskens, "Matrix-isolation IR Studies on the Basic Interaction Sites in Esters and Thiolesters towards Proton Donors," *J. Mol. Struct.,* zv. 173, str. 349-356, 1988/01/01 1988.

[108] H. U. Gremlich in B. Yan, *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. New York: Marcel Dekker Inc., 2001.

[109] P. J. Tonge, R. Fausto, in P. R. Carey, "FTIR Studies of Hydrogen Bonding Between α,β-unsaturated Esters and Alcohols," *J. Mol. Struct.,* zv. 379, str. 135-142, 1996/06/15 1996.

[110] A. K. Dioumaev in M. S. Braiman, "Modeling Vibrational Spectra of Amino Acid Side Chains in Proteins: The Carbonyl Stretch Frequency of Buried Carboxylic Residues," *JACS,* zv. 117, str. 10572-10574, 1995/10/01 1995.

[111] G. Steiner, "Measurement Techniques," v *Handbook of Spectroscopy*, G. Gauglitz in D. S. Moore, Ur.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014, str. 71-94.

[112] J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, in F. M. Goñi, "Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-transform Infrared Spectroscopy," *Prog. Biophys. Mol. Biol.,* zv. 59, str. 23-56, 1993/01/01 1993.

[113] S. Y. Venyaminov in F. G. Prendergast, "Water (H_2O and D_2O) Molar Absorptivity in the 1000–4000 cm^{-1}Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions," *Anal. Biochem.,* zv. 248, str. 234-245, 1997/06/01 1997.

[114] K. A. Oberg in A. L. Fink, "A New Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy Method for the Study of Proteins in Solution," *Anal. Biochem.,* zv. 256, str. 92-106, 1998/02/01 1998.

[115] P. Rigler, W.-P. Ulrich, R. Hovius, E. Ilegems, H. Pick, in H. Vogel, "Downscaling Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the Micrometer and Nanogram Scale: Secondary Structure of Serotonin and Acetylcholine Receptors," *Biochemistry,* zv. 42, str. 14017-14022, 2003/12/01 2003.

[116] J. Grdadolnik, "ATR FTIR Spectroscopy: Its Advantage and limitations," *Acta Chim. Slov.,* str. 631-642, 2002.

[117] J. Grdadolnik, "Saturation Effects in FTIR Spectroscopy: Intensity of Amide I and Amide II Bands in Protein Spectra," *Acta Chim. Slov.,* zv. 50, str. 777-788, 2003.

[118] S. Krimm, "Interpreting Infrared Spectra of Peptides and Proteins," v *Infrared Analysis of Peptides and Proteins.* zv. 750: American Chemical Society, 1999, str. 38-53.

[119] A. Barth, "The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains," *Prog. Biophys. Mol. Biol.,* zv. 74, str. 141-173, // 2000.

[120] G. E. Schulz in R. H. Schirmer, "Prediction of Secondary Structure from the Amino Acid Sequence," v *Principles of protein structure.* zv. 8, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1979, str. 108-130.

[121] P. Y. Chou in G. D. Fasman, "Prediction of Protein Conformation," *Biochemistry,* zv. 13, str. 222-245, 1974/01/01 1974.

[122] F. R. Salemme in D. W. Weatherford, "Conformational and Geometrical Properties of β-sheets in Proteins," *J. Mol. Biol.,* zv. 146, str. 101-117, 1981/02/15 1981.

[123] K.-C. Chou, M. Pottle, G. Némethy, y. Ueda, in H. A. Scheraga, "Structure of β-sheets: Origin of the Right-Handed Twist and of the Increased Stability of Antiparallel Over Parallel Sheets," *J. Mol. Biol.,* zv. 162, str. 89-112, 1982.

[124] J. S. Richardson, E. D. Getzoff, in D. C. Richardson, "The Beta Bulge: A Common Small Unit of Nonrepetitive Protein Structure," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 75, str. 2574-2578, 1978.

[125] W. G. J. Hol, P. T. van Duijnen, in H. J. C. Berendsen, "The α-helix Dipole and the Properties of Proteins," *Nature,* zv. 273, str. 443-446, 1978.

[126] W. G. J. Hol, L. M. Halie, in C. Sander, "Dipoles of the α-helix and β-sheet: Their Role in Protein Folding," *Nature,* zv. 294, str. 532-536, 1981.

[127] C. M. Venkatachalam, "Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V. Conformation of a System of Three Linked Peptide Units," *Biopolymers,* zv. 6, str. 1425-1436, 1968.

[128] E. N. Baker in R. E. Hubbard, "Hydrogen Bonding in Globular Proteins," *Prog. Biophys. Mol. Biol.,* zv. 44, str. 97-179, 1984/01/01 1984.

[129] B. W. Matthews, "The γ Turn. Evidence for a New Folded Conformation in Proteins," *Macromolecules,* zv. 5, str. 818-819, 1972/11/01 1972.

[130] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, in V. Sasisekharan, "Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations," *J. Mol. Biol.,* zv. 7, str. 95-99, 1963.

[131] R. V. Pappu, R. Srinivasan, in G. D. Rose, "The Flory Isolated-Pair Hypothesis Is Not Valid for Polypeptide Chains: Implications for Protein Folding," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 97, str. 12565-12570, 2000.

[132] L. L. Perskie, T. O. Street, in G. D. Rose, "Structures, basins, and energies: A deconstruction of the Protein Coil Library," *Protein Sci.,* zv. 17, str. 1151-1161, 2008.

[133] J. Grdadolnik, S. G. Grdadolnik, in F. Avbelj, "Determination of Conformational Preferences of Dipeptides Using Vibrational Spectroscopy," *J. Phys. Chem. B,* zv. 112, str. 2712-8, Mar 6 2008.

[134] L. J. Smith, K. A. Bolin, H. Schwalbe, M. W. MacArthur, J. M. Thornton, in C. M. Dobson, "Analysis of Main Chain Torsion Angles in Proteins: Prediction of NMR Coupling Constants for Native and Random Coil Conformations," *J. Mol. Biol.,* zv. 255, str. 494-506, 1996/01/26 1996.

[135] F. Avbelj in S. G. Grdadolnik, "Electrostatic Screening and Backbone Preferences of Amino Acid Residues in Urea-denatured Ubiquitin," *Prot. Sci.,* zv. 16, str. 273-284, 08/11/received
10/16/revised
11/12/accepted 2007.

[136] F. Eker, K. Griebenow, X. Cao, L. A. Nafie, in R. Schweitzer-Stenner, "Preferred Peptide Backbone Conformations in the Unfolded State Revealed by the Structure Analysis of Alanine-based (AXA) Tripeptides in Aqueous Solution," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 101, str. 10054-10059, 2004.

[137] F. Avbelj in R. L. Baldwin, "Origin of the Neighboring Residue Effect on Peptide Backbone Conformation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 101, str. 10967-10972, 2004.

[138] G. Ravishanker, M. Mezei, in D. L. Beveridge, "Conformational Stability and Flexibility of the Ala Dipeptide in Free Space and Water: Monte Carlo Computer Simulation Studies," *J. Comput. Chem.,* zv. 7, str. 345-348, 1986.

[139] A. M. Rijs, M. Kabeláč, A. Abo-Riziq, P. Hobza, in M. S. de Vries, "Isolated Gramicidin Peptides Probed by IR Spectroscopy," *ChemPhysChem,* zv. 12, str. 1816-1821, 2011.

[140] M. Aznauryan, D. Nettels, A. Holla, H. Hofmann, in B. Schuler, "Single-Molecule Spectroscopy of Cold Denaturation and the Temperature-Induced Collapse of Unfolded Proteins," *JACS,* zv. 135, str. 14040-14043, 2013/09/25 2013.

[141] F. U. Hartl, A. Bracher, in M. Hayer-Hartl, "Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis," *Nature,* zv. 475, str. 324-332, 07/21/print 2011.

[142] G. I. Makhatadze in P. L. Privalov, "Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics," *J. Mol. Biol.,* zv. 232, str. 639-659, 1993/07/20 1993.

[143] P. L. Privalov in G. I. Makhatadze, "Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics. II. The entropy and Gibbs Energy of Hydration," *J. Mol. Biol.,* zv. 232, str. 660-679, 1993/07/20 1993.

[144] K. A. Dill, T. M. Truskett, V. Vlachy, in B. Hribar-Lee, "Modeling Water, the Hydrophobic Effect, and Ion Solvation," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.,* zv. 34, str. 173-199, 2005/06/01 2005.

[145] R. L. Baldwin, "Dynamic Hydration Shell Restores Kauzmann's 1959 Explanation of How the Hydrophobic Factor Drives Protein Folding," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 111, str. 13052-13056, 08/25 2014.

[146] N. D. Socci, J. N. Onuchic, in P. G. Wolynes, "Protein Folding Mechanisms and the Multidimensional Folding Funnel," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 32, str. 136-158, 1998.

[147] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, in P. G. Wolynes, "Theory of protein folding: The Energy Landscape Perspective," *Annu. Rev. Phys. Chem.,* zv. 48, str. 545-600, 1997/10/01 1997.

[148] G. D. Rose in R. Wolfenden, "Hydrogen Bonding, Hydrophobicity, Packing, and Protein Folding," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.,* zv. 22, str. 381-415, 1993/06/01 1993.

[149] Y. Maréchal, "Water and Biomolecules: An Introduction," *J. Mol. Struct.,* zv. 700, str. 207-210, 8/20/ 2004.

[150] J. Maddox, "One-Dimensional Ice Made Clear?," *Nature,* zv. 332, s. 677, 1988.

[151] C. Mattos, "Protein–Water Interactions in a Dynamic World," *Trends Biochem. Sci.,* zv. 27, str. 203-208, 2002.

[152] G. A. Jeffrey in W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, 1 izd.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991.

[153] J. A. Rupley in G. Careri, "Advances in Protein Chemistry." zv. 41, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, in F. M. Richards, Ur.: Academic Press, 1991.

[154] I. J. Goldstein, C. E. Hollerman, in E. E. Smith, "Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides," *Biochemistry,* zv. 4, str. 876-883, May 1965.

[155] K. D. Hardman in C. F. Ainsworth. *Structure of Concanavalin A at 2.4-A Resolution.* Available: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=3CNA

[156] K. D. Hardman in C. F. Ainsworth, "Structure of Concanavalin A at 2.4-A Resolution," *Biochemistry,* zv. 11, str. 4910-9, Dec 19 1972.

[157] M. Levitt in J. Greer, "Automatic Identification of Secondary Structure in Globular Proteins," *J. Mol. Biol.,* zv. 114, str. 181-293, 1977.

[158] D. Wang, W. Bode, in R. Huber, "Bovine Chymotrypsinogen A," *J. Mol. Biol.,* zv. 185, str. 595-624, 1985/10/05 1985.

[159] H. U. Ahmed, M. P. Blakeley, M. Cianci, D. W. J. Cruickshank, J. A. Hubbard, in J. R. Helliwell, "The Determination of Protonation States in Proteins," *Acta Crystallogr. D,* zv. 63, str. 906-922, 08/01 2007.

[160] A. R. Sielecki, A. A. Fedorov, A. Boodhoo, N. S. Andreeva, in M. N. G. James, "Molecular and Crystal Structures of Monoclinic Porcine Pepsin Refined at 1.8 Å Resolution," *J. Mol. Biol.,* zv. 214, str. 143-170, 1990/07/05 1990.

[161] M. Renko, A. Taler-Verčič, M. Mihelič, E. Žerovnik, in D. Turk, "Partial Rotational Lattice Order–Disorder in Stefin B Crystals," *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.,* zv. 70, str. 1015-1025, 2014.

[162] B. S. Hartley, "Amino-Acid Sequence of Bovine Chymotrypsinogen-A," *Nature,* zv. 201, str. 1284-1287, 1964.

[163] A. A. Ismail, H. H. Mantsch, in P. T. T. Wong, "Aggregation of Chymotrypsinogen: Portrait by Infrared Spectroscopy," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzym.,* zv. 1121, str. 183-188, 1992/05/22 1992.

[164] J. M. Andrews in C. J. Roberts, "Non-Native Aggregation of α-Chymotrypsinogen Occurs through Nucleation and Growth with Competing Nucleus Sizes and Negative Activation Energies," *Biochemistry,* zv. 46, str. 7558-7571, 2007/06/01 2007.

[165] K. Márta, L. M. Simon, B. Attila, S. Márton Richárd, S. Kitti, S. Titanilla*, in sod.*, "Amyloid-like Fibril Formation by Trypsin in Aqueous Ethanol. Inhibition of Fibrillation by PEG," *Protein Pept. Lett.,* zv. 22, str. 1104-1110, 2015.

[166] S. Ghosh, S. Dolai, in J. Dey, "Amyloid Fibril Formation by Pepsin in Neutral pH at Room Temperature," *Soft Matter,* zv. 9, str. 11457-11460, 2013.

[167] M. T. Stubbs, B. Laber, W. Bode, R. Huber, R. Jerala, B. Lenarcic*, in sod.*, "The Refined 2.4 Å 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.,* zv. 9, str. 1939-1947, 1990.

[168] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart*, in sod.*, "Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins," *Mol. Immunol.,* zv. 52, str. 174-182, 2012.

[169] P. Taboada, S. Barbosa, E. Castro, in V. Mosquera, "Amyloid Fibril Formation and Other Aggregate Species Formed by Human Serum Albumin Association," *J. Phys. Chem. B,* zv. 110, str. 20733-20736, 2006/10/01 2006.

[170] M. Bhattacharya, N. Jain, in S. Mukhopadhyay, "Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin," *J. Phys. Chem. B,* zv. 115, str. 4195-4205, 2011/04/14 2011.

[171] T. E. Finn, A. C. Nunez, M. Sunde, in S. B. Easterbrook-Smith, "Serum Albumin Prevents Protein Aggregation and Amyloid Formation and Retains Chaperone-like Activity in the Presence of Physiological Ligands," *J. Biol. Chem.,* zv. 287, str. 21530-21540, 2012.

[172] S. Rabzelj, V. Turk, in E. Žerovnik, "*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.,* zv. 14, str. 2713-2722, 2005.

[173] R. Jerala, M. Trstenjak, B. Lenarčič, in V. Turk, "Cloning a Synthetic Gene for Human Stefin B and Its Expression in *E. Coli*," *FEBS Lett.,* zv. 239, str. 41-44, 1988.

[174] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. e. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel*, in sod.*, "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server," v *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, Ur., Totowa, NJ: Humana Press, 2005, str. 571-607.

[175] J. Grdadolnik, "Infrared Difference Spectroscopy: Part I. Interpretation of the Difference Spectrum.," *Vib. Spectrosc.,* zv. 31, str. 279-288, 2003.

[176] D. Aichun, H. Ping, in S. C. Winslow, "Protein Secondary Structure in Water from Second-Derivative Amide I Infrared Spectra," *Biochemistry,* zv. 29, str. 3303-3308, 1990.

[177] A. Mirtič, F. Merzel, in J. Grdadolnik, "The Amide III Vibrational Circular Dichroism Band as a Probe to Detect Conformational Preferences of Alanine Dipeptide in Water," *Biopolymers,* zv. 101, str. 814-818, 2014.

[178] B. Grobelnik in J. Grdadolnik, "Calculation of the Absorption Spectrum from an ATR Infrared Experiment," *Acta Chim. Slov.,* str. 978-984, 2008.

[179] G. N. Reeke, Jr., J. W. Becker, B. A. Cunningham, J. L. Wang, I. Yahara, in G. M. Edelman, "Structure and function of Concanavalin A," *Adv. Exp. Med. Biol.,* zv. 55, str. 13-33, 1975.

[180] G. N. Reeke, Jr., J. W. Becker, in G. M. Edelman, "The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. IV. Atomic Coordinates, Hydrogen bonding, and Quaternary Structure," *J. Biol. Chem.,* zv. 250, str. 1525-47, Feb 25 1975.

[181] J. L. Ortega-Vinuesa, P. Tengvall, in I. Lundström, "Molecular Packing of HSA, IgG, and Fibrinogen Adsorbed on Silicon by AFM Imaging," *Thin Solid Films,* zv. 324, str. 257-273, 7/1/ 1998.

[182] E. Krissinel in K. Henrick, "Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State," *J. Mol. Biol.,* zv. 372, str. 774-797, 9/21/ 2007.

[183] C. A. Ross in M. A. Poirier, "What is the Role of Protein Aggregation in Neurodegeneration?," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,* zv. 6, str. 891-898, 2005.

[184] F. E. Cohen in J. W. Kelly, "Therapeutic Approaches to Protein-Misfolding Diseases," *Nature,* zv. 426, str. 905-909, 2003.

[185] A. L. Goldberg, "Protein Degradation and Protection Against Misfolded or Damaged Proteins," *Nature,* zv. 426, str. 895-899, 2003.

[186] W. Seufert in S. Jentsch, "Ubiquitin-Conjugating Enzymes UBC4 and UBC5 Mediate Selective Degradation of Short-Lived Andabnormal Proteins," *EMBO J.,* zv. 9, str. 543-550, 1990.

[187] T. Sommer in W. Seufert, "Genetic Analysis of Ubiquitin Dependent Protein Degradation Experientia," *Experientia,* zv. 48, str. 172-178, 1992.

[188] R. Watt in P. W. Piper, "UBI4, the Polyubiquitin Gene of Saccharomyces Cerevisiae, is a Heat Shock Gene that is Also Subject to Catabolite Derepression Control," *Mol. Genet. Genomics,* zv. 253, str. 439-447, 1997.

[189] A. Hershko in A. Ciechanover, "The Ubiquitin System," *Annu. Rev. Biochem.,* zv. 67, str. 425-479, 1998.

[190] A. L. Schwartz in A. Ciechanover, "The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Pathogenesis of Human Diseases," *Annu. Rev. Med.,* zv. 50, str. 57–74, 1999.

[191] E. Monsellier in F. Chiti, "Prevention of Amyloid-like Aggregation as a Driving Force of Protein Evolution," *EMBO Rep.,* zv. 8, str. 737-742, 2007.

[192] M. Stefani in C. M. Dobson, "Protein Aggregation and Aggregate Toxicity: New Insights into Protein Folding, Misfolding Diseases and Biological Evolution," *J. Mol. Med.,* zv. 81, str. 678-699, 2003.

[193] V. N. Uversky in A. L. Fink, "Conformational Constraints for Amyloid Fibrillation: The Importance of Being Unfolded.," *Biochim. Biophys. Acta 1698,* str. 131-153, 2004.

[194] A. Vitalis in A. Caflisch, "Micelle-like Architecture of the Monomer Ensemble of Alzheimer's Amyloid-β Peptide in Aqueous Solution and Its Implications for Aβ Aggregation," *J. Mol. Biol.,* zv. 403, str. 148-165, 2010.

[195] A. Vitalis, N. Lyle, in R. V. Pappu, "Thermodynamics of β-sheet Formation in Polyglutamine," *Biophys. J.,* zv. 97, str. 303-311, 2009.

[196] C. C. Lee, R. H. Walters, in R. M. Murphy, "Reconsidering the Mechanism of Polyglutamine Peptide Aggregation," *Biochemistry,* zv. 46, str. 12810-12820, 2007/11/01 2007.

[197] R. Krishnan in S. L. Lindquist, "Structural Insights into a Yeast Prion Illuminate Nucleation and Strain Diversity," *Nature,* zv. 435, str. 765-772, 2005.

[198] S. E. Radford in J. S. Weissman, "Special Issue: The Molecular and Cellular Mechanisms of Amyloidosis," *J. Mol. Biol.,* zv. 421, str. 139-141, 2012.

[199] S. Ghaemmaghami, D. W. Colby, H.-O. B. Nguyen, S. Hayashi, A. Oehler, S. J. DeArmond*, in sod.*, "Convergent Replication of Mouse Synthetic Prion Strains," *Am. J. Pathol.,* zv. 182, str. 866-874, 2013.

[200] C. Weissmann, J. Li, S. P. Mahal, in S. Browning, "Prions on the Move," *EMBO Rep.,* zv. 12, str. 1109-1117, 2011.

[201] N. Makarava, G. G. Kovacs, R. Savtchenko, I. Alexeeva, H. Budka, R. G. Rohwer*, in sod.*, "Genesis of Mammalian Prions: From Non-infectious Amyloid Fibrils to a Transmissible Prion Disease," *PLoS Pathog.,* zv. 7, s. e1002419, 2011.

[202] D. W. Colby, K. Giles, G. Legname, H. Wille, I. V. Baskakov, S. J. DeArmond*, in sod.*, "Design and Construction of Diverse Mammalian Prion Strains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 106, str. 20417-20422, December 1, 2009 2009.

[203] N. Gonzalez-Montalban, N. Makarava, R. Savtchenko, in I. V. Baskakov, "Relationship between Conformational Stability and Amplification Efficiency of Prions," *Biochemistry,* zv. 50, str. 7933-7940, 2011/09/20 2011.

[204] J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber, in P. T. Lansbury, "Observation of Metastable Abeta Amyloid Protofibrils by Atomic Force Microscopy," *Chem. Biol.,* zv. 4, str. 119-125, 1997.

[205] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, in D. B. Teplow, "Amyloid Beta-Protein Fibrillogenesis. Detection of a Protofibrillar Intermediate," *J. Biol. Chem.,* zv. 272, str. 22364-72, Aug 29 1997.

[206] A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. McLeish*, in sod.*, "Hierarchical Self-Assembly of Chiral Rod-like Molecules as a Model for Peptide Beta-sheet Tapes, Tibbons, Fibrils, and Fibers," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 98, str. 11857-11862, Oct 9 2001.

[207] A. Mirtic, "Spectroscopic characterization of conformations of short alanine peptides, poly-L-lysine and insulin during formation of amyloid fibrils," Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana, 2013.

[208] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol*, in sod.*, "Atomic Structures of Amyloid Cross-β Spines Reveal Varied Steric Zippers," *Nature,* zv. 447, str. 453-457, 2007.

[209] R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. O. Madsen, C. Riekel, R. Grothe*, in sod.*, "Structure of the Cross-β Spine of Amyloid-like Fibrils," *Nature,* zv. 435, str. 773-778, 2005.

[210] W. Qiang, W.-M. Yau, Y. Luo, M. P. Mattson, in R. Tycko, "Antiparallel β-sheet Architecture in Iowa-Mutant β-Amyloid Fibrils," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 109, str. 4443-4448, 2012.

[211] K. E. Marshall, K. L. Morris, D. Charlton, N. O'Reilly, L. Lewis, H. Walden*, in sod.*, "Hydrophobic, Aromatic, and Electrostatic Interactions Play a Central Role in Amyloid Fibril Formation and Stability," *Biochemistry,* zv. 50, str. 2061-2071, 2011/03/29 2011.

[212] E. Gazit, "A Possible Role for π-Stacking in the Self-Assembly of Amyloid Fibrils," *FASEB J.,* zv. 16, str. 77-83, 2002.

[213] Y. Miller, B. Ma, in R. Nussinov, "Polymorphism in Alzheimer Aβ Amyloid Organization Reflects Conformational Selection in a Rugged Energy Landscape," *Chem. Rev.,* zv. 110, str. 4820-4838, 2010/08/11 2010.

[214] R. Nelson in D. Eisenberg, "Recent Atomic Models of Amyloid Fibril Structure," *Curr. Opin. Struct. Biol.,* zv. 16, str. 260-265, 2006.

[215] A. A. Serag, C. Altenbach, M. Gingery, W. L. Hubbell, in T. O. Yeates, "Arrangement of Subunits and Ordering of β-strands in an Amyloid Sheet," *Nat. Struct. Mol. Biol.,* zv. 9, str. 734-739, 2002.

[216] J. S. Elam, A. B. Taylor, R. Strange, S. Antonyuk, P. A. Doucette, J. A. Rodriguez*, in sod.*, "Amyloid-like Filaments and Water-Filled Nanotubes Formed by SOD1 Mutant Proteins Linked to Familial ALS," *Nat. Struct. Mol. Biol.,* zv. 10, str. 461-467, 2003.

[217] M. I. Ivanova, M. R. Sawaya, M. Gingery, A. Attinger, in D. Eisenberg, "An Amyloid-Forming Segment of β2-Microglobulin Suggests a Molecular Model for the Fibril," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 101, str. 10584-10589, 2004.

[218] J. A. Huntington, N. S. Pannu, B. Hazes, R. J. Read, D. A. Lomas, in R. W. Carrell, "A 2.6 Å Structure of a Serpin Polymer and Implications for Conformational Disease," *J. Mol. Biol.,* zv. 293, str. 449-455, 1999.

[219] A. R. A. Ladiwala, J. S. Dordick, in P. M. Tessier, "Aromatic Small Molecules Remodel Toxic Soluble Oligomers of Amyloid β through Three Independent Pathways," *J. Biol. Chem.,* zv. 286, str. 3209-3218, 2011.

[220] J. W. Wu, L. Breydo, J. M. Isas, J. Lee, Y. G. Kuznetsov, R. Langen*, in sod.*, "Fibrillar Oligomers Nucleate the Oligomerization of Monomeric Amyloid β but Do Not Seed Fibril Formation," *J. Biol. Chem.,* zv. 285, str. 6071-6079, 2010.

[221] B. Ma in R. Nussinov, "Polymorphic C-terminal β-sheet Interactions Determine the Formation of Fibril or Amyloid β-derived Diffusible Ligand-like Globulomer for the Alzheimer Aβ42 Dodecamer," *J. Biol. Chem.,* zv. 285, str. 37102-37110, 2010.

[222] C. Liu, M. Zhao, L. Jiang, P.-N. Cheng, J. Park, M. R. Sawaya*, in sod.*, "Out-of-Register β-sheets Suggest a Pathway to Toxic Amyloid Aggregates," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 109, str. 20913-20918, 2012.

[223] A. Laganowsky, C. Liu, M. R. Sawaya, J. P. Whitelegge, J. Park, M. Zhao*, in sod.*, "Atomic View of a Toxic Amyloid Small Oligomer," *Science,* zv. 335, str. 1228-1231, 2012.

[224] M. F. Calabrese, C. M. Eakin, J. M. Wang, in A. D. Miranker, "A Regulatable Switch Mediates Self-Association in an Immunoglobulin Fold," *Nat. Struct. Mol. Biol.,* zv. 15, str. 965-971, 2008.

[225] J. M. Lopez del Amo, U. Fink, M. Dasari, G. Grelle, E. E. Wanker, J. Bieschke*, in sod.*, "Structural Properties of EGCG-Induced, Nontoxic Alzheimer's Disease A β Oligomers," *J. Mol. Biol.,* zv. 421, str. 517-524, 2012.

[226] R. Kayed, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman*, in sod.*, "Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis," *Science,* zv. 300, str. 486-489, 2003.

[227] R. Kayed, E. Head, F. Sarsoza, T. Saing, C. Cotman, M. Necula*, in sod.*, "Fibril Specific, Conformation Dependent Antibodies Recognize a Generic Epitope Common to Amyloid Fibrils and Fibrillar Oligomers that is Absent in Prefibrillar Oligomers," *Mol. Neurodegener.,* zv. 2, s. 18, 2007.

[228] C. G. Glabe, "Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers," *J. Biol. Chem.,* zv. 283, str. 29639-29643, 2008.

[229] R. J. W. Truscott, "Age-Related Nuclear Cataract-Oxidation is the Key," *Exp. Eye Res.,* zv. 80, str. 709-725, 2005.

[230] M. Sugiyama, N. Fujii, Y. Morimoto, K. Itoh, K. Mori, T. Fukunaga*, in sod.*, "SAXS and SANS Observations of Abnormal Aggregation of Human α-Crystallin," *Chem. Biodivers.,* zv. 7, str. 1380-1388, 2010.

[231] V. Vetri, C. Canale, A. Relini, F. Librizzi, V. Militello, A. Gliozzi*, in sod.*, "Amyloid Fibrils Formation and Amorphous Aggregation in Concanavalin A," *Biophys. Chem.,* zv. 125, str. 184-190, 2007.

[232] L. Wang, S. K. Maji, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, in R. Riek, "Bacterial Inclusion Bodies Contain Amyloid-like Structure," *PLoS Biol.,* zv. 6, s. e195, 2008.

[233] N. S. de Groot, R. Sabate, in S. Ventura, "Amyloids in Bacterial Inclusion Bodies," *Trends Biochem. Sci.,* zv. 34, str. 408-416, 2009.

[234] S. D. Stranks, H. Ecroyd, S. Van Sluyter, E. J. Waters, J. A. Carver, in L. von Smekal, "Model for Amorphous Aggregation Processes," *Phys. Rev. E,* zv. 80, s. 051907, 2009.

[235] F. Bemporad in F. Chiti, "Protein Misfolded Oligomers: Experimental Approaches, Mechanism of Formation, and Structure-Toxicity Relationships," *Chem. Biol.,* zv. 19, str. 315-327, 2012.

[236] T. Miti, M. Mulaj, J. D. Schmit, in M. Muschol, "Stable, Metastable, and Kinetically Trapped Amyloid Aggregate Phases," *Biomacromolecules,* zv. 16, str. 326-335, 2015/01/12 2015.

[237] P. G. Wolynes, "Energy Landscapes and Solved Protein–Folding Problems," *Phil. Trans. R. Soc. A,* zv. 363, str. 453-467, 2005.

[238] H. Nymeyer, A. E. García, in J. N. Onuchic, "Folding Funnels and Frustration in Off-Lattice Minimalist Protein Landscapes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 95, str. 5921-5928, 1998.

[239] K. D. Hardman, R. C. Agarwal, in M. J. Freiser, "Manganese and Calcium Binding Sites of Concanavalin A," *J. Mol. Biol.,* zv. 157, str. 69-86, May 5 1982.

[240] G. H. McKenzie, W. H. Sawyer, in L. W. Nichol, "The Molecular Weight and Stability of Concanavalin A," *Biochim. Biophys. Acta,* zv. 263, str. 283-93, Apr 15 1972.

[241] R. Carrotta, V. Vetri, F. Librizzi, V. Martorana, V. Militello, in M. Leone, "Amyloid Fibrils Formation of Concanavalin A at Basic pH," *J. Phys. Chem. B,* zv. 115, str. 2691-2698, 2011/03/31 2011.

[242] C. A. Stark in A. D. Sherry, "Metal Ion Induced Conformational Changes in Concanavalin A: Evidence for Saccharide Binding to One Metal Free Structure," *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* zv. 87, str. 598-604, 1979.

[243] J. B. Sumner in S. F. Howell, "The Role of Divalent Metals in the Reversible Inactivation of Jack Bean Hemagglutinin," *J. Biol. Chem.,* zv. 115, s. 583, 1936.

[244] L. L. So in I. J. Goldstein, "Protein-Carbohydrate Interaction. 13. The Interaction of Concanavalin A with Alpha-Mannans from a Variety of Microorganisms," *J. Biol. Chem.,* zv. 243, str. 2003-7, Apr 25 1968.

[245] M. A. Leon in N. M. Young, "Concanavalin A: A Reagent for Sensitization of Erythrocytes with Glycoproteins and Polysaccharides," *J. Immunol.,* zv. 104, str. 1556-7, Jun 1970.

[246] K. O. Lloyd, E. A. Kabat, in S. Beychok, "Immunochemical Studies on Blood Groups. 43. The Interaction of Blood Group Substances from Various Sources with a Plant Lectin, Concanavalin A," *J. Immunol.,* zv. 102, str. 1354-62, Jun 1969.

[247] A. E. Powell in M. A. Leon, "Reversible Interaction of Human Lymphocytes with the Mitogen Concanavalin A," *Exp. Cell. Res.,* zv. 62, str. 315-25, Oct 1970.

[248] A. Novogrodsky in E. Katchalski, "Lymphocyte Transformation Induced by Concanavalin A and Its Reversion by Methyl-Alpha-D-Mannopyranoside," *Biochim. Biophys. Acta,* zv. 228, str. 579-83, Jan 28 1971.

[249] R. D. Berlin, "Effect of Concanavalin A on Phagocytosis," *Nature New Biol.,* zv. 235, str. 44-5, Jan 12 1972.

[250] M. Inbar, H. Ben-Bassat, in L. Sachs, "A Specific Metabolic Activity on the Surface Membrane in Malignant Cell-Transformation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* zv. 68, str. 2748-51, Nov 1971.

[251] D. H. Cribbs, V. M. Kreng, A. J. Anderson, in C. W. Cotman, "Cross-Linking of Concanavalin A Receptors on Cortical Neurons Induces Programmed Cell Death," *Neuroscience,* zv. 75, str. 173-185, 1996.

[252] K. Andersson, A. Olofsson, E. H. Nielsen, S.-E. Svehag, in E. Lundgren, "Only Amyloidogenic Intermediates of Transthyretin Induce Apoptosis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* zv. 294, str. 309-314, 2002.

[253] A. L. Fink, "Protein Aggregation: Folding Aggregates, Inclusion Bodies and Amyloid," *Fold Des.,* zv. 3, str. R9-R23, 1998.

[254] G. J. Morgan, S. Giannini, A. M. Hounslow, C. J. Craven, E. Zerovnik, V. Turk*, in sod.*, "Exclusion of the Native α-helix from the Amyloid Fibrils of a Mixed α / β Protein," *J. Mol. Biol.,* zv. 375, str. 487-498, 1/11/ 2008.

[255] V. Turk in W. Bode, "The Cystatins: Protein Inhibitors of Cysteine Proteinases," *FEBS Lett.,* zv. 285, str. 213-219, 1991.

[256] V. Turk, B. Turk, in D. Turk, "Lysosomal Cysteine Proteinases: Facts and Opportunities," *EMBO J.,* zv. 20, str. 4629-33, 2001.

[257] L. A. Pennacchio, D. M. Bouley, K. M. Higgins, M. P. Scott, J. L. Noebels, in R. M. Myers, "Progressive Ataxia, Myoclonic Epilepsy and Cerebellar Apoptosis in Cystatin B-Deficient Mice," *Nature Genetetics,* zv. 20, str. 251-258, 1998.

[258] M. K. Houseweart, L. A. Pennacchio, A. Vilaythong, C. Peters, J. L. Noebels, in R. M. Myers, "Cathepsin B but not Cathepsins L or S Contributes to the Pathogenesis of Unverricht-Lundborg Progressive Myoclonus Epilepsy (EPM1)," *J. Neurophysiol.,* zv. 56, str. 315-327, 2003.

[259] J. Kos, M. Krašovec, N. Cimerman, H. J. Nielsen, I. J. Christensen, in N. Brünner, "Cysteine Proteinase Inhibitors Stefin A, Stefin B, and Cystatin C in Sera from Patients with Colorectal Cancer: Relation to Prognosis," *Clin. Cancer Res.,* zv. 6, str. 505-511, 2000.

[260] R. Di Giaimo, M. Riccio, S. Santi, C. Galeotti, D. C. Ambrosetti, in M. Melli, "New Insights into the Molecular Basis of Progressive Myoclonus Epilepsy: A Multiprotein Complex with Cystatin B," *Hum. Mol. Genet.,* zv. 11, str. 2941-2950, 2002.

[261] A. Malaspina, N. Kaushik, in J. De Belleroche, "Differential Expression of 14 Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Detected Using Gridded cDNA Arrays," *J. Neurochem.,* zv. 77, str. 132-145, 2001.

[262] C. Lefebvre, C. Cocquerelle, F. Vandenbulcke, D. Hot, L. Huot, Y. Lemoine*, in sod.*, "Transcriptomic Analysis in the Leech *Theromyzon Tessulatum*: Involvement of Cystatin B in Innate Immunity," *Biochem. J.,* zv. 380, str. 617-625, 2004.

[263] L. A. Pennacchio, A.-E. Lehesjoki, N. E. Stone, V. L. Willour, K. Virtaneva, J. Miao*, in sod.*, "Mutations in the Gene Encoding Cystatin B in Progressive Myoclonus Epilepsy (EPM1)," *Science,* zv. 271, str. 1731-1734, 1996.

[264] M. D. Lalioti, H. S. Scott, C. Buresi, C. Rossier, A. Bottani, M. A. Morris*, in sod.*, "Dodecamer Repeat Expansion in Cystatin B Gene in Progressive Myoclonus Epilepsy," *Nature,* zv. 386, str. 847-851, 1997.

[265] E. Žerovnik, R. Jerala, R. Virden, L. K. Žitko, V. Turk, in J. P. Waltho, "On the Mechanism of Human Stefin B Folding: II. Folding from GuHCl Unfolded, TFE Denatured, Acid Denatured, and Acid Intermediate States," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 32, str. 304-313, 1998.

[266] E. Žerovnik, R. Virden, R. Jerala, V. Turk, in J. P. Waltho, "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: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 32, str. 296-303, 1998.

[267] E. Žerovnik, M. Škarabot, K. Škerget, S. Giannini, V. Stoka, S. Jenko-Kokalj*, in sod.*, "Amyloid Fibril Formation by Human Stefin B: Influence of pH and TFE on Fibril Growth and Morphology," *Amyloid,* zv. 14, str. 237-247, 2007/01/01 2007.

[268] E. Žerovnik, R. A. Staniforth, in D. Turk, "Amyloid Fibril Formation by Human Stefins: Structure, Mechanism & Putative Functions," *Biochimie,* zv. 92, str. 1597-1607, 2010.

[269] K. Škerget, A. Vilfan, M. Pompe-Novak, V. Turk, J. P. Waltho, D. Turk*, in sod.*, "The Mechanism of Amyloid-Fibril Formation by Stefin B: Temperature and Protein Concentration Dependence of the Rates," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 74, str. 425-436, 2009.

[270] E. Žerovnik, M. Pompe-Novak, M. Škarabot, M. Ravnikar, I. Muševič, in V. Turk, "Human Stefin B Readily Forms Amyloid Fibrils *In Vitro*," *Biochim. Biophys. Acta,* zv. 1594, str. 1-5, 2002.

[271] J. Jenko Kokalj, G. Guncar, I. Stern, G. Morgan, S. Rabzelj, M. Kenig*, in sod.*, "Essential Role of Proline Isomerization in Stefin B Tetramer Formation," *J. Mol. Biol.,* zv. 366, str. 1569-1579, 2007.

[272] S. Ceru, J. Kokalj, S. Rabzelj, M. Skarabot, I. Gutierrez-Aguirre, N. Kopitar-Jerala*, in sod.*, "Size Limits for Toxic Oligomers of Amyloidogenic Proteins: A Case Study of Human Stefin B (Cystatin B)," *Amyloid,* zv. 15, str. 147-159, 2008.

[273] S. Jenko, M. Skarabot, M. Kenig, G. Guncar, I. Musevic, D. Turk*, in sod.*, "Different Propensity to Form Amyloid Fibrils by Two Homologous Proteins-Human Stefin A and B: Searching for an Explanation," *Proteins,* zv. 55, str. 417-425, 2004.

[274] M. Kenig, S. Jenko-Kokalj, M. Tušek-Žnidarič, M. Pompe-Novak, G. Gunčar, D. Turk*, in sod.*, "Folding and Amyloid-Fibril Formation for a Series of Human Stefins' Chimeras: Any Correlation?," *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.,* zv. 62, str. 918-927, 2006.

[275] A. Taler-Verčič, T. Kirsipuu, M. Friedemann, A. Noormägi, M. Polajnar, J. Smirnova*, in sod.*, "The Role of Initial Oligomers in Amyloid Fibril Formation by Human Stefin B," *Int. J. Mol. Sci.,* zv. 14, str. 18362-18384, 2013.

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

Članki v revijah

U. Novak in J. Grdadolnik, "The hydration of Concanavalin A studied by infrared spectroscopy," *Journal of Molecular Structure,* zv. 1135, str. 138-143, 5/5/ 2017.

U. Novak, M. Tušek-Žnidarič, in J. Grdadolnik, "Aggregation of Concanavalin A studied by infrared spectroscopy," (v pošiljanju)

U. Novak, J. Grdadolnik, E. Žerovnik, M. Tušek-Žnidarič in A. Taler-Verčič, "Aggregation of Stefin B," (članek v pripravi)

M. Wierzejewska, U. Novak, F. Avbelj, in J. Grdadolnik, "Distribution of conformations of small blocked alanine peptides in inert matrices," (članek v pripravi)

Prispevek na konferenci

U. Novak in J. Grdadolnik, "An Infrared Study of Concanavaline A Aggregation at pH 5 and 9," in *8. študentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana = 8th Jožef Stefan International Postgraduate School Students*, Ljubljana, Slovenija, 2016.

Druge objave

M. Vittori, A. Rozman, J. Grdadolnik, U. Novak, in J. Štrus, "Mineral Deposition in Bacteria-Filled and Bacteria-Free Calcium Bodies in the Crustacean *Hyloniscus riparius* (Isopoda: Oniscidea)," *PLoS ONE,* zv. 8, s. e58968, 2013.

P. Pori, A. Vilčnik, M. Petrič, A. Sever Škapin, M. Mihelčič, A. Šurca Vuk*, in sod.*, "Structural Studies of TiO_2/wood Coatings Prepared by Hydrothermal Deposition of Rutile Particles from $TiCl_4$ Aqueous Solutions on Spruce (*Picea Abies*) Wood," *Appl. Surf. Sci.,* zv. 372, str. 125-138, 5/30/ 2016.

O. Panák, M. Držková, M. Kaplanová, U. Novak, in M. K. Gunde, "The Relation Between Colour and Structural Changes in Thermochromic Systems Comprising Crystal Violet Lactone, Bisphenol A, and Tetradecanol," v *Dyes Pigm.*, iz, 2016.

Biografija

Urban Novak, univ. dipl. biokemik, se je rodil leta 1986 v Ljubljani, kjer je leta 2010 tudi diplomiral na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Živi v vasi Prikrnica, občina Moravče.

Leta 2011 se je vpisal na podiplomski študij na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana, smer Nanoznanosti in nanotehnologija. Istega leta se je kot mladi raziskovalec zaposlil na Kemijskem inštitutu, v Laboratoriju za strukturo biomolekul. Pod mentorstvom izr. prof. Jožeta Grdadolnika se je glavnina raziskav nanašala na področje proteinskega zvitja, natančneje konformacijskih lastnosti kratkih peptidov in strukturnih sprememb v proteinskem zvitju, ki nastopijo med procesom hidratacije proteinskih filmov in agregacije nativno zvitih polipeptidnih verig. Glavno orodje pri preučevanju opisanih procesov so predstavljale različne metode vibracijske spektroskopije.

Poleg raziskav na opisanem področju Urban v okviru Laboratorija za strukturo biomolekul sodeluje tudi s predstavniki slovenske industrije in ostalih raziskovalnih ustanov.

Stvarno kazalo

3D(tridimenzionalno), xxvi, xxvii, 1, 4, 7, 9, 15, 16, 17, 37, 61, 62, 75

Ac-Ala-Ala-Ala-NHMe, xxvii, 16
Ac-Ala-Ala-NHMe, xxvii, 16
Ac-Ala-NHMe, xxvii, 16
AFM
mikroskopija na atomsko silo, xxvii, xxxii, 109, 138
Agar Scientific, 81
agregacija, ix, xiv, xv, 1, 2, 13, 69, 70, 71, 82, 89, 94, 103, 107, 121, 125
AK
aminokislinski (ostanek), ix, xxvii, 1, 39, 40, 62, 67, 77, 112, 113, 115, 116, 124
Ala
alanin, xiii, xiv, xviii, xxv, xxvii, 16, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 32, 33, 34, 124, 135
Ala_2, xiii, xiv, xviii, xxv, xxvii, 16, 22, 24, 28, 29, 32, 33, 34
Ala_3, xiii, xiv, xviii, xxv, xxvii, 16, 22, 24, 28, 30, 31, 33, 34
alfa vijačnica, xxvii, xxxi, 2, 17
alfa zavoj, xxvii, xxxi
ALS
amiotrofična lateralna skleroza, xxxi, 78, 140
amid A, 44, 80
amid I, 16, 44, 80
amid II, 16, 44, 80
amid III, 16, 44, 80
amiloidne fibrile, ix, 2, 5, 39, 69, 71, 74, 75, 78, 93, 103
amorfni agregati, ix, 69, 76
Anfinsen
Christian Anfinsen, ix, xi, 4, 127, 131, 136
apoptoza, 78
Ar
argon, xviii, xxv, 24, 26, 29, 31
Asp
asparaginska kislina, xxvii, 9, 64, 65, 124
ataksija, 78
atmosfera, 38
ATR
metoda oslabljenega popolnega odboja, xiii, xxvii, 10, 11, 47, 79, 134, 138

Beer-Lambertov zakon, 32, 88
beta izboklina, xxxi
beta ravnina, xxvii, xxxi
beta sodček, xxxi
beta trak, xxvii, xxxi
beta zavoj, xxvii, xxxi
BSA
goveji serumski albumin, ix, xi, xix, xxvii, xxxi, 3, 40, 42, 61, 62, 66, 67, 124

C_7 konformacija, ix, 32, 115
Canavalia ensiformis, 38, 41, 77, 79
CCl_4
kloroform, xxvii, 15
CD
cirkularni dikroizem, xxvii, xxxi, 109
CH vezi, 57, 58, 59, 63, 66, 67, 124
cistatin B, 40, 78
CsI
cezijev jodid, xxvii, 22
Cys
cistein, xxvii, 16, 124

deformacijsko nihanje, xxxi
dekonvolucija, 45
delilnik žarka, xxxi
diferenčni spektri, xix, 51, 52, 53, 65, 66, 82, 84, 85, 89, 103, 104, 107, 110
DLS
metoda dinamičnega sipanja svetlobe, xxvii, xxxii, 78
DNK
deoksiribonukleinska kislina, xxvii, 17
donor, 6, 32

DP
diseminirani plazmocitom, xxvii, xxxi, 69
drugi odvod, 45, 85
DTGS, xxvii, xxxi, 22, 41

elektrostatske
elektrostatske interakcije, 1, 2, 5, 16
ELT
teorija energijskih pokrajin, xxvii, xxxiii, 5
entalpija, 7
EPM1
progresivna mioklonska epilepsija tipa 1, xxvii, 78, 138, 143

faza rasti, 73
Formvar
Formval folija, 81
frekvenca, 10, 32, 42, 46
FTIR, xiii, xiv, xx, xxi, xxii, xxvi, xxvii, 1, 11, 22, 41, 42, 58, 59, 60, 79, 81, 83, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 101, 103, 130, 133, 134

Ge
germanij, xxvii, 11
genomika, 1
globularni proteini, 35
Glu
glutaminska kislina, xxvii, 9, 64, 65, 124
Golden gate, 79
Grams, 23, 80
gravimetrija, 66
Grdadolnik
izr. prof. Jože Grdadolnik, viii, ix, 11, 22, 32, 128, 129, 130, 134, 135, 138, 145

HCl
vodikov klorid, xxvii, 79
hidratacija, ix, xiv, 13, 37, 51, 65
hidrofobne interakcije, 2
Hot dog zvitje, xxxi
HSE
cloveski serumski albumin, xxvii, xxxi, 40
Hsps
proteini toplotnega šoka, xxvii, 71

H-vezi, xviii, xxii, xxix, 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 26, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 47, 50, 51, 52, 54, 64, 65, 66, 67, 74, 83, 84, 87, 101, 103, 104, 105, 109, 111, 112, 113

in vitro, 2
in vivo, 5
INP proteini
intrinzični (proteini), xxvii, 71, 74, 75
intermediati, xvii, xxii, 6, 101
intermolekularna
intermolekularna (vez), 6
intramolekularna
intramolekularna (vez), xiii, 6, 7, 13, 34
IR
infrardeče, vii, ix, xiii, xvii, xviii, xix, xxvii, xxxi, 3, 8, 9, 10, 15, 22, 23, 34, 38, 41, 43, 48, 50, 56, 57, 63, 64, 65, 66, 79, 106, 108, 130, 133, 135
Iso-Disc™, 79, 81

KBr
kalijev bromid, xviii, xix, xxvii, 22, 23, 43
KH_2PO_4
kalijev dihidrogen fosfat, xxvii, 79
kimotripsinogen, xx, xxxii, 39, 40, 59, 60, 61, 62, 119, 123
kongo rdeče, 2, 5, 70, 78
konkanavalin A, ix, xiv, xv, xx, xxvii, xxxii, 38, 40, 57, 61, 62, 66, 77, 79, 81, 82, 103
ksenon
Xn, xviii, 22, 23

lag
lag faza, xxi, 3, 72, 73, 78, 91, 94, 95, 97, 103, 107, 109
Levinthal
Cyrus Levinthal, 4, 131

makromolekule, 1, 7, 37
mioklonus, 78
modelni trakovi, 27, 28, 34, 63, 91, 108, 115
molekule vode, xviii, 16, 17, 32, 35, 36, 37, 38, 50, 51, 52, 53, 54, 60, 64, 65, 67

morfologija, 2, 70, 78

NaCl
natrijev klorid, xxvii, 41, 79
nativna struktura, 35
nativno, xx, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 35, 62, 70, 71, 74, 75, 76, 78, 91, 108, 147
nihanje, xxxii, xxxiii, 11, 12, 16, 46, 64, 109
NMR
Jedrska magnetna resonanca, 1

oligomeri, xvii, 6, 69, 70, 75, 76, 78
os, 2, 18, 74, 113

PDBePISA, 60, 66
pepsin, xi, xxxii, 39, 40, 57, 60, 61, 62, 137
peptid, ix, xiii, xiv, xviii, xxv, xxvii, 13, 16, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33
Perkin Elmer System 2000, 41
PP_{II}, ix, xi, xvii, xx, xxi, xxii, xxiii, xxvi, 2, 12, 39, 71, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 125, 137, 142, 144, 145
Philips CM 100, 81
polipeptidna veriga, 2, 35
prečna β-struktura, 2, 5, 13
proteinski filmi, ix, 63
protofibrile, xvii, 2, 6
ProtParam, 42
PTFE
PTFE membrana, 79, 81

rentgenska kristalografija, 1

SEC
kromatografija z ločevanjem po velikosti, xxvii, xxxii, 78
Sigma-Aldrich, 41, 79
siva mrena, 76
solvatacija, 1, 5
Specac, 79
spekter, xviii, xix, xxi, 8, 12, 23, 24, 25, 28, 33, 34, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 57, 63, 65, 66, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 91, 94, 95, 96, 97, 103, 104, 107, 112
stabilna faza, 73, 92, 104
stefin B, ix, xiv, xviii, xix, xx, xxii, 39, 53, 54, 55, 59, 60, 61, 65, 66, 67, 78, 79, 80, 81, 99, 100, 102, 103, 115, 119, 123, 125
steklasti prehod, xxxii, 76
sterične zadrge, xxxii

šaperoni, 35, 71

TEM
transmisijski elektronski mikroskop, transmisijska elektronska mikroskopija, xiv, xxvii, xxxiii, 78, 81, 105
temperatura, 2, 35, 70, 71, 76, 80, 94, 108, 109, 115
temperatura prehoda, ix, xxix, xxxii, 94, 103, 104, 112, 113, 115, 116
TFE
2,2,2-trifluoroetanol, xxvii, xxxi, 78, 144
tioflavin T, 2, 5
tlak, 15, 35
TTR
prenešalni protein v cerebrospinalni tekočini, xxvii, 75

uranilacetat, 81

Van der Waalsove interakcije, 1, 5, 7, 17, 74
Vertex 80, 41, 79
vibracijska spektroskopija, ix, 9, 69, 116
voda, 37
vodikova vez
H-vez, xiii, xxvii, 6
vse beta protein, xxxiii
Wierzejewska
prof. Marija Wierzejewska, vii, 22, 145

Xe
ksenon, xviii, xxv, 24, 26

ZnSe
cink-selen, xix, xxvii, 10, 11, 41, 42, 43, 120

α-kristalin, xxxiii
α-vijačnica, xxvii, 2, 16, 17, 18, 19, 99, 100, 111
α-zavoj, xxvii

β-ravnina, xxvii, 2, 11, 16, 17, 89, 92, 99, 100
β-trak, xxvii, 11, 19, 89, 92, 99, 100, 111
β-zavoj, xxvii, 33, 34

γ-zavoj, xxvii, xxix, 18

$_{\Delta}G$
prosta Gibbsova energija, xxix, 5, 6, 61

π-vezan, xxxiii

Φ, xvii, xxv, xxix, 1, 18, 19, 20, 46, 47

Ψ, xvii, xxv, xxix, 1, 18, 19, 20, 46, 47