

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Fizyki

Praca doktorska

*Analiza strukturalna wodnych roztworów lizozymu*

Agnieszka Szymańska

Praca wykonana pod kierunkiem  
dr hab. Genowefy Ślósarek  
w Zakładzie Biofizyki Molekularnej Wydziału Fizyki UAM



Poznań 2010

*Pracę tę dedykuję mojemu mężowi i synkowi Michałkowi*

*Pragnę gorąco podziękować wszystkim pracownikom  
Zakładu Biofizyki Molekularnej za pomoc,  
cenne uwagi przy realizacji badań.*

*Szczególne podziękowania dla wszystkich doktorantów  
Zakładu Biofizyki Molekularnej za wsparcie.*

*Promotorowi,  
Dr hab. Genowefie Ślósarek dziękuję  
za pomoc i cenne uwagi*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	5
STRESZCZENIE .....	7
SUMMARY .....	9
1. WPROWADZENIE .....	11
1.1. Mechanizmy tworzenia amyloidów.....	14
1.2. Modele strukturalne amyloidów.....	17
1.3. Charakterystyka fizyczno – chemiczna amyloidów .....	22
1.4 Proces tworzenia amyloidów na przykładzie lizozymu.....	30
1.5. Struktura i funkcja lizozymu .....	32
2. CEL PRACY.....	35
3.MATERIAŁ I METODY .....	36
3.1. Podstawowe odczynniki chemiczne .....	36
3.2. Pomiary współczynnika załamania światła w wodnych roztworach etanolu .....	36
3.3. Pomiary współczynnika ekstynkcji w układach woda-etanol-lizozym .....	38
3.4. Przygotowanie próbek .....	39
3.5. Dynamiczne rozpraszanie światła .....	40
3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego .....	44
3.4. Reologia.....	47
3.5. Pomiary gęstości właściwej .....	48
3.6. Próba spektrofotometryczna z wykorzystaniem barwnika – czerwień Kongo .....	49
3.7. Pomiary natężenia fluorescencji z wykorzystaniem tioflawiny T <sub>1</sub> . .....	50

4. WYNIKI I DYSKUSJA .....	52
4.1. Proces denaturacji białka w roztworach (zmiany konformacyjne cząsteczek lizozymu) .....	52
4.2. Diagram zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu w roztworze ..	56
4.2.1. Zmiany współczynnika dyfuzji translacyjnej. Analiza procesu agregacji białka ..	56
4.2.2. Identyfikacja agregatów włóknistych z wykorzystaniem barwnika czerwieni Kongo. ....	67
4.3. Zmiany struktury drugorzędowej cząsteczki białka pod wpływem etanolu .....	72
4.4. Właściwości reologiczne roztworów lizozymu.....	82
4.5. Odwracalność procesu agregacji .....	94
4.5.1. Kinetyka procesu agregacji cząsteczek lizozymu w roztworze .....	94
4.5.2. Odwracalność procesu agregacji .....	98
5. WNIOSKI .....	104
LITERATURA.....	109

## Streszczenie

Rozmaitość form strukturalnych białka w roztworze zależy od wielu czynników decydujących o stabilności jego struktury natywnej. Do grupy najważniejszych czynników zalicza się temperaturę, niektóre substancje organiczne i sole nieorganiczne, pH roztworu oraz stężenia białka. Na podstawie wielu wyników badań pokazano, że określone formy strukturalne białka obserwuje się w dość specyficznych warunkach. Odnosi się to między innymi do agregatów uporządkowanych, jak włókna amyloidowe lub filamenty pozostające w stanie równowagi z monomerami białka. Zakłada się zazwyczaj, że forma białka, pośrednia pomiędzy stanem natywnym i nowym stanem konformacyjnym, jaki osiąga białko wbudowane w agregat, poddana jest specyficznym intermolekularnym oddziaływaniom, które prowadzą do powiększenia łańcucha struktury włóknistej.

Niniejsza praca wyjaśnia na poziomie molekularnym mechanizmy tworzenia różnych form strukturalnych stanów pośrednich białka, które prowadzą do powstania struktury włóknistej. Prezentuje nowe koncepcje oraz nowe wyniki badań *in vitro* dotyczące form strukturalnych lizozymu. W pracy opisano wyniki uzyskane metodą rozpraszania światła, metodami reologicznymi, metodą spektrofotometryczną z użyciem barwnika czerwien Kongo, oraz za pomocą spektroskopii CD i badania z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego.

Badania metodą rozpraszania światła pozwoliły na określenie różnorodności form strukturalnych lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych roztworach etanolu jako czynnika denaturującego. Wyniki te ujęto w postaci diagramu fazowego.

Analiza zmian reologicznych roztworów lizozymu pozwoliła sformułować hipotezy, dotyczące przemian konformacyjnych białka, w którym wyszczególniono dwa etapy. Pierwszy dotyczy zmian otoczki hydratacyjnej monomerów lizozymu. Drugi etap zmian strukturalnych dotyczy tworzenia agregatów w postaci struktur włóknistych – protofilamentów. Nie obserwowano całkowitej denaturacji lizozymu.

Szczegółowa analiza ilościowa i jakościowa widm CD pozwoliła na strukturalną charakterystykę form pośrednich białka w procesie tworzenia uporządkowanych agregatów. Zaobserwowano, że domena  $\beta$  jest mniej stabilna w stosunku do domeny  $\alpha$ .

---

Stwierdzono również, że kolejne zmiany konformacyjne wiążą się z tworzeniem nowych nie natywnych form heliakalnych.

Analiza kinetyki tworzenia uporządkowanych agregatów potwierdziła istnienie etapu nukleacji i elongacji w tym procesie. Ponadto zaproponowano model wyjaśniający konsekwencje tego molekularnego mechanizmu. Istnienie etapu nukleacji, podczas którego obecne są agregaty o różnej konformacji może być bowiem przyczyną pewnej niejednorodności przestrzennej w procesie tworzenia amyloidów. Obecność w wybranej objętości roztworu białka pierwszych agregatów uporządkowanych promuje powstanie innych włókien. W rezultacie, w rozpatrywanej objętości stężenie agregatów włóknistych jest większe od średniego stężenia włókien w całym roztworze. Agregaty te mogą dyfundować w całej objętości. Powoduje to powstanie włókien w innych regionach, a co za tym idzie wzrasta szybkość powstawania amyloidów w całym roztworze. Oszacowano również stałą szybkości etapu elongacji  $k=0.8 \text{ dni}^{-1}$  oraz czas po którym obserwujemy zakończenie etapu nukleacji  $t_{\text{lag}}=3.9$  dnia.

Analizy stabilności włóknistych form strukturalnych pozwoliły wysunąć interesującą hipotezę. Obecność kwasu acetylosalicylowego o stężeniu  $6 \text{ mg/ml}$  powoduje zniszczenie włóknistej struktury białka. Z uporządkowanej konformacji tworzą się bezpostaciowe, amorficzne struktury. Oddziaływania pomiędzy włóknami i cząsteczkami kwasu acetylosalicylowego prowadzą do osłabienia wiązań stabilizujących strukturę amyloidów. Dane literaturowe oraz przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza odwracalności procesu agregacji uporządkowanej pozwoliła na wniosek, że właściwości antyutleniające cząsteczki są warunkiem zasadniczym, ale nie wystarczającym, w procesie destabilizacji włóknistej struktury amyloidów.

## Summary

Diversity of structural forms of proteins in solution depends on many factors influencing the stability of its native structure. The most important of such factors are temperature, some organic substances and inorganic salts, pH of the solution and concentration of the protein. It has been established that certain structural forms of proteins occur in rather specific conditions, for instance ordered aggregates such as amyloid fibres or filaments in equilibrium with protein monomers. It is usually assumed that the protein form intermediate between the native state and a new conformational state of the protein built into aggregation is subjected to specific intermolecular interactions leading to enlargement of the chain of fibrous structure.

The study was undertaken to explain on the molecular level the mechanisms of formation of different structures of intermediate states of protein leading to the appearance of fibrous structure. The paper presents new concepts and new results of *in vitro* studies of structural forms of lysozyme. The results were obtained by dynamic light scattering, rheological methods, spectrophotometric method with the use of Kongo red dye, CD spectroscopy and fluorescent dye. The method of dynamic light scattering provided information on the diversity of structural forms of lysozyme from hen's egg in water solutions of ethanol used as a denaturing agent. The results are presented in the form of a phase diagram.

Analysis of rheological changes in lysozyme solutions permitted formulating hypotheses on the model of conformational changes of protein. Two stages were proposed to be distinguished in this process. The first concerned changes in the hydration shell of lysozyme monomers, while the second was related to structural changes, i.e. formation of aggregations arranged in elongated forms known as filaments. No total denaturation of lysozyme was noted.

Detail quantitative (CONTIN algorithm) and qualitative analysis of CD spectra permitted structural characterisation of the intermediate forms of protein in the process of formation of ordered aggregates. Domain  $\beta$  was found less stable than domain  $\alpha$ . Subsequent conformational changes were related to formation of new non-native helical forms.

---

Analysis of the kinetics of formation of the ordered aggregates confirmed the participation of nucleation and elongation stages in this process. A model was proposed to explain the consequences of this molecular mechanism. The occurrence of nucleation at which aggregates of different conformation are present can lead to a certain spatial inhomogeneity in the process of amyloid formation. The presence of the first ordered aggregates in a certain volume of the protein solution promotes the formation of other filaments. Consequently, in this volume the concentration of filament aggregates is greater than its mean concentration in the whole solution. The aggregates can diffuse in the whole volume of the solution, which leads to formation of such filaments in other regions and thus the rate of formation of amyloids in the bulk of the solution increases. The rate constant of the stage of elongation was estimated as  $k=0.8 \text{ dni}^{-1}$ , whereas the time of conclusion of the stage of nucleation as  $t_{lag}=3.9 \text{ dnia}$ .

Analysis of stability of the filaments permitted putting forward an interesting hypothesis. The presence of acetylsalicylic acid in concentration of  $6 \text{ mg/ml}$  leads to destruction of the filament structure of the protein. The ordered conformation deteriorates into amorphous structures. The interactions between the filaments and the molecules of acetylsalicylic acid leading to weakening of the bond stabilising the amyloid structure. The literature data and analysis of reversibility of the process of ordering aggregation permitted concluding that the antioxidant properties of the molecule are necessary but not sufficient to destabilise the filament structure of amyloids.

## 1. Wprowadzenie

Termin „amyloidy” został wprowadzony przez niemieckiego naukowca Rudolpha Virchowa w 1854 roku, w celu zdefiniowania patologicznej tkanki [1]. Badania z wykorzystaniem mikroskopu wykazały, że ta nieprawidłowa struktura pozakomórkowa barwi się na kolor bładoniebieski, po dodaniu jodiny oraz na kolor fioletowy, pod wpływem kwasu siarkowego. Na podstawie znanych już wcześniej właściwości skrobi i celulozy niemiecki badacz wywnioskował, że nieprawidłowa tkanka posiada analogiczną strukturę chemiczną i nazwał ją amyloidem. Późniejsze badania prowadzone przez Fredricha A. Kekule w 1859 wykazały, że w skład amyloidów wchodzi białka, gdyż badane struktury zawierają zwiększoną ilość azotu. Odkrycie to przyczyniło się do rozszerzenia pojęcia amyloid na białka lub klasy białek i peptydów, które mają zdolność do zmian konformacyjnych prowadzących do utworzenia form włóknistych. Na podstawie badań prowadzonych przy użyciu mikroskopu wykazano, że te szczególne formy strukturalne nie są amorficzne. Cechują się powinowactwem do barwnika - czerwieni Kongo i mają zdolność do podwójnego załamania światła spolaryzowanego [2]. W latach 1960 badania mikroskopowe podjęte przez Cohena i Calkinsa [3] potwierdziły fibrylarną strukturę amyloidu. Pozwoliły też na wyciągnięcie wniosku, że amyloidy izolowane z różnych tkanek ludzkich i zwierzęcych wykazują podobną morfologię.

Amyloidy to proste, sztywne włókna o średnicy od 7 do 10 nm i długości od 100 do 1600 nm. Dalsze badania strukturalne wykazały, że włókna amyloidowe zbudowane są z monomerów białkowych, w których dominującymi elementami struktury drugorzędowej są struktury  $\beta$ , których powierzchnie ułożone są prostopadle do osi włókna [4].

Obecnie wiadomo, że włókna amyloidowe są ściśle związane z patologicznymi zmianami w funkcjonowaniu organizmu. Na przykład, u człowieka są to zmiany w mózgu, śledzionie lub wątrobie. Grupę schorzeń wywołaną obecnością złogów amyloidowych w różnych tkankach u człowieka nazywa się „amyloidozą” lub skrobiawicą. Do grupy tej zalicza się między innymi choroby centralnego układu nerwowego takie, jak choroba Alzheimera, Parkinsona lub Creutzfelda-Jakoba.

Intensywne badania wykazały, że stany chorobowe z grupy amyloidoz związane są z transformacją strukturalną ponad 20 białek [1]. Liczne badania [5-9] dotyczące włóknistych form strukturalnych w warunkach *in vitro* pozwoliły na wniosek, iż zdolność tworzenia włókien amyloidowych nie jest ograniczona do małej liczby białek związanych z różnymi stanami chorobowymi, lecz jest genetyczną właściwością wszystkich łańcuchów peptydowych. Otwartym pozostaje jednak pytanie, jakie mechanizmy są odpowiedzialne za transformację strukturalną białka natywnego do formy włóknistej. Odpowiedzi poszukuje się obecnie między innymi przez analizę procesów agregacji i fałdowania białek.

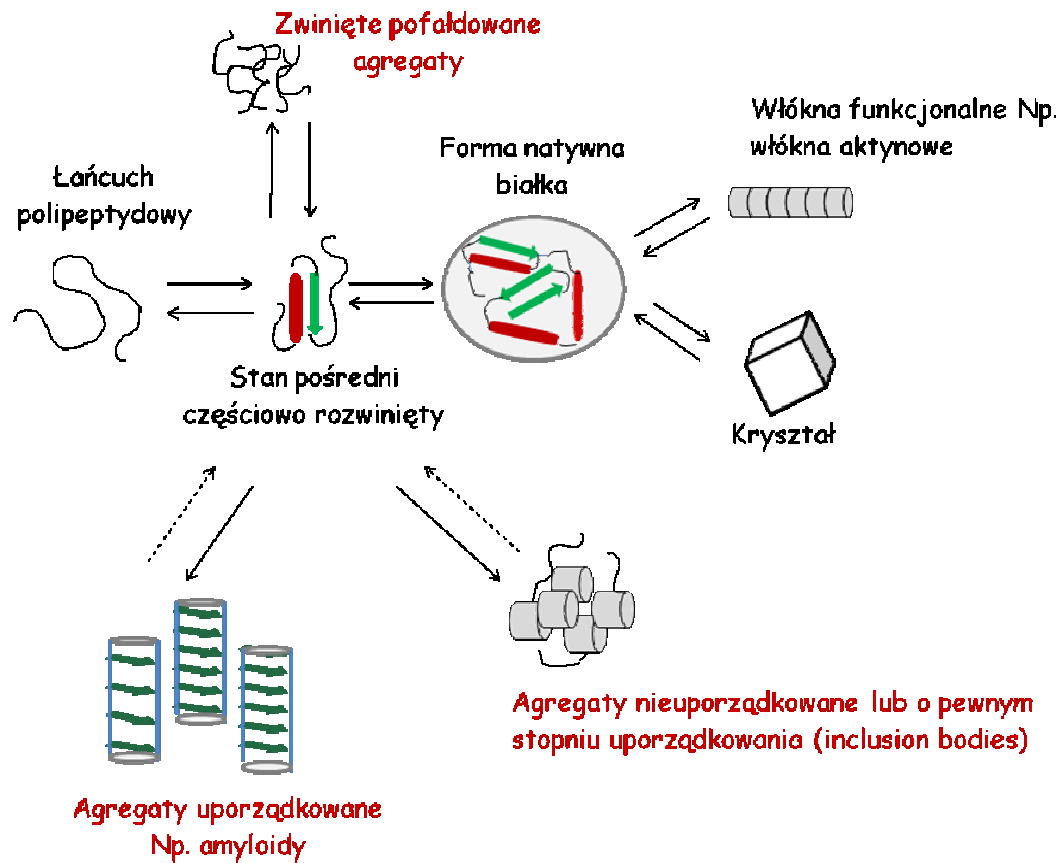
Agregaty białkowe można podzielić na dwie kategorie:

- a) agregaty tworzone *in vitro* lub *in vivo* oraz
- b) agregaty o strukturze uporządkowanej i nieuporządkowanej (bezpostaciowej).

Ostatecznie proces agregacji białek prowadzi do utworzenia trzech form agregatów:

- a) agregatów zlokalizowanych w komórce (ang. *inclusion bodies*). Powstają one w warunkach *in vivo* podczas nadekspresji określonego białka w komórce. Mają one strukturę nieuporządkowaną.
- b) włókien amyloidowych (mogą powstawać *in vivo* lub *in vitro*) o uporządkowanej strukturze.
- c) zwiniętych, pofałdowanych agregatów (ang. *folded aggregates*) - to bezpostaciowe, nieuporządkowane agregaty, które powstają *in vitro* podczas ponownego zwijania białka zdenaturowanego.

W zakresie biofizyki proces fałdowania białek, prowadzący do stabilnej, funkcjonalnej struktury, rozpatrywany jest z uwzględnieniem termodynamicznych i kinetycznych właściwości białka. Zakłada się, że natywna forma zlokalizowana jest w globalnym minimum energetycznym układu atomów. Taki stan konformacyjny jest najbardziej stabilnym stanem dla łańcucha peptydowego. Niestety, pod wpływem różnych czynników, jeden ze stanów nietrwałych może stać się energetycznie korzystniejszy, co prowadzi do utworzenia niefunkcjonalnej struktury białka. Takie procesy towarzyszą powstawaniu amyloidów [10].



Rys.1. Schemat przemian strukturalnych cząsteczek białkowych [7].

Warto podkreślić, że w procesie fałdowania łańcuch polipeptydowy syntetyzowany w rybosomach związa się do funkcjonalnej, natywnej formy poprzez intramolekularne oddziaływania podjednostek strukturalnych częściowo zwiniętej formy pośredniej. Bardzo często model procesu agregacji zakłada również obecność częściowo rozwiniętego stanu, zawierającego znaczącą ilość struktur natywnych białka [7] (Rys.1). Odnosi się to do agregatów uporządkowanych, jak amyloidy, lub też do struktur bezpostaciowych tworzonych *in vivo* (np. *inclusion bodies*) lub *in vitro* (np. *folded aggregates*). Zakłada się zazwyczaj, że forma pośrednia białka poddana jest specyficznym intermolekularnym oddziaływaniom, które prowadzą do powiększenia łańcucha struktury supramolekularnej [11]. Ponadto forma strukturalna białka w

specyficznym warunkach zależy od termodynamicznej stabilności dostępnych stanów konformacyjnych. Włókna amyloidowe są przykładem agregatów o dużej stabilności z uwagi na wysoko zorganizowaną sieć wiązań wodorowych. Dodatkowo, do czynników mających wpływ na proces agregacji uporządkowanej należą: wysokie stężenie białka, czas życia formy pośredniej oraz równowaga dynamiczna pomiędzy stanem częściowo rozwiniętym a formą natywną. Ostatecznie powstałe agregaty są zazwyczaj jednorodne, a sam proces jest bardzo wrażliwy na mutacje w białku. Warto również podkreślić, że obecność w warunkach *in vivo* specyficznych cząsteczek zwanych chaperonami odgrywa istotną rolę w zapobieganiu agregacji wewnątrzkomórkowej.

### 1.1. Mechanizmy tworzenia amyloidów

Właściwie wszystkie łańcuchy peptydowe posiadają zdolność do tworzenia włókien amyloidowych. Dlatego zdarza się, że formy włókniste związane z patologicznymi zmianami w funkcjonowaniu organizmu noszą nazwę amyloidów, natomiast analogiczne formy strukturalne utworzone przez inne białka nazwane są jedynie „amyloidopodobnymi”. Generalnie, model procesu agregacji prowadzący do utworzenia amyloidów zakłada wstępną, częściową denaturację białka [12]. Warto wspomnieć, że coraz częściej pojawiają się badania sugerujące, że ten warunek nie jest konieczny, gdyż istnieją białka, które tworzą włókniste formy strukturalne bez obecności formy pośredniej, częściowo rozplecionego łańcucha peptydowego. Najbardziej znanym przykładem takiego białka jest insulina [13]. Z drugiej strony zmiany strukturalne insuliny pokazują, że amyloidy mogą powstać z utworzonych w początkowym procesie bezpostaciowych agregatów białka [14].

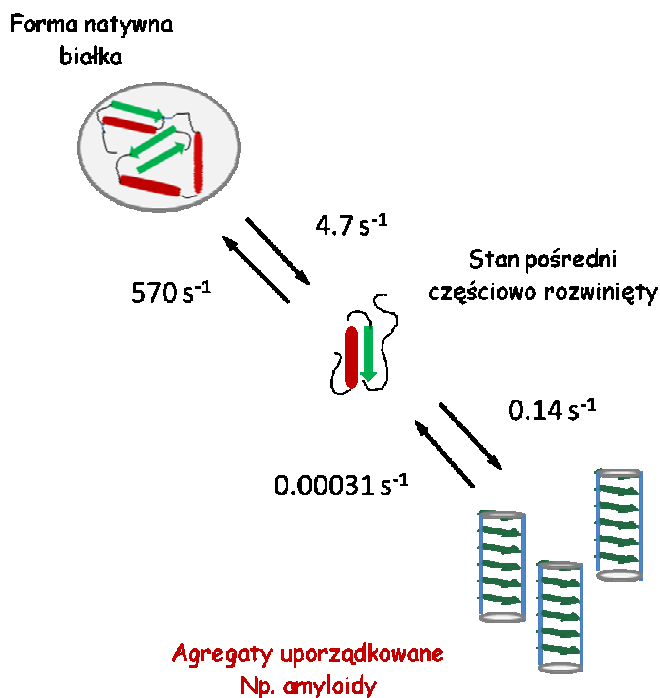
Obecnie nie istnieje jeden, do końca poznany, wspólny dla wszystkich rodzajów białek, molekularny mechanizm tworzenia włóknistych form strukturalnych. Na podstawie wyników dotychczas przeprowadzonych badań zaproponowano szereg różnych modeli wyjaśniających proces powstawania amyloidów [15]. Do najważniejszych z nich zalicza się model nukleacji i elongacji oraz mechanizm powielania struktury na podstawie swoistych „wzorców”.

W pierwszym przypadku, zakłada się istnienie trzech podstawowych etapów tworzenia amyloidów [16]. W pierwszym kroku, natywne, rozpuszczalne białko ulega

transformacji do częściowo rozwiniętej formy nazwanej „stanem pośrednim”. Taka forma ma większą skłonność do agregacji w stosunku do zwiniętej, funkcjonalnej postaci tego białka. Należy podkreślić, że proces agregacji w dużym stopniu zależy od czasu życia formy pośredniej białka. Obecność częściowo rozplecionego łańcucha peptydowego, charakteryzującego się długim czasem życia, wspomaga powstanie agregatów poprzez wzajemne oddziaływania form pośrednich prowadzących do utworzenia nie natywnych, intermolekularnych kontaktów między nimi. W drugim etapie procesu agregacji uporządkowanej, zwanym fazą nukleacji, specyficzne oddziaływania pomiędzy formami pośrednimi określonego typu białka prowadzą do powstania struktur – oligomerów - załączków. Struktura tych oligomerów zależy nie tylko od struktury białka będącego prekursorem amyloidów, lecz również od czynników fizycznych i chemicznych środowiska, w którym to białko się znajduje. W trzecim etapie, zwanym „fazą wzrostu”, oligomery białkowe łączą się, tworząc formę włóknistą. Warto zaznaczyć, że etap ten zachodzi dużo szybciej niż etap fazy nukleacji. Najważniejszymi parametrami, pozwalającymi uzyskać dość szczegółowy obraz powstania agregatów określonego białka, są wyznaczone eksperymentalnie stałe szybkości agregacji oraz stałe szybkości „zaplatania” i „rozplatania” łańcucha białkowego. Podstawowymi metodami, które wykorzystuje się w tych badaniach, są metody fluorescencji, spektroskopia CD w bliskim nadfiolecie lub eksperymenty typu *stopped-flow*. Przykład tego typu analizy przedstawiony jest na Rys.2.

Na podstawie uzyskanych danych o szybkości poszczególnych procesów, można po pierwsze potwierdzić występowanie częściowej denaturacji białka prowadzącej do utworzenia formy pośredniej. Po drugie, taka analiza pozwala wywnioskować, że protofilamenty amyloidowe są strukturami dość stabilnymi w wybranych warunkach eksperymentalnych.

Zaobserwowano wpływ szeregu czynników zewnętrznych i wewnętrznych na proces agregacji białka, prowadzący do tworzenia włókien amyloidowych. Do czynników wewnętrznych zalicza się przede wszystkim zmiany w strukturze pierwszorzędowej białka wywołane mutacjami [18, 19]. W szeregu innych prac analizowano zmiany konformacyjne białka wywołane różnymi czynnikami zewnętrznymi, zarówno chemicznymi i fizycznymi [20-31].



Rys. 2. Parametry równowagi dynamicznej pomiędzy różnymi stanami N-końcowej domeny białka HypF z *E.coli*. [17].

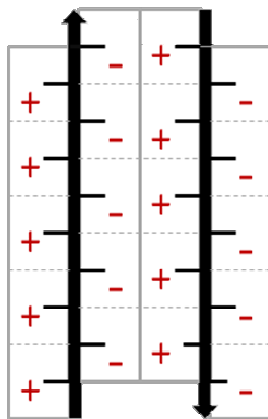
W warunkach *in vitro*, czynnikami fizycznymi, inicjującymi proces agregacji uporządkowanej są: wysoka temperatura [20, 21], wysokie ciśnienie [22, 23], oraz zmiany (najczęściej obniżenie) pH [24-27]. Do najbardziej znanych przykładów czynników chemicznych promujących tworzenie form włóknistych zalicza się substancje organiczne takie jak: metanol [28], etanol [29], trifluoroetanol [30, 31] oraz mocznik [31]. Dla większości prostych alkoholi odpowiednie zmiany w białku są efektem destabilizacji otoczki hydratacyjnej i wymiany cząsteczek wody na cząsteczki alkoholu lub mocznika. Warto zaznaczyć, że działanie czynników denaturujących musi jednak zachować zdolność do efektywnego działania sił intermolekularnych, generujących powstawanie form włóknistych. Warto wspomnieć, że chodzi tu głównie o rozkład ładunku powierzchniowego, oddziaływania hydrofobowe, stopień hydratacji oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych [32]. Zaobserwowano również, że stężenie białka poddanego częściowej denaturacji odgrywa ważną rolę w procesie fibrylogenezy. Zakładając, że proces agregacji jest procesem wielocząsteczkowym,

wzrost stężenia białka wspomaga powstawania agregatów. Ponadto, na podstawie wielu różnych cząsteczek białka, pokazano, że obecność określonych elementów struktury drugorzędowej białka – monomeru nie ma zasadniczo wpływu na postać końcowej formy włóknistej [31].

## 1.2. Modele strukturalne amyloidów

Generalnie przyjmuje się, że amyloidy powstają w wyniku agregacji białek, a prekursorem jest częściowo rozwinięta forma pośrednia białka [12]. Natomiast, otwartym pozostaje pytanie, na drodze jakich mechanizmów taka forma strukturalna ulega przekształceniu w wysoko uporządkowane, włókna amyloidowe o dużej stabilności. Do dnia dzisiejszego zaproponowano szereg modeli strukturalnych włókien amyloidowych [33]. Zalicza się do nich model polarnego zamka (ang. *polar zipper*), model wymiany domen (ang. *domain-swapping model*) oraz model tuby wypełnionej wodą (ang. *water-filled tube structure model*).

Model polarnego zamka zakłada obecność sieci wiązań wodorowych pomiędzy polarnymi resztami aminokwasowymi glutaminy i asparaginy, która to stabilizuje strukturę  $\beta$  [34]. Rysunek 3 przedstawia schematycznie tworzenie się polarnych zamków w antyrównoległej strukturze  $\beta$  poli(L-glutaminy-L-argininy). Jedną z hipotez dotyczących tworzenia polarnych zamków zakłada, że wspomniane wiązania wodorowe powstają pomiędzy przeciwnie naładowanymi resztami aminokwasowymi w łańcuchu peptydowym.



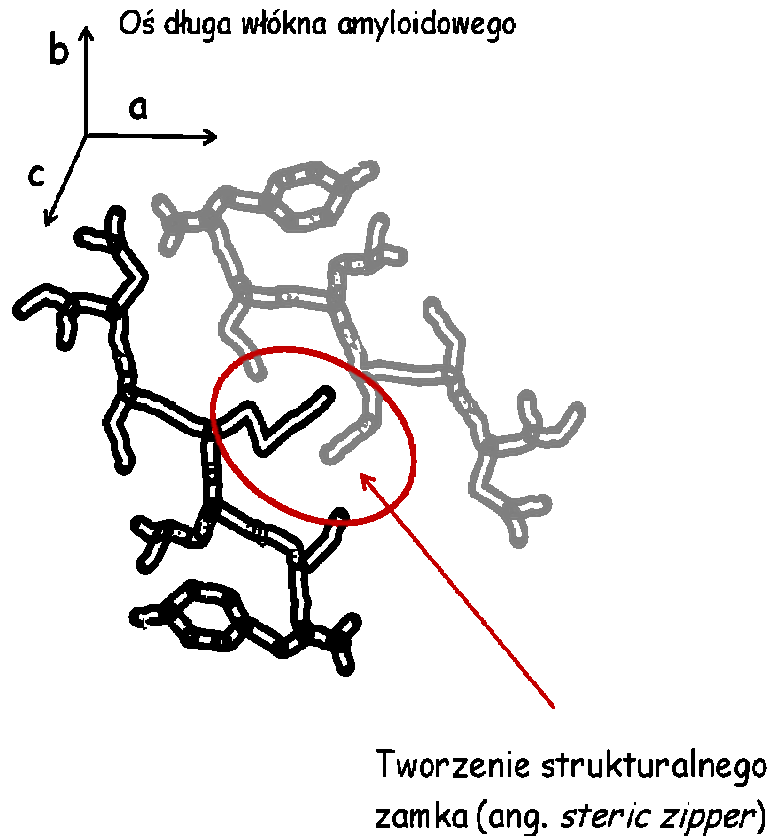
Rys. 3. Tworzenie polarnych zamków podczas łączenia się antyrównoległych składowych struktury  $\beta$  poli (L-glutaminy-L—argininy) [34].

Ponadto badania potwierdziły, że w strukturze czterech białek anomalnie powtarzają się glutaminy. Reszty te zlokalizowane są szczególnie przy końcu N łańcuchów peptydowych. Ponadto, konwersja tych białek do włókien amyloidowych jest ściśle związana z patologicznymi zmianami w funkcjonowaniu organizmu. Badania prowadzone przez Orpiszewskiego i Bensona [35] potwierdziły również obecność asparaginy w łańcuchach polipeptydowych mających zdolność tworzenia włókien amyloidowych, wykazując wzrost amyloido-genicznych własności białka poprzez zamianę reszt kwasu asparaginowego na reszty asparaginy. Nie jest to model powszechny, gdyż włókniste formy strukturalne tworzą również peptydy, w których struktury  $\beta$  stabilizowane są w regionach bogatych w reszty niepolarne, np. reszty alaninowe [36].

Warto wspomnieć o oddziaływaniach pomiędzy strukturami  $\beta$ , które tworzą włókno amyloidowe. Takie oddziaływania możemy podzielić na dwie kategorie: oddziaływania typu „mokrego” (ang. *wet interfaces*) oraz typu „suchego” (ang. *dry interfaces*) [37]. Pierwszy typ oddziaływania związany jest z występowaniem cząsteczek wody, które powodują hydrolizę polarnych reszt aminokwasowych w łańcuchu peptydowym. Cząsteczki wody występują pomiędzy strukturami  $\beta$ .

W drugim przypadku, cząsteczki wody nie występują pomiędzy strukturami, a polarne reszty jednego łańcucha zostają ciasno wsunięte pomiędzy te same miejsca łańcucha w drugiej strukturze  $\beta$ . Ponadto, oddziaływaniami stabilizującymi nowo utworzoną parę struktur  $\beta$  nie są wiązania wodorowe, ale raczej oddziaływania van der Waalsa. W przekroju poprzecznym nowo utworzonej formy strukturalnej (Rys.4) wsunięte reszty łańcuchów peptydowych dwóch struktur  $\beta$  wyglądają jak „zęby zamka”, dlatego ten rodzaj oddziaływania nazwano „zatkami strukturalnymi” (ang. *steric zipper*).

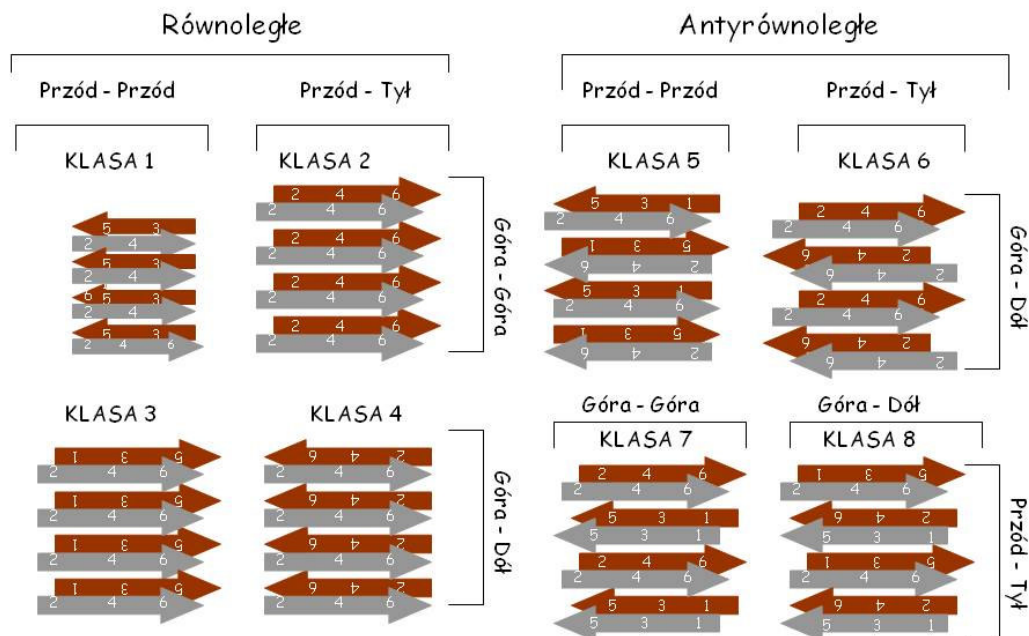
Otwartym pozostaje natomiast pytanie, czy występuje tylko jedna forma zamka strukturalnego, stabilizującego parę struktur  $\beta$ , czy też można obserwować zjawisko polimorfizmu. Sawaya i współprac. [38] wyszczególnili osiem różniących się geometrią teoretycznych klas oddziaływań w ramach strukturalnego zamka. Pięć z nich została potwierdzona eksperymentalnie w mikrokryształach.



Rys. 4. Model powstawania zamka (ang. *steric zipper*) stabilizującego dwie struktury  $\beta$  podczas tworzenia włókna amyloidowego.

Osiem różnych wyszczególnionych form „strukturalnych zamków” można podzielić na trzy kategorie:

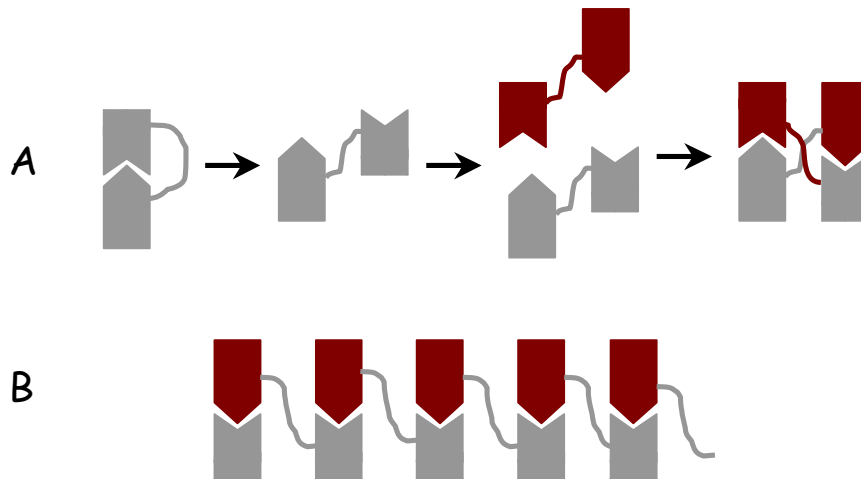
- pierwszą, wyszczególnioną ze względu na orientację części składowych struktur  $\beta$ . Do tej grupy zaliczamy geometrie typu „*up-up*” oraz „*up-down*”;
- drugą, wyszczególnioną ze względu na ustawienie względem siebie części składowych w obrębie jednej struktury  $\beta$ . Do tej grupy zaliczamy dwie formy: równoległą lub antyrównoległą;
- trzecią, wyszczególnioną ze względu na orientację powierzchni części składowych struktur  $\beta$ . Do tej grupy zaliczamy dwie formy: przód-przód (ang. *face-to-face*) lub przód-tył (ang. *face-to-back*).



Rys. 5. Osiem wyróżnionych form „strukturalnych zamków” [38].

Efekt wymiany domen w oligomerach białkowych został zaproponowany po raz pierwszy podczas analizy strukturalnej rybonukleazy A [39, 40]. Zjawisko to zostało również zaobserwowane eksperymentalnie przez Eisenberga i współprac. [41] podczas analizy krystalograficznej jednej z toksyn. Efekt ten polega na wymianie identycznych domen między dwoma cząsteczkami jednego typu białka. Proces ułatwia istnienie luźnego elementu strukturalnego (ang. *flexible linker*) (to najczęściej nieukształtowany fragment łańcucha polipeptydowego) łączącego domenę podlegającą wymianie z pozostałą częścią białka. Na skutek zmian konformacyjnych linkera wyeksponowana zostaje niedostępna w formie natywnej powierzchnia, która rozpoznaje komplementarną do niej powierzchnię w drugiej, monomerycznej, częściowo rozwiniętej cząsteczce [42]. Oddziaływaniami stabilizującymi nową postać strukturalną są wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne lub hydrofobowe oraz mostki siarczkowe. Ponadto, w powstałym dimerze obserwuje się dodatkową, intermolekularną płaszczyznę, która zwiększa stabilność nowej formy strukturalnej względem formy monomerycznej białka. Prawdopodobnie część energii pochodzącej od nowych intermolekularnych

oddziaływań w dimerze zostaje zużyta na zrekompensowanie czynnika entropowego, który faworyzuje postać monomeryczną białka. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań krystalograficznych różnych białek występujących w postaci dimerów lub oligomerów wyższego rzędu, zaobserwowano, że w ponad 40 różnych cząsteczkach białka za proces oligomeryzacji odpowiedzialny jest mechanizm wymiany domen.



Rys. 6. Wymiana domen w oligomerach białkowych: a – mechanizm powstawania dimeru, b – mechanizm powstawania formy włóknistej [42].

Proces wymiany domen dotyczy najczęściej fragmentów końca N lub C łańcucha peptydowego. Dane eksperymentalne podają przykłady, w których oligomery powstają na drodze wymiany obu fragmentów łańcucha, tak się dzieje np. w powstawaniu oligomerów RNAzy A [43, 44]. Warto zaznaczyć, że klasyczna wymiana domen obejmuje różne fragmenty strukturalne, takie jak helisa  $\alpha$ , struktura  $\beta$ , pętla lub całe domeny. Natomiast, w przypadku tworzenia włókien amyloidowych, motywami strukturalnymi podlegającymi wymianie są najczęściej „ $\beta$ -spinki” (ang.  *$\beta$  hairpin*), a oddziaływaniami stabilizującymi są wiązania wodorowe lub oddziaływania hydrofobowe.

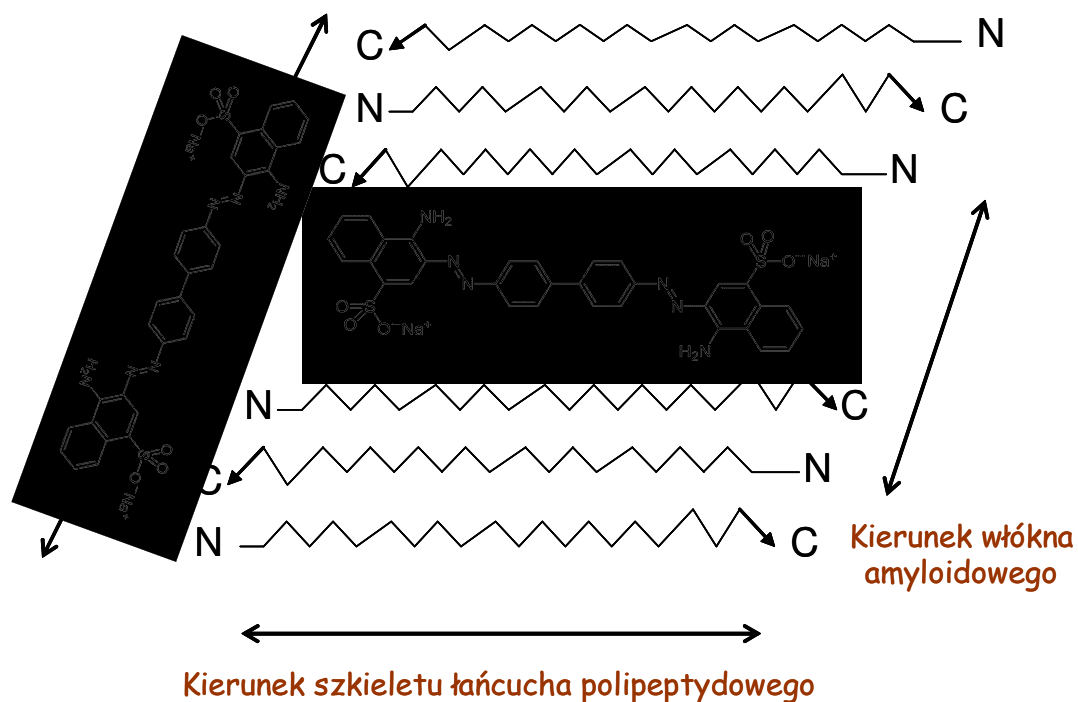
Model włókna amyloidowego jako tuby wypełnionej wodą został zaproponowany po raz pierwszy przez Preutza i współprac. [45]. Na podstawie badań procesu tworzenia włókien amyloidowych poliglutaminy, wskazali oni na obecność cylindrycznej struktury  $\beta$  o średnicy 3,1nm. Przypuszczano, że zaproponowany model

spiralnego włókna, z 20 aminokwasami przypadającymi na jeden obrót, będzie najbardziej stabilną formą strukturalną. Wypisane tu parametry strukturalne wskazują na to, że średnia odległość między końcowymi atomami łańcuchów bocznych jest równa 0,36 nm, co odpowiada promieniowi van der Waalsa. Natomiast dla formy strukturalnej, w której na jeden obrót przypada 18 reszt aminokwasowych, odległość ta wynosi tylko 0,32nm. Jest to odległość za mała aby zapewnić odpowiednią stabilność włókna. W przypadku 22 reszt aminokwasowych dystans jest większy, w konsekwencji wpływa to na zmniejszenie oddziaływania pomiędzy końcowymi atomami. Na podstawie badań jednorodnego łańcucha peptydowego pokazano, że zasadnicze znaczenie dla stabilności formy włóknistej jest występowanie wiązań wodorowych pomiędzy resztami aminokwasowymi znajdującymi się w sąsiednich splotach (utworzone są pomiędzy grupą karbonylową CO, znajdującą się w jednym ze splotów, oraz grupą NH lub NH<sub>2</sub> drugiego, sąsiadującego splotu). Ponadto, na podstawie badań z wykorzystaniem dwuwymiarowej spektroskopii w podczerwieni, wykazano obecność cząsteczek wody w włóknach amyloidowych, jednak jej rozkład jest niejednorodny [46]. Przypuszcza się, że cząsteczki wody najprawdopodobniej zlokalizowane są blisko grup amidowych hydrofobowych reszt aminokwasowych oraz zajmują przestrzenie pomiędzy sąsiadującymi składowymi struktury  $\beta$ , gdzie nie obserwuje się obecności cząsteczek wody. Obliczono, że na jedną monomeryczną jednostkę białka w włóknie przypada średnio około 1.2 cząsteczek wody.

### 1.3. Charakterystyka fizyczno – chemiczna amyloidów

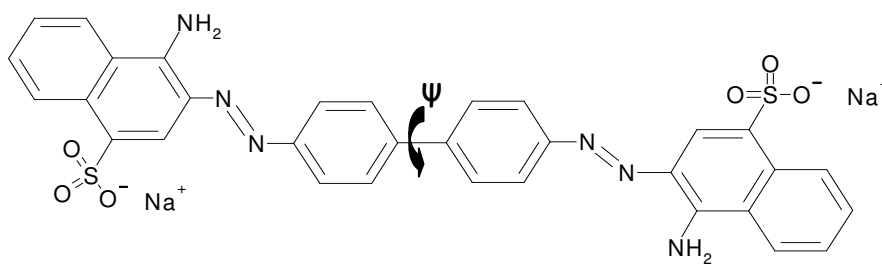
Strukturę i morfologię włókien amyloidowych badano z wykorzystaniem różnych technik eksperymentalnych. Identyfikacji włókien dokonuje się przy użyciu barwnika czerwieni Kongo. Pokazano, że w stanie wolnym barwnik ten wykazuje maksimum absorpcji dla długości fali  $\lambda = 498\text{nm}$ , natomiast pod wpływem oddziaływania z włóknami amyloidowymi obserwuje się zmiany w widmie tego barwnika, polegające na przesunięciu maksimum absorpcji do  $\lambda = 541\text{nm}$ . Ponadto, pod wpływem wiązania się barwnika do amyloidów, włókna obserwowane pod mikroskopem mają kolor czerwony w świetle przechodzącym oraz kolor zielonego jabłka w świetle spolaryzowanym [47].

Decydującym warunkiem wiązania barwnika z włóknami jest obecność struktury  $\beta$ . Obecnie istnieje kilka hipotez wyjaśniających oddziaływanie czerwieni Kongo ze strukturą  $\beta$  włókien amyloidowych. W pierwszym przypadku zakłada się, że barwnik ten leży w płaszczyźnie prostopadłej do łańcucha peptydu [48]. W drugim modelu, barwnik lokalizuje się pomiędzy dwoma strukturami  $\beta$ , równoległe do łańcucha szkieletowego peptydu i prostopadle do osi długiej włókna [49]. Ponadto przypuszcza się, że występują oddziaływania polarnych reszt aminokwasowych (np. Arg i Lis w dimerze insuliny składającej się z dwóch struktur  $\beta$ ) z naładowanymi grupami sulfonowymi występującymi w barwniku. Carter i współprac. [49] potwierdzają, że czerwień Kongo nie wiąże się do dowolnego peptydu, lecz oddziaływanie z strukturami  $\beta$  następuje dopiero po przekształceniu go do postaci włókien. Ponadto zaobserwowano, że powinowactwo barwnika do włókien amyloidowych związane jest z charakterystyczną strukturą czerwieni Kongo [50].



Rys. 7. Modele wiązania czerwieni Kongo do włókna amyloidowego [49].

W cząsteczce barwnika dwie cząsteczki kwasu naftalensulfonowego, w których podstawiona jest jedna grupa aminowa, połączone są poprzez grupy azowe z centralnie zlokalizowaną cząsteczką difenyłową (cząsteczka ta ma możliwość obrotu wokół wiązania C-C łączącego dwa pierścienie benzenowe) (Rys.8). Przypuszcza się, że podczas przyłączania się barwnika do włókien, konformacja cząsteczki difenyłowej jest bardziej planarna w porównaniu z jej ułożeniem w stanie wolnym. Natomiast części cząsteczki grupy naftalenowej i difenyłowej są wstawione pomiędzy struktury  $\beta$  w włóknie amyloidowym. Analiza widm Ramana wykazała, że kąt dwuścienny ( $\psi$ ) centralnie położonej grupy difenyłowej ma mniejszą wartość dla kompleksu Czerwień Kongo-amyloid w porównaniu z wartością tego kąta w strukturze wolnego barwnika.

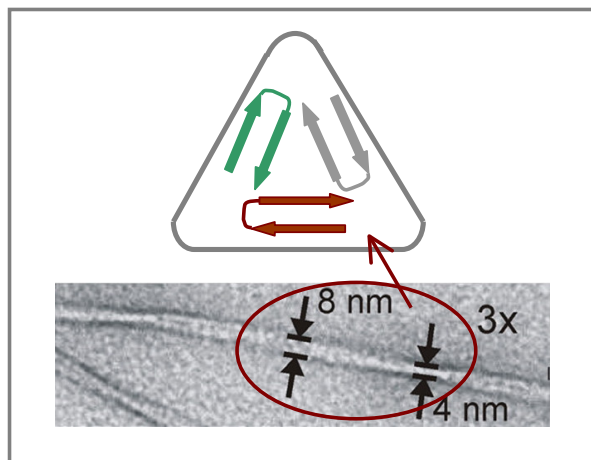


Rys. 8. Struktura chemiczna barwnika czerwieni Kongo.

Kolejnym barwnikiem wykorzystywanym do identyfikacji amyloidów jest barwnik fluorescencyjny – tioflawina [51]. W stanie wolnym barwnik ten emituje światło fluorescencji o długości fali 438 nm (fala wzbudzająca – 350 nm). Natomiast dla kompleksu tioflawina - włókno amyloidowe obserwujemy fluorescencję o bardzo dużym natężeniu o długości fali 482 nm (fala wzbudzająca – 450 nm) [52]. Warto zaznaczyć, że intensywność fluorescencji barwnika w obecności stałej liczby włókien osiąga plateau wraz ze wzrostem stężenia tioflawiny. Maksymalna wydajność fluorescencji jest obserwowana przy pH = 9.

Morfologię włóknistej formy strukturalnej amyloidów badano, wykorzystując technikę mikroskopii elektronowej. Pokazano, że niezależnie od sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym oraz struktury natywnej białka będącego

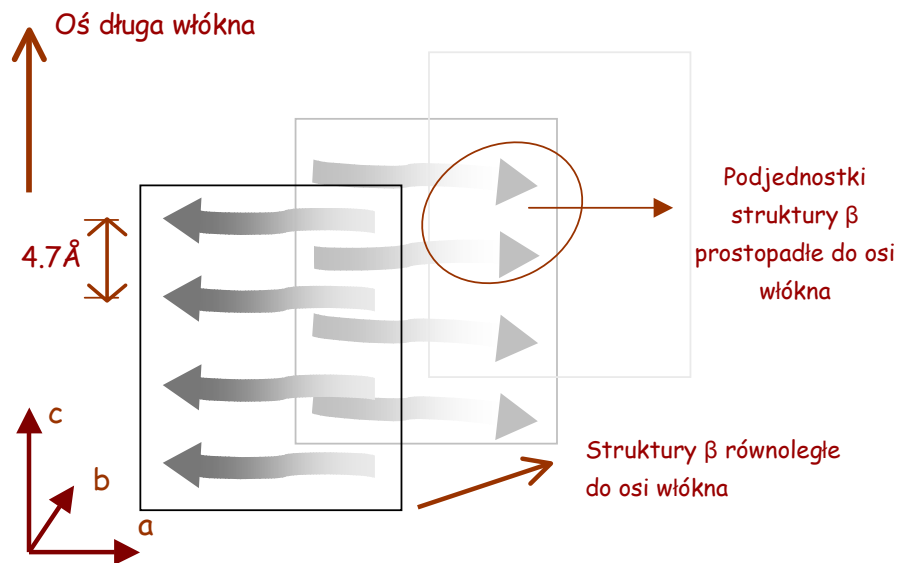
prekursorem włókien, amyloidy mają podobną morfologię. Dojrzałe amyloidy to proste, nie rozgałęzione, o zróżnicowanej długości włókna, a ich średnica waha się w granicach od 6 do 12nm [53]. Warto wspomnieć, że niezależnie od tego, jakie białko jest zalążkiem tworzenia amyloidów, wszystkie włókna mają podobne rozmiary, mimo że masa molekularna białek waha się w szerokim zakresie. Pokazano, że większość hydrofobowych reszt aminokwasowych łańcucha polipeptydowego zlokalizowana jest w wewnętrznej części włókna, natomiast polarne i naładowane reszty na zewnątrz, zgodnie z hydrofobowym modelem włókna zapewniającym stabilną strukturę amyloidu. Pokazano również, że włókna amyloidowe składają się z co najmniej dwóch podjednostek składowych – protofilamentów, które skręcają się dookoła wspólnej osi. Liczba protofilamentów tworzących dojrzałe włókno amyloidowe może wahać się od dwóch do kilkudziesięciu. Ponadto zaobserwowano, że włókna amyloidowe mogą posiadać wewnętrzny, centralny kanał (np. wypełniony wodą). Ostatnie badania prowadzone za pomocą technik mikroskopowych pokazały, że przekrój poprzeczny włókna amyloidowego ma kształt trójkąta (Rys.9) [54]. W konsekwencji szerokość włókien pochodzących od tego samego białka jest modulowana i waha się w pewnym zakresie.



Rys. 9. Przekrój poprzeczny włókna amyloidowego [54].

Strukturę włókna amyloidowego badano po raz pierwszy w 1968, na podstawie dyfrakcji promieniowania X [55]. Zdefiniowano strukturę amyloidów jako „poprzeczną

strukturę  $\beta'$  (ang. *cross  $\beta$  structure*). Na dyfraktogramie widoczne są dwa charakterystyczne refleksy: pierwszy (intensywny) południkowy wskazuje na występowanie w włóknie amyloidu regularnej struktury, powtarzającej się co 0,47 nm, natomiast sygnał drugi, bardziej rozmyty (równikowy), informuje o wstępowaniu odstępów strukturalnych co 0,98 nm ułożonych prostopadle do osi włókna. Taka analiza pozwoliła na określenie struktury włókna, w której struktury  $\beta$  rozmieszczone są równoległe do osi włókna, natomiast ich części składowe biegną prostopadle do osi włókna (Rys.10). Ponadto, badania prowadzone przez Nelsona i współprac. [37] wskazują na trójpoziomą organizację strukturalną włókien amyloidowych. W pierwszym poziomie obserwuje się układanie podjednostek strukturalnych w odległości 0,48 nm od siebie, prostopadle do osi włókna, tworząc pojedynczą strukturę  $\beta$  z wiązaniami wodorowymi równoległymi do osi włókna. Na drugim poziomie organizacji, pojedyncze struktury  $\beta$  łączą się w pary (ang. *pair-of-sheets organization*), między którymi nie występują cząsteczki wody, a zazębianie się łańcuchów peptydowych pochodzących od sąsiednich struktur  $\beta$  prowadzi do utworzenia wcześniej opisanych strukturalnych zamków (ang. *sternic zipper*). Podjednostki jednej struktury  $\beta$  są antyrównoległe w stosunku do podjednostek w drugiej strukturze  $\beta$ . Natomiast, jedna z struktur  $\beta$  tworząca parę jest przesunięta wzdłuż osi śrubowej w stosunku do drugiej struktury  $\beta$ , o  $\frac{1}{2}$  odległości jaka występuje między składowymi w pojedynczej strukturze  $\beta$ . Warto zaznaczyć, że struktury  $\beta$  tworzone są bardzo szybko, dlatego zakłada się, że pierwszy stopień organizacji strukturalnej włókna tworzy się szybciej w stosunku do drugiego. Trzeci poziom organizacji strukturalnej amyloidów opiera się na oddziaływaniach pomiędzy utworzonymi wcześniej parami struktur  $\beta$ . Oddziaływaniami stabilizującymi nową postać strukturalną są nie-kowalencyjne siły, które prawdopodobnie na tym poziomie organizacji są słabsze w stosunku do tych, które kierowały tworzeniem dwóch pierwszych poziomów strukturalnych włókna.



Rys.10. Struktura włókna amyloidowego [55].

Z energetycznego punktu widzenia, proces tworzenia włókien amyloidowych zakłada, że zmiana standardowej energii swobodnej, jaka towarzyszy tworzeniu protofilamentów,  $\Delta G^0$ , jest sumą zmian entalpii ( $\Delta H^0$ ) i entropii ( $\Delta S^0$ ) oraz prawdopodobnie jest silnie ujemna [37]:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (1)$$

Ponadto zakładając, że dla  $n$  monomerycznych peptydów ( $M$ ), które biorą udział w konwersji do włókien amyloidowych  $M_n$ , ( $nM \rightarrow M_n$ ), zmiana energii swobodnej towarzysząca temu procesowi zdefiniowana jest jako

$$\Delta G = \Delta G^0 + n \ln \frac{[M_n]}{[M]^n} \quad (2)$$

Korzystając z zależności (1), zmiana energii swobodnej dla procesu tworzenia uporządkowanych agregatów przyjmuje wtedy postać:

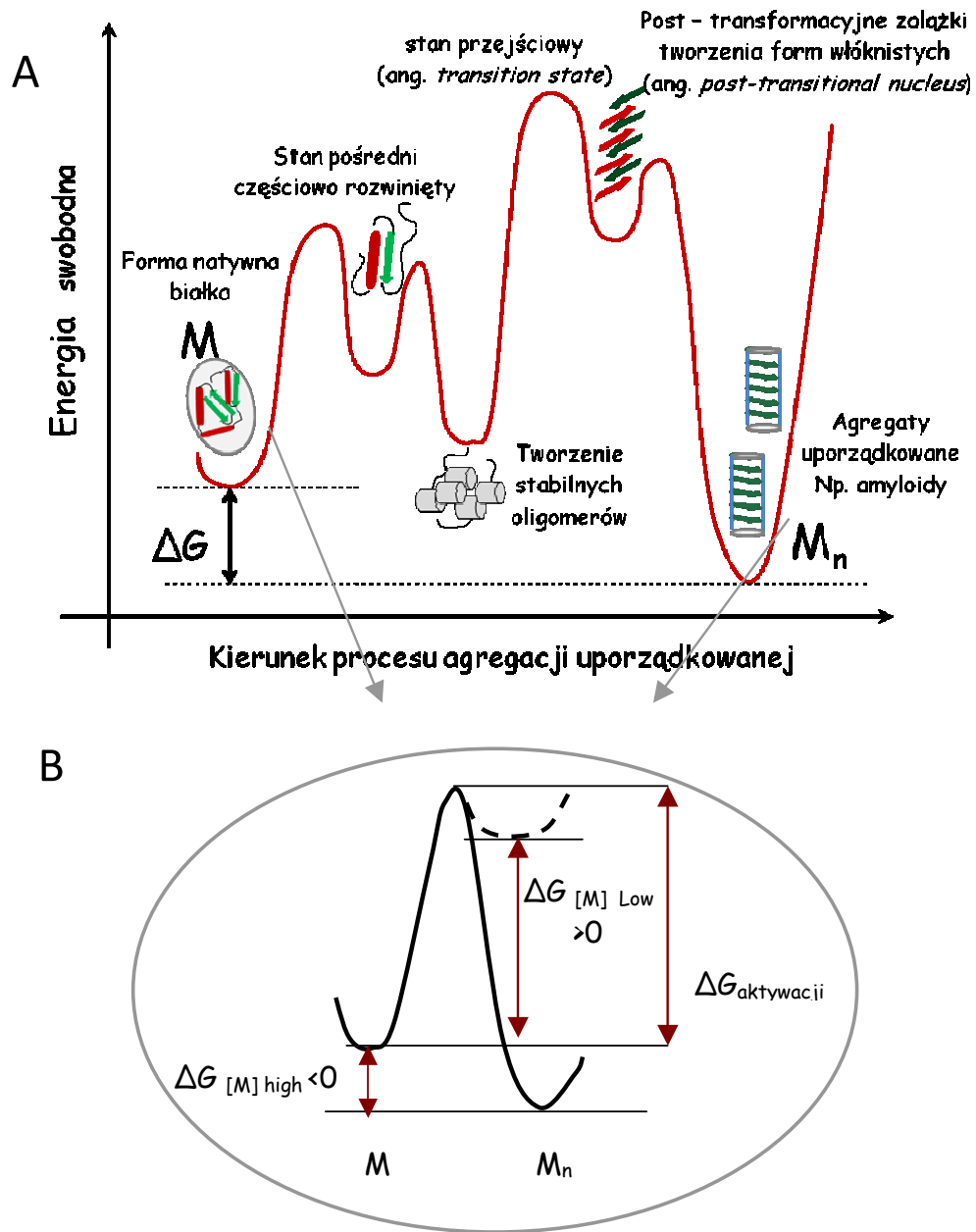
$$\Delta G = \Delta H^0 - T\Delta S^0 + RT \ln \frac{[M_n]}{[M]^n} \quad (3)$$

W stanie równowagi, kiedy szybkość reakcji przebiegającej w prawo jest równa szybkości reakcji przebiegającej w lewo, zmiana energii swobodnej  $\Delta G = 0$ . Wówczas stosunek równowagowej ilości cząsteczek białka w postaci agregatów do równowagowej ilości monomerów białka określa równanie

$$K = \frac{[M_n]^{eq}}{[M]^{n^{eq}}} = e^{-\Delta G^0 / RT} \quad (4)$$

Wielkość K nazywamy stałą równowagi w procesie agregacji.

Ponieważ zmiana standardowej energii swobodnej ( $\Delta G^0$ ) dla przejścia białko natywne – agregaty jest mała, to zmiana energii swobodnej towarzysząca temu procesowi jest kontrolowana przede wszystkim przez stężenie monomerów białkowych (Rys.11b). W przypadku wysokiego stężenia monomerów, korzystając z zależności (3), zmiana energii swobodnej jest silnie ujemna,  $\Delta G < 0$ . W konsekwencji mechanizm tworzenia włókien amyloidowych jest faworyzowany i jest to reakcja egzoenergetyczna zachodząca spontanicznie z uwolnieniem energii. Dla niskiego stężenia białka zmiana energii swobodnej towarzysząca procesowi tworzenia agregatów jest dodatnia,  $\Delta G > 0$ . Jest to reakcja endoenergetyczna, która nie może zachodzić spontanicznie. Tylko dostarczenie energii spoza układu umożliwi zapoczątkowanie reakcji. W rezultacie stan monomeryczny białka jest bardziej preferowany - w stosunku do agregatów. Warto zaznaczyć, że dla procesu agregacji uporządkowanej występuje znacząca bariera energetyczna - energia aktywacji.



Rys. 11. A) Energia swobodna różnych stanów konformacyjnych białka podczas procesu agregacji uporządkowanej B) uproszczony schemat zmian energii swobodnej towarzyszący procesowi tworzenia włókien amyloidowych z uwzględnieniem tylko substratu (monomerów białkowych) oraz końcowego produktu reakcji (włókien amyloidowych) w funkcji stężenia monomerycznego białka [37, 56].

### 1.4 Proces tworzenia amyloidów na przykładzie lizozymu

Proces agregacji lizozymu prowadzący do tworzenia form włóknistych pod wpływem różnych czynników fizycznych i chemicznych w warunkach *in vitro*, badano stosując metody analizujące promieniowanie rozproszone, czyli dynamiczne (DLS) [78] i statyczne (SLS) [58] rozpraszanie światła, niskokątowe rozpraszanie promieniowania X (SAXS) [59] i promieniowania neutronów [60]. Wyznaczone eksperymentalnie warunki tworzenia włókien amyloidowych na przykładzie lizozymu przedstawione są w Tabeli 1.

Tabela 1. Warunki tworzenia włókien amyloidowych na przykładzie lizozymu (HEWL).

Warunki pomiaru	Literatura
10mg/ml lizozymu, 10 mM NaCl, 90% (v/v) EtOH, inkubowany przez 1 tydzień w temp. 298K	[29]
1 mM HEWL, pH 2,0 przez dodanie HCl, inkubowany w temp. 310K lub 338K 1 mM HEWL, pH 7,4 przez dodanie NaOH, inkubowany w temp. 310K lub 338K	[57]
1 mM HEWL, pH 2, podgrzewany do temp 373K i ochładzany za pomocą ciekłego azotu; inkubowany przez 56 dni w temp. 310K	[21]
1 mM HEWL, 30% 2,2,2 trifluoroetanol, pH 6,8, temp. 310K lub 338K	[21]
pH 2,0, inkubowany przez 2 dni w temp. 330K lub pH 3,0, inkubowany przez 11 dni w temp. 330K	[58]
10 mg/ml HEWL, H <sub>2</sub> O, 90% (v/v) EtOH; niedojrzałe włókna amyloidowe	[59]
10 mg/ml HEWL, 90% (v/v) EtOH, 0,3-2,0 mM NaCl	[60]
lizozym, pH 2,0-4,0, temp. 310-338 K przez kilka dni	[61]
0,55 mM HEWL fragment: 57-107, 10 mM NaCl, pH 2,0, temp. 310 K po 24 h	[57]
1 mM HEWL, pH 2,0 przez dodanie 10 mM HCl, inkubowany w temp. 338 K przez więcej niż 10 dni	[57]

Na podstawie zmian wartości promienia żyrcacji cząsteczki lizozymu analizowano wpływ stężenia alkoholu na tworzenie uporządkowanych agregatów białka [59]. Przy niskim stężeniu alkoholu ( $c_{\text{EtOH}} < 60\%$  (v/v)) obserwowano spadek promienia żyrcacji od

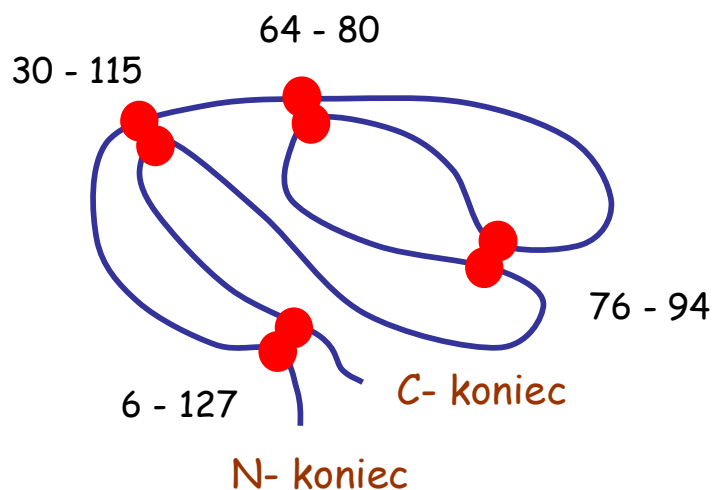
wartości 1,73 do 1,48nm. Obserwowana zmiana tego parametru oznacza, że białko traci otoczkę hydratacyjną. Ponadto, w wybranych warunkach, lizozym występuje w postaci monomerów. Proces agregacji cząsteczek białka rozwija się dopiero dla stężenia lizozymu 7 mg/ml w 70% (v/v) wodnym roztworze etanolu. Autorzy cytowanej pracy pokazali, że przy stężeniu lizozymu w zakresie od 7,3 mg/ml do 9,6 mg/ml w 70% (v/v) etanolu następuje przejście z postaci globularnej w postać włóknistą białka. Ostatecznie agregaty włókniste obserwowano przy stężeniu białka 9,7 mg/ml w 90% (v/v) wodnym roztworze etanolu. Wysoko uporządkowane struktury w postaci złogów amyloidowych obserwowano w środowisku o pH 3.0 w temperaturze 57°C oraz o pH 2.0 i temperaturze 37°C oraz 57°C po inkubacji przez okres od 6 do 8 dni [61]. W badaniach procesu agregacji lizozymu analizowano temperaturowe zmiany natężenia światła rozproszonego posługując się techniką SLS [58]. Gwałtowny wzrost natężenia światła rozproszonego tłumaczy się rozpoczęciem procesu agregacji cząsteczek białka. Powstałe agregaty miały postać włóknistą.

Pomimo wielu badań *in vitro* poświęconych procesowi tworzenia amyloidów, mechanizm ten na poziomie molekularnym jest nadal słabo poznany. Szczegółowa analiza procesu agregacji lizozymu z jaja kurzego byłaby nie tylko pomocna w wyjaśnieniu wspólnego-, dla wszystkich białek i peptydów-, mechanizmu agregacji włóknistej. Wiedza ta byłaby również istotna w badaniach odwracalności procesu agregacji cząsteczek białka, gdyż liczba prac poświęcona temu zagadnieniu jest niewielka. W szeregu prac analizowano natomiast wpływa różnych cząsteczek organicznych na zahamowanie bądź spowolnienie procesu agregacji uporządkowanej lizozymu. Do tej grupy związków zalicza się melatoninę [62], p-benzochinon [62], TCEP [63], kurkuminy [64]. Wykazano, że obecność cząsteczek kurkuminy o stężeniu 50µM powoduje zahamowanie procesu tworzenia włókien amyloidowych. Dominującym oddziaływaniem pomiędzy cząsteczkami lizozymu a kurkuminy były oddziaływania van der Waalsa i wiązania wodorowe. Autorzy cytowanej pracy wykazali również, że melatonina o stężeniu 1000µM powoduje spowolnienie procesu agregacji cząsteczek lizozymu. Z analizy widm CD lizozymu w środowisku o pH 2.0 wynika, że obecność benzochinonu o stężeniu 1000µM powoduje zahamowanie zmian w strukturze drugorzędowej lizozymu. Dominującą strukturą drugorzędową lizozymu, w wybranych warunkach, pozostawała helisa  $\alpha$ . Nie obserwowano tworzenia nowych struktur  $\beta$ .

### 1.5. Struktura i funkcja lizozymu

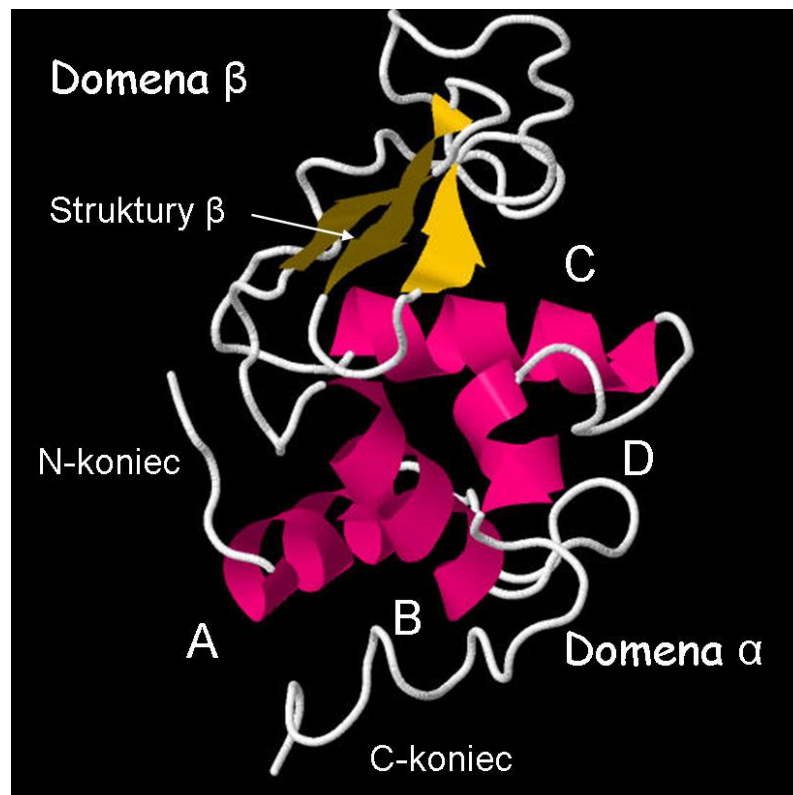
Lizozym z białka jaja kurzego (HEWL) jest często obiektem analizy procesów agregacji. Jest to glikozydaza katalizująca rozpad wiązania glikozydowego pomiędzy składnikami NAG (N-acetylglucozamina) i NAM (kwas N-acetylmuraminowy) łańcuchów polisacharydowych ścian komórkowych niektórych bakterii oraz pomiędzy resztami NAG w chitynie [65]. Dwoma resztami aminokwasowymi zaangażowanymi w reakcje enzymatyczne jest kwas glutaminowy Glu35 oraz asparaginowy Asp52, które zlokalizowane są po przeciwnych stronach szczeliny wiążącej substrat. Maksymalna aktywność białka jako enzymu jest obserwowana dla pH=6.

Białko to zbudowane jest z 129 reszt aminokwasowych a jego masa cząsteczkowa wynosi 14,32kDa. Strukturę natywną białka stabilizuje obecność czterech mostków dwusiarczkowych: Cys6-Cys127; Cys30-Cys115; Cys64-Cys80; cys76-Cys94 (Rys.11). Struktura pierwszorzędowa została po raz pierwszy określona w 1963 roku natomiast pozycję mostków dwusiarczkowych zdefiniowano dwa lata później – 1965 roku.



Rys. 12. Schematyczna reprezentacja struktury lizozymu z białka jaja kurzego z zaznaczonymi mostkami dwusiarczkowymi.

Jest to białko globularne, którego kształt zbliżony jest do elipsoidy o wymiarach 4.5nm x 3.0 nm x 3.0nm. Na podstawie analizy krystalograficznej 20 różnych kryształów lizozymu pokazano, że struktura trzeciorzędowa zbudowana jest z dwóch domen, pomiędzy którymi, w szczelinie znajduje się miejsce aktywne enzymu. Domenę I, nazywaną domeną  $\alpha$ , tworzą koniec N (reszty 1-38) oraz koniec C (reszty 88-129). Zbudowana jest ona z czterech helis  $\alpha$ : helisy A (reszty 5-14), helisy B (reszty 25-36), helisy C (reszty 89-100) i helisy D (reszty 109-114) oraz dwóch helis  $3_{10}$  (reszty 104-107 oraz 120-124). Domenę II, nazywaną domeną  $\beta$ , tworzy centralny odcinek struktury pierwszorzędowej białka (reszty 37-84). W jej obrębie, strukturę drugorzędową tworzą trzy małe podjednostki struktury  $\beta$  (reszty 43-45; 51-53; 58-59), długa pętla (reszty 60-79) oraz helisa  $3_{10}$  pomiędzy resztami aminokwasowymi w pozycji 80-83 [66].



Rys. 13. Struktura lizozymu z białka jaja kurzego [ wg. 132L.pdb.]

Teoretyczny punkt izoelektryczny (pI) wynosi powyżej 11. Grubość otoczki hydratacyjnej cząsteczki lizozymu wynosi ok. 0,35 nm. Inne parametry fizykochemiczne lizozymu przedstawione są w Tabeli 2.

Tabela 2. Parametry fizyko – chemiczne lizozymu [67, 68].

Parametr	Wartość
Objętość właściwa	0.703 ml/g
Współczynnik dyfuzji rotacyjnej	$D_R = 16,7 \cdot 10^6 s^{-1}$
Współczynnik dyfuzji translacyjnej	$D_T = 1,12 \cdot 10^{-10} m^2/s$
Współczynnik ekstynkcji	$\varepsilon = 2,64 ml \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}$
Współczynnik sedimentacji	$s = 1,91 \cdot 10^{-13} s^{-1}$
Masa cząsteczkowa	M = 13950 Da

---

## 2. Cel pracy

W ujęciu ogólnym, celem niniejszej pracy doktorskiej jest analiza strukturalna wodnych roztworów lizozymu. Badania te będą prowadzone w obecności czynnika denaturującego (alkoholu etylowego), przyjmując, że warunkiem wstępnym powstawania różnych form strukturalnych jest obecność częściowo rozwiniętej formy pośredniej białka. Z literatury wiadomo, że istnienie takiej formy pośredniej jest warunkiem koniecznym utworzenia uporządkowanych agregatów - protofilamentów amyloidowych.

W niniejszej pracy wyznaczono następujące cele szczegółowe:

1. Określenie różnorodności form strukturalnych lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych roztworach etanolu.
2. Analiza procesu powstawania określonej formy strukturalnej lizozymu
3. Wyznaczenie kinetyki zmian konformacyjnych lizozymu.
4. Analiza stabilności włóknistych form strukturalnych w obecności różnych czynników chemicznych.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Podstawowe odczynniki chemiczne

Lizozym z białka jaja kurzego (HEWL) nr. kat. L6876	Sigma-Aldrich
Chlorek sodu, chlorek potasu	POCH Gliwice
Czerwień Kongo nr. katalogowy 8609556	Sigma-Aldrich
Etanol 96% (v/v) cz.d.a	POCH Gliwice
Fosforan potasu, fosforan sodu	POCH Gliwice
Kwas askorbinowy	Sigma-Aldrich
Kwas acetylosalicylowy	Sigma-Aldrich
Tioflawina T <sub>1</sub> nr. katalogowy T3516	Sigma-Aldrich

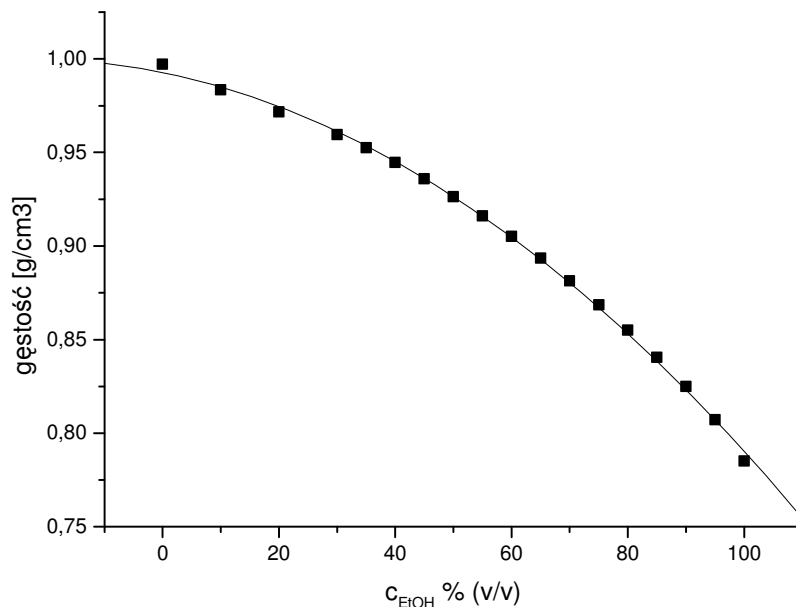
#### 3.2. Pomiary współczynnika załamania światła w wodnych roztworach etanolu

Za pomocą refraktometru Pulfricha PR 2 wykonano pomiary kąta granicznego dla całkowitego wewnętrznego odbicia światła, w wodnych roztworach etanolu o stężeniu zmieniającym się w zakresie 0 - 90% (v/v). Refraktometr ten wyposażony jest w zestaw lamp i przesłon, które umożliwiają pomiar dla kilku różnych linii widmowych. W badaniach opisanych w niniejszej pracy wszystkie pomiary wykonano przy użyciu lampy rtęciowej emitującej światło zielone (lampa Hg; długość fali  $\lambda=546,1nm$ ).

Przed dokonaniem pomiarów refraktometrycznych obliczono rzeczywiste stężenia wodnych roztworów etanolu. W tym celu zmierzono wartości gęstości dla tych próbek i wyznaczono rzeczywistą wartość stężenia wodnych roztworów etanolu na podstawie zmian wartości gęstości etanolu [69] (Rys.14). Zależność ta opisana jest funkcją postaci :

$$\rho(x) = -1.396 \cdot 10^{-5} x^2 - 6.27913 \cdot 10^{-4} x + 0.99271 \quad (5)$$

gdzie  $x$  – oznacza stężenie wodnych roztworów etanolu.



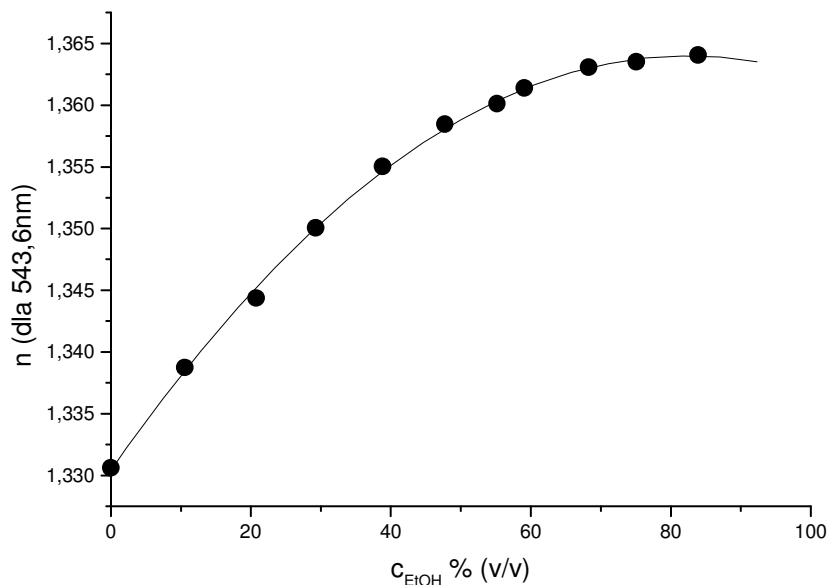
Rys.14. Zmiana gęstości wodnych roztworów etanolu w funkcji stężenia etanolu [69].

Podczas pomiarów refraktometrycznych każdorazowo w naczyniu pomiarowym umieszczono 1ml roztworu etanolu. Następnie, zmierzone wartości kątowe przeliczono na współczynniki załamania (do refraktometru dołączone są tablice zawierające przeliczniki współczynników załamania dla poszczególnych wartości kątów granicznych). Na rysunku 15 przedstawiono zmianę obliczonych wartości współczynnika załamania światła w funkcji stężenia etanolu. Zależność ta opisana jest funkcją wielomianową postaci:

$$n(x) = -4.9515 \cdot 10^{-6} x^2 + 8.15044 \cdot 10^{-4} x + 1.33044 \quad (6)$$

gdzie  $x$  - oznacza stężenie wodnych roztworów etanolu.

Na podstawie wyznaczonej w ten sposób postaci funkcji (6), obliczano rzeczywistą wartość stężenia etanolu w roztworach białka, przygotowanych do badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

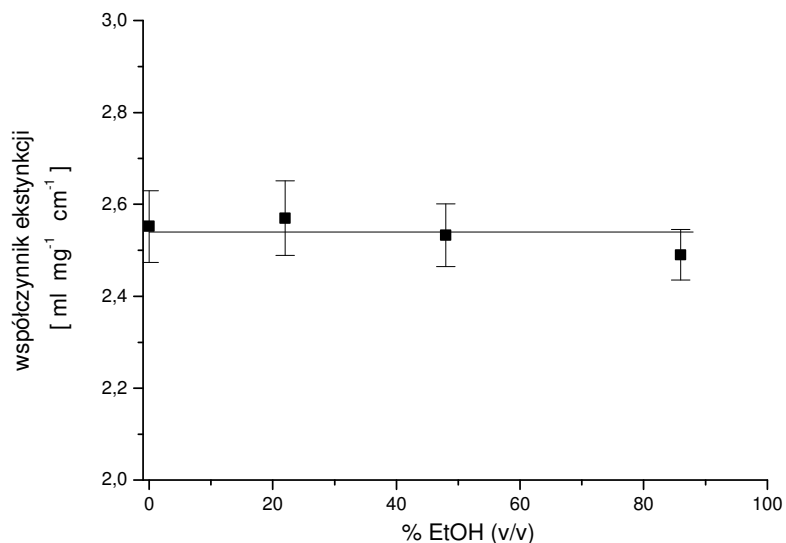


Rys. 15. Zmiana współczynnika załamania światła w wodnych roztworach etanolu (dla  $\lambda=543,6\text{nm}$ ). Dokonano aproksymacji wyników funkcją wielomianową (6).

### 3.3. Pomiar współczynnika ekstynkcji w układach woda-etanol-lizozym

Końcowe stężenia lizozymu w przygotowanych roztworach oznaczano za pomocą spektrofotometru UV/VIS (firmy Hitachi model UV2000). W tym celu metodą spektrofotometryczną wyznaczono zmiany współczynnika ekstynkcji  $\epsilon$  roztworu lizozymu w funkcji stężenia etanolu (Rys. 16).

Otrzymana wartość współczynnika ekstynkcji dla lizozymu pozostaje stała  $\epsilon^{\lambda=280\text{nm}} = 2.54 \text{ ml/mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i jest zbliżona do wartości literaturowej  $\epsilon^{\lambda=280\text{nm}} = 2,64 \text{ ml/mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [68]. Warto zaznaczyć, że wartość tego parametru dla lizozymu wyznaczono w innych warunkach eksperymentalnych. Badania te zostały przeprowadzone w 0.02 M buforze octanowym o pH=5.4, zawierającym 0.15 mol/L KCl.



Rys. 16. Współczynnik ekstynkcji dla lizozymu w wodnych roztworach etanolu.

### 3.4. Przygotowanie próbek

Wyjściowy roztwór koloidalny lizozymu otrzymano przez rozpuszczenie liofilizowanego białka w niewielkiej ilości wody. Stężenie próbki wyjściowej (60mg/ml) oznaczono za pomocą spektrofotometru UV/VIS ( $\epsilon^{\lambda=280\text{nm}} = 2.54 \text{ ml/mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Kolejne próbki zawierające alkohol etylowy o stężeniu zmieniającym się w zakresie 10 – 85% (v/v) otrzymano przez zmieszanie w odpowiednim stosunku objętościowym próbki wyjściowej lizozymu, wody i alkoholu etylowego o stężeniu wyjściowym 96% (v/v). Alkohol etylowy był dodawany bardzo małymi porcjami za pomocą strzykawki, podczas ciągłego mieszania roztworu koloidalnego na mieszadłku magnetycznym. Natomiast, subtelne zmiany w oddziaływaniach intermolekularnych lizozymu, wywołane solwatacją etanolem badano dla roztworów białka o następującym składzie: alkohol etylowy o stężeniu zmieniającym się w zakresie 0 – 10% (v/v), 50mmol/L NaCl, pH=4.5.

W tym celu wyjściowy roztwór koloidalny lizozymu otrzymano przez rozpuszczenie liofilizowanego białka w niewielkiej ilości wody. Stężenie próbki wyjściowej (20mg/ml) oznaczono za pomocą spektrofotometru UV/VIS ( $\epsilon^{\lambda=280\text{nm}} = 2.54 \text{ ml/mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Kolejne próbki zawierające alkohol etylowy o stężeniu zmieniającym się w zakresie 0 – 10% (v/v) i 50mmol/L NaCl otrzymano przez zmieszanie w odpowiednim stosunku

objętościowym próbki wyjściowej lizozymu, 100mmol/L NaCl i alkoholu etylowego o stężeniu wyjściowym 96% (v/v). Wartość pH roztworu białka zmierzono za pomocą pH-metru. Następnie pH=4.5 roztworu lizozymu otrzymano poprzez dodawanie bardzo małymi porcjami kwasu solnego. Ostatecznie spektrofotometrycznie skontrolowano stężenie wszystkich przygotowanych roztworów.

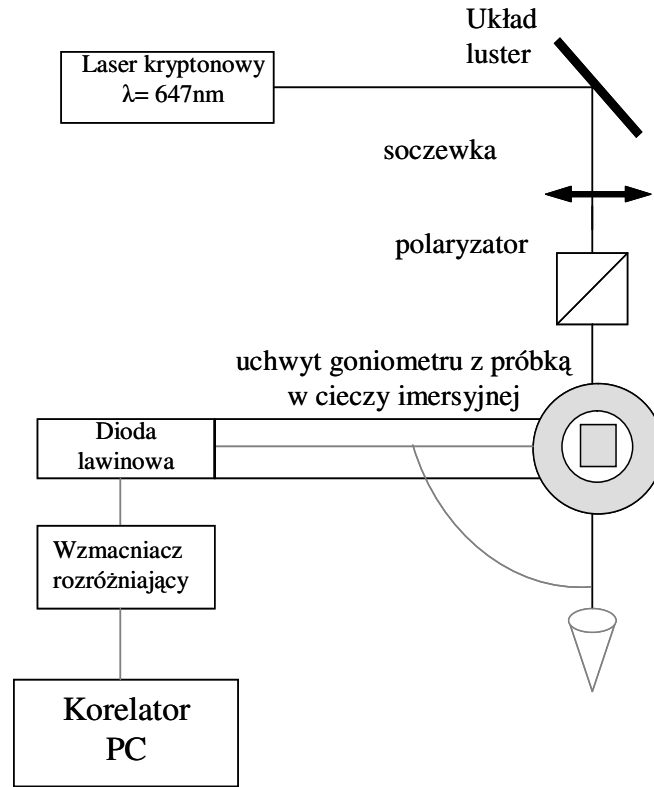
### 3.5. Dynamiczne rozpraszanie światła

W celu opisanie dynamiki makrocząsteczek w koloidzie, analizuje się zmiany natężenia światła rozproszonego w czasie opisane za pomocą funkcji korelacji. Metoda ta pozwala analizować zmiany w oddziaływaniach intermolekularnych, w szczególności zmiany w stopniu hydratacji makrocząsteczek. Za pomocą tego typu pomiarów, można w łatwy i precyzyjny sposób analizować kinetykę procesu agregacji oraz rozpoznać początkowe zmiany strukturalne prowadzące do denaturacji białka.

Źródłem światła w eksperymencie DLS był laser kryptonowy firmy Zeiss emitujący światło o długości 647nm i mocy 200mV. Za pomocą układu optycznego (systemu luster, filtrów i soczewek) wiązka światła laserowego była ogniskowana w kuwecie pomiarowej, która to umieszczona była w cieczy immersyjnej (toluen) w goniometrze (Rys.17).

Wewnątrz goniometru znajduje się szklane naczynie wypełnione cieczą immersyjną oraz uchwyt do kuwety pomiarowej. Ramię goniometru jest ruchome. Umożliwia to pomiar światła rozproszonego pod różnymi kątami. Ruch ramienia możliwy jest dzięki silnikowi krokowemu sterowanemu przy pomocy komputera. Pozwala to na ustawienie ramienia z dokładnością do ułamków stopnia.

Natężenie światła rozproszonego mierzono pod kątem  $\theta = 90^\circ$ . Wiązka światła rozproszonego poprzez światłowód trafiała do diody lawinowej. Natężenie światła rozproszonego było mierzone za pomocą fotodiody Perkin Elmer SPMC i normalizowane w stosunku do toluenu jako cieczy standardowej. Korelator ALV5000 (firmy ALV Langen) służył do pomiaru funkcji korelacji natężenia światła rozproszonego.



Rys. 17. Schemat układu pomiarowego do badania rozproszenia światła.

Kuwetki pomiarowe wykorzystywane w eksperymencie wykonane były ze szkła kwarcowego lub z kalibrowanego szkła optycznego. Ich przygotowanie obejmowało wielokrotne przepłukiwanie ciepłą wodą destylowaną, a na końcu oczyszczoną wodą dejonizowaną, wolną od kurzu. Ostatecznie kuwetki starannie suszono .

Przed przystąpieniem do pomiarów przygotowane próbki przefiltrowano za pomocą filtrów Millex-GV o średnicy porów równej  $0,22 \mu\text{m}$  do wcześniej oczyszczonej i osuszonej kuwety i odwirowano przez 30 minut z prędkością  $8000 \text{ rpm}$  w temperaturze  $293\text{K}$ . Podczas pomiarów, temperatura próbek była kontrolowana i stabilizowana przy użyciu termostatu (*firmy* Haake) z dokładnością  $0,1\text{K}$ .

Do analizy zmierzonych funkcji autokorelacji fotonów zmierzonej podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu stosowano program CONTIN.

Program ten oparty jest na procedurach zaproponowanych przez Stevena Provenchera [70]. Definiuje się zmierzoną funkcję korelacji fotonów jako transformatę Laplace'a

funkcji  $w(\Gamma)$ , która to opisuje ciągły rozkład stałych zaniku procesów relaksacyjnych typu  $e^{-\Gamma t}$ :

$$g_1(\tau) = L[w(\Gamma)] = \int_0^{\infty} e^{-\Gamma\tau} w(\Gamma) d\Gamma \quad (7)$$

$\Gamma$  - szybkość zaniku funkcji korelacji dla danego procesu (rodzaju cząsteczek (składników)) biorącego udział w procesie rozpraszania światła,  $w(\Gamma)$  - rozkład stałych zaniku.

Wyznaczenie rozkładu stałych zaniku  $w(\Gamma)$  na podstawie funkcji korelacji fotonów otrzymanej podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach białka oparte jest na obliczeniu odwrotnej transformaty Laplace'a  $w(\Gamma) = L^{-1}[g_1(\tau)]$ . Istnieje jednak wiele rozkładów  $w(\Gamma)$  spełniających w granicach niepewności pomiarowych równanie (6). W tym celu nałożono określone ograniczenia na postać funkcji  $w(\Gamma)$ . Wykorzystywany algorytm zawiera warunek nieujemności szukanego rozwiązania.

Program CONTIN wykorzystuje metodę wygładzania opartą na pomysłe Tikhonova. Algorytm ten zamiast sumy kwadratów odchyłeń punktów pomiarowych od dopasowanej krzywej, minimalizuje funkcję postaci

$$\chi^2(\alpha) = \sum \frac{1}{\sigma_i^2} (g_i - \int K(t, \Gamma) w(\Gamma) d\Gamma)^2 + \alpha \|\mathfrak{S}w(\Gamma)\|^2 \quad (8)$$

gdzie  $\sigma_i$  jest niepewnością  $i$ -tego punktu,  $\mathfrak{S}$  jest operatorem działającym na funkcji  $w(\Gamma)$  (standardowo jest to operator drugiej pochodnej, a  $\alpha$  jest tzw. parametrem wygładzania).

Program CONTIN rozwiązuje równanie dla szeregu wartości parametru  $\alpha$ . Na podstawie testu F Fishera obliczona jest wartość prawdopodobieństwa odrzucenia danego rozwiązania. Jeżeli wartość prawdopodobieństwa odrzucenia rozwiązania  $\alpha$  jest większa od 0.5, oznacza to taki stopień wygładzenia, który powoduje utratę informacji o badanym układzie. Wartości  $\alpha < 0.5$  oznaczają, że otrzymane rozwiązania w zbyt dużym stopniu reagują na szumy pomiarowe. Program typuje rozwiązanie, dla którego prawdopodobieństwa odrzucenia przyjmuje wartość najbliższą 0.5.

Na podstawie wyznaczonych w ten sposób wartości stałych zaniku funkcji korelacji fotonów obliczono wartości współczynnika dyfuzji translacyjnej lizozymu korzystając z zależności postaci:

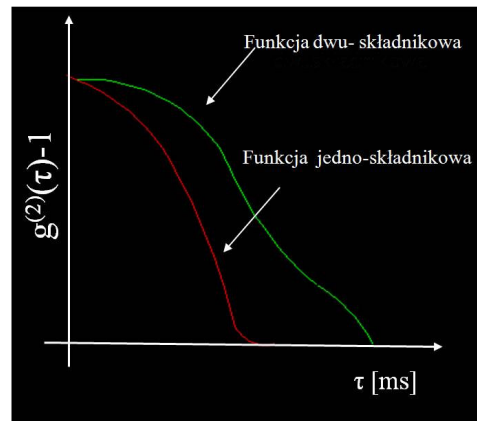
$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (9)$$

gdzie  $q$  – oznacza wartość wektora rozpraszania. Wielkość tą definiujemy jako  $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2}$ ,  $n$  – współczynnik załamania,  $\lambda$  – długość fali światła padającego.

Na podstawie otrzymanych wartości  $D_T$  dla danego stężenia białka przy stałym stężeniu etanolu w roztworze, wykonano wykres zależności  $D_T$  od stężenia lizozymu,  $c$ , w celu otrzymania ekstrapolowanej do zerowego stężenia białka wartości współczynnika dyfuzji własnej  $D_0$  lizozymu. Wartość tego parametru wykorzystano następnie w obliczeniach promienia hydrodynamicznego cząsteczek lizozymu (przy założeniu o symetrii sferycznej cząsteczki) korzystając z zależności postaci:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (10)$$

gdzie  $k_B T$  – oznacza czynnik Boltzmanna,  $\eta$  – lepkość rozpuszczalnika,  $R$  – promień kuli opisującej cząsteczkę lizozymu.



Rys. 18. Modelowe funkcje korelacji fotonów zmierzone podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach białka, dla próbki monodispersyjnej gdzie obserwujemy tylko monomery białka (funkcja jednoskładnikowa) oraz dla próbki składającej się z dwóch rodzajów cząsteczek (funkcja dwu-składnikowa).

### 3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego

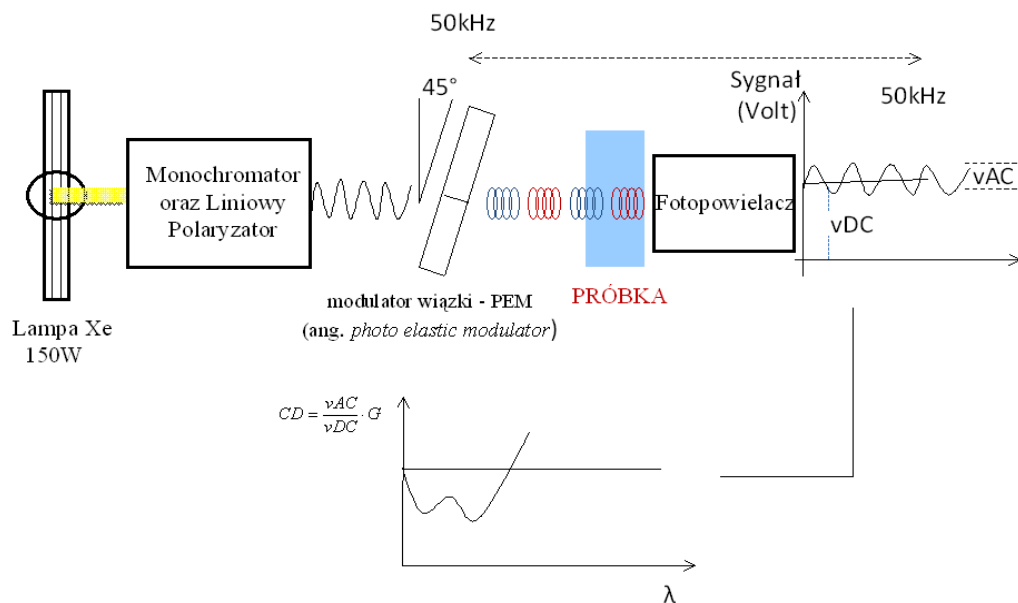
Analiza widm dichroizmu kołowego jest doskonałym źródłem wiedzy na temat zmian w strukturze drugorzędowej białka, wywołanych szeregiem czynników fizycznych i chemicznych. Za pomocą tego typu pomiarów można w łatwy i precyzyjny sposób rozpoznać zmiany strukturalne prowadzące do denaturacji i agregacji białka. Widmo dichroizmu kołowego w zakresie dalekiego UV zawiera informacje o zawartości poszczególnych elementów struktury drugorzędowej w strukturze przestrzennej białka. W eksperymentalnym widmie CD dla białka zbudowanego z helis  $\alpha$  możemy wyszczególnić trzy charakterystyczne pasma: dwa minima dla  $\lambda = 222\text{nm}$  (związane z przejściem  $n \rightarrow \pi^*$ ) i  $\lambda = 208\text{nm}$  (związane z przejściem  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) oraz jedno maksimum dla  $\lambda = 192\text{nm}$  (związane z przejściem  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Ponieważ dla struktury  $\beta$  widmo CD związane jest z dwoma przejściami  $\pi - \pi^*$ , obserwujemy dwa pasma: minimum dla  $\lambda = 218\text{nm}$  oraz maksimum dla  $\lambda = 195\text{nm}$  [71].

Widma CD w zakresie dalekiego i bliskiego UV (od 190nm – 320nm) dla lizozymu (o stężeniu w zakresie 2-8 mg/ml) w wodnym roztworze etanolu (o stężeniu zmieniającym się od 0 – 85% (v/v)) zostały rejestrowane na spektropolarymetrze firmy *Jasco* (model J-810). Temperatura badanych próbek wyniosła 293K. Badania wykonano w laboratorium Zakładu Stereochemii Organicznej na Wydziale Chemii, którego kierownikiem jest prof. Gawroński. Pomiary widm CD były prowadzone przy współpracy z dr Karolem Kacprzykiem.

Schemat układu pomiarowego do badania dichroizmu kołowego przedstawiono na rys.19. Źródłem światła jest lampa ksenonowa o mocy 150W. Wiązka światła po przejściu przez podwójny, pryzmatyczny monochromator oraz liniowy polaryzator pada na modulator. Jest to element piezoelektryczny, który oscyluje z częstotliwością rezonansową równą około 50kHz. Rolą tego elementu jest zamiana polaryzacji światła z liniowej na kołową (prawoskrętną i lewoskrętną).

Wzmacniacz to urządzenie (pracuje z częstotliwością modulatora) służące do pomiaru różnicy natężenia promieniowania spolaryzowanego prawoskrętnie i lewoskrętnie po przejściu przez badaną próbkę (vAC). Jednocześnie fotopowielacz rejestruje średnią wartość natężenia promieniowania (vDC). Miarą dichroizmu kołowego jest stosunek wartości vAC oraz wartości vDC pomnożony przez współczynnik kalibracji (G). Wynik pojedynczego pomiaru nazywany jest w tym przypadku eliptycznością.

Do badań wykorzystano kuwety kwarcowe (firmy *NSG Precision Cell*) o długościach dróg optycznych równych odpowiednio 0.1 mm (dla pomiarów widm CD w zakresie dalekiego UV) oraz 1 mm (dla pomiarów widm CD w zakresie bliskiego UV). Dla każdej próbki wykonano czterokrotny pomiar widm CD, uśredniono oraz odjęto od nich widmo CD dla czystego rozpuszczalnika (etanolu o stężeniu w zakresie 0 – 85% (v/v)).



Rys. 19. Schemat układu pomiarowego do badania dichroizmu kołowego.

W obliczeniach udziału procentowego poszczególnych struktur drugorzędowych w strukturze przestrzennej lizozymu wykorzystano algorytm obliczeniowy CONTIN dostępny *on-line* na serwerze obliczeniowym DichroWeb. Wyniki obliczeń przedstawione są w formie graficznej oraz w formie tabeli, zawierającej informacje na temat procentowego udziału poszczególnych struktur drugorzędowych. W formie graficznej przedstawione jest teoretyczne i eksperymentalne widmo CD oraz krzywa będąca różnicą pomiędzy tymi dwoma widmami. O jakości dopasowania krzywej

obliczonej do krzywej eksperymentalnej informuje parametr nazwany *Normalized Root Mean Square Deviation (NRMSD)*, zdefiniowanym w postaci

$$[\sum (\theta_{\text{exp}} - \theta_{\text{cal}})^2 / \sum (\theta_{\text{exp}})^2]^{1/2} \quad (11)$$

W przypadku kiedy parametr ten przyjmuje wartość mniejszą od 0.1, jakość dopasowania jest akceptowana, a otrzymane wyniki obliczeń można przyjąć za poprawne.

Algorytm obliczeniowy CONTIN rozpatruje eksperymentalne widmo CD jako liniową kombinację 16 ( $N_\gamma$ ) widm CD ( $R_j(\lambda)$ ) białek, których struktura jest znana na podstawie badań krystalograficznych [72]:

$$y(\lambda) = \sum_{j=1}^{N_\gamma} \gamma_j R_j(\lambda) \quad (12)$$

gdzie  $y(\lambda)$  - oznacza eksperymentalne widmo CD badanego białka,  $R_j(\lambda)$  - widm CD białka, którego struktura jest znana na podstawie badan krystalograficznych,  $\gamma_j$  - pewna stała.

Celem obliczeń jest wyznaczenie ilości (frakcji) reszt aminokwasowych w badanym białku ( $f_i$ ), które tworzą daną klasę konformacyjną:

$$f_i = \sum_{j=1}^{N_\gamma} \gamma_j F_{ji} \quad i = 1, \dots, N_f \quad (13)$$

gdzie  $F_{ji}$  - oznacza frakcję reszt aminokwasowych białka „j” w klasie konformacyjnej „i”. Natomiast stała  $\gamma_j$  jest wyznaczona na podstawie wartości średniej eliptyczności przypadającej na aminokwas w funkcji długości fali  $y_{\text{obsd}}(\lambda_k)$  oraz korzystając z zależności w postaci:

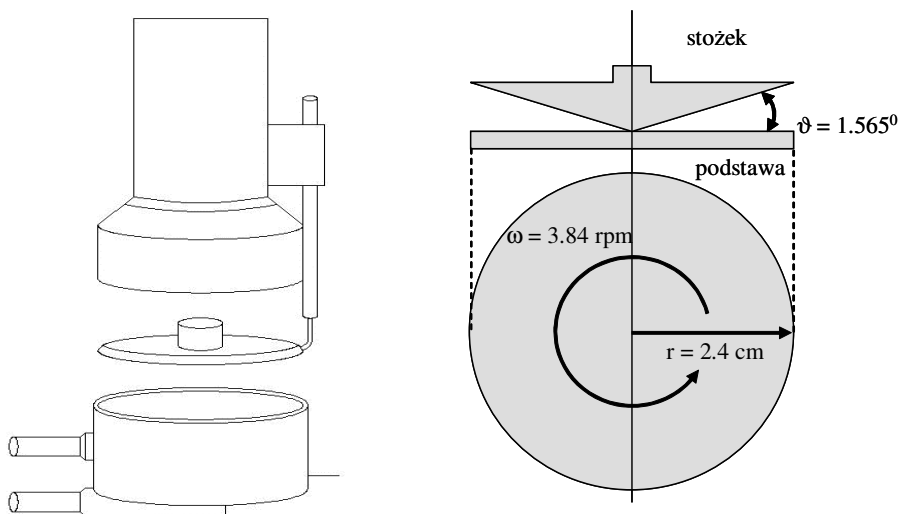
$$\sum_{k=1}^{N_\gamma} [y(\lambda_k) - y_{\text{obsd}}(\lambda_k)]^2 + \alpha \sum_{j=1}^{N_\gamma} \left( \gamma_j - \frac{1}{N_\gamma} \right)^2 = \text{minimum} \quad \text{zakładając, że}$$

$$\sum_{i=1}^{N_f} f_i = 1 \quad f_i \geq 0 \quad i = 1, \dots, N_f. \quad (14)$$

### 3.4. Reologia

Molekularne własności badanego koloidu są podstawą makroskopowych własności lepko – sprężystych roztworów. Analiza zmian właściwości reologicznych układu woda – etanol – lizozym jest bowiem doskonałym źródłem wiedzy na temat oddziaływań intermolekularnych między cząsteczkami lizozymu. Metoda ta opiera się na analizie krzywych lepkości oraz krzywych płynięcia. Na podstawie tych wyników można między innymi uzyskać informacje o orientacji cząsteczek, zmianach w ich wzajemnym oddziaływaniu pod wpływem przyłożonej siły. Wzrost lepkości koloidu może również wskazywać na proces denaturacji białka lub proces powstawania agregatów białkowych [73].

Pomiary lepkości wodnego roztworu lizozymu z dodatkiem etanolu oraz soli (NaCl o różnym stężeniu) zostały wykonane w laboratorium Zakładu Akustyki Molekularnej przy współpracy z prof. Tomaszem Hornowskim. Badania wykonano za pomocą reometru firmy Brookfield, stosując układ stożek – płytka (stosowano stożki typu LV- 42 oraz LV-52). Badany koloid o objętości 1ml (przy zastosowaniu stożka LV- 42 ) lub objętości 0.5ml (dla stożka LV-52) znajdował się w szczelinie pomiędzy nieruchomą płytką a stożkiem (Rys.20).



Rys.20. A) Schemat reometru firmy Brookfield; B) Niektóre parametry stożka LV-42 stosowanego w badaniach reologicznych.

W wyniku zastosowania różnej prędkości obrotu stożka powstawało różne naprężenie ścinające. Podczas pomiarów jednocześnie określano wartość szybkości ścinania (dla stożka typu LV-42 szybkość ścinania określano jako iloczyn ilości obrotów stożka w czasie jednej minuty i liczby 3.84), naprężenia ścinające oraz lepkość badanej cieczy. Podczas pomiarów, temperatury próbek były kontrolowane i stabilizowane (temperatura wszystkich badanych próbek wynosiła 298K) przy użyciu termostatu (Brookfield TC 500) z dokładnością 0,1K.

W celu analizy procesu agregacji badanego białka wyznaczono lepkość graniczną, która zależy od wielkości i kształtu makrocząsteczki. Jest to wielkość, która charakteryzuje pojedynczą molekułę. Lepkość graniczną definiuje się jako [74]

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left[ \frac{1}{c} \left( \frac{\eta_r}{\eta_0} - 1 \right) \right] \quad (15)$$

gdzie:  $[\eta]$  – lepkość graniczna,  $\frac{\eta_r}{\eta_0} - 1$  - lepkość właściwa,  $\eta_r$  - lepkość roztworu,

$\eta_0$  - lepkość fazy rozpraszającej,  $c$  - stężenie roztworu wyrażone w  $\text{g/cm}^3$ .

Przeprowadzając ekstrapolację lepkości właściwej podzielonej przez stężenie roztworu lizozymu do wartości zerowej stężenia białka, wyznacza się lepkość graniczną badanego koloidu.

### 3.5. Pomiary gęstości właściwej

Gęstość upakowania atomów w molekułę białka jest bezpośrednio związana z właściwościami wolumetrycznymi. Ponieważ gęstość właściwa jest wielkością informującą nie tylko o objętości badanej cząsteczki białka ale również o oddziaływaniach z środowiskiem, dlatego zmiany tego parametru pozwalają śledzić wpływ różnych czynników fizycznych lub chemicznych na konformację białka.

Gęstość właściwa jest zdefiniowana jako [75]

$$\bar{v}^o = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( 1 - \frac{d-c}{d_0} \right) \quad (16)$$

gdzie  $d$  – jest to gęstość roztworu białka,  $c$  – stężenie białka wyrażone w  $[\text{g}/\text{cm}^3]$ ,  $d_0$  - gęstość fazy rozpraszającej.

Pomiary gęstości były prowadzone w laboratorium Akustyki Molekularnej przy współpracy z prof. Tomaszem Hornowskim. Pomiary wykonano za pomocą gęstościomierza Anton-Parar typ DMA 38. Przyrząd ten wykorzystuje oscylującą szklaną tubę w kształcie litery U, w której znajduje się badany roztwór koloidalny o objętości 2ml. Gęstościomierz ten wyposażony jest w termostat elektroniczny. Za pomocą przyrządu dokonuje się pomiaru gęstości w zakresie  $0 - 3 \times 10^3 \text{ kg}/\text{m}^3$  z dokładnością  $10^{-4} \text{ kg}/\text{m}^3$ . Temperatura badanych próbek wynosiła 298K. Wartości gęstości roztworu lizozymu odczytywano po 15min (w celu stabilizacji próbki) od momentu wprowadzenia roztworu białka do szklanej tuby.

### 3.6. Próba spektrofotometryczna z wykorzystaniem barwnika – czerwień Kongo

Struktura agregatów lizozymu była analizowana metodą spektrofotometryczną z użyciem czerwieni Kongo. Metoda ta pozwala wykryć oddziaływanie barwnika z formami włóknistymi. Jest zatem bardzo prostą lecz niezwykle efektywną metodą identyfikacji agregatów białka jako protofilamentów i włókien amyloidowych. Opiera się ona bowiem na procesie rozpoznawania molekularnego.

Roztwór czerwieni Kongo o stężeniu  $100 \mu\text{M}$  został przygotowany w buforze o składzie:  $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $2,7\text{mM KCl}$ ,  $137\text{mM NaCl}$  oraz  $10\%$  EtOH. Alkohol etylowy został dodany do buforu w celu przeciwdziałania tworzeniu się miceli barwnika. Bezpośrednio przed wykonaniem pomiarów widm absorpcji barwnika

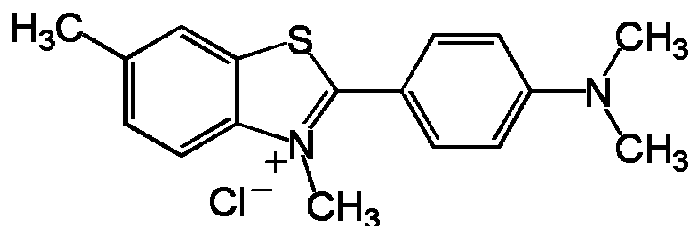
przygotowany roztwór czerwieni Kongo oczyszczono za pomocą filtrów o średnicy porów 0,2 $\mu$ m

Roztwór zawierający czerwień Kongo oraz białko otrzymano przez zmieszanie w odpowiednim stosunku objętościowym roztworu lizozymu (o stężeniu w zakresie 2-20mg/ml w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0 – 85% (v/v)) oraz przygotowanego roztworu czerwieni Kongo. Końcowe stężenie barwnika wynosiło 5 $\mu$ M (całkowita objętość otrzymanego roztworu wynosiła 1mL). Przed pomiarem widm absorpcji przygotowany roztwór inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Do pomiarów absorpcji wykorzystano dwu-wiązkowy spektrofotometr HITACHI2000. Widma absorpcji barwnika zmierzono w zakresie długości fali od 400 do 650 nm. Do pomiarów wykorzystano kuwety wykonane ze szkła kwarcowego. Temperatura badanych próbek wynosiła 293K. Pod wpływem oddziaływania czerwieni Kongo z włóknami amyloidowymi obserwowano zmianę w widmie absorpcji tego barwnika. Maksimum absorpcji przesunięte jest w kierunku fal dłuższych w stosunku do widma absorpcji barwnika w stanie wolnym – niezwiązanym (maksimum absorpcji dla długości fali  $\lambda = 498$  nm).

### 3.7. Pomiary natężenia fluorescencji z wykorzystaniem tioflawiny

#### T<sub>1</sub>.

Barwnik tioflawina T<sub>1</sub> posiada zdolność do tworzenia miceli gdy jej stężenie przekroczy wartość 4  $\mu$ M. Wiązanie się miceli tego barwnika do włókien amyloidowych powoduje wzrost natężenia fluorescencji w widmie emisji. Przypuszcza się, że tworzenie kompleksu barwnik – włókna amyloidowe wynika z ich specyficznej struktury. Struktura chemiczna barwnika przedstawiona jest na Rys.21.



Rys 21. Struktura chemiczna barwnika fluorescencyjnego – tioflawiny T1 [76].

Barwnik ten posiada hydrofobowy koniec z dimetylową grupą przyłączoną do grupy fenylowej, która to związana jest z bardziej polarnym pierścieniem benzotialowym zawierającym polarny azot i siarkę. Kombinacja regionów polarnych i hydrofobowych barwnika powoduje tworzenie miceli w wodnym roztworze. Przypuszcza się, że specyficzne tworzenie kompleksu barwnik - włókna związane jest z tworzeniem wiązania wodorowego pomiędzy grupą tiazolowi, posiadającą azot w cząsteczce barwnika i grupą hydroksylową włókna [75]. Oddziaływanie tioflawiny z włóknami powoduje wzrost natężenia fluorescencji barwnika dla długości fali  $\lambda = 482$  nm.

Roztwór tioflawiny T<sub>1</sub> o stężeniu 2,5 mmol/L został przygotowany w buforze fosforanowym o składzie 10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mmol/L NaCl i pH = 7.0.

W ramach niniejszej pracy wykonano pomiary natężenia fluorescencji barwnika w obecności lizozymu (c=4.5mg/ml) w 80% (v/v)) etanolu dla różnych czasów inkubacji roztworu białka. Roztwór zawierający tioflawinę T<sub>1</sub> oraz białko otrzymano przez zmieszanie tych dwóch składników w odpowiednim stosunku objętościowym. Końcowe stężenie barwnika wynosiło 0.050mM a stężenie białka 0.003mM (całkowita objętość otrzymanego roztworu wynosiła 1.5mL).

Widma fluorescencji tioflawiny zmierzono w zakresie długości fali od 450 do 550 nm (fala wzbudzająca  $\lambda = 440$  nm).

Analiza otrzymanych widm polegała na obserwacji wzrostu natężenia fluorescencji kompleksu barwnik - białko dla długości fali  $\lambda = 482$  nm w funkcji czasu.

Metodę fluorymetryczną wykorzystano również do badania wpływu kwasu askorbinowego,- oraz kwasu acetylosalicylowego na odwracalność procesu agregacji uporządkowanej.

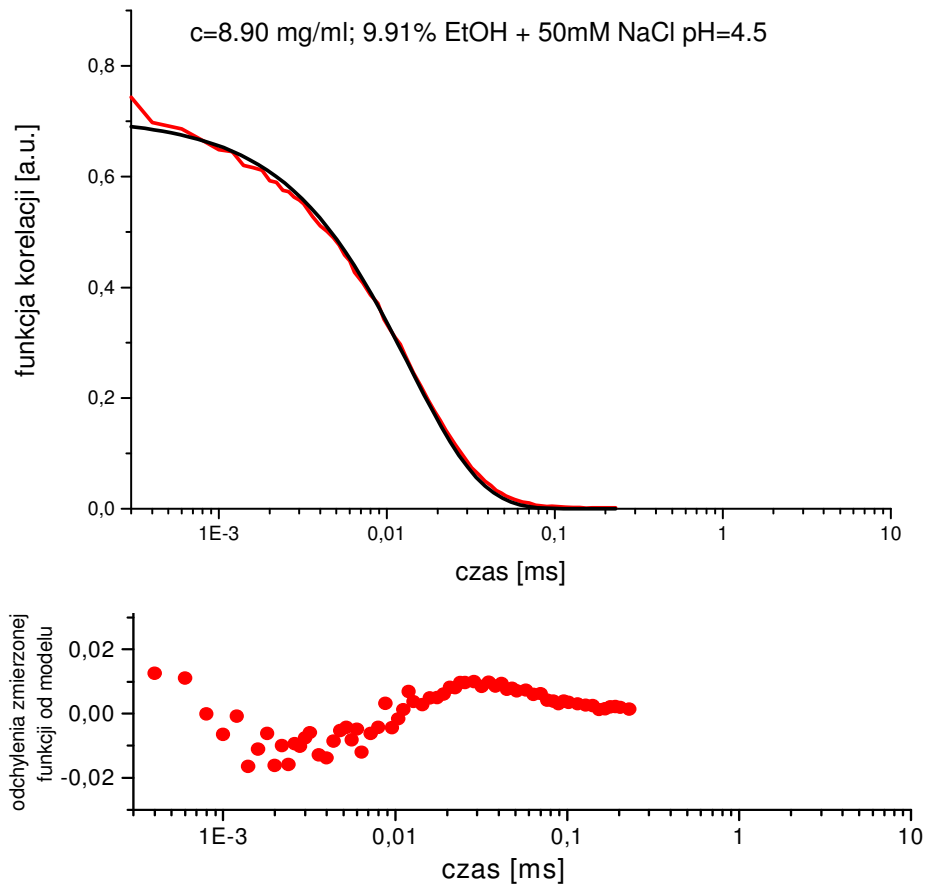
Roztwór zawierający tioflawinę T<sub>1</sub>, białko (w postaci agregatów włóknistych), kwas askorbinowy lub acetylosalicylowy otrzymano przez zmieszanie tych trzech składników w odpowiednim stosunku objętościowym. Końcowe stężenie barwnika wynosiło 0.050 mmol/L, stężenie białka 0.003 mmol/L a stężenie kwasu askorbinowego lub acetylosalicylowego w zakresie 0.1 – 6.5 mg/ml (całkowita objętość otrzymanego roztworu wynosiła 1.5 mL). Wszystkie pomiary były prowadzone w laboratorium Zakładu Elektroniki Kwantowej przy współpracy z dr Jerzym Karolczakiem. Pomiary wykonano za pomocą spektrofluorymetru typu HNA 188-S. Temperatura badanych próbek wyniosła 293K.

## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1. Proces denaturacji białka w roztworach (zmiany konformacyjne cząsteczek lizozymu)

Jedną z pierwszych analiz procesu denaturacji białka dotyczyła denaturacja termiczna roztworu lizozymu ( $\text{pH} = 4.5$ ,  $\text{HCl}$ ,  $0.2 \text{ mol/L KCl}$ ) [77]. Krzywa zmian promienia cząsteczki białka w funkcji temperatury była opisana funkcją sigmoidalną. Jedną ze skrajnych wartości odpowiada stanowi natywnemu druga denaturacji. Inny model zakłada istnienie stanu pośredniego białka powstałego w wyniku dehydratacji i zaburzenia struktury trzeciorzędowej i drugorzędowej białka. Obecnie intensywne badania poświęcone procesowi denaturacji i agregacji białek wiążą się niewątpliwie z faktem, że indukowana w tym procesie forma pośrednia białka, w postaci częściowo rozplecionego łańcucha peptydowego jest ściśle związana z patologicznymi zmianami w funkcjonowaniu organizmu.

W ramach niniejszej pracy dokonano analizy procesu denaturacji lizozymu w obecności etanolu. Analiza dotyczyła zmian współczynnika dyfuzji translacyjnej oraz zmian promienia hydrodynamicznego cząsteczki lizozymu wywołanych etanolem (0% - 12% (v/v)) oraz po dodaniu soli – NaCl (50 mmol/L NaCl). Na rysunku 21 przedstawiono funkcję korelacji fotonów zmierzoną podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu i rejestrowanego pod kątem  $90^\circ$  (lizozym o stężeniu  $c = 8.90 \text{ mg/ml}$  w roztworze etanolu (9.91% (v/v)) i 50 mmol/L NaCl  $\text{pH} = 4.5$ ). Wyznaczone w eksperymencie funkcje korelacji fluktuacji natężenia światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu dopasowano do pojedynczych funkcji wykładniczych. Przyjęto zatem założenie, że w wybranych warunkach lizozym występuje w postaci monomerów białkowych. Zatem analiza może dotyczyć tylko zmian konformacyjnych monomerycznych cząsteczek białka.

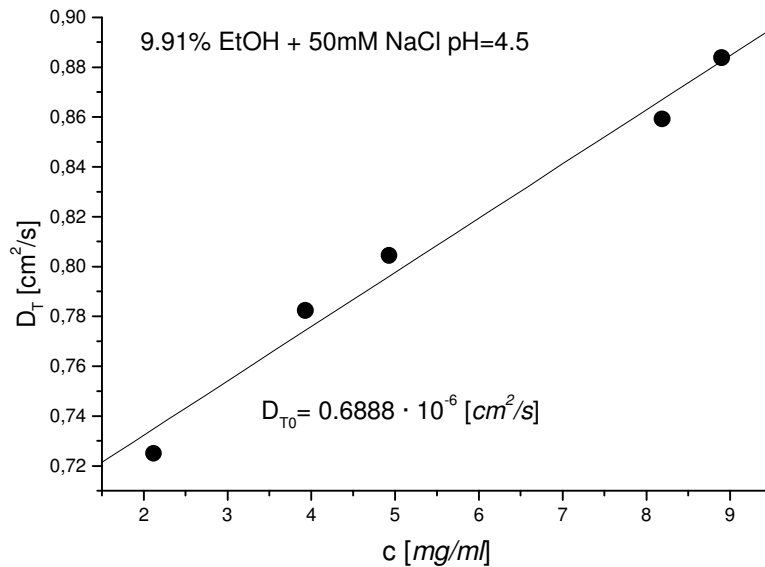


Rys.22. Funkcja korelacji fotonów zmierzona podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu (kolor czerwony) ( $c=8.90$  mg/ml) w roztworze etanolu o stężeniu 9.91% (v/v) i 50mM NaCl; pH=4.5 oraz dopasowana funkcja teoretyczna (kolor czarny). Poniżej przedstawiono odchylenia zmierzonej funkcji korelacji fotonów od dopasowanej funkcji teoretycznej.

Rysunek 23 przedstawia zależność współczynnika kolektywnej dyfuzji translacyjnej  $D_T$  badanego białka od stężenia lizozymu w etanolu ( $c_{\text{EtOH}}=9.91\%$  (v/v) i 50mmol/L NaCl; pH=4.5). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia lizozymu w próbce, wartość współczynnika dyfuzji również rośnie. Jest to wynik oddziaływań międzycząsteczkowych.

Na podstawie obliczonych wartości  $D_T$ , wykonano wykres zależności  $D_T$  od stężenia lizozymu (dla danego stężenia etanolu w roztworze) w celu otrzymania

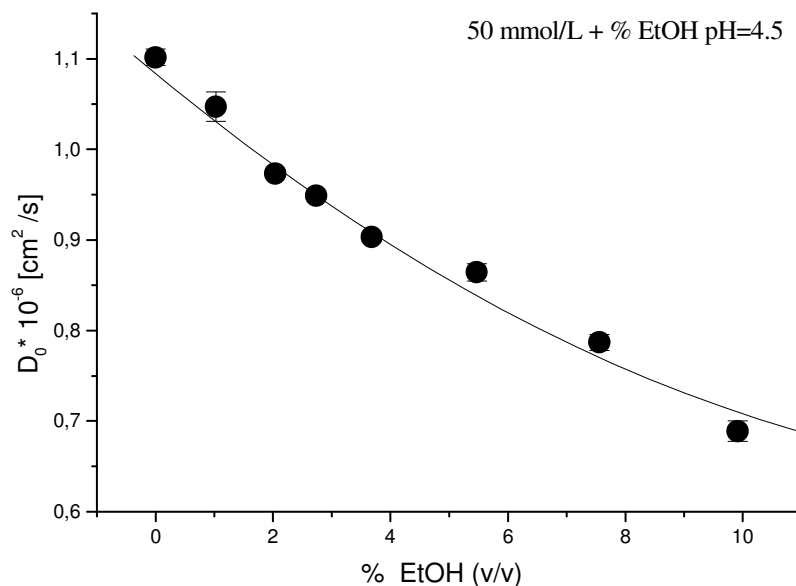
ekstrapolowanej do zerowego stężenia białka wartości współczynnika dyfuzji translacyjnej własnej  $D_0$  lizozymu.



Rys.23. Zmiany współczynnika dyfuzji translacyjnej lizozymu w funkcji stężenia badanego białka w roztworze zawierającym etanol (9.91% (v/v) i NaCl (50mmol/L); pH=4.5.

Wyznaczono zmiany współczynników dyfuzji własnej roztworów lizozymu w funkcji stężenia etanolu po dodaniu NaCl (50mmol/L NaCl) (Rys.24). Widać, że wartość  $D_{T0}$  zmienia się od  $1,102 \cdot 10^{-6} cm^2/s$ , przy braku etanolu, do  $0,689 \cdot 10^{-6} cm^2/s$ , gdy stężenie etanolu wynosi 9.91% (v/v).

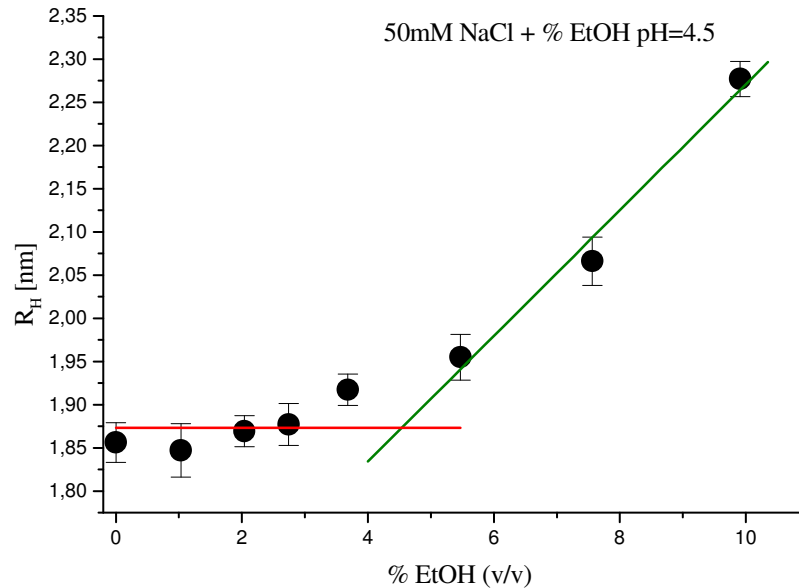
Zmiany promienia hydrodynamicznego cząsteczki lizozymu mogą być podstawą analizy zmian w konformacji molekuł białka. W obliczeniach promienia hydrodynamicznego założono, że cząsteczkę lizozymu możemy traktować jako obiekt kulisty. Wyznaczono wartość graniczną stężenia etanolu ( $c_{EtOH} = 4.54\%$  (v/v)) (Rys.25), przy której rozpoczyna się proces zmian strukturalnych lizozymu. Można zatem założyć, że wartość  $R_H$  pozostaje stała (1.873 nm), aż do momentu gdy ilość etanolu osiągnie poziom 4.54% (v/v). Obecność coraz większej liczby cząsteczek alkoholu wpływa na wzrost  $R_H$  do wartości 2.28nm ( $c_{EtOH} = 9.91\%$  (v/v)).



Rys. 24. Zmiana współczynnika dyfuzji translacyjnej własnej  $D_0$  lizozymu w funkcji stężenia etanolu po dodaniu 50mmol/L NaCl. W każdym przypadku wartość  $D_0$  wyznaczono przez ekstrapolację wyników pomiaru do zerowego stężenia lizozymu.

Obserwowany wzrost  $R_H$  oznacza rozpoczęcie procesu zmian strukturalnych wywołanych solwatacją etanolem gdy  $c_{\text{EtOH}} = 4.54\%$  (v/v). Naruszenie struktury otoczki hydratacyjnej powoduje, że natywna, zwarta struktura białka staje się bardziej elastyczna. Destabilizacja funkcjonalnej struktury lizozymu powoduje bowiem odsłanianie pewnych regionów cząsteczki takich jak poszczególne grupy hydrofobowe. Tego typu zmiany prowadzą do wzrostu całkowitego ładunku co wpływa na zmianę oddziaływań elektrostatycznych cząsteczki białka. W rezultacie wzrasta prawdopodobieństwo tworzenia się nowych, -intermolekularnych oddziaływań prowadzących do procesu agregacji białka. Podobne zmiany  $R_H$  dla cząsteczki lizozymu w 50 mmol/L buforze fosforanowym w funkcji stężenia etanolu obserwował Gierszewski [68]. Wartość promienia hydrodynamicznego rosła od wartości 1.811 nm (gdy stężenie etanolu osiągnęło wartość  $c_{\text{EtOH}} = 5.84\%$ ) do wartości 2.35 nm. Posługując się metodą statycznego rozpraszania światła, autorzy cytowanej pracy wyznaczyli również zmianę drugiego współczynnika wirialnego  $B_2$  w funkcji stężenia

etanolu. Parametr ten ma wartość dodatnią i maleje wraz ze wzrostem ilości alkoholu w roztworze. Takie zmiany tłumaczy się występowaniem elektrostatycznych oddziaływań odpychających pomiędzy cząsteczkami białka.



Rys. 25. Zmiana promienia hydrodynamicznego  $R_H$  cząsteczki lizozymu w roztworach o różnym stężeniu etanolu po dodaniu 50 mmol/L NaCl.

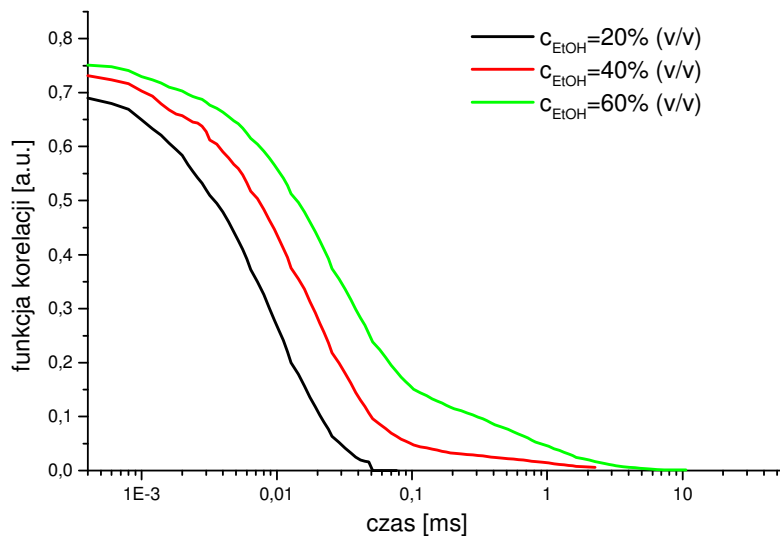
#### 4.2. Diagram zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu w roztworze

##### 4.2.1. Zmiany współczynnika dyfuzji translacyjnej. Analiza procesu agregacji białka

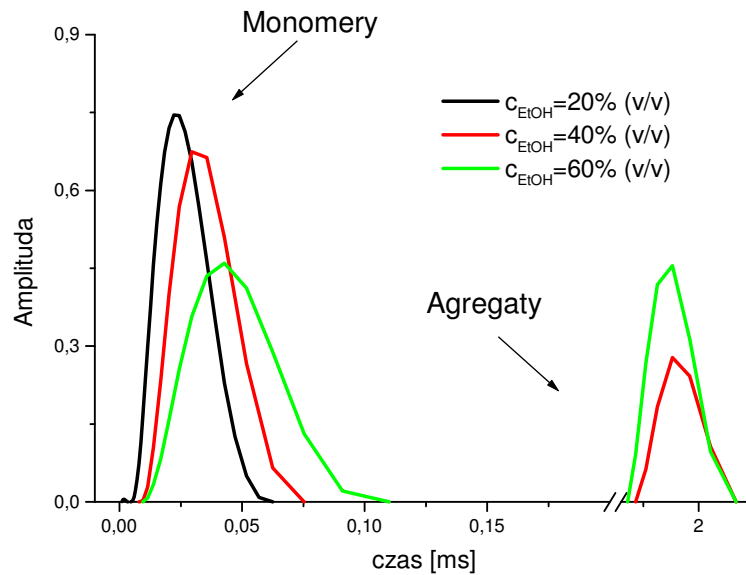
Pomimo wielu badań *in vitro* poświęconych procesowi tworzenia amyloidów, mechanizm tego procesu na poziomie molekularnym nadal jest słabo poznany. Warunki tworzenia się amyloidów zależą bowiem od różnych czynników fizycznych i chemicznych takich jak: temperatura, obecności rozpuszczalnika organicznego lub soli,

pH roztworu oraz stężenie białka. Wszystkie te parametry są ze sobą powiązane. Szczegółowa analiza procesu agregacji lizozymu w funkcji stężenia etanolu wykonana metodą dynamicznego rozpraszania światła pozwoliła na wyznaczenie diagramu zmian strukturalnych.

Na rysunku 26 przedstawiono funkcje korelacji fotonów wyznaczone w eksperymencie rozpraszania światła na cząsteczkach lizozymu o stężeniu  $c = 20.3 \text{ mg/ml}$ . Funkcje korelacji fluktuacji natężenia światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu w wodnym roztworze etanolu o stężeniu od 10 % do 30 % dopasowano pojedynczą funkcją wykładniczą. Natomiast, wraz ze wzrostem etanolu w roztworze białka, funkcje korelacji fotonów wyznaczone w eksperymencie rozpraszania światła na cząsteczkach lizozymu dopasowano do funkcji dwu - wykładniczej (dla  $c_{\text{EtOH}} = 40 \text{ \% (v/v)}$ ). Zarejestrowana w eksperymencie funkcja korelacji fotonów jest zatem sumą dwóch funkcji korelacji, z których każda opisuje proces rozpraszania na cząsteczek białka danego rodzaju. Warto zaznaczyć, że średnia ta jest ważona cząstkowym stężeniem molekuł danego rodzaju oraz ich zdolnością rozpraszania światła. Na podstawie wyznaczonych w ten sposób wartości stałych zaniku funkcji korelacji fotonów obliczono wartości współczynnika dyfuzji translacyjnej lizozymu (7).



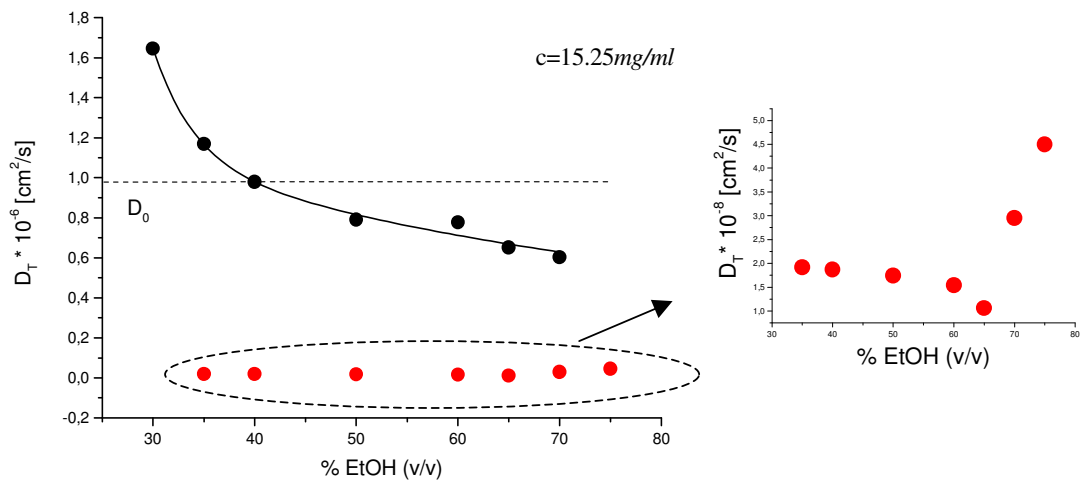
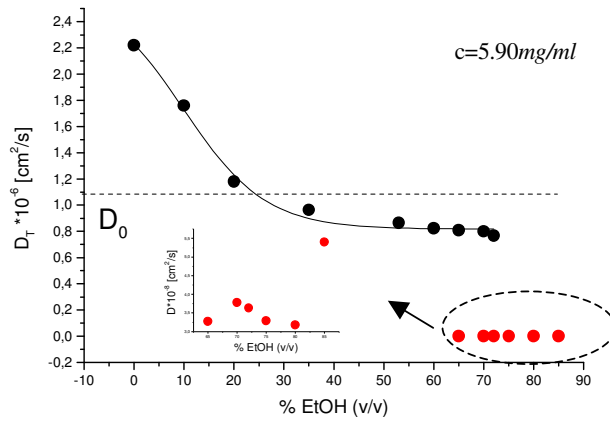
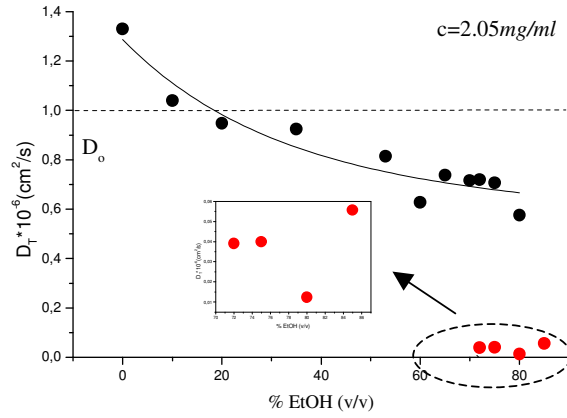
Rys. 26. Funkcja korelacji fotonów wyznaczona podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu o stężeniu 20.3 mg/ml zarejestrowana dla trzech różnych zawartości etanolu w roztworze.

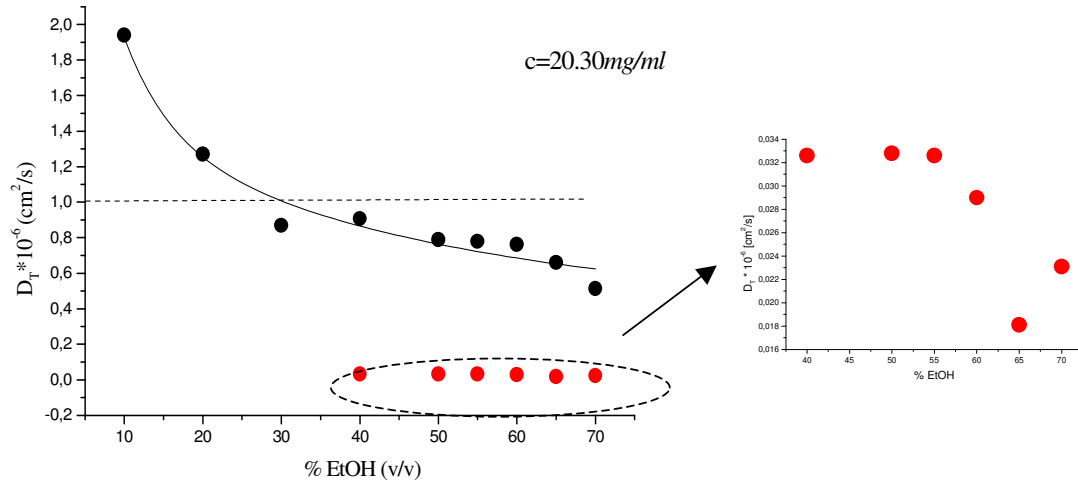


Rys. 27. Rozkład czasów zaniku funkcji korelacji fotonów zmierzonej podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu o stężeniu 20.3 mg/ml zarejestrowana dla trzech różnych zawartości etanolu w roztworze.

Jednocześnie pokazano rozkład czasów zaniku funkcji korelacji fotonów zmierzonej podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu, obliczonych przy pomocy odwrotnej transformaty Laplace'a (Rys.27).

Na rysunku 27 wyraźnie widoczne są dwa składniki (dla  $c_{\text{EtOH}} = 40\%$ ). Pierwszy z nich to monomer, a drugi to tworzący się agregat. Udział drugiego składnika zwiększał się wraz ze wzrostem etanolu w roztworze, natomiast udział pierwszego składnika ulega zmniejszeniu. Ostatecznie, przy stężeniu etanolu równym  $c_{\text{EtOH}} = 72\%$  (v/v), obserwowano tylko jeden składnik w rozkładzie czasów zaniku. Funkcję korelacji fotonów zmierzoną podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu (agregatach białkowych) dopasowano do pojedynczej funkcji wykładniczej.





Rys. 28. Wartość współczynnika dyfuzji dla dwóch rodzajów cząsteczek lizozymu: monomerów (kolor czarny) i agregatów (kolor czerwony) (stężenie białka w zakresie 2.05 ÷ 20.30 mg/ml) w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0 ÷ 85 % (v/v). Linia przerywana określa wartość granicznego współczynnika dyfuzji dla lizozymu w wodnym roztworze  $D_0 = 1.02 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

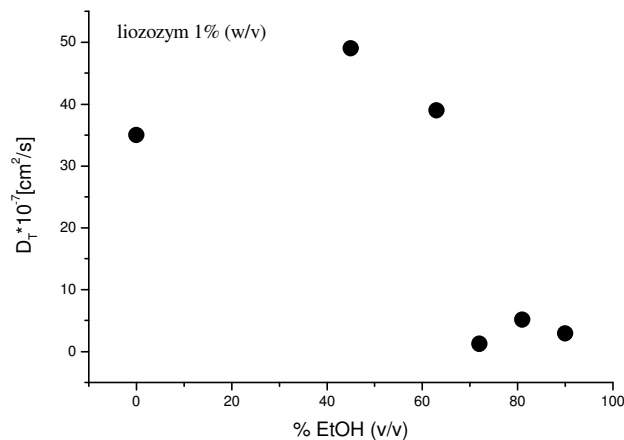
W ramach niniejszej pracy, śledzono zmiany współczynnika dyfuzji translacyjnej lizozymu  $D_T$  (przy stężeniu białka zmieniającym się w zakresie 2.05 ÷ 20.30 mg/ml) w roztworze wodnym etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0 ÷ 85% (v/v) (Rys.28). Przy niskim stężeniu etanolu wartość  $D_T$  maleje wraz ze wzrostem stężenia etanolu. Jednocześnie pokazano, że dla niskiego stężenia etanolu w roztworze wartość współczynnika dyfuzji lizozymu jest dużo większa od wartości granicznego współczynnika dyfuzji dla lizozymu w wodnym roztworze  $D_0 = 1.02 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ . Na przykład, przy stężeniu lizozymu równym 10.20 mg/ml w roztworze etanolu o stężeniu mniejszym niż 35 % (v/v), współczynnik dyfuzji badanego białka zmienia się od wartości  $2.68 \cdot 10^{-6}$  do  $1.41 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ . Zwiększanie ilości alkoholu w roztworze białka wpływa na obniżenie wartości  $D_T$ , do wartości mniejszej od  $D_0$ .

W rezultacie na podstawie analizy zmierzonych funkcji korelacji fluktuacji natężenia światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu oraz współczynnika dyfuzji translacyjnej lizozymu można wnioskować, że obecność etanolu wpływa na proces zmian konformacyjnych białka. Obserwujemy dwa etapy zmian strukturalnych lizozymu od formy natywnej (monomerów) do agregatów. Obecność etanolu o stężeniu

30% (v/v) [przy stężeniu białka  $c = 20.30\text{mg/ml}$ ] wpływa na obniżenie oddziaływań odpychających pomiędzy cząsteczkami białka, co pociąga za sobą wzrost oddziaływań pomiędzy białkiem a rozpuszczalnikiem rozpoczyna się proces rozplatania łańcucha peptydowego lizozymu. W rezultacie, obserwuje się tworzenie dużych ilości wolnych przestrzeni wewnątrz białka, co pozwala na penetrację rozpuszczalnika do wewnętrznych regionów cząsteczki lizozymu. Ostatecznie prowadzi to do obniżenia efektywnej hydrofobowości białka. Jednocześnie w wybranych warunkach lizozym występuje w postaci monomerów. Jest to pierwszy etap zmian konformacyjnych lizozymu.

Obecność coraz to większej liczby cząsteczek alkoholu ( $c_{\text{EtOH}} = 40\%$  (v/v)) wpływa na zmianę kształtu funkcji korelacji fotonów zmierzona podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu. Funkcję tą dopasowano do funkcji dwuwykładniczej (5). Otrzymane dwa czasy zaniku funkcji korelacji opisują proces rozpraszania światła na dwóch rodzajach cząsteczek: monomerów i pierwszych agregatów białkowych. Na przykład wartość współczynnika dyfuzji lizozymu w wodnym roztworze etanolu o stężeniu równym 65% (v/v) przyjmuje wartość  $D_T = 7.93 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s}$  dla monomerów oraz  $D_T = 2.93 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 / \text{s}$  dla agregatów. Obecność pierwszych agregatów w roztworze białka, promuje powstanie innych (40 % (v/v) do 72 % (v/v)). Ponadto wyznaczona eksperymentalnie wartość  $D_T$  dla drugiego agregatów białkowych maleje wraz ze wzrostem zawartości alkoholu w roztworze (Rys.27). Spadek wartości tego parametru wskazuje na wzrost wielkości oligomerów. Ostatecznie obecność większej liczby cząsteczek alkoholu ( $c_{\text{EtOH}} = 70\%$ , gdy stężenie białka wynosiło 20.30 mg/ml) prowadzi do wzrostu wartości  $D_T$  dla agregatów białkowych (Rys.28). Zatem w wybranych warunkach tworzy się nowa postać strukturalna białka. W oparciu o wyniki uzyskane innymi metodami (wykorzystując barwnik czerwień Kongo) wykazano obecność agregatów włóknistych, powstałych poprzez ciasne, uporządkowane układanie się molekuł białka, co prowadzi do utworzenia zwartej struktury. Takie zmiany strukturalne białka, mogą tłumaczyć obserwowany wzrost wartości  $D_T$ . Jednocześnie pokazano, że w wybranych warunkach cząsteczki lizozymu występują tylko w postaci agregatów. Zatem drugi etap zmian strukturalnych białka odpowiada tworzeniu się początkowo oligomerów bezpostaciowych, a w konsekwencji agregatów w postaci wydłużonych struktur - filamentów.

Podobne zmiany tego parametru zaobserwowali Tanaka i współprac [78]. Zaproponowany model procesu tworzenia uporządkowanych agregatów lizozymu (1% (w/v), 0 ÷ 90% EtOH) obejmował powstanie słabo związanych klasterów przy początkowym zwiększaniu stężenia alkoholu w roztworze białka. Rozplecenie łańcuch peptydowego cząsteczek białka oraz proces agregacji następuje przy zawartości etanolu 72 ÷ 81% (v/v). Wyznaczona eksperymentalnie wartość  $D_T$  zmienia się od  $1 \div 5 \cdot 10^{-6}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  w roztworze etanolu, w przedziale stężeń 0 ÷ 63%, do wartości  $1 \div 5 \cdot 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , gdy procentowa zawartość etanolu wynosi 72 ÷ 81%. Obserwowany również wzrost wartości  $D_T$  w warunkach 90% (v/v) zawartości etanolu tłumaczy się wzajemnym, chaotycznym splataniem łańcuchów. Warto również zaznaczyć, że w wybranych warunkach obserwowano uporządkowane agregaty liniowe (włókna amyloidowe).



Rys. 29. Wartość współczynnika dyfuzji dla lizozymu (stężenie białka 1% (w/v)) w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0 ÷ 90 % (v/v) (71).

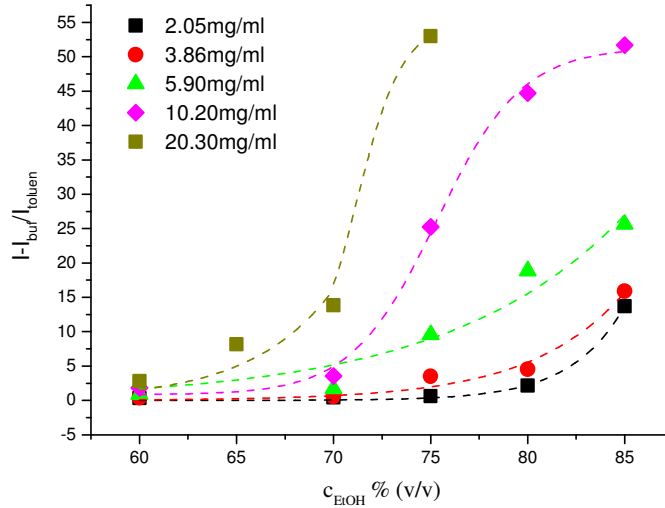
Na podstawie analizy funkcji korelacji fotonów zmierzonej podczas analizy światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu o różnym stężeniu pokazano, że proces tworzenia uporządkowanych agregatów zależy od stężenia białka i czynnika denaturującego (Rys.28). Wraz ze wzrostem stężenia białka, a przy stałym stężeniu etanolu, szybkość agregacji rośnie. Przy niskim stężeniu białka równym 2.05 mg/ml proces agregacji rozpoczyna się po dodaniu etanolu o stężeniu 75% (v/v), natomiast dla wysokiego stężenia lizozymu ( $c = 10.20$  mg/ml), proces łączenia się monomerów w agregaty jest obserwowany już w 60% (v/v) etanolu. Podobne wyniki uzyskał Arnaudov i współprac. [58]. Na podstawie analizy zmian natężenia światła rozproszonego w funkcji czasu inkubacji lizozymu w temperaturze 330K w środowisku o pH 2 pokazano,

że proces agregacji rozpoczął się najszybciej dla największego stężenia białka. Ponadto pokazano, że za proces tworzenia się agregatów odpowiedzialny jest etap nukleacji.

W ramach niniejszej pracy analizowano zmiany natężenia światła rozproszonego w funkcji stężenia etanolu dla roztworów lizozymu (2.05 ÷ 20.30 mg/ml) (Rys.30). Widać, że dla całego zakresu stężeń białka wartość natężenia światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu rośnie wolno. Na przykład od 1.88 dla  $c_{\text{EtOH}} = 60\%$  (v/v) etanolu do wartości 3.54, gdy ilość etanolu osiągnie poziom 70% (v/v) (stężenie białka  $c = 10.20$  mg/ml). Powyżej tej ilości etanolu w roztworze wzrost natężenia światła rozproszonego jest silniejszy. Wyznaczona eksperymentalnie wartość natężenia światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu roztworu w 85% roztworze etanolu wynosiła 51.68. Ostatecznie analiza zmian natężenia światła rozproszonego i współczynnika dyfuzji translacyjnej białka, uzupełniona badaniami spektrofotometrycznymi z wykorzystaniem barwnika czerwien Kongo wskazuje na tworzenie nowej postaci strukturalnej białka - wydłużonych form (filamentów) w wysokim stężeniu etanolu ( $c_{\text{EtOH}} > 80\%$  v/v).

Natężenie światła rozproszonego jest wprost proporcjonalne do stężenia, masy cząsteczkowej i czynnika kształtu. Im cząsteczka jest większa tym większe jest natężenie światła przez nią rozpraszane. Wyraźny wzrost światła rozproszonego może wskazywać o obecności dużych obiektów w roztworze takich jak agregaty białkowe. Na rysunku 31 i 32 przedstawiono wartości natężenia światła rozproszonego na dwóch rodzajach cząsteczek: monomerów i agregatów białkowych (tzn. całkowitego natężenia ważonego względną amplitudą danego składnika otrzymaną z analizy funkcji korelacji) w funkcji stężenia etanolu (stężenia białka od 2.05 do 20.30 mg/ml). Przy niskim stężeniu etanolu obserwuje się znaczący wzrost natężenia światła rozproszonego na monomerach lizozymu. W przypadku agregatów, zarówno natężenie światła jak i współczynnik dyfuzji zaczęły zmieniać się znacząco przy stężeniu etanolu większym niż 55% (v/v).

Zauważono, że przeważająca część natężenia światła rozproszonego pochodziła od pierwszego składnika, gdy stężenie etanolu nie przekraczało 50% (v/v) (początkowo monomerów, a później dimerów), natomiast od drugiego składnika, gdy  $c_{\text{EtOH}} > 55\%$  (v/v).

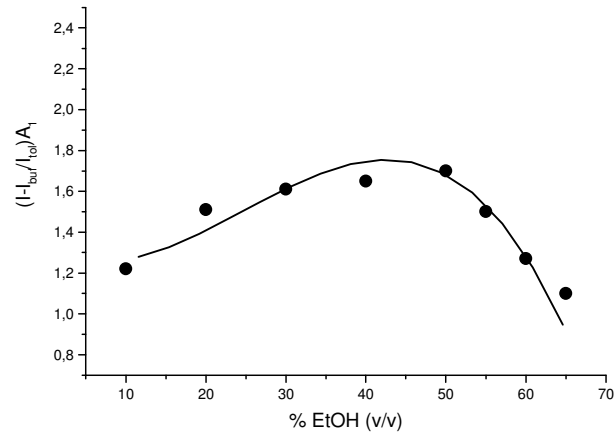


Rys. 30. Natężenie światła rozproszonego na cząsteczkach lizozymu (o stężeniu w zakresie 2.05 ÷ 20.30 mg/ml) w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 60 ÷ 85% (v/v).

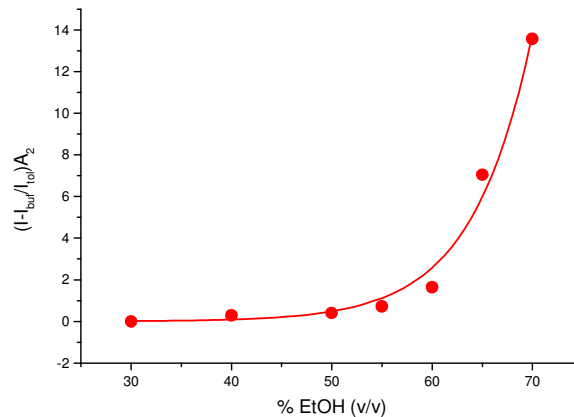
Podobne zmiany obserwowano w przypadku roztworów dla lizozymu o temperaturze 330K, 333K i 338K, 353K w środowisku o pH 2 ÷ 3 [58]. Wartość natężenia światła rozproszonego pozostawała początkowo stała, a następnie gwałtownie rosła. Obserwowany wzrost natężenia oznaczał rozpoczęcie procesu agregacji białka. Pokazano, że powstające w ten sposób agregaty miały postać włóknistą. Włókna amyloidowe były również obserwowane w środowisku o pH 3,0 w temperaturze 330K [61].

Istotne zmiany strukturalne obserwowano dla lizozymu o stężeniu 20.30mg/ml gdy procentowa zawartość etanolu wynosiła 75% (v/v). W wybranych warunkach badany roztwór przechodził w żel. Fujiwara i współpracownicy [60] tłumaczą powstanie żelu jako obecność w roztworze włókien w formie ostatecznej - dojrzałych włókien amyloidowych. Warto zaznaczyć, że dla niższego stężenia białka, nie obserwowano procesu żelowania roztworu lizozymu. Podobną zmianę obserwowali Yonezawa i współpracownicy [59]. Stwierdzili oni łączenie się protofilamentów w włókna amyloidowe przy stężeniu białka 9.7 mg/ml w 90% (v/v) roztworze etanolu. Niestety również w tych warunkach powstałe włókna nie przechodziły w żel. Inne badania prowadzone przez Fujiwarę i współpracowników [60] pokazały, że dopiero dodanie soli do roztworu lizozymu w 90% roztworze etanolu (stężenie białka wynosiło 10.20 mg/ml) przyspiesza proces

tworzenia żelu. Autorzy cytowanej pracy wykazali również, że NaCl o stężeniu 1mmol/L promuje boczne łączenie się protobiałek co powoduje powstanie dojrzałych włókien amyloidowych. Analogiczne zmiany w właściwościach roztworu obserwowano dla ovalbuminy pod wpływem denaturacji termicznej [79]. Przy stężeniach białka  $60 \text{ g/dm}^3$  i  $12 \text{ g/dm}^3$  w obecności soli o stężeniach odpowiednio 3mmol/L oraz 100 mmol/l w temperaturze 351K obserwowano proces żelowania roztworu ovalbuminy.

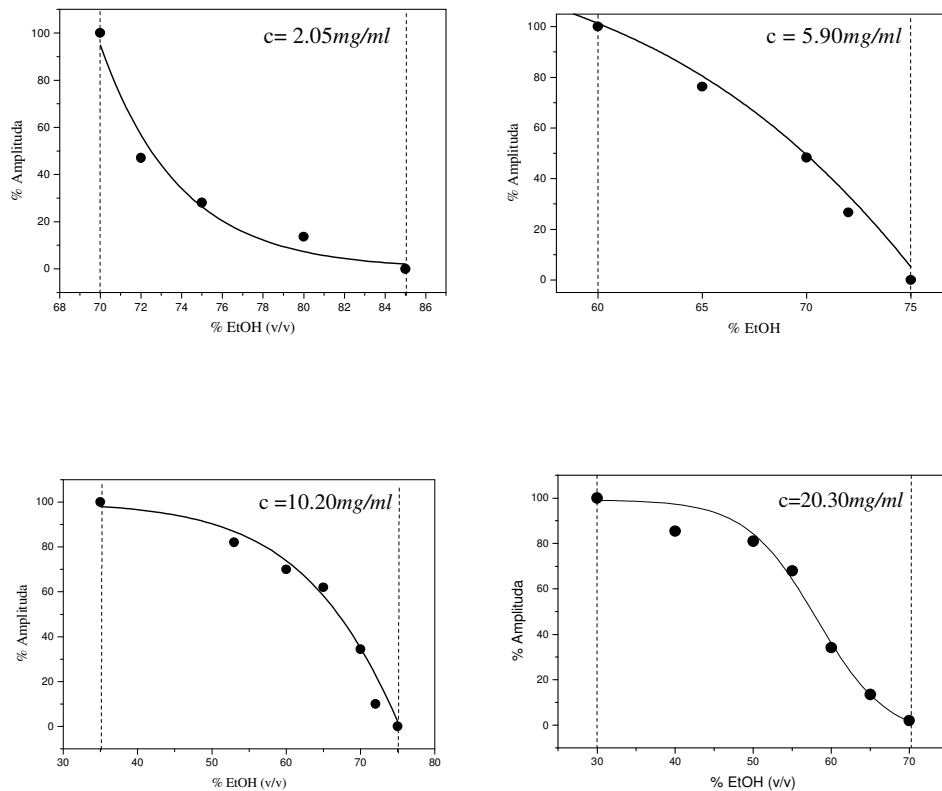


Rys. 31. Zmiany znormalizowanej wartości natężenia światła rozproszonego na monomerach lizozymu (stężenie 20.30 mg/ml) w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 10 ÷ 85% (v/v).



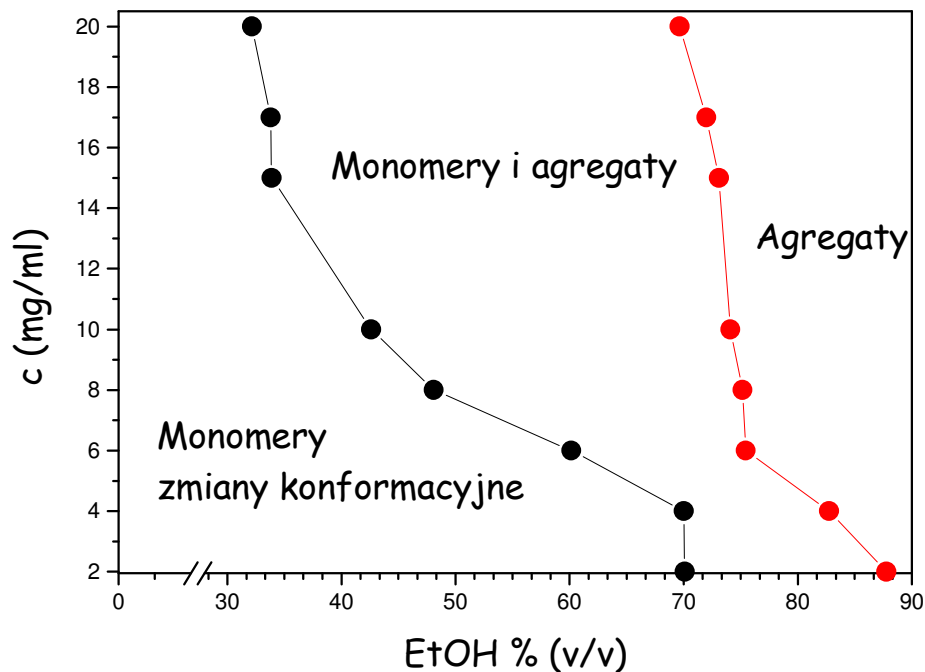
Rys. 32. Zmiany znormalizowanej wartości natężenia światła rozproszonego na agregatach białkowych (stężenie 20.30 mg/ml) w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 30 ÷ 85% (v/v). Powstawanie pierwszych agregatów obserwowano gdy stężenie etanolu  $c_{\text{EtOH}} > 30\%$  (v/v).

W ramach niniejszej pracy wyznaczono udział dwóch rodzajów cząsteczek: monomerów i agregatów lizozymu w procesie rozpraszania światła w roztworach o zmieniającym się stężeniu białka i etanolu. Obliczono stężenia etanolu, dla których udział monomerów w procesie rozpraszania światła wynosił 99% i 1%. Na przykład, dla roztworu lizozymu o stężeniu równym 10mg/ml, udział monomerów w procesie rozpraszania światła wynosił 99% i 1% przy stężeniu etanolu odpowiednio równym  $c_{\text{EtOH}}=35\%$  i  $c_{\text{EtOH}}=75\%$  v/v. Oznacza to, że w wodnym roztworze etanolu o stężeniu od 0 do 35% (v/v) cząsteczki białka [stężenie lizozymu 10.20mg/ml] występują w postaci monomerów. Dalsze zmiany strukturalne monomerów lizozymu oraz tworzenie się agregatów białka obserwuje się w chwili, gdy stężenie alkoholu w roztworze mieści się w zakresie 35% - 75% (v/v). Ostatecznie, gdy stężenie etanolu w roztworze osiąga poziom większy niż 75% obserwuje się w roztworze tylko agregaty białka.



Rys. 33. Udział monomerów lizozymu (o stężeniu w zakresie 2.05 ÷ 20.30 mg/ml) w procesie rozpraszania światła w wodnym roztworze etanolu.

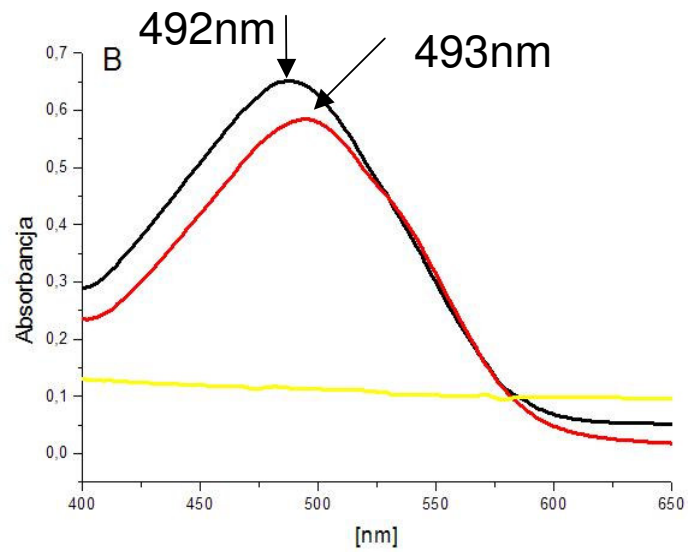
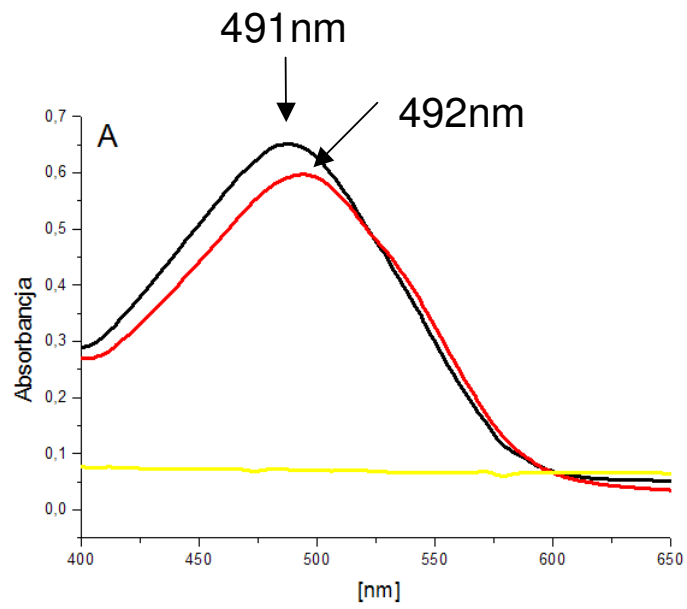
W oparciu o uzyskane wyniki wykreślono diagram zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu i białka w roztworze (Rys.34). Krzywa czarna określa warunki, dla których udział monomerów w procesie rozpraszania światła wynosił 99%. Natomiast krzywa czerwona przedstawia warunki, dla których udział monomerów w procesie rozpraszania światła wynosił 1%.

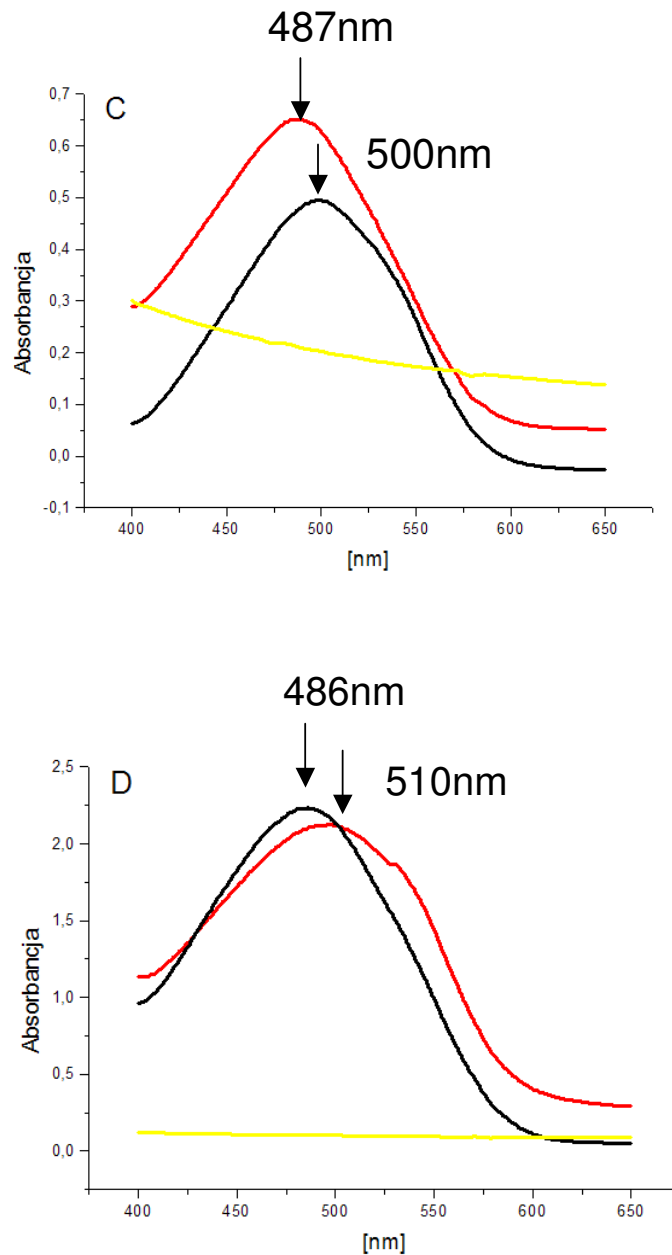


Rys. 34. Diagram zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu i białka w roztworze.

#### 4.2.2. Identyfikacja agregatów włóknistych z wykorzystaniem barwnika czerwieni Kongo.

W ramach niniejszej pracy wykonano eksperymenty z wykorzystaniem barwnika czerwieni Kongo, umożliwiające identyfikację agregatów o strukturze włóknistej (protofilamentów lub włókien amyloidowych). Z literatury bowiem wiadomo, że amyloidy wiążą czerwień Kongo [80]. Wyznaczone eksperymentalnie widma absorpcji czerwieni Kongo przedstawione są na Rys. 35.





Rys. 35. Widma absorpcji barwnika czerwieni Kongo w stanie wolnym (kolor czarny) i w obecności agregatów białkowych (kolor czerwony). Zawartość etanolu w roztworze wynosiła (A) – 35%, stężenie białka  $c = 8.11 \text{ mg/ml}$ ; (B) – 70%,  $c = 8.20 \text{ mg/ml}$ ; (C)– 75%  $c = 8.25 \text{ mg/ml}$  oraz (D)- 80% (v/v)  $c = 8.05 \text{ mg/ml}$ . Kolorem żółtym oznaczono widmo dla roztworu lizozymu.

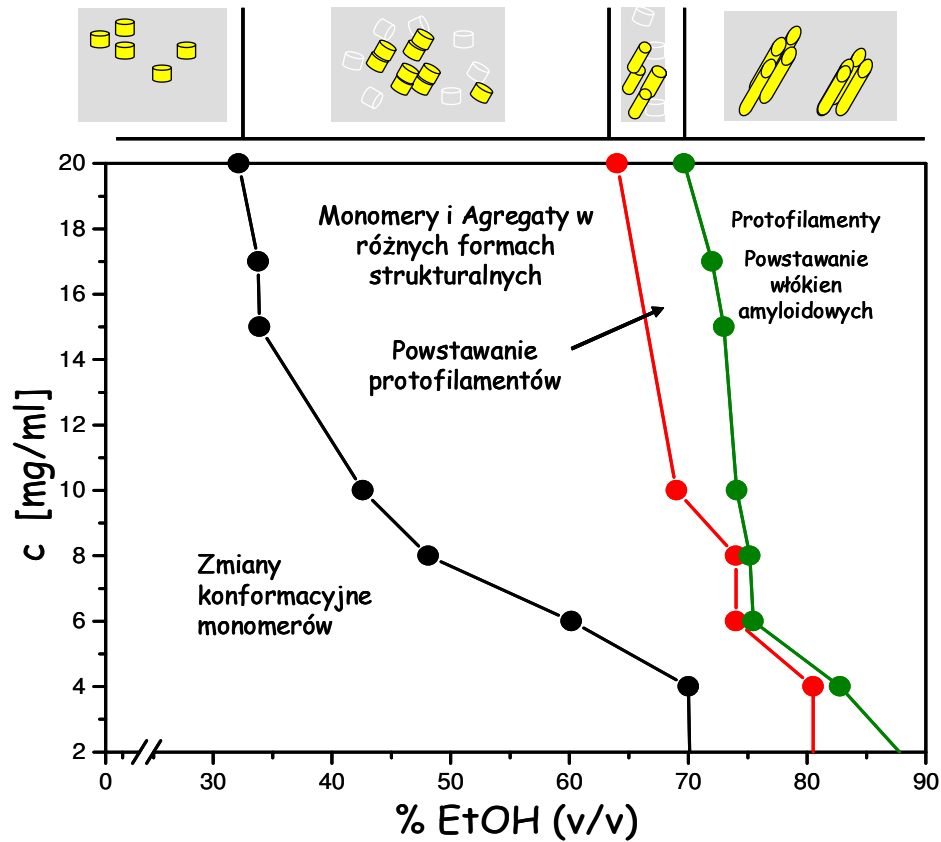
Na rysunku 35 (A oraz B) nie obserwuje się przesunięcia widma absorpcji czerwieni Kongo w kierunku fal dłuższych. Maksimum absorpcji barwnika z stanie wolnym oraz w obecności agregatów białkowym praktycznie pokrywają się. Można zatem wnioskować, że agregaty białkowe obecne w roztworze przy stężeniu etanolu nie przekraczającym 70% (v/v) są agregatami o strukturze nieuporządkowanej (bezpostaciowej). Powyżej tej ilości etanolu w roztworze ( $C_{EtOH} = 75\%$  (v/v)), przesunięcie widma absorpcji barwnika jest niewielkie (rys. C). W obecności agregatów maksimum absorpcji czerwieni Kongo obserwowano dla długości fali  $\lambda = 500\text{nm}$  (dla barwnika w stanie wolnym maksimum absorpcji dla  $\lambda = 487\text{nm}$ ) Można zatem przyjąć, że w tych warunkach następuje przejście z postaci globularnej w postać włóknistą białka. Oznacza to pierwszy etap w procesie tworzenia amyloidów jako form włóknistych (powstawanie protofilamentów). Istotne zmiany strukturalne lizozymu obserwowano w wysokim stężeniu etanolu (80% (v/v)). Wyraźne przesunięcie maksimum absorpcji barwnika (dla barwnika niezwiązanego maksimum dla  $\lambda = 486\text{nm}$ , w obecności agregatów maksimum dla  $\lambda = 510\text{ nm}$ ) wskazuje na występowanie w tych warunkach agregatów o uporządkowanej strukturze - protofilamentów ( agregatów włóknistych).

Analogiczną analizę umożliwiającą identyfikację procesu tworzenia amyloidów wykonano dla innych białek [81]. Stabilność ludzkiego białka prionowego PrP zawierającego tylko jedną domenę obejmującą reszty aminokwasowe 121-230 badano w obecności 1M chlorku guanidyny. Modyfikacja formy dzikiej tego białka, poprzez dodanie mostka dwusiarczkowego łączącego reszty Cys<sup>166</sup> i Cys<sup>221</sup> lub Cys<sup>225</sup> nie powodowała istotnych zmian strukturalnych prowadzących do tworzenia włóknistych agregatów. Dla tych mutacji nie obserwowano przesunięcia maksimum absorpcji barwnika w kierunku fal dłuższych. Warto podkreślić, że w tych warunkach obserwowano natomiast wzrost stabilności cząsteczki białka w porównaniu z formą dziką . W przypadku tego białka, obejmującego dwie domeny - PrP (23-230) obecność chlorku guanidyny o stężeniu zmieniającym się w zakresie  $0 < C_{Gdn-HCl} < 2\text{ M}$  powodowała wyraźne, charakterystyczne przesunięcia widma absorpcji barwnika w kierunku fal dłuższych.

Eksperymenty z wykorzystaniem barwnika czerwieni Kongo pozwoliły na wyznaczenie warunków, w których agregaty białkowe mają postać protofilamentów

lub włókien amyloidowych (analiza obejmowała roztwór lizozymu o stężeniu w zakresie 2.05 ÷ 20.30 mg/ml w etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0 ÷ 85% (v/v)). Ostatecznie, na podstawie analizy światła rozproszonego oraz widm absorpcji barwnika czerwieni Kongo, określono różnorodne formy strukturalne lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych roztworach etanolu. Wyniki te zostały ujęte w postaci diagramu fazowego (Rys.36). Pokazano pośrednie formy strukturalne, prowadzące do ostatecznej postaci – włókna amyloidowego, tj. monomery, agregaty, protofilamenty, włókna amyloidowe. W wodnym roztworze etanolu, o stężeniu od 0 do 70,1 % (v/v), gdy stężenie białka wynosi 2 mg/ml, lizozym występuje w postaci monomerów. Pokazano, że w wybranych warunkach następuje rozplatanie łańcucha peptydowego lizozymu oraz penetracja cząsteczek alkoholu do wewnętrznych regionów cząsteczki lizozymu. Proces agregacji cząsteczki białka rozpoczyna się dopiero dla stężenia białka 2 mg/ml w 70,2 % (v/v) wodnym roztworze etanolu. Przy stężeniach lizozymu w zakresie od 2 mg/ml do 4 mg/ml oraz w 81% (v/v) etanolu, a także przy stężeniu około 10 mg/ml w 69% roztworze etanolu i przy stężeniu 20 mg/ml w 64% roztworze etanolu, następuje przejście z postaci globularnej w postać włóknistą białka. Prawdopodobnie jest to pierwszy etap w procesie tworzenia agregatów włóknistych. W wybranych warunkach powstają pierwsze protofilamenty. W ostatnim etapie procesu przemian strukturalnych następuje łączenie protofilamentów w włókna, które obserwowano między innymi przy stężeniu białka 15 mg/ml w 74% roztworze etanolu.

Pomimo wielu badań *in vitro* poświęconych procesowi tworzenia amyloidów, dotychczas wyznaczony został tylko jeden diagram zmian strukturalnych lizozymu. [59]. Różnorodne formy strukturalne lizozymu tj. monomery, dimery, protofilamenty i włókna amyloidowe pokazano na podstawie badania zmian wartości promienia żyracji cząsteczki lizozymu przy stężeniach w zakresie od 2 mg/ml do 10 mg/ml, wywołane obecnością etanolu. Natomiast, wyznaczony w ramach niniejszej pracy diagram, dotyczy zmian strukturalnych lizozymu, analizowanych w szerszym zakresie stężeń białka (od 2 mg/ml do 20 mg/ml). Ponadto, diagram ten został wykreślony w oparciu o wyniki uzyskane różnymi uzupełniającymi się metodami.

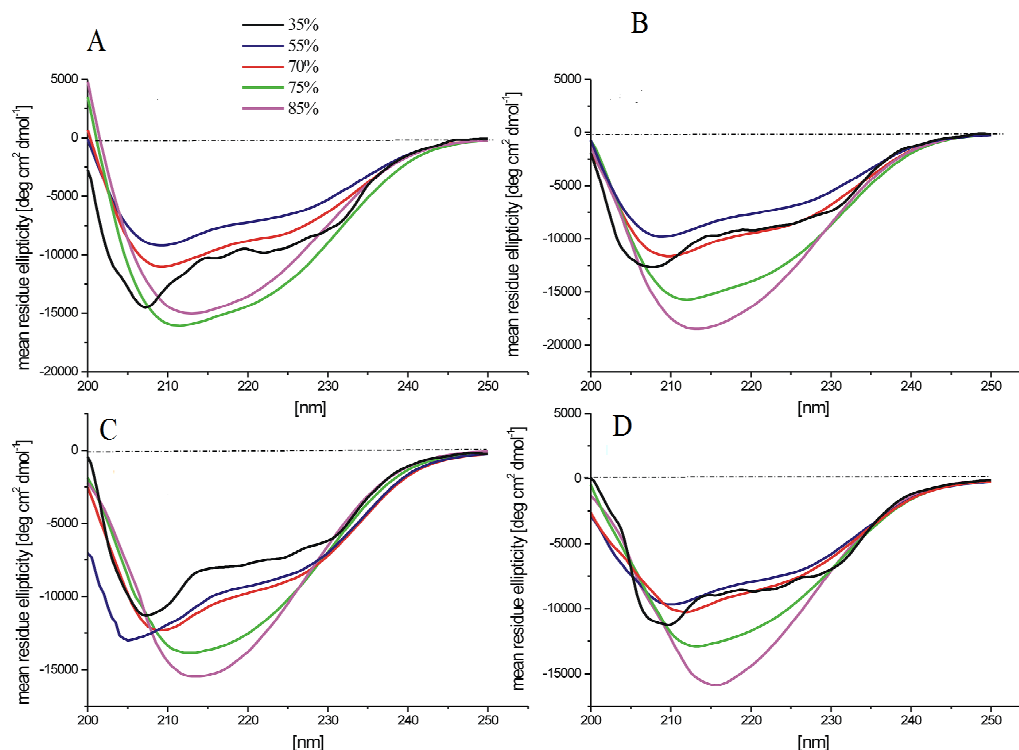


Rys. 36. Diagram fazowy różnorodnych form strukturalnych lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych roztworach etanolu.

### 4.3. Zmiany struktury drugorzędowej cząsteczki białka pod wpływem etanolu

Jak wspomniano wyżej, włókna amyloidowe powstają w wyniku agregacji białek po ich wstępnej częściowej denaturacji, pod wpływem której pojawiają się formy pośrednie białka w postaci częściowo rozplecionego łańcucha polipeptydowego. Otwartym pozostaje natomiast pytanie, jaka jest forma strukturalna stanów pośrednich białka w procesie tworzenia wysoko uporządkowanych agregatów. Odpowiedzi poszukiwano na podstawie analizy zmian struktury drugorzędowej cząsteczki lizozymu pod wpływem etanolu, wykorzystując w tym celu spektroskopię dichroizmu kołowego.

Na rysunku 37 przedstawiono widma CD z zakresu dalekiego UV dla lizozymu w roztworze etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0 ÷ 85% (v/v). Stężenie białka zmieniało się w zakresie od 2.01 do 8.19 mg/ml.



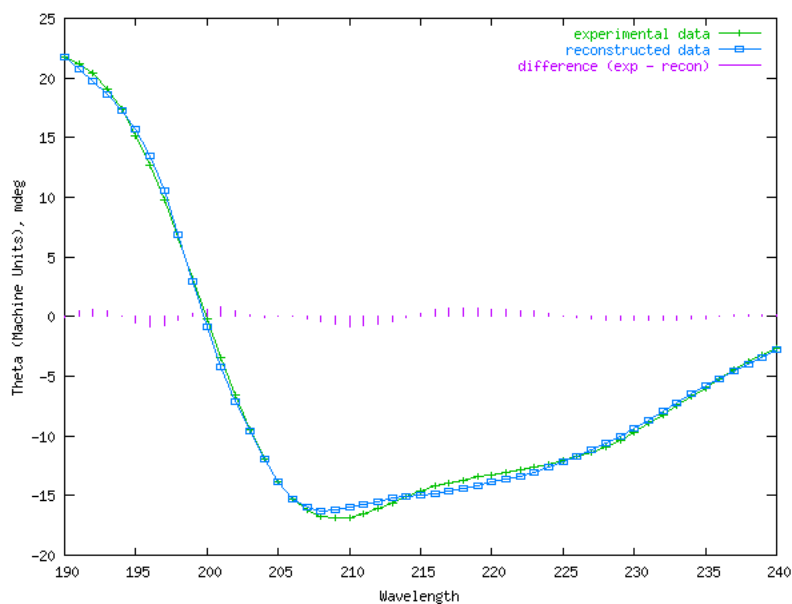
Rys. 37. Widma CD z zakresu dalekiego UV dla lizozymu o stężeniu (A) – 2.01 mg/ml; (B) – 4.13 mg/ml; (C) – 6.20 mg/ml; (D) – 8.19 mg/ml, w wodnych roztworach etanolu.

Przy niskim stężeniu etanolu (0 ÷ 35% v/v) obserwowano ujemny efekt Cottona dla fali o długości 208 nm i 222 nm. Wynika z tego, że dominującą strukturą drugorzędową lizozymu w tych warunkach eksperymentalnych jest helisa  $\alpha$ . Obecność coraz większej liczby cząsteczek etanolu ( $c_{\text{EtOH}} \leq 70\%$  v/v) powoduje zwiększenie wartości minimów. Oznacza to, że udział helisa  $\alpha$  w strukturze drugorzędowej rośnie wraz ze wzrostem stężenia etanolu. Gdy stężenie etanolu w roztworze osiąga 75% ujemny efekt Cottona dla fali o długości 222 nm staje się coraz mniej intensywny, aż praktycznie zanika ( $c_{\text{EtOH}} = 80\%$  v/v). Ponadto obserwuje się przesunięcie

batochromowe drugiego minimum (od  $\lambda = 208$  nm w 55% EtOH do  $\lambda = 215$  nm w 80% EtOH, przy niskim stężeniu białka ( $2.01 \div 4.13$  mg/ml) lub w 75% EtOH w wysokim stężeniu lizozymu ( $6 \div 8$  mg/ml)). W przypadku gdy stężenie etanolu w roztworze osiągnęło poziom 85%, niezależnie od stężenia białka, obserwowano wyraźną zmianę w widmie CD. Na widmie pojawia się jedno wyraźne minimum dla fali o długości 215 nm. Wskazuje to, że dominującą strukturą drugorzędową lizozymu staje się struktura  $\beta$  [82]. W oparciu o wyniki uzyskane innymi metodami można przyjąć, że przy stężeniu etanolu około 85% rozpoczyna się proces tworzenia protofilamentów poprzez liniowe łączenie się struktur  $\beta$ .

Więcej informacji na temat oddziaływania etanolu z cząsteczką lizozymu niesie analiza ilościowa widm CD. Za pomocą algorytmu obliczeniowego CONTIN dostępnego *on - line* na serwerze obliczeniowym Dichroweb, [83] oszacowano zawartość poszczególnych typów struktury drugorzędowej w cząsteczce lizozymu, w roztworach o zmieniającym się stężeniu białka i etanolu.

Rysunek 38 przedstawia reprezentację graficzną wyników analizy widm CD lizozymu w roztworze zawierającym białko o stężeniu równym 2.01 mg/ml w 55% EtOH. W tym przypadku parametr dopasowania wynosił NRMSD = 0.035, natomiast obliczony procentowy udział struktur drugorzędowych w strukturze przestrzennej lizozymu wynosi:  $\alpha = 26\%$  ;  $\beta = 24,6\%$ .

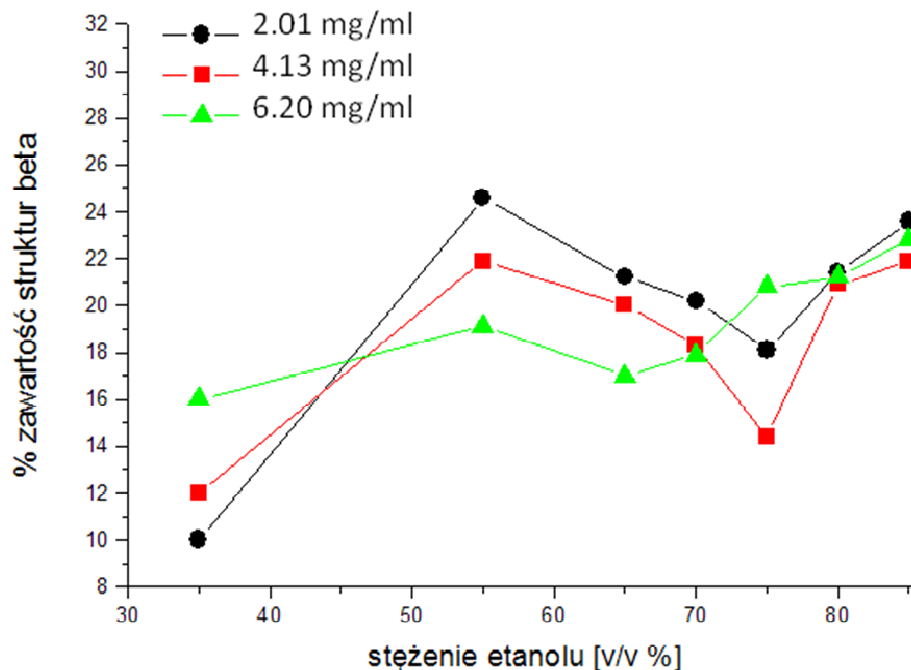


Rys. 38. Dopasowanie krzywej teoretycznej CD do widma eksperymentalnego z zastosowaniem algorytmu CONTIN (lizozym o stężeniu  $c = 2.01$  mg/ml w roztworze wodnym 55%EtOH).

Na podstawie analizy ilościowej widma CD dla lizozymu w formie natywnej, w wodzie pokazano, że stan funkcjonalny białka zawiera 40,4% helis  $\alpha$  oraz 14,1% struktur  $\beta$ . Podobne wyniki udziału procentowego poszczególnych struktur drugorzędowych w strukturze przestrzennej lizozymu uzyskano na podstawie analizy dyfrakcji promieniowania X ( $\alpha=41\%$ ;  $\beta=10\%$ ) [84].

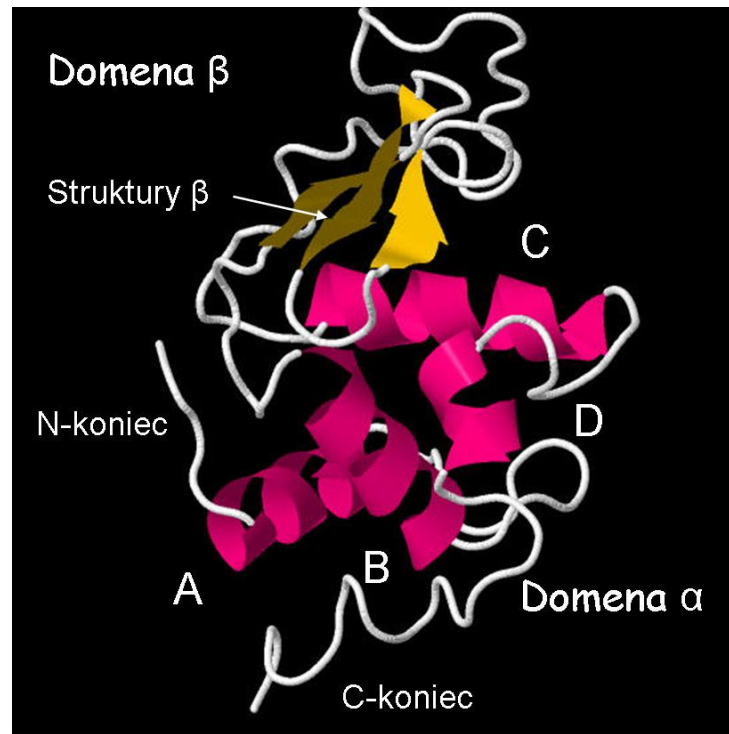
W ramach niniejszej pracy wyznaczono zmianę udziału poszczególnych struktur drugorzędowych w cząsteczce lizozymu, prowadząc badania w roztworach zawierających białko o stężeniu (( 2.01 ÷ 6.20 ) mg/ml oraz przy zmieniającej się ilości etanolu. Na podstawie analizy widm CD pokazano, że dla stężenia lizozymu 2.01 mg/ml w 35% (v/v) wodnym roztworze etanolu,  $\alpha$ -helisy zachowują swoją strukturę. Jednocześnie, na podstawie badań prowadzonych za pomocą metod dynamicznego rozpraszania światła wykazano, że w niskim stężeniu etanolu ( $c_{\text{EtOH}} < 35\%$  (v/v)) zmiany strukturalne lizozymu dotyczą naruszenia otoczki hydratacyjnej a molekuly białka występują w postaci monomerów. Można zatem przyjąć, że przy stężeniu lizozymu 2 mg/ml, stężenie etanolu 0 ÷ 35% (v/v) nie wywołuje istotnych zmian strukturalnych w obrębie domeny  $\alpha$  w cząsteczce białka. Zmiany konformacyjne mogą być natomiast związane z rozplataniem pierwotnej domeny  $\beta$ . Udział struktury  $\beta$  w strukturze przestrzennej lizozymu, w wybranych warunkach, wynosił 9.7 %. Proces denaturacji lizozymu pod wpływem etanolu był również analizowany w trakcie badań neutronograficznych [85]. Na podstawie analizy kryształów lizozymu nasączonych w 25% EtOH wskazano trzy miejsca wiązania etanolu na powierzchni białka charakteryzujące się dużym powinowactwem oraz szereg innych miejsc, gdzie wiązanie się molekuł rozpuszczalnika było dużo słabsze. Jednocześnie, nie wskazano żadnych istotnych zmian w strukturze trzeciorzędowej białka. Badania te wskazują, że proces denaturacji białka wynika głównie z naruszenia struktury otoczki hydratacyjnej. Podobny model został zaproponowany na podstawie analizy struktury kryształów otrzymanych w 20% roztworze etanolu [86]. Ostatecznie można wnioskować, że dla stężenia etanolu  $< 35\%$ , przy stężeniu białka 2.01 mg/ml obserwuje się wiązanie molekuł etanolu na powierzchni białka, powodujące stopniowe niszczenie otoczki hydratacyjnej bez zmian w całościowej konformacji białka. Wraz ze wzrostem stężenia etanolu w roztworze ( $c_{\text{EtOH}} > 35\%$  v/v) następuje zaburzenie struktury drugorzędowej obserwowane w postaci rozplatania domeny  $\beta$ . Ponadto, w pierwszym obserwowanym stanie pośrednim białka prowadzącym do tworzenia form włóknistych domena  $\alpha$  jest stabilna i zachowuje swoją strukturę przestrzenną. Warto zaznaczyć, że potwierdzona w

analizie ilościowej zmniejszona stabilność domeny  $\beta$  jest zgodna z modelem zaproponowanym przez Bootha i współpracowników, którzy łączyli mniejszą stabilność domeny  $\beta$  z procesem tworzenia włókien amyloidowych [18].

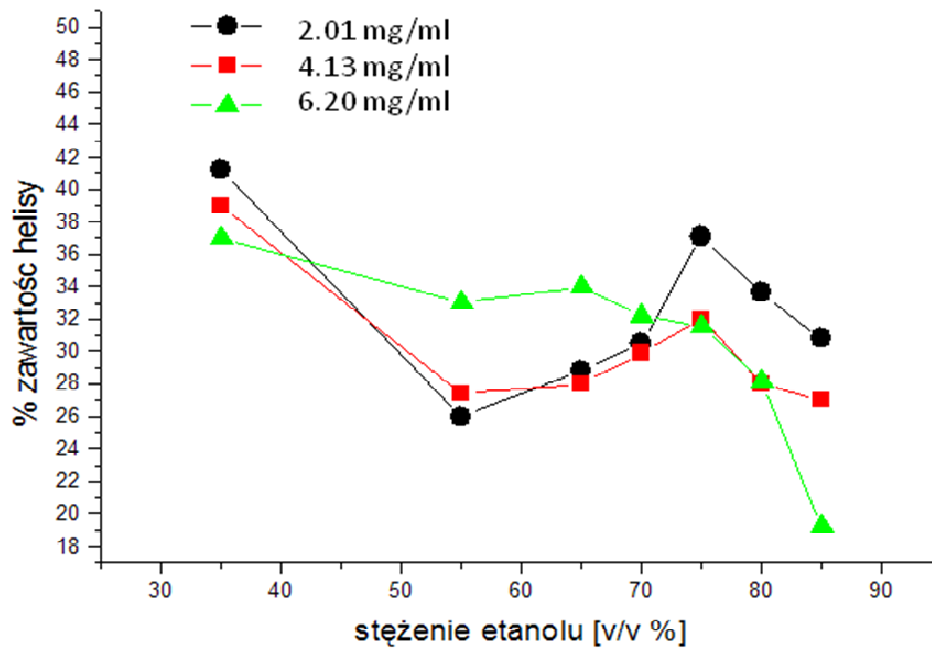


Rys. 39. Udział struktury  $\beta$  (roztwory lizozymu o stężeniu (2.01 ÷ 6.20) mg/ml).

Przy stężeniu etanolu w zakresie od 35% do 55% (v/v) obserwowane zmiany w widmie CD wskazują na spadek zawartości helisy  $\alpha$  w strukturze przestrzennej lizozymu w stosunku do formy natywnej. Z literatury wiadomo [21], że fragment łańcucha polipeptydowego lizozymu zawierający reszty od 49 do 101 jest najbardziej amyloidogennym fragmentem lizozymu. Ta część obejmuje domenę  $\beta$  i helisę C. Ponadto, na podstawie analizy komputerowej, prowadzonej w oparciu o metody mechaniki statystycznej i analizy empirycznej pokazano [87], że helisa C jest najmniej stabilną strukturą heliakalną spośród wszystkich czterech helis tworzących domenę  $\alpha$  lizozymu.



Rys. 40. Struktura lizozymu z białka jaja kurzego [ wg. 132L.pdb.]



Rys. 41. Zmiana udziału helisy α (roztworu lizozymu o stężeniu (2.01 ÷ 6.20) mg/ml).

Na podstawie opisanych powyżej badań można wnioskować, że w roztworach o zawartości etanolu 35% ÷ 55% (v/v) następuje kolejne lokalne rozplatanie łańcucha. Obejmuje ono prawdopodobnie helisę C.

Zmiany w widmie CD roztworów lizozymu były również obserwowane przy zawartości etanolu 55% ÷ 70%. Pogłębienie minimów przy  $\lambda = 208$  nm oraz  $\lambda = 222$  nm, sugerujące wzrost zawartości helisy  $\alpha$ , zostało potwierdzone w analizie ilościowej z wykorzystaniem programu CONTIN (Rys.41). Oznacza to prawdopodobnie tworzenie nowych nie - natywnych struktur heliakalnych. Warto zaznaczyć, że dla niskiego stężenia lizozymu w roztworze (2.01 ÷ 4.13 mg/ml) ujemny efekt Cottona rośnie wraz ze wzrostem zawartości etanolu aż do  $c_{EtOH} = 75\%$  (v/v), natomiast w tych warunkach zwiększenie stężenia białka (6.20 ÷ 8.19 mg/ml) powoduje zanikanie dwóch minimów i powstanie jednego dla długości fali 215 nm. Ostatecznie w wysokim stężeniu etanolu ( $c_{EtOH} = 85\%$  (v/v)) obserwowano tworzenie struktur  $\beta$  (elementów strukturalnych włókien amyloidowch). Ponadto, powstałe zmiany w widmie sugerują, że stężenie białka ma istotne znaczenie na szybkość procesu agregacji uporządkowanej.

Istotne zmiany strukturalne obserwowano również w obecności cząsteczek metanolu oraz trifluoroetanolu. Badania pokazały, że obecność metanolu może wpływać na proces przejścia między dwoma stanami: natywnym i denaturowanym [28]. W wysokim stężeniu metanolu (60% (v/v)) obserwowano znaczny wzrost zawartości struktury heliakalnej. Ponadto z analizy oddziaływania cząsteczek lizozymu z trifluoroetanolem wynika, że obserwowane zmiany w konformacji białka są podobne do obserwowanych w wodnym roztworze etanolu [30]. Nie obserwowano natomiast przejścia helisy  $\alpha$  w strukturę  $\beta$ .

Istotny wzrost zawartości struktur helikalnych w procesie rozplatania łańcucha lizozymu pokazano również w analizie komputerowej z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Kazmirskiego i współprac. obserwowany efekt wyjaśniono jako tworzenie nowych nie natywnych form heliakalnych [87]. Powstanie dwóch krótkich helis, obejmujących reszty aminokwasowe od 72 do 76 oraz od 80 do 85, związane było z zwiększeniem stabilności formy pośredniej poprzez tworzenie hydrofobowych kontaktów z innymi fragmentami białka. Obserwowano jednocześnie trzecią, krótką nie natywną helisę utworzoną z reszt 50-56 (dwóch fragmentów struktury  $\beta$  w formie natywnej) łańcucha, umiejscowioną na powierzchni białka.

Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę na temat mniejszej stabilności domeny  $\beta$  w stosunku do pozostałej części białka, z której to w kolejnych przemianach strukturalnych tworzą się nie natywne nowe formy heliakalne. Analogiczne wyniki uzyskano również, analizując formę dziką lizozymu ludzkiego i dwie mutacje tego białka (Ile56Thr oraz Asp67His) mające zdolność tworzenia amyloidów [25]. Autorzy cytowanej pracy wykazali, że dwie amyloidogenne formy lizozymu ludzkiego są bardziej wrażliwe na zmiany konformacyjne w obrębie domeny  $\beta$  w stosunku do formy dzikiej.

Zmiany w widmie CD w zakresie dalekiego UV w wodnym roztworze etanolu (85% (v/v)), przy dowolnym stężeniu lizozymu wskazują, że tworzą się nowe struktury  $\beta$  (szeroki ujemny efekt Cottona przy  $\lambda = 215\text{nm}$ ). Oznacza to, że nowa postać strukturalna białka tworzy się poprzez liniowe łączenie się struktur  $\beta$ . Możemy zatem przyjąć, że w tych warunkach eksperymentalnych tworzą się protofilamenty za pośrednictwem wcześniej utworzonych struktur  $\beta$ , oraz następuje łączenie się tych podjednostek w włókna amyloidowe.

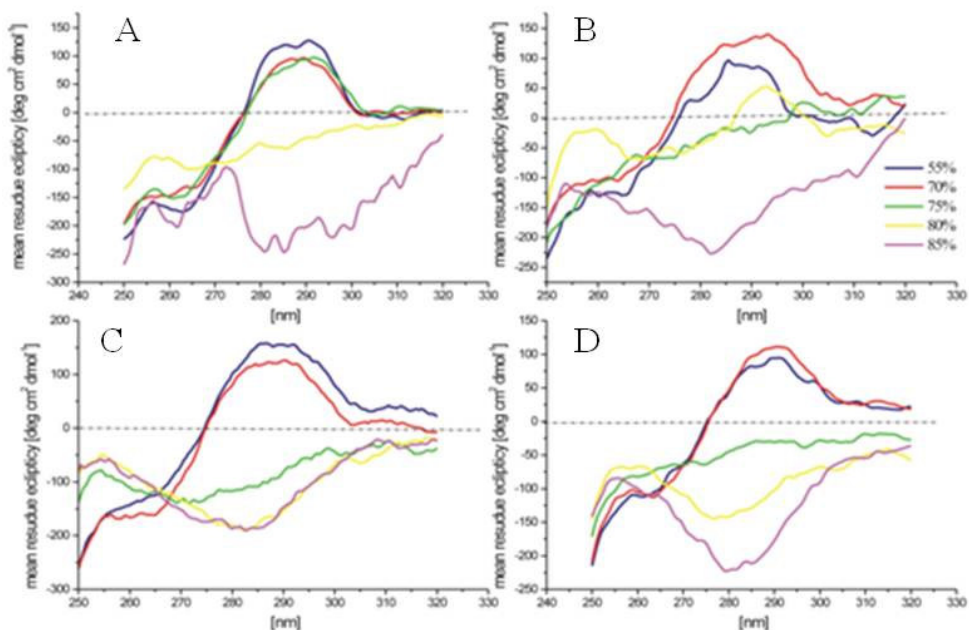
Wysoko uporządkowane struktury w postaci złogów amyloidowych powstają również pod wpływem obecności innych cząsteczek organicznych, jak chlorowodorek guanidyny [88, 89], melatonina oraz p-benzochinon [62]. Wykazano, że obecność chlorowodoru guanidyny o stężeniu  $2 \div 3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  powoduje częściowe rozplecenie łańcucha polipeptydowego. Badania te potwierdzają, że stan częściowej denaturacji białka może przyspieszyć proces tworzenia amyloidów. Zauważono, że obecność form pośrednich wpływa na szybkość tworzenia struktur włóknistych na drodze takiego samego procesu jak mutacja białka [88].

Więcej informacji na temat oddziaływania etanolu z cząsteczkami lizozymu niesie widmo CD w zakresie bliskiego UV (260 nm  $\div$  320 nm) (Rys.42). W niskim stężeniu białka (2.01 mg/ml) obserwujemy maksimum przy  $\lambda = 288 \text{ nm}$ , gdy procentowa zawartość etanolu wynosi do 75% (v/v). Natomiast, obecność białka o stężeniu w zakresie od 4.13 mg/ml do 8.19 mg/ml powoduje zanik maksimum przy stężeniu etanolu przekraczającym 70% (v/v).

W przypadku gdy stężenie etanolu w roztworze osiągnęło poziom 85% (v/v) [stężenie białka 2.01  $\div$  4.13 mg/ml] oraz 80% (v/v) [stężenie lizozymu 6.20  $\div$  8.19 mg/ml] na widmie CD występuje szerokie minimum przy  $\lambda = 280\text{nm}$ . Obserwowana zmiana w widmie CD oznacza zniszczenie struktury trzeciorzędowej. Podobne zmiany

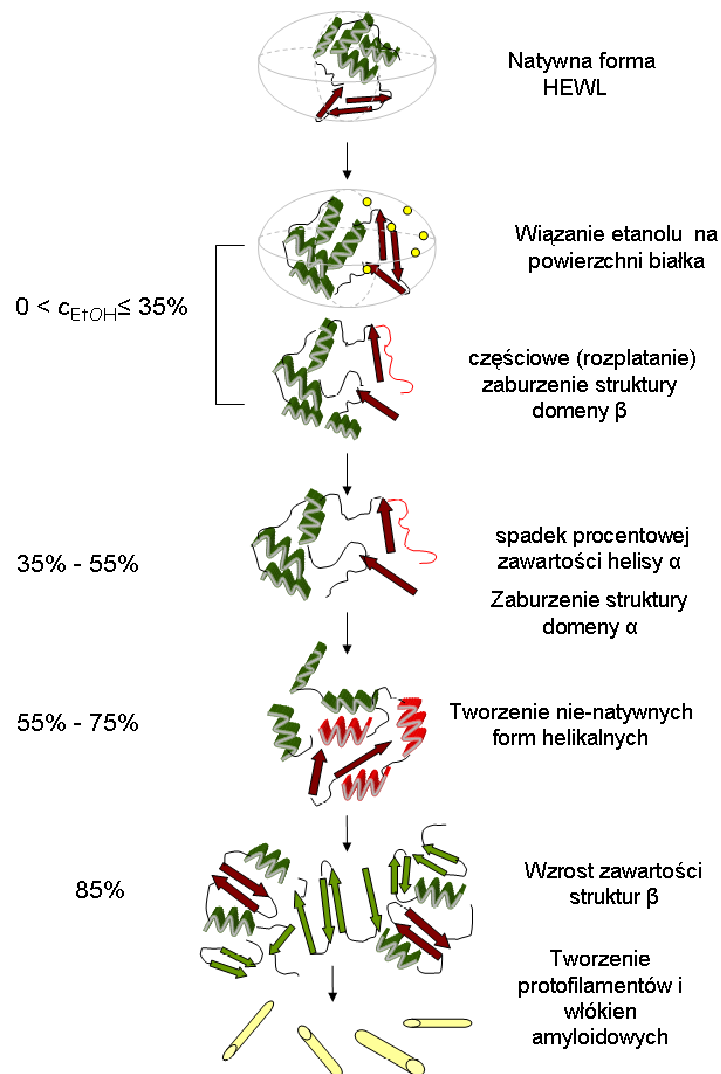
strukturalne widoczne byłym również pod wpływem takich czynników jak: temperatura [21], pH [90, 61], trifluoroetanol [90], NaCl [91].

Ostatecznie analiza jakościowa i ilościowa widm CD w zakresie dalekiego i bliskiego UV (dla lizozymu o stężeniu w zakresie od 2.01 mg/ml do 8.19 mg/ml w wodnym roztworze etanolu o stężeniu zmieniającym się od 0% do 85% (v/v)) pozwoliła na wyszczególnienie form pośrednich białka w procesie przemian strukturalnych prowadzących do tworzenia złogów amyloidowych (Rys.43). W wodnym roztworze etanolu, o stężeniu od 0 do 35% (v/v) pierwsza postać strukturalna tworzy się poprzez wiązanie się molekuł etanolu na powierzchni białka, powodując stopniowe niszczenie otoczki hydratacyjnej bez niszczenia całościowej konformacji lizozymu. W kolejnej formie pośredniej obserwowanej w procesie tworzenia złogów amyloidowych następuje rozplatanie mniej stabilnej domeny  $\beta$ , natomiast domena  $\alpha$  prawdopodobnie zachowuje swoją strukturę przestrzenną. Proces ten rozpoczyna się przy stężeniu lizozymu 2 mg/ml gdy ilość etanolu osiągnęła poziom około 35% (v/v). Przy stężeniach etanolu w zakresie od 35% do 55% (v/v) następuje zaburzenie struktury domeny  $\alpha$  prawdopodobnie poprzez rozplatanie najmniej stabilnej helisy C.



Rys. 42. Widma CD z zakresu bliskiego UV dla lizozymu o stężeniu (A) – 2.01 mg/ml; (B) – 4.13 mg/ml; (C) – 6.20 mg/ml; (D) – 8.19 mg/ml, w wodnych roztworach etanolu.

Kolejna forma pośrednia obserwowana w procesie tworzenia amyloidów charakteryzuje się obecnością nowych nie natywnych form helikalnych. Tworzą się one w chwili, gdy ilość alkoholu w roztworze białka wynosiła 55% - 75% (v/v). W ostatnim etapie procesu przemian strukturalnych, gdy procentowa zawartość etanolu wynosi 85%, obserwowano tworzenie się nowych struktur  $\beta$ . Można zatem przyjąć, że w tych warunkach obserwowana jest forma pośrednia, z której powstają pierwsze protofilamenty poprzez liniowe łączenie się struktur  $\beta$ , a te z kolei tworzą włókna amyloidowe.

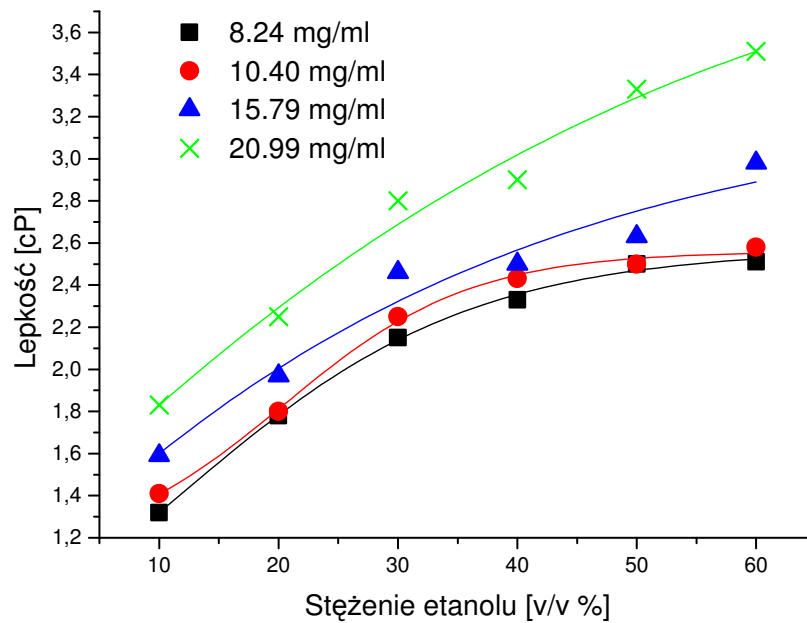


Rys. 43. Schemat zmian strukturalnych lizozymu ( $c = 2.01 \text{ mg/ml}$ ) w funkcji stężenia etanolu w roztworze. Podstawę do opracowania tego schematu była analiza widm CD.

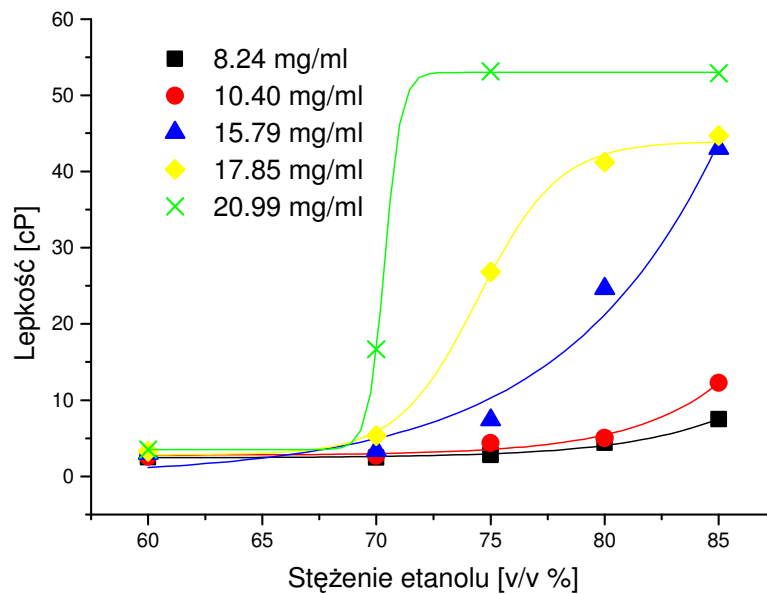
#### 4.4. Właściwości reologiczne roztworów lizozymu

Badanie zmian konformacyjnych białek z zastosowaniem metod rozproszeniowych oraz spektroskopii zostały uzupełnione o badania reologiczne. Badania te pozwoliły na analizę oddziaływań białko – rozpuszczalnik. Z literatury bowiem wiadomo [72], że wzrost lepkości koloidu może wskazywać na proces denaturacji białka lub proces powstawania agregatów białkowych. Ansami i współprac. pokazali, że rozpuszczalnik o niskiej wartości lepkości nie wpływa na zmiany konformacyjne mioglobiny [92]. Autorzy cytowanej pracy wykazali również, że szybkość zmian strukturalnych tego białka zależy odwrotnie proporcjonalnie do pierwszej potęgi lepkości rozpuszczalnika. Dominującym czynnikiem powodującym wyraźny spadek szybkości zmian strukturalnych mioglobiny w niskiej temperaturze (mniejszej od 200K) jest obecność wodnego roztworu glicerolu o dużej lepkości (powyżej 107 cP).

Zmiany lepkości roztworu białka w funkcji stężenia etanolu przedstawione są na rysunkach 44 oraz 45. Można zauważyć, że w całym zakresie analizowanych stężeń białka, wartość lepkości lizozymu rośnie wolno do momentu gdy stężenie etanolu osiągnie poziom 60% (v/v). Powyżej tej ilości etanolu w roztworze wzrost lepkości jest znacznie silniejszy. Wyznaczona eksperymentalnie wartość lepkości roztworu lizozymu o stężeniu równym 20.99 mg/ml rośnie od wartości  $\eta = 3.51\text{cP}$  ( dla stężenia etanolu  $c_{\text{EtOH}} = 61.1\% \text{ v/v}$ ) do wartości  $\eta = 53.15\text{cP}$  (dla stężenia etanolu  $c_{\text{EtOH}} = 75.5\% \text{ v/v}$ ), osiągając plateau. Warto zaznaczyć, że podobne zmiany obserwowano dla lizozymu o mniejszym stężeniu (10 mg/ml) w wysokim stężeniu etanolu i po dodaniu soli (15mmol/L NaCl) (Rys.46).

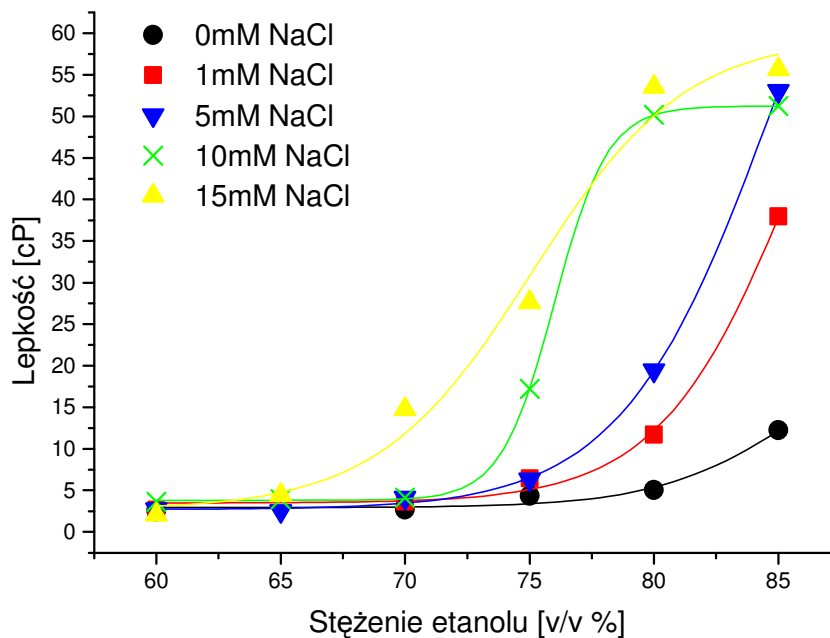


Rys. 44. Zmiana wartości lepkości roztwory lizozymu w funkcji stężenia etanolu w roztworze w zakresie od 0 ÷ 60% (v/v) dla czterech różnych stężeń białka



Rys. 45. Zmiana wartości lepkości roztwory lizozymu w funkcji stężenia etanolu w roztworze w zakresie od 60 ÷ 85% (v/v) dla czterech różnych stężeń białka.

Analogiczne zmiany obserwowano dla wartości promienia żyracji cząsteczki lizozymu (w 90% v/v EtOH) w funkcji czasu inkubacji wywołane obecnością soli [60]. Można przyjąć, że występowanie plateau może się wiązać z tworzeniem w tych warunkach stabilnych form strukturalnych białka pomimo zwiększania ilości alkoholu w roztworze. Obserwowane zmiany lepkości lizozymu w funkcji stężenia soli pokazują, że obecność NaCl modyfikuje oddziaływania intermolekularne cząsteczek białka. Można przyjąć, że wraz ze wzrostem soli początkowo osłabieniu ulegają oddziaływania o charakterze odpychającym, a następnie wzrastają systematycznie oddziaływania przyciągające.



Rys. 46. Zmiana wartości lepkości roztworu lizozymu w funkcji stężenia etanolu w roztworze w zakresie od 60 ÷ 85% (v/v) dla białka o stężeniu 10 mg/ml i czterech różnych stężeń soli obecnych w roztworze.

Inne badania pokazały, że w roztworach lizozymu zawierających co najmniej 500mmol/L NaCl występuje całkowite ekranowanie elektrostatyczne – dominują oddziaływania van der Waalsa [93]. Ponadto zauważono, że te procesy zależą od rodzaju jonów obecnych w roztworze [94].

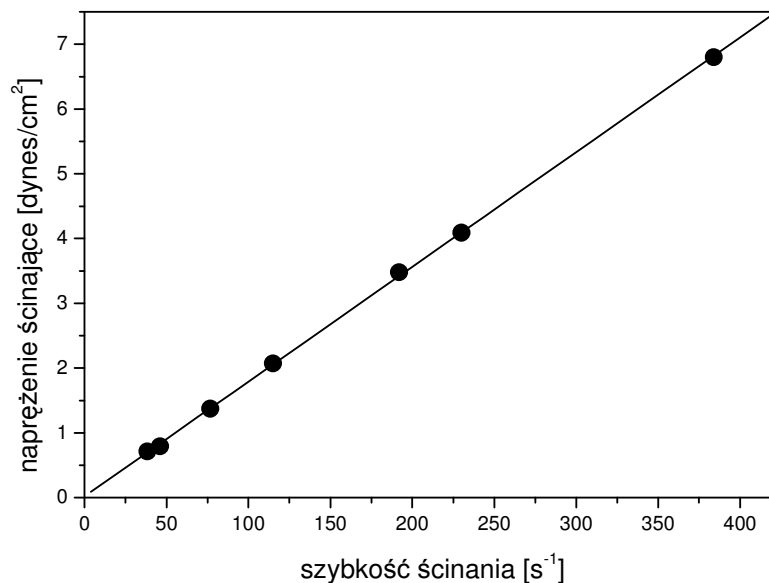
Na podstawie wykreślonego diagramu fazowego różnorodnych form strukturalnych lizozymu (Rys.36), białko to ( $c=10\text{mg/ml}$ ) w 85% występuje w postaci agregatów włóknistych. Ponadto, w wybranych warunkach, nie obserwowano fazy plateau w zależności lepkości roztworów lizozymu w funkcji stężenia etanolu. Roztwory te również nie przechodziły w żel. Wynika z tego, że agregaty włókniste lizozymu o stężeniu 10mg/ml w 85% etanolu nie są formą ostateczną – nie są to włókna dojrzałe. Natomiast, dodanie soli w tych warunkach eksperymentalnych powodowało powstanie żelu. Tabela 3 przedstawia warunki, w których obserwowano proces żelowania roztworu lizozymu o stężeniu równym 10.20mg/ml. W tych warunkach powstają prawdopodobnie dojrzałe włókna amyloidowe. Powstawanie żelu jest związane z zmianą oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy włóknami. Dodawanie soli powoduje zmniejszenie oddziaływań odpychających w wyniku elektrostatycznego efektu ekranowania ładunków na powierzchni włókien. Zwiększa się prawdopodobieństwo łączenia włókien. Fujiwara i współprac. [60] pokazali, że dodawanie NaCl do lizozymu w 90% wodnym roztworze etanolu przyspiesza proces tworzenia żelu.

Tabela. 3. Warunki, w których obserwowano proces żelowania roztworu lizozymu o stężeniu równym 10.20mg/ml w funkcji stężenia etanolu i soli w roztworze.

L.P	Stężenie NaCl (mmol/L)	Stężenie etanolu % (v/v)
1.	1	85%
2.	5	85%
3.	10	80%
4.	15	75%

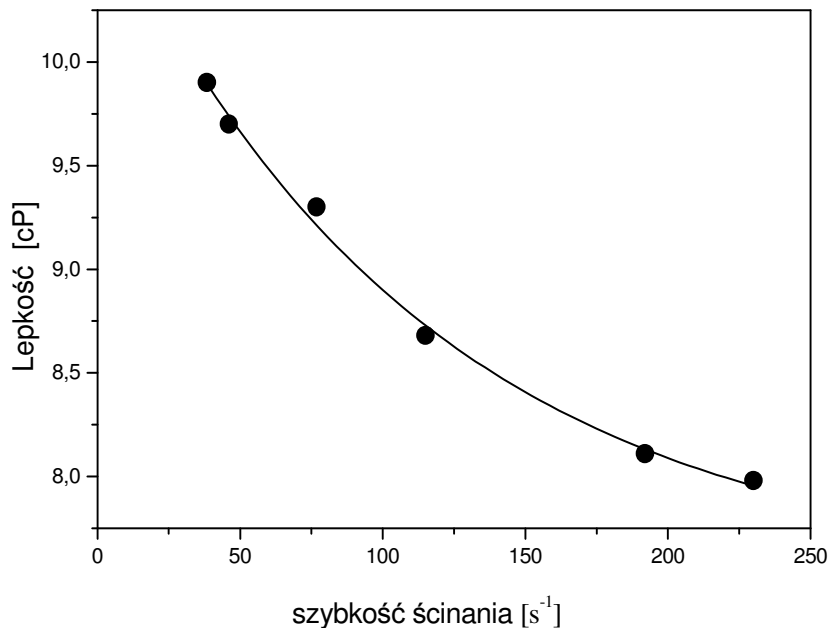
Zauważyli oni, że dodanie 0,3mM NaCl w temperaturze 20°C powoduje powstanie żelu po 6 godzinach, natomiast w temperaturze 10°C – po 3 dniach inkubacji. Podobne wyniki uzyskał Goda i współprac. [91]. Wyznaczone eksperymentalnie widma CD wykazały, że proces tworzenia żelu jest odwracalny. Na podstawie analizy zmian reologicznych lizozymu w roztworach etanolu i wspomnianych wyników badań przeprowadzonych przez inne ośrodki badawcze można wnioskować, że warunki powstawania lepkiego roztworu zawierającego częściowo denaturowane białko są podobne jak w procesie powstawania osadu. Ponadto, szczegółowa analiza pokazała, że w tych warunkach wartość lepkości silnie zależy od zmiany stężenia soli.

Z analizy zmian właściwości reologicznych cząsteczek lizozymu pod wpływem etanolu, wynika że dla niskiego stężenia alkoholu w roztworze obserwowano nie tylko niewielkie zmiany lepkości koloidu ale również wykazano, że wyznaczone eksperymentalnie krzywe płynięcia roztworu wodnego lizozymu są liniami prostymi.



Rys. 47. Zmiany naprężenia ścinającego w funkcji szybkości ścinania dla cieczy idealnej spełniającej prawo Newtona (dla białka o stężeniu równym 8.24 mg/ml w 10% EtOH).

Tego typu zmiany naprężenia ścinającego w funkcji szybkości ścinania wskazują na zachowanie się badanego koloidu jako cieczy idealnej spełniającej prawo Newtona (Rys.47). Oznacza to, że wartość lepkości w roztworze o danym stężeniu etanolu jest stała i nie zależy od szybkości ścinania. Natomiast wyznaczone eksperymentalnie zależności naprężenia ścinającego oraz lepkości lizozymu od szybkości ścinania w wysokim stężeniu etanolu (Rys.48) różnią się drastycznie od tych, które uzyskano dla białka w niższych stężeniach alkoholu. Obserwujemy typowy nienewtonowski - pseudoplastyczny charakter przepływu badanej cieczy. Drastyczny spadek lepkości oraz nieliniowa zależność naprężenia ścinającego od szybkości ścinania wskazuje na rozcieńczenie roztworu pod wpływem ścinania. Proces ten może być wywołany reorientacją układów molekularnych w warunkach płynięcia cieczy, polegającą między innymi na rozplataniu i ustawieniu łańcuchów molekularnych równoległe do działającej siły.

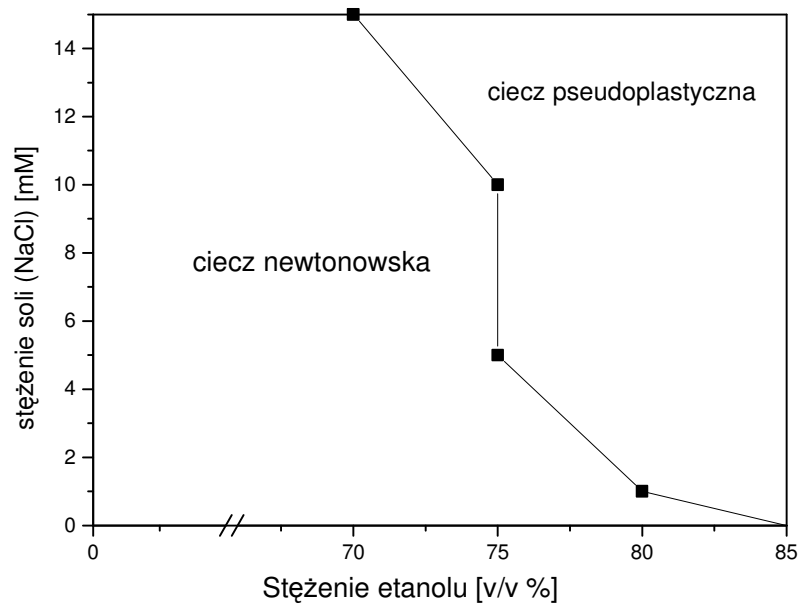
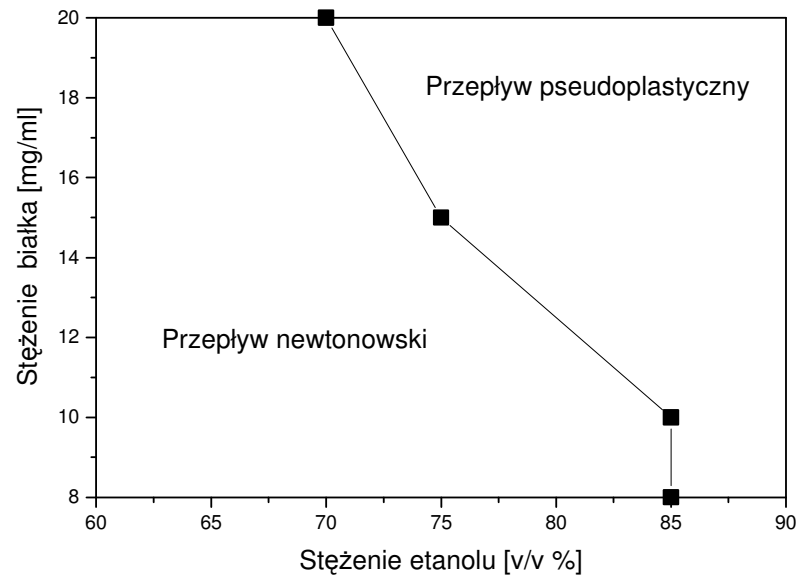


Rys. 48. Zależność lepkości roztworu lizozymu o stężeniu równym 8.24 mg/ml w 85% wodnym roztworze etanolu. Obserwujemy typowy nienewtonowski – pseudoplastyczny charakter przepływu badanego koloidu.

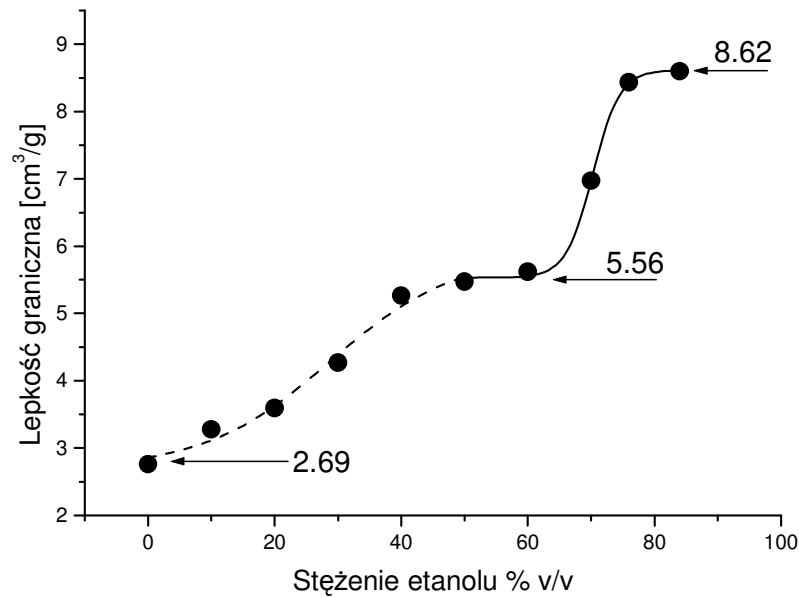
Podobny przepływ cząsteczek obserwuje się również w obecności innych związków organicznych. Pseudoplastyczny charakter przepływu białka w czterometylomoczniku [95] może wskazywać na obecność wydłużonych form strukturalnych zdolnych do orientacji w kierunku przepływu. W niskim stężeniu rozpuszczalnika molekuly związku organicznego są w zasadzie rozproszone w postaci mikrodomen. Gdy stężenie rozpuszczalnika rośnie, mikrodomeny łączą się w większe jednostki, powodując wzrost stabilności wewnątrz utworzonych domen. Rysunek 49 przedstawia diagram zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu i soli w roztworze. Pokazano, w jakich warunkach eksperymentalnych następuje przejście z przepływu newtonowskiego badanego koloidu do przepływu pseudoplastycznego.

Zmiany lepkości roztworu lizozymu wywołane czynnikami fizycznymi i chemicznymi badano eksperymentalnie [96-99], jak również w oparciu o analizę komputerową [100]. Z analizy komputerowej zmian lepkości granicznej wynika, że parametr ten silnie zależy od poziomu hydratacji białka. Wykazano, że teoretyczna wartość lepkości granicznej odpowiada wartości eksperymentalnej, gdy poziom hydratacji molekuł lizozymu wynosił (0.3 – 0.4)g wody na gram białka (grubość otoczki hydratacyjnej jest równa 0.9 Å). Obliczona wartość lepkości granicznej wynosiła 2.99 [cm<sup>3</sup>/g]. Natomiast, wyznaczona eksperymentalnie wartość tego parametru dla natywnego lizozymu z jaja kurzego zmienia się w zakresie od 2.66 [cm<sup>3</sup>/g] [98] (w temperaturze 298K) do wartości 2.84 [cm<sup>3</sup>/g] [102]. W przypadku lizozymu w formie zdenaturowanej obserwowano znaczny wzrost lepkości granicznej do wartości 18.4 [cm<sup>3</sup>/g] (w obecności chlorowodoru guanidyny o stężeniu 6M w temperaturze 298K) [97].

Rysunek 50 przedstawia zmiany lepkości granicznej wodnego roztworu lizozymu w funkcji stężenia wodnego roztworu etanolu [101]. Wyznaczona eksperymentalnie wartość lepkości granicznej lizozymu w roztworze wodnym wynosi 2.69 [cm<sup>3</sup>/g]. Wartość ta jest zgodna z danymi literaturowymi: 2,66 cm<sup>3</sup>/g [98], 2,7 cm<sup>3</sup>/g [97], 2,84 cm<sup>3</sup>/g [102]. Obserwowano systematyczny wzrost lepkości granicznej. Zmiany tego parametru w funkcji stężenia etanolu w roztworze mogą być opisane dwoma funkcjami sigmoidalnymi, których plateau występuje dla wartości [η] równych 2.69 [cm<sup>3</sup>/g], 5.56 [cm<sup>3</sup>/g] oraz 8.62 [cm<sup>3</sup>/g]. Podobny sigmoidalny przebieg zmian lepkości granicznej obserwowano w warunkach denaturacji termicznej rybonukleazy [103].



Rys. 49. Diagram zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu i soli w roztworze. Wykresy przedstawiają warunki, w których następuje przejście z przepływu newtonowskiego badanego koloidu do przepływu pseudoplastycznego.



Rys. 50. Lepkość graniczna roztworów lizozymu w funkcji stężenia etanolu (0 ÷ 85% (v/v)).

Na podstawie analizy uzyskanych danych (Rys.50) można wnioskować, że obecność etanolu wpływa na proces zmian strukturalnych badanego białka. Obserwujemy dwa etapy zmian konformacyjnych lizozymu od formy natywnej do agregatów. W wodnym roztworze etanolu o stężeniu od 0 do 55% (v/v) obserwowany jest wzrost lepkości granicznej. Pokazano jednocześnie, że roztwór lizozymu zachowuje się jak ciecz newtonowska. Można wnioskować, że w pierwszym etapie przemian strukturalnych, lizozym występuje w postaci monomerów, a zmiany dotyczą otoczki hydratacyjnej. Drugi wyraźny wzrost wartości lepkości granicznej obserwowano w wodnych roztworach etanolu o stężeniu zmieniającym się od 55% (v/v) (drugie plateau) do 85% (v/v) (trzecie plateau). Jest to drugi etap zmian konformacyjnych białka, odpowiadający tworzeniu się agregatów w postaci wydłużonych struktur - filamentów. Warto zaznaczyć, że nowa postać strukturalna białka tworzy się w warunkach w których następuje zmiana charakteru przepływu badanego białka z przepływu newtonowskiego do przepływu pseudoplastycznego. Ponadto w ostatnim etapie procesu przemian strukturalnych nie obserwowano całkowitej denaturacji lizozymu. Wniosek ten wynika z wyznaczonej przez Tanforda i współprac. empirycznej formuły

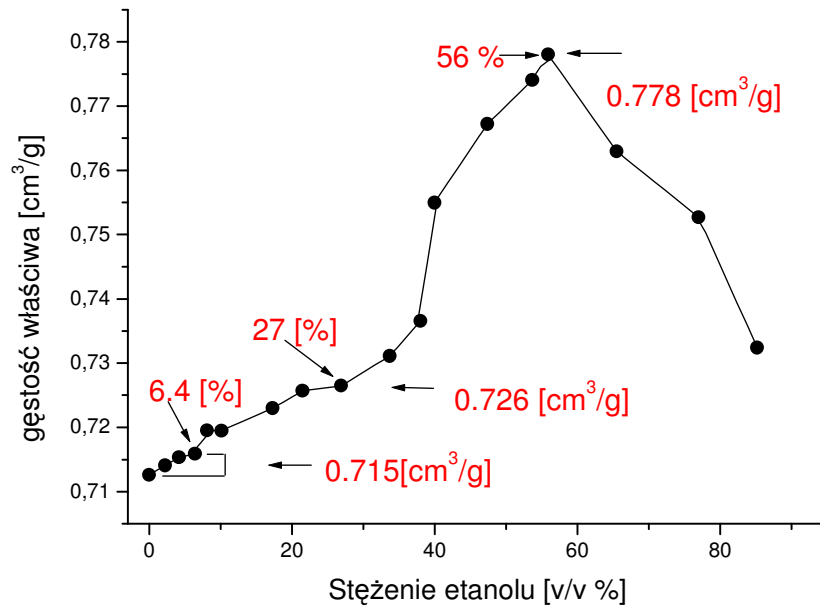
pozwalającej obliczyć wartość lepkości granicznej roztworów białka całkowicie denaturowanego, mającego postać statystycznego kłęбка [74]:

$$[\eta] = 0.716 \cdot n^{0.67} \quad (17)$$

we wzorze tym  $n$  - oznacza liczbę reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym. Na podstawie powyższej formuły lepkość graniczna lizozymu z jaja kurzego zbudowanego z 129 reszt aminokwasowych w warunkach całkowitej denaturacji powinna wynosić  $18.85 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Jest ona zgodna z wartością eksperymentalną równą  $18.4 \text{ cm}^3/\text{g}$  wyznaczoną dla lizozymu w 6 M chlorowodoru guanidyny [97]. Warto również zaznaczyć, że w warunkach całkowitej denaturacji przepływ roztworu lizozymu miał charakter newtonowski.

Więcej informacji na temat zmian strukturalnych lizozymu wywołanych obecnością etanolu w roztworze niesie analiza zmian gęstości właściwej koloidu w funkcji stężenia etanolu (Rys. 51). Wpływ na wartość gęstości właściwej białka ma: a) objętość molekuly wynikająca z oddziaływań van der Waalsa -  $v_c$ ; b) obecność pustych przestrzeni w białku występujące z powodu niedoskonałego upakowania atomów w cząsteczce -  $v_{cav}$  oraz c) zmiana objętości cząsteczki białka wywołana procesem hydratacji lub solwatacji -  $\Delta_{solv}v$  [75]. Obserwowane zmiany wartości tego parametru wywołane obecnością alkoholu o stężeniu w przedziale od 0 – 85% v/v mogą być wytłumaczone zmianą dwóch czynników:  $v_{cav}$  oraz  $\Delta_{solv}v$ , ponieważ zmiana wartości czynnika  $v_c$  nie zależy od zmian konformacyjnych białka.

Wyznaczona w ramach tej pracy wartość gęstości właściwej zmienia się od  $0,7126 \text{ [cm}^3/\text{g]}$ , przy braku etanolu, do wartości  $0,7159 \text{ [cm}^3/\text{g]}$ , gdy stężenie etanolu wynosi 6,42% (v/v). Zatem średnia wartość tego parametru dla lizozymu w roztworze etanolu w przedziale stężeń 0 - 6% wynosi  $0.715 \text{ [cm}^3/\text{g]}$ . Wartość ta jest zgodna z danymi literaturowymi. Obecność coraz większej liczby cząsteczek alkoholu (6 ÷ 30% v/v) wpływa na istotny wzrost wartości  $v^\circ$ . Przy stężeniu etanolu równym 26,90 % wartość gęstości właściwej lizozymu jest równa  $0.727 \text{ [cm}^3/\text{g]}$ .



Rys. 51. Gęstość właściwa roztworów lizozymu w funkcji stężenia etanolu (0 ÷ 85% (v/v)).

Otrzymane wyniki badań korelują dobrze z obserwowanymi zmianami promienia hydrodynamicznego lizozymu. Posługując się metodą dynamicznego rozpraszania światła wyznaczono zmianę promienia hydrodynamicznego cząsteczki lizozymu w funkcji stężenia etanolu. W obliczeniach założono, że cząsteczkę lizozymu można traktować jako obiekt sferyczny. Wartość promienia hydrodynamicznego pozostaje stała aż do momentu, gdy ilość etanolu osiągnie poziom około 4.54 % (v/v) a potem rośnie. Można zatem przyjąć, że w niskim stężeniu etanolu (0 ÷ 4.54% v/v) oddziaływania pomiędzy cząsteczkami białka i rozpuszczalnika są bardzo słabe. Natomiast obecności etanolu o stężeniu  $\leq 4.54\%$  v/v powoduje naruszenie struktury otoczki hydratacyjnej lizozymu i wymianę cząsteczek wody na cząsteczki alkoholu. W konsekwencji rozpoczyna się proces zmian strukturalnych lizozymu wywołanych solwatacją etanolem.

Wyraźny wzrost wartości gęstości właściwej lizozymu obserwowano w roztworze etanolu, w przedziale stężeń 30 ÷ 55% (v/v). Wyznaczona eksperymentalnie maksymalna wartość gęstości właściwej jest równa 0.778 [cm³/g] w roztworze etanolu o stężeniu 55,90% (v/v). Powyżej tej zawartości etanolu w roztworze wartość gęstości

właściwej maleje. Podobne zmiany gęstości właściwej lizozymu obserwowano w obecności dwumetylosulfotlenku [104]. W tych warunkach eksperymentalnych maksymalna wartość gęstości właściwej lizozymu wynosiła  $0.734 \text{ [cm}^3/\text{g]}$ . Obserwowany wzrost wartości gęstości właściwej pod wpływem etanolu oznacza tworzenie się nowych wolnych przestrzeni (objętości). Można zatem przypuszczać, że w tym zakresie stężeń alkoholu obserwujemy wyraźne zmiany strukturalne białka (proces rozplatania łańcucha polipeptydowego poszczególnych cząsteczek lizozymu) prowadzące w konsekwencji do utworzenia formy pośredniej będącej prekursorem łączenia się molekuł białka w liniowe agregaty – tworzenie się filamentów. Obecność coraz to większej liczby cząsteczek alkoholu ( $55 \div 85\%$ ) wpływa na obniżenie wartości  $v^\circ$ . Wyznaczona eksperymentalnie wartość  $v^\circ$  zmienia się od  $0.778 \text{ [cm}^3/\text{g]}$  w  $55,90\%$  roztworze etanolu, do wartości  $0,7324 \text{ [cm}^3/\text{g]}$  gdy procentowa zawartość etanolu wynosiła  $85.20\%$  (v/v). Warto zaznaczyć, że przy wysokim stężeniu etanolu obserwowano zmianę charakteru przepływu badanego koloidu – z przepływu newtonowskiego do pseudoplastycznego. Ponadto widmo absorpcji barwnika – Czerwieni Kongo oraz widoczny w widmach CD ujemny efekt Cottona dla fali o długości  $215\text{nm}$  pokazują, że dominującą strukturą drugorzędową lizozymu stają się struktury  $\beta$ , które to poprzez liniowe wzajemne łączenie się tworzą protofilamenty. Zatem w wybranych warunkach obserwuje się powstawanie agregatów włóknistych (amyloidów), a w konsekwencji ciasne upakowanie struktur  $\beta$  oraz zmniejszenie wolnych przestrzeni w cząsteczce, co prowadzi do zmniejszenia końcowej wartości gęstości właściwej lizozymu. W badaniach procesu tworzenia złogów amyloidowych analizowano również zmiany temperaturowe i zmiany czasowe objętości cząsteczki insuliny [105]. Pokazano, że podczas tworzenia się agregatów włóknistych insuliny następuje wyraźna zmiana w fizykochemicznych parametrach opisujących fluktuacje objętości cząsteczki białka. Zauważono, że zmiany te związane są z tworzeniem się charakterystycznej topologii włókna, która to powstaje poprzez uporządkowane układanie się molekuł insuliny. Obserwowane zmiany tłumaczy się nagłym zmniejszeniem powierzchni interfazy pomiędzy cząsteczką białka, a molekułami wody oraz jednoczesnym spadkiem ściśliwości cząsteczek białka. Ponadto dla insuliny w temperaturze  $333\text{K}$  obserwowano spadek gęstości właściwej od wartości około  $0.745 \text{ [cm}^3/\text{g]}$  do około  $0.723 \text{ [cm}^3/\text{g]}$  po inkubacji przez okres  $250 \text{ min}$  [105].

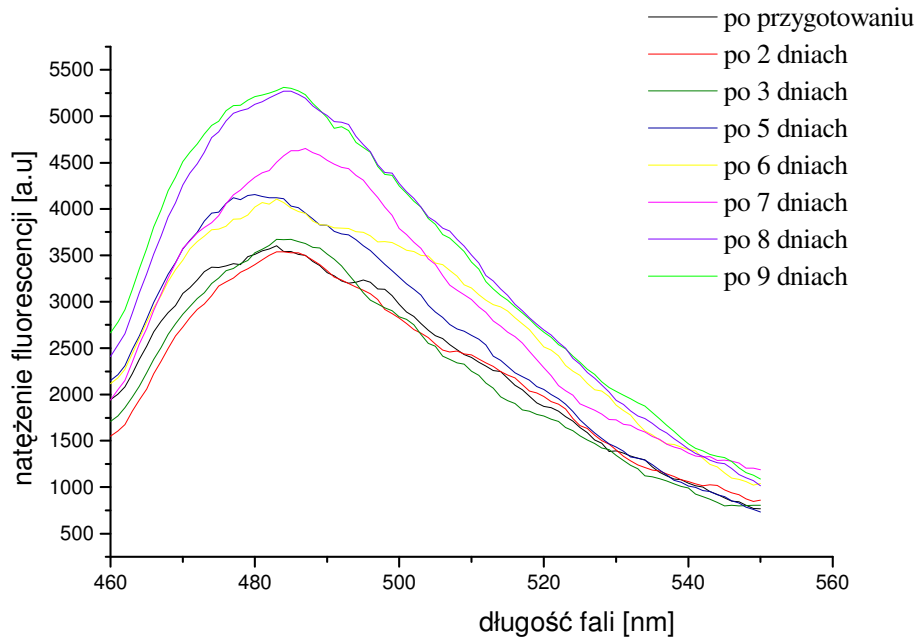
## 4.5. Odwracalność procesu agregacji

### 4.5.1. Kinetyka procesu agregacji cząsteczek lizozymu w roztworze

W szeregu pracach przedstawiano zależność czasową procesu tworzenia włókien amyloidowych [106]. Zwykle są to zmiany obejmujące okres godzin lub dni.

W ramach niniejszej pracy badano kinetykę procesu agregacji uporządkowanej lizozymu o stężeniu 4.5 mg/ml w roztworze etanolu ( $C_{EtOH} = 80\%$  (v/v)). W tym celu wykonano badania z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego – tioflawiny.

Eksperymentalne widma fluorescencji tioflawiny dla różnych czasów inkubacji roztworu białka przedstawione są na rysunku 52. Wartość natężenia fluorescencji przy ( $\lambda = 482\text{nm}$ ) zwiększa się nieznacznie od wartości 3570 [a.u.] (zmierzona po przygotowaniu roztworu białka) do wartości 3609 [a.u.] (po 3 dniach inkubacji roztworu lizozymu). Oznacza to, że w wybranych warunkach następuje przejście z postaci globularnej w postać włóknistą białka. Obserwuje się powstawanie pierwszych protofilamentów. Wyraźny wzrost wartości natężenia fluorescencji barwnika obserwowano po 5 dniach inkubacji roztworu. Proces inkubacji powoduje bowiem wzrost liczby agregatów włóknistych w roztworze. Po ośmiu dniach inkubacji roztworu białka, nie obserwowano dalszego wzrostu natężenia fluorescencji barwnika. Można wnioskować o stałej liczbie włókien w roztworze. Na podstawie analizy zmian fluorescencji barwnika zaproponowano model kinetyki procesu tworzenia uporządkowanych agregatów. Istnienie etapu nukleacji, podczas którego obecne są agregaty o różnorodnej konformacji może być przyczyną pewnej niejednorodności przestrzennej w procesie tworzenia amyloidów. Początkowa inkubacja roztworu białka prowadzi do powstawania pierwszych agregatów uporządkowanych. Obecność w wybranej objętości roztworu białka, pierwszych stabilnych agregatów włóknistych promuje powstawanie innych włókien. W rezultacie, w rozpatrywanej objętości stężenie agregatów włóknistych jest większe od średniego stężenia włókien w całym roztworze. Agregaty te mogą dyfundować po całej objętości, powodując powstawanie włókien w innych regionach. Ostatecznie wzrasta szybkość powstawania amyloidów w całym roztworze.



Rys. 52. Widma fluorescencji tioflawiny w obecności lizozymu w 80% (v/v) etanolu.

Zmiana znormalizowanej wartości natężenia światła fluorescencji o długości fali  $\lambda=482\text{nm}$  w funkcji czasu inkubacji roztworu białka ( $c=4.5\text{mg/ml}$ ) w 80% (v/v) przedstawiona jest na rys. 53. Zmiana natężenia fluorescencji w funkcji czasu inkubacji roztworu białka może być opisana funkcją sigmoidalną postaci [107]:

$$F(t) = \frac{A}{1 + e^{-k(t-t_{1/2})}} \quad (18)$$

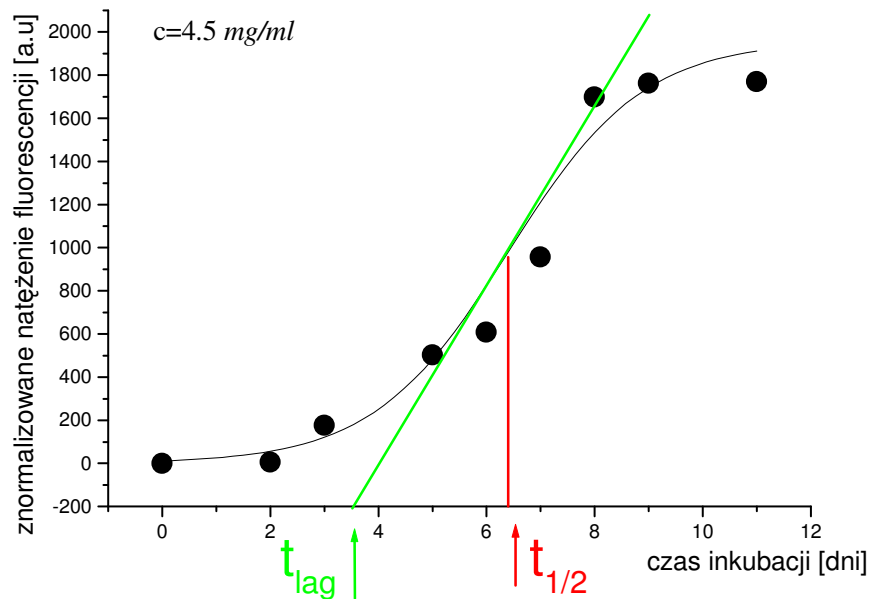
gdzie  $A$  - oznacza amplitudę,  $t_{1/2}$  - czas potrzebny na ukończenie połowy procesu agregacji uporządkowanej,  $k$  - stała szybkości etapu elongacji. Czas po którym obserwuje się zakończenie etapu nukleacji ( $t_{lag}$ ) wyznaczamy na podstawie przecięcia się z osią czasu, prostej przechodzącej przez punkt  $(t_{1/2}; F(t))$ , której nachylenie definiowane jest jako tangens ze stałej szybkości etapu elongacji ( $k$ ). Na podstawie tej definicji wartość  $t_{lag}$  można obliczyć, korzystając ze wzoru postaci:

$$t_{lag} = t_{1/2} - \frac{2}{k} \quad (19)$$

Wyznaczone eksperymentalnie wartości  $k$ ,  $t_{1/2}$  oraz  $t_{lag}$  wynoszą odpowiednio 0,8 dni<sup>-1</sup>; 6,4 dni oraz 3,9 dni. Oznacza to, że mechanizm agregacji włóknistej lizozymu z jaja kurzego w wodnych roztworach etanolu można opisać wyróżniając etap nukleacji i elongacji. Zatem kinetykę procesu agregacji uporządkowanej można zdefiniować następująco [107]:



gdzie  $A$  – oznacza włókna amyloidowe,  $N$  - agregaty nie wykazujące formy włóknistej,  $k_s$ ;  $k_f$  – stałe szybkości odpowiednio pierwszej i drugiej fazy, opisujące kinetykę procesu tworzenia amyloidów.



Rys. 53. Kinetyka procesu tworzenia włókien amyloidowych lizozymu (4.5 mg/ml) w 80% EtOH. Roztwór białka inkubowano w temperaturze  $T \approx 293\text{K}$

W eksperymencie opisanym w tej pracy początkowy etap tworzenia amyloidów trwał 3.9 dni (etap nukleacji). W tym czasie tworzą się pierwsze agregaty włókniste a szybkość ich tworzenia jest wyraźnie wolniejsza w stosunku do powstawania amyloidów w fazie drugiej. Podczas drugiej fazy (trwającej około 4 dni) obserwujemy eksponentalny charakter zmian natężenia fluorescencji barwnika. Zatem w wybranych warunkach eksperymentalnych proces tworzenia agregatów włóknistych jest bardzo szybki. Stała szybkości tej fazy wynosiła  $k = 0.8 \text{ dni}^{-1}$ . Uzyskany wynik potwierdza, że szybkość tworzenia nowych włókien zależy od ilości początkowych agregatów włóknistych obecnych w roztworze. Ostatecznie maksymalną wartość natężenia fluorescencji obserwowano podczas fazy plateau. Na podstawie uzyskanych danych, można wnioskować, że w ostatnim etapie filamenty amyloidowe są strukturami dość stabilnymi, a ich liczba jest stała. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi innymi metodami (dynamicznego rozpraszania światła i Czerwieni Kongo oraz spektroskopii dichroizmu kołowego). Przed wykonaniem badań rozproszeniowych oraz badań dichroizmu kołowego roztwór białka w 80% EtOH inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Na podstawie analizy widm CD pokazano, że dominującą strukturą drugorzędową jest helisa  $\alpha$ . Analiza widm absorpcji barwnika czerwieni Kongo wykazała, że w wybranych warunkach białko nie występuje w postaci agregatów uporządkowanych (włókien). Analiza fluorymetryczna również potwierdziła brak obecności agregatów włóknistych po 24 godzinach inkubacji roztworu białka.

Analogiczne zmiany natężenia fluorescencji tioflawiny w funkcji czasu inkubacji (w temperaturze 310K) obserwowano w roztworach insuliny (pH = 2.0; 1M kwas octowy) [105]. Autorzy cytowanej pracy wskazali na szybki wzrost natężenia fluorescencji barwinka w obecności insuliny inkubowanej w czasie dłuższym niż 55 godzin. Podobne wyniki uzyskał Wang i współprac. [62]. Pokazali, że obecność lizozymu z jaja kurzego w roztworze HCl (pH = 2.0) nie wpływa na istotną zmianę natężenia fluorescencji tioflawiny dla  $\lambda = 482\text{nm}$  dla różnych czasów inkubacji roztworu białka w temperaturze 328K. Na podstawie powyższej analizy wnioskowano, że w wybranych warunkach nie tworzyły się agregaty włókniste. Jednocześnie pokazano, że proces dodawania soli do roztworu białka powodował drastyczny wzrost natężenia fluorescencji barwinka. Wyznaczone dwa parametry: stała szybkości etapu elongacji i czas trwania etapu nukleacji, charakteryzujące proces agregacji uporządkowanej lizozymu w obecności soli wynosiły odpowiednio  $k = 0.12 \text{ dni}^{-1}$  oraz

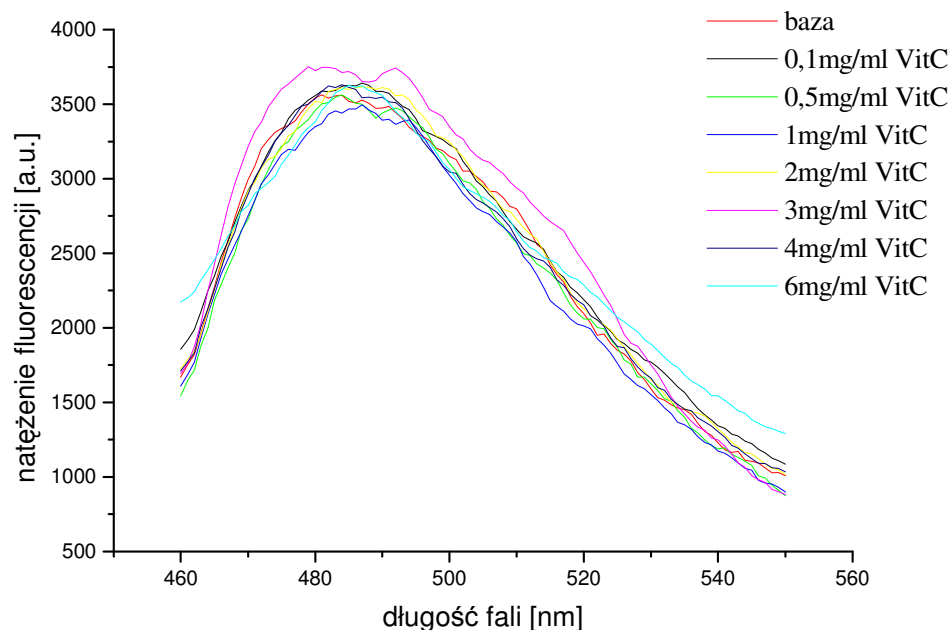
$t_{lag} = 32.14$  dni. Można zatem przyjąć, że oddziaływania elektrostatyczne odgrywają istotną rolę w procesie tworzenia włókien amyloidowych.

#### 4.5.2. Odwracalność procesu agregacji

Intensywne badania amyloidów w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* poświęcone są przede wszystkim wyjaśnieniu wspólnego molekularnego mechanizmu agregacji włóknistej dla wszystkich rodzajów białek. Natomiast w literaturze brak informacji o odwracalności procesu agregacji włókien amyloidowych w warunkach *in vivo*. Generalnie, liczba prac poświęcona temu zagadnieniu jest niewielka. Ustalenie czynników decydujących o odwracalności procesu byłoby istotną wskazówką w poszukiwaniu skutecznej terapii chorób wywołanych przez amyloidy.

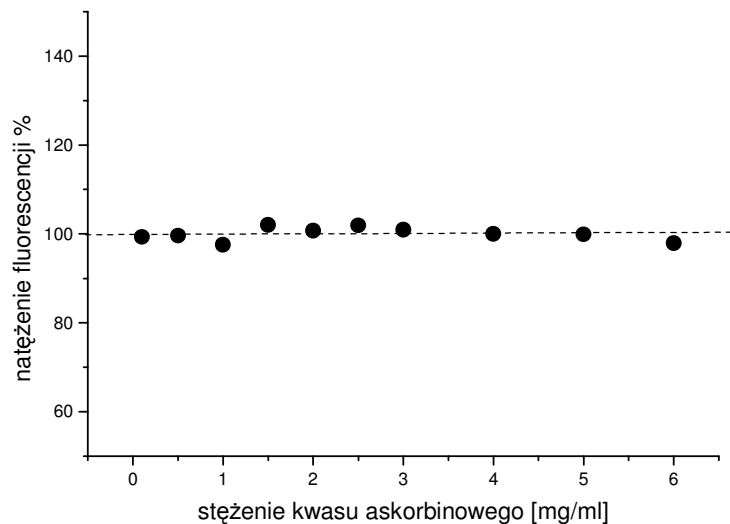
W ramach niniejszej pracy oprócz określenia warunków powstawania określonego rodzaju form strukturalnych w układzie woda – etanol – lizozym, zbadane zostały czynniki chemiczne decydujące o możliwej odwracalności procesu agregacji lub o zwiększeniu jego efektywności. Do grupy czynników, które były brane pod uwagę, należą kwas salicylowy i askorbinowy. Badania te zostały przeprowadzone z użyciem barwnika fluorescencyjnego i uzupełnione o badania z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego.

Włókna amyloidowe lizozymu z jaja kurzego w 80% (v/v) etanolu otrzymano podczas inkubacji roztworu białka przez okres 9 dni w temperaturze pokojowej. W wybranych warunkach, wartość natężenia fluorescencji barwnika tioflawiny obserwowano w fazie plateau (Rys.53). Proces zaburzenia struktury włókien obserwowano w obecności kwasu askorbinowego o stężeniu w zakresie 0 ÷ 6 mg/ml. Widma natężenia fluorescencji tioflawiny w obecności włókien amyloidowych oraz kwasu askorbinowego o zmieniającym się stężeniu przedstawione są na rys 54. Zaobserwowano, że obecność coraz to większej liczby cząsteczek kwasu askorbinowego w roztworze nie wpływa na zmianę widma fluorescencji barwnika. Ponadto wartość natężenia fluorescencji tioflawiny dla  $\lambda = 482\text{nm}$  nie zmienia się w sposób istotny, lecz pozostaje stała pomimo wzrostu stężenia kwasu askorbinowego w roztworze (Rys.55).

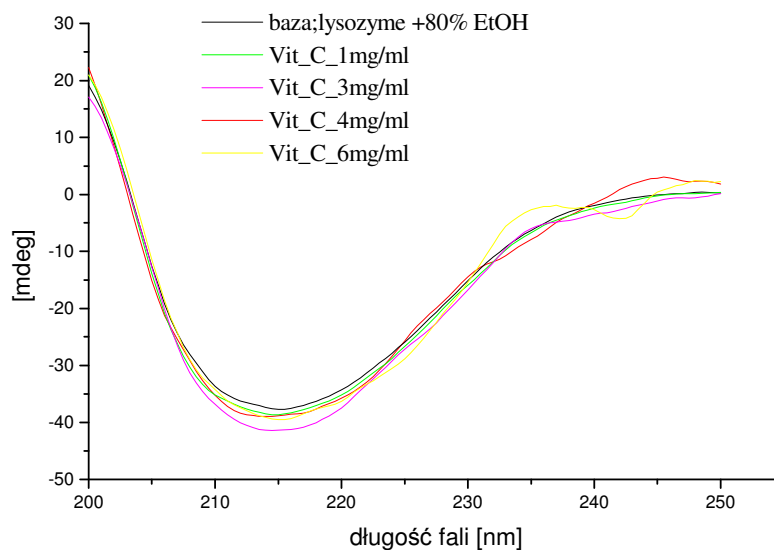


Rys. 54. Widma fluorescencji barwnika w obecności w obecności włókien amyloidowych lizozymu ( $c = 4.5 \text{ mg/ml}$  w 80% EtOH) w obecności kwasu askorbinowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie  $0 \div 6 \text{ mg/ml}$ .

Powyższa analiza pozwala wnioskować, że obecność kwasu askorbinowego nie powoduje zniszczenia wiązań stabilizujących włókna. Nie obserwuje się zmian w strukturze włókien. Generalnie wiadomo, że kwas askorbinowy ma właściwości antyoksydacyjne. Podobne właściwości wykazują również polifenole [108]. Badania pokazały, że antyoksydacyjne właściwości polifenoli odgrywają istotną rolę w zniszczeniu struktury włókien. Niestety, molekularny mechanizm działania tych cząsteczek, powodujący zniszczenie struktury włókien podczas procesów redox nie jest do końca poznany. Na podstawie wyników badań uzyskanych w ramach niniejszej pracy można wnioskować, że właściwości antyutleniające cząsteczki są warunkiem zasadniczym, ale nie wystarczającym podczas odwracalności procesu agregacji uporządkowanej. Do grupy czynników, odgrywających prawdopodobnie istotną rolę w procesie zniszczenia struktury włókien zalicza się między innymi, oddziaływania hydrofobowe, obecność grup fenyloowych w cząsteczce, zawierających w swych pierścieniach wiele grup hydroksylowych.



Rys. 55. Natężenie fluorescencji tioflawiny dla  $\lambda = 482$  nm w obecności włókien amyloidowych lizozymu ( $c_{\text{EtOH}} = 80\%$  (v/v)) w obecności kwasu askorbinowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie  $0 \div 6$  mg/ml. Natężenie fluorescencji wyrażone jako % początkowej wartości (dla barwnika z włóknami lizozymu gdy stężenie kwasu askorbinowego wynosiło 0 mg/ml).



Rys. 56. Widmo CD włókien amyloidowych lizozymu w obecności kwasu askorbinowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie  $0\text{-}6$  mg/ml.

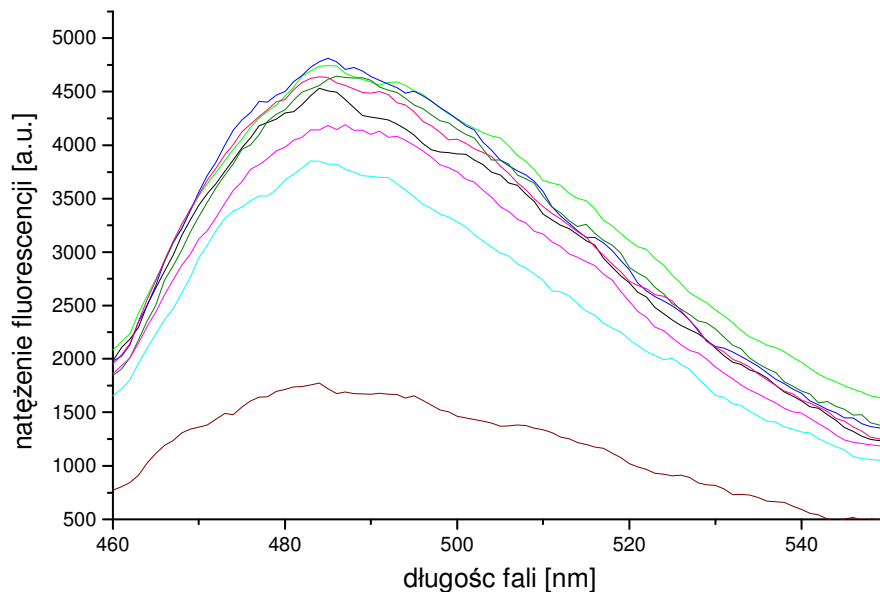
Więcej informacji na temat oddziaływania cząsteczek kwasu askorbinowego z włóknami amyloidowymi niesie widmo CD w zakresie dalekiego UV (Rys.56). Obecność kwasu askorbinowego w analizowanym zakresie stężeń ( 0 ÷ 6 mg/ml) nie powoduje zmian w widmie lizozymu. We wszystkich przypadkach obserwowano ujemny efekt Cottona dla fali o długości 215 nm. Oznacza to, że dominującą strukturą drugorzędową lizozymu jest struktura  $\beta$ . W rezultacie w wybranych warunkach agregaty włókniste są stabilne a ich struktura jest zachowana.

W ramach niniejszej pracy badano również, odwracalność procesu agregacji uporządkowanej wywołaną cząsteczkami kwasu acetylosalicylowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie 0 ÷ 6 mg/ml. Widma fluorescencji tioflawiny w obecności włókien amyloidowych i kwasu acetylosalicylowego przedstawione są na Rys.57. W obecności kwasu acetylosalicylowego w zakresie stężeń od 0 ÷ 3 mg/ml, nie obserwowano zmian w widmie barwnika. Ponadto, w wybranych warunkach wartość natężenia fluorescencji tioflawiny dla  $\lambda = 482$  nm pozostawała praktycznie stała (Rys.58). Włókna zachowują swoją charakterystyczną konfigurację nazywaną jako „poprzeczną strukturę  $\beta$ ”. Jednocześnie nie obserwowano zmian w kształcie widm CD dla włókien lizozymu (Rys.59). Wartość ujemnego efektu Cottona dla fali o długości 215nm pozostawała stała. Wynika z tego, że strukturą drugorzędową tworzącą włókna są struktury  $\beta$ , a ich ilość również się nie zmienia.

W przypadku gdy, stężenie kwasu acetylosalicylowego w roztworze osiągnęło poziom 4 mg/ml obserwowano zmiany w widmie fluorescencji tioflawiny. Natężenie fluorescencji dla  $\lambda = 482$  nm wynosiło 91% swojej początkowej wartości. Ponadto obserwowano wyraźną zmianę w widmie CD. Można zatem przyjąć, że w wybranych warunkach osłabieniu ulegają wiązania stabilizujące strukturę amyloidów.

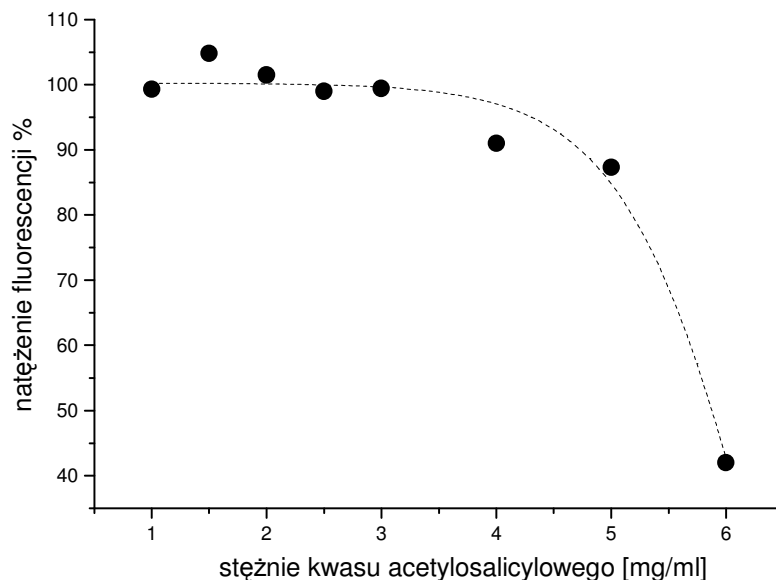
Warto zauważyć, że obecność intramolekularnych mostków S-S jest niezbędna w procesie tworzenia włókien. Na podstawie badań innych białek lub łańcuchów peptydowych, np.  $\beta_2$  – makroglobuliny [109], pokazano, że białka pozbawione mostków S-S nie tworzą włókien amyloidowych. Badano również zahamowanie bądź spowolnienie procesu agregacji uporządkowanej pod wpływem obecności takich cząsteczek jak, TCEP (Tris(2-karboksyetylo)fosfina) [63], melatonina [62], p-benzochinon [62], kurkumina [64]. Wykazano, że obecność cząsteczek TCEP o stężeniu 50  $\mu$ mol/L powoduje redukcję mostków dwusiarczkowych, co utrudnia tworzenie włókien amyloidowych. W przypadku niedenaturowanych białek, TCEP nie jest w

stanie zredukować wszystkich mostków S - S, lecz tylko tę część, która ulega ekspozycji do środowiska wodnego. Zauważono, że zniszczenie 40% mostków dwusiarczkowych obecnych w lizozymie powoduje, że w 90% proces agregacji uporządkowanej jest zahamowany.



Rys. 57. Widma fluorescencji barwnika w obecności włókien amyloidowych lizozymu ( $c_{\text{EtOH}} = 80\%$  (v/v)) w i kwasu acetylosalicylowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie  $0 \div 6$  mg/ml.

Wyznaczona eksperymentalnie wartość natężenia światła fluorescencji o długości fali  $\lambda = 482$  nm pod wpływem oddziaływania z włóknami wyraźnie maleje od 91% w obecności kwasu acetylosalicylowego o stężeniu 4 mg/ml do 42% swojej początkowej wartości, gdy zawartość inhibitora wynosi 6 mg/ml. Jednocześnie pokazano drastyczną zmianę w kształcie widma CD dla lizozymu. Obserwowano nieregularny kształt widma. Oznacza to, że struktury  $\beta$  tworzące włókna ulegają zniszczeniu. Ostatecznie z uporządkowanej konformacji tworzą się bezpostaciowe, amorficzne struktury. Ponadto wyznaczono graniczną wartość stężenia kwasu acetylosalicylowego ( $c = 3.2$  mg/ml), przy której rozpoczyna się proces zaburzenia stabilności struktury włókna.

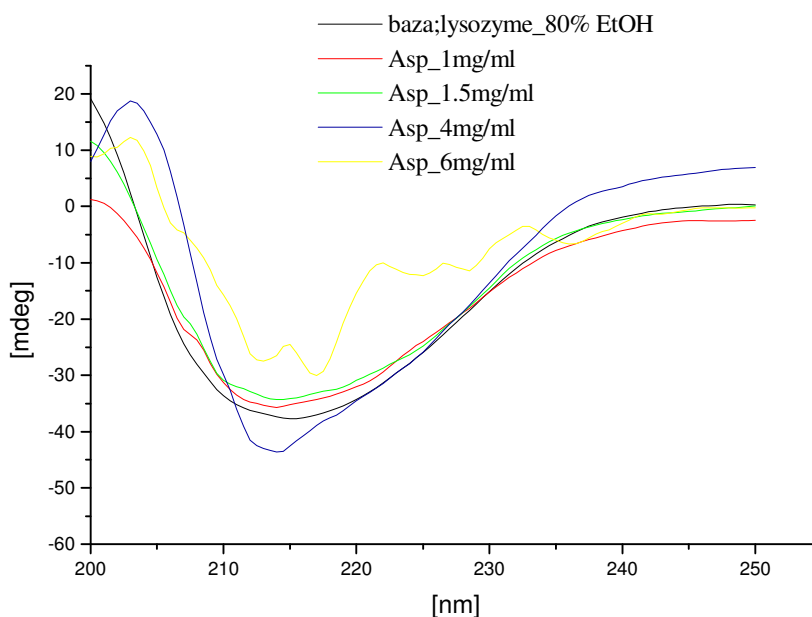


Rys. 58. Natężenie fluorescencji tioflawiny dla  $\lambda = 482$  nm w obecności włókien amyloidowych lizozymu ( $c_{\text{EtOH}} = 80\%$  (v/v)) i kwasu acetylosalicylowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie  $0 \div 6$  mg/ml. *Natężenie fluorescencji wyrażone jako % początkowej wartości (dla barwnika z włóknami lizozymu gdy stężenie kwasu acetylosalicylowego wynosiło 0 mg/ml).*

Generalnie wiadomo, że podczas tworzenia amyloidów hydrofobowość włókien rośnie. Można zatem zakładać, że specyficzne, hydrofobowe oddziaływania pomiędzy kwasem acetylosalicylowym a włóknami odgrywają istotną rolę w procesie destabilizacji amyloidów.

Zniszczenie włóknistej struktury białka obserwowano również w obecności innych związków, do których zaliczamy katechiny. Zauważono, że prolina i tryptofan są specyficznymi miejscami wiązania się tych cząsteczek z molekułami lizozymu [110]. Jednocześnie reszty te są bardziej dostępne dla katechin w włóknach niż w formie natywnej białka. Prowadzi to do wzrostu oddziaływań hydrofobowych pomiędzy włóknami a cząsteczkami katechiny i zaburzenia fibrylarniej struktury włókna.

Podobne wyniki uzyskał Hirohota i współprac. [111]. Autorzy cytowanej pracy pokazali, że miry cetyna, należąca do grupy flawanoidów łączy się specyficznie i w sposób odwracalny z dojrzałymi włóknami amyloidowymi. Pokazano jednocześnie, że cząsteczka ta powoduje zahamowanie bądź spowolnienie procesu agregacji włóknistej oraz wpływa na destabilizację amyloidów.



Rys. 59. Widma CD włókien amyloidowych lizozymu w obecności kwasu acetylosalicylowego o stężeniu zmieniającym się w zakresie 0 ÷ 6 mg/ml.

## 5. Wnioski

W ramach niniejszej pracy, by zrealizować główny cel pracy, którym była analiza strukturalna wodnych roztworów lizozymu, postanowiono zrealizować cztery zadania szczegółowe:

1. Określenie różnorodności form strukturalnych lizozymu z białka jaja kurzego w wodnych roztworach etanolu.

Analiza światła rozproszonego na roztworach lizozymu pozwoliła wyjaśnić na poziomie molekularnym subtelne zmiany zachodzące w oddziaływaniach intermolekularnych. Pokazano, że obecność etanolu o stężeniu  $c_{\text{EtOH}} = 4.54\%$  (v/v), powoduje proces początkowych zmian strukturalnych lizozymu wywołanych solwatacją etanolem. Wiązanie się cząsteczek etanolu na powierzchni białka nie narusza struktury trzeciorzędowej lizozymu, gdy ilość etanolu w roztworze nie przekrocza wartości granicznej ( $c_{\text{EtOH}} = 4.54\%$  v/v).

Badania prowadzone metodą dynamicznego rozpraszania światła oraz metodą spektrofotometryczną, z wykorzystaniem barwnika czerwień Kongo, pozwoliły na określenie różnorodności form strukturalnych lizozymu z białka jaja kurzego (monomery, agregaty o strukturze nieuporządkowanej, protofilamenty i włókna amyloidowe) w wodnych roztworach etanolu. Wyniki te zostały ujęte w postaci diagramu fazowego (Rys.36). Wyznaczone eksperymentalnie podstawowe dane o warunkach tworzenia się określonych form strukturalnych lizozymu, są zgodne z wynikami badań procesu agregacji białka uzyskanymi za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego i spektrofluorymetrii. Zarówno przed wykonaniem badań DLS oraz badań CD roztwór białka (4 mg/ml) w 80% EtOH inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Na podstawie wykreślonego diagramu fazowego, w wybranych warunkach lizozym ma postać agregatów nieuporządkowanych (Rys.36). Ponadto, z analizy widm CD wynika, że nie obserwowano przejścia helisy  $\alpha$  w strukturę  $\beta$ , charakterystycznego dla procesu tworzenia form włóknistych (Rys.37). Analiza fluorymetryczna również potwierdziła brak obecności agregatów włóknistych po 24 godzinach inkubacji roztworu białka (Rys.53).

Jest to pierwszy diagram zmian strukturalnych lizozymu, analizowanych w tak szerokim zakresie stężeń białka (od 2 mg/ml do 20 mg/ml) i czynnika denaturującego. Ponadto diagram ten został wykreślony w oparciu o wyniki uzyskane dwoma uzupełniającymi się metodami. Obecnie znany jest z literatury tylko jeden tego typu diagram fazowy dla lizozymu [59]. Hipotezy o istnieniu pośrednich form strukturalnych formułowano tylko na podstawie badania zmian wartości promienia żyrcacji cząsteczki lizozymu wywołane obecnością etanolu. Ponadto analiza ta dotyczyła lizozymu przy stężeniach w zakresie od 2 mg/ml do 10 mg/ml.

Niniejsza praca doktorska prezentuje po raz pierwszy diagramy zmian strukturalnych lizozymu w funkcji stężenia etanolu i soli w roztworze, wyznaczone w oparciu o analizę zmian reologicznych roztworów białka (Rys.45). Przedstawiają one

warunki, w których następuje przejście z przepływu newtonowskiego badanego koloidu do przepływu pseudoplastycznego, co świadczy o tworzeniu się wydłużonych struktur – filamentów.

Analiza współczynnika dyfuzji translacyjnej lizozymu uzupełniona o wyniki uzyskane innymi metodami (metoda spektrofotometryczna z użyciem czerwieni Kongo, spektroskopia CD, analiza zmian gęstości właściwej roztworu lizozymu) pozwoliła sformułować koncepcję wyjaśniającą wzrost wartości współczynnika dyfuzji translacyjnej agregatów lizozymu, gdy stężenie etanolu w roztworze przekroczyło poziom 80% (v/v). W wysokim stężeniu alkoholu tworzy się nowa postać strukturalna lizozymu poprzez ciasne, uporządkowane układanie się molekuł białka prowadzące do utworzenia zwartej struktury oraz zmniejszenia wolnych przestrzeni w cząsteczce. Ostatecznie tworzą się agregaty włókniste.

## 2. Analiza procesu powstawania określonej formy strukturalnej lizozymu;

Analiza ilościowa (z wykorzystaniem algorytmu obliczeniowego CONTIN) i jakościowa widm CD z zakresie dalekiego i bliskiego UV pozwoliła na wyznaczenie warunków powstawania określonych, pośrednich form strukturalnych lizozymu. Przedstawiono również nowe wyniki dotyczące charakterystyki strukturalnej tych form białka. W niskim stężeniu etanolu pierwsza z form strukturalnych tworzyła się poprzez wiązanie molekuł etanolu na powierzchni białka, powodując stopniowe niszczenie otoczki hydratacyjnej. W kolejnej formie pośredniej mniej stabilna domena  $\beta$  rozplata się, natomiast struktura przestrzenna domeny  $\alpha$  prawdopodobnie zostaje zachowana. Wzrost zawartości etanolu w roztworze (35% – 55 % (v/v)) powoduje rozplatanie najmniej stabilnej helisy C, co prowadzi do zaburzenia struktury domeny  $\alpha$ . Nowa postać strukturalna charakteryzuje się obecnością nie natywnych form heliakalnych. Tworzą się one w chwili, gdy stężenie alkoholu w roztworze białka mieści się w zakresie 55% - 75% (v/v). Ostatecznie obserwowana forma pośrednia charakteryzuje się tworzeniem nowych struktur  $\beta$  (Rys.43).

Analiza zmian reologicznych lizozymu pozwoliła sformułować hipotezy, dotyczące modelu przemian konformacyjnych białka, w którym wyszczególniono dwa etapy (Rys.50). Pierwszy dotyczy zmian otoczki hydratacyjnej, a lizozym występuje w postaci monomerów. Ponadto dla tych warunków, roztwór lizozymu zachowuje się jak ciecz newtonowska. Drugi etap zmian strukturalnych dotyczy tworzeniu agregatów w

postaci wydłużonych struktur – filamentów. Ponadto, w tych warunkach następuje zmiana charakteru przepływu białka z przepływu newtonowskiego do pseudoplastycznego. Pokazano również, że dla wysokiego stężenia etanolu ( $C_{EtOH}=85\%$  (v/v)) tworzą się stabilne formy strukturalne białka, o czym świadczy występowanie plateau w zależności wartości lepkości roztworów lizozymu w funkcji stężenia etanolu.

Analogiczne formy strukturalne lizozymu obserwowano natomiast w obecności 15mmol/L NaCl przy niższych stężeniach białka. Analiza zmian strukturalnych lizozymu wywołana obecnością soli w roztworze pozwoliła wysunąć hipotezę, że obecność soli w roztworze powoduje osłabienie oddziaływań opychających, a następnie wzrost oddziaływań przyciągających. Warto zaznaczyć, że dodawanie soli powodowało powstawanie żelu. W wyniku elektrostatycznego ekranowania ładunków na powierzchni agregatów włóknistych zwiększa się bowiem prawdopodobieństwo łączenia się ich w formę ostateczną – włókna dojrzałe.

### 3. Wyznaczenie kinetyki zmian konformacyjnych lizozymu.

Analiza kinetyki tworzenia uporządkowanych agregatów potwierdziła istnienie etapu nukleacji i elongacji w tym procesie. Zmiany natężenia fluorescencji w funkcji czasu inkubacji roztworu białka opisano funkcją sigmoidalną. Kinetykę zmian konformacyjnych lizozymu scharakteryzowano za pomocą trzech parametrów: stałej szybkości etapu elongacji ( $k$ ), czasu potrzebnego na ukończenie połowy etapu agregacji uporządkowanej ( $t_{1/2}$ ) oraz czasu, po którym obserwowano zakończenie etapu nukleacji ( $t_{lag}$ ). Wyznaczone eksperymentalnie wartości  $k$ ,  $t_{1/2}$ ,  $t_{lag}$  wynosiły odpowiednio  $0.8\text{dni}^{-1}$ , 6.4dni oraz 3.9dni.

Zaprezentowano koncepcję wyjaśniającą, na poziomie molekularnym, mechanizmy działania tych dwóch etapów. Istnienie etapu nukleacji, podczas którego obecne są agregaty o różnej konformacji może być przyczyną pewnej niejednorodności przestrzennej w procesie tworzenia amyloidów. Obecność w wybranej objętości roztworu białka pierwszych agregatów uporządkowanych promuje powstanie innych włókien. W rezultacie, w rozpatrywanej objętości stężenie agregatów włóknistych jest większe od średniego stężenia włókien w całym roztworze. Agregaty te mogą dyfundować po całej objętości. Powoduje to powstanie włókien w innych regionach, a co za tym idzie wzrasta szybkość powstawania amyloidów w całym roztworze.

---

#### 4. Analiza stabilności włóknistych form strukturalnych w obecności różnych czynników chemicznych.

Analiza stabilności włóknistych form strukturalnych lizozymu pozwoliła na prezentację nowych wyników badań *in vitro*, dotyczących odwracalności procesu agregacji uporządkowanej. W ramach niniejszej pracy pokazano po raz pierwszy, że obecność kwasu acetylosalicylowego o stężeniu 6 mg/ml powoduje zniszczenie włóknistej struktury białka. Z uporządkowanej konformacji tworzyły się bezpostaciowe, amorficzne struktury. Zaproponowano, że w procesie destabilizacji włókien istotną rolę odgrywają specyficzne, hydrofobowe oddziaływania pomiędzy włóknami i cząsteczkami kwasu acetylosalicylowego, które to prowadzą do osłabienia wiązań stabilizujących strukturę amyloidów. Ponadto wyznaczono graniczną wartość stężenia kwasu acetylosalicylowego ( $c = 3.2$  mg/ml), przy której rozpoczyna się proces niszczenia struktury włókna. Zaproponowano, że właściwości antyutleniające cząsteczki są warunkiem zasadniczym, ale nie wystarczającym w procesie destabilizacji włóknistej struktury amyloidów. Oczywiście jest to hipoteza, która wymaga dalszej weryfikacji i analizy. Wiedza ta jednak byłoby istotną wskazówką w poszukiwaniu skutecznej terapii chorób wywołanych przez amyloidy.

---

## Literatura

- [1] Sipe D.J., Cohen S.A. (2000) History of the amyloid fibril, *J. Struc. Biol.* 130, 88-98.
- [2] Divry P., Florkin M. (1927) Sur les proprietes optiques de l'amyloide, *C.R. Soc. Biol.* 97, 1808-1810.
- [3] Cohen A.S., Calkins E. (1959) Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins, *Nature* 183, 1202-1203.
- [4] Bonar L., Cohen A.S., Skinner M.M. (1969) Characterization of the amyloid fibril as a cross-beta protein, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1373-1375.
- [5] Guijarro J.I., Sunde M., Jones J.A., Campbell I.D., Dobson C.M. (1999) Amyloid fibril formation by an SH3 domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4224-4228.
- [6] Frandrich M., Dobson C.M. (2002) The behavior of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation, *EMBO J.* 21, 5682-5690.
- [7] Dobson C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 329-332.
- [8] Stefani M., Dobson C.M., (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution, *J. Mol. Med.* 81, 678-699.
- [9] Uversky V.N., Fink A.L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded, *Biochem. Biophys. Acta* 1698, 131-153.
- [10] Dobson M.Ch., (2003) Protein folding and misfolding, *Nature* 426, 18-25.
- [11] Fink A.L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid, *Folding and Design* 3, R9-R23.
- [12] Kelly J. (1998) The alternative conformation of amyloidogenic proteins and their multistep assembly pathways, *Curr. Opin. Strct. Biol.* 8, 101-106.
- [13] Bouchard M., Zurdo J., Nettleton E.J., Dobson C.M., Robinson C.V. (2000) Formation of amyloid fibrils followed by FT-IR simultaneously with CD and electron microscopy, *Protein Sci.* 9, 960-967.
- [14] Nettleton E.J., Tito P., Sunde M., Bouchard M., Dobson C.M., Robinson C.V. (2000) Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry, *Biophys. J.* 79, 1053-1065.

- [15] Kelly J.W. (2000) Mechanisms of amyloidogenesis, *Nat. Struct. Biol.* 7, 824-826.
- [16] Idicula S.T., Balaji P.V. (2007) Protein aggregation: A perspective from amyloid and inclusion – body formation, *Curr. Sci.* 92, 758-767.
- [17] Marcon G., Plakoutsi G., Canale C., Relini A., Taddei N., Dobson Ch.M., Ramponi G., Chiti F. (2005) Amyloid formation from HypF-N under conditions in which the protein is initially in its native state, *J. Mol. Biol.* 347, 323-335.
- [18] Booth D.R., Sunde M., Bellotti V., Robinson C.V., Hutchinson W.L., Fraser P.E., Hawkins P.N., Dobson Ch.M., Radford S.E., Blake C.C.P., Pepys M.B. (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis, *Nature* 385, 787-793
- [19] Chiti F., Taddei N., Bucciantini M., White P., Ramponi G., Dobson C.M. (2000) Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein, *EMBO J.* 19, 1441-1440
- [20] Arai S., Hirai M. (1999) Reversibility and hierarchy of thermal transition of hen egg-white lysozyme studied by small-angle X-ray scattering, *Biophys. J.* 76, 2192-2197.
- [21] Krebs H.R.M., Wilkins K.D., Chung W.E., Pitkeathly C.M., Chamberlain K.A., Zurdo J., Robinson V.C., Dobson M. (2000) Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the  $\beta$ -domain, *J. Mol. Biol.* 300, 541-549.
- [22] Ferrao-Gonzales A.D., Souta S.O., Silva J.L., Foguel D. (2000) The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6445-6450
- [23] De Felice F.G., Vieira M.N., Meirelles M.N., Morozova-Roche L.A., Dobson C.M., Ferreira S.T. (2004) Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure, *FASEB J.* 18, 1099-1101
- [24] Velev D.O., Kaler M.E., Lenhoff M.A. (1998) Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen, *Biophys. J.* 75, 2682-2667.
- [25] Morozova- Roche A.L., Zurdo J., Spencer A., Noppe W., et al. (2000) Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease – related mutational variants, *J. Struct. Biol.* 130, 339-351.
- [26] Khurana R., Gillespie J.R., Talapatra A., Minert L.J., Ionescu-Zanetti C., Millett I., Fink A.L. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates, *Biochemistry* 40, 3525-3535
- [27] Zurdo J., Guijarro J.J., Jimenez J.L., Saibil H.R., Dobson C.M. (2001) Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain, *J. Mol. Biol.* 311, 325-340

- [28] Kamatari O.Y., Konno T., Kataoka M., Kasaka K. (1998) The methanol-induced transition and the expanded helical conformation in hen lysozyme, *Protein Science* 7, 681-688.
- [29] Goda S., Takano K., Yamagata Y., Maki S., Namba k., Yutani K. (2002) Elongation in a  $\beta$ -structure promotes amyloid-like fibril formation of human lysozyme, *J. Biochem.* 132, 655-661.
- [30] Hoshino M., Hagihara Y., Hamada D., Kataoka M., Goto Y. (1997) Trifluoroethanol-induced conformational transition of hen egg-white lysozyme studied by small-angle X-ray scattering, *FEBS Letters* 414, 72-76.
- [31] Calamai M., Chiti F., Dobson Cg.M., (2005) Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein, *Biophys. J.* 89, 4201-4210.
- [32] Bemporad F., Calloni G., Campioni S., Plakoutsi G., Taddei N., Chiti F. (2006) Sequence and structural determinants of amyloid fibril formation, *Acc. Chem. Res.* 39, 620-627.
- [33] Ohnishi S., Takano K. (2004) Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding, *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 511-524.
- [34] Perutz M., (1994) Polar zippers: their role in human disease, *Protein Sci.* 3, 1629-1637.
- [35] Orpiszewski J., Benson M.D. (1999) Induction of beta-sheet structure in amyloidogenic peptides by neutralization of aspartate: a model for amyloid nucleation, *J. Mol. Biol.* 289, 413-428.
- [36] Blondelle S.E., Forood B., Houghten R.A., Perez-Paya E. (1997) Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes, *Biochemistry* 36, 8393-8400.
- [37] Nelson R., Sawaya M.R., Balbirine M., Mdsen A., Riekel Ch., Grothe R., Eisenberg D. (2005) Structure of the cross- $\beta$  spine of amyloid-like fibrils, *Nature*, 435, 773-778.
- [38] Sawaya M.R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M.I., Sievers S.A., Apostol M.I., Thompson M.J. (2007) Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers, *Nature*, 447, 453-457
- [39] Crestfield A.M., Stein W.H., Moore S. (1962) On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease, *Arch. Biochem. Biophys.* 1(suppl.), 217-222
- [40] Crestfield A.M., Stein W.H., Moore S. (1963) Properties and conformation of the histidine residues at the active site of ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 238, 2421-2428
- [41] Bennett M.J., Choe S., Eisenberg D. (1994) Domain swapping: entangling alliances between proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3127-3131.
- [42] Jaskólski M. (2001) 3D domain swapping, protein oligomerization and amyloid formulation, *Acta Biochem. Pol.* 48, 807-827.

- [43] Liu Y., Eisenberg D., (2002) 3D domain swapping: As domains continue to swap, *Protein Sci.* 11, 1285-1299.
- [44] Stanforth R., Giannini S., Higgins L., Conroy J.M. (2001) Three dimensional domain swapping in the folded and molten globule of cystatins and amyloid – forming structural superfamily, *EMBO J.* 20, 4774-4781.
- [45] Perutz M., Finch T.J., Berriman J., Lesk A. (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5591-5595.
- [46] Kim Y.S., Liu L., Axelsen P.H., Hochstresser R.M. 2D IR provides evidence for mobile water molecules in  $\beta$ -amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17751-17756.
- [47] Klunk E.W., Jacob F.R., Mason P.R., (1999) Quantifying amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) aggregation using the Congo Red- $A\beta$  (CR- $A\beta$ ) spectrophotometric assay, *Anal. Biochem.* 266, 66-76.
- [48] Klunk W.E., Pettegrew J.W., Abraham D.J., (1989) Quantitative evaluation of Congo Red bonding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation, *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1273-1281.
- [49] Carter D.B., Chou K.C., (1998) A model for the structure-dependent binding of Congo Red to Alzheimer  $\beta$ -amyloid fibrils, *Neurobiol. Aging.* 19, 37-40.
- [50] Miura T., Yamamiya Ch., Sasaki M., Suzuki K., Takeuchi H., (2002) Binding mode of Congo Red to Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide studied by UV Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 33, 530-535.
- [51] Makin S.O., Serpell C.L., (2005) Structures for amyloid fibrils, *FEBS J.* 272, 5950-5961.
- [52] Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T., (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal. Biochem.* 177, 244-249.
- [53] Serpell C.L., Sunde M., Benson D.M., Tennent A.G., Pepys B.M., Fraser E.P., (2000) The protofilament substructure of amyloid fibrils – Communication, *J. Mol. Biol.* 300, 1033-1039.
- [54] Paravaastu A.K., Leapman D.R., Yau W-M., Tycko R., (2008) Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18349-18354.
- [55] Eanes D.E., Glenner (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments, *J. Histochem. Cytochem.* 16, 673-677.
- [56] Khare S.D., Dokholyan N.V., (2007) Molecular mechanism of polypeptide aggregation in human diseases, *Curr. Protein. and Peptide Sci.* 8, 573-579.
- [57] Frare E., Laureto P.P., Zurdo J., Dobson M.ch., Fontana A. (2004) A highly amyloidogenic region of hen lysozyme, *J. Mol. Biol.* 340, 1153-1165.

- [58] Arnaudov N.L., Vries de R., (2005) Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme, *Biophys. J.* 88, 515-526.
- [59] Yonezawa Y., Tanaka S., Kubota T., Wakabayashi K., Yutani K., Fujiwara S. (2002) An insight into the pathway of the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme obtained from a small- angle X-ray and neutron scattering study, *J. Mol. Biol.* 323, 237-251.
- [60] Fujiwara S., Matsumoto F., Yonezawa Y., (2003) Effects of salt concentration on association of the amyloid protofilaments of hen egg white lysozyme studied by time-resolved neutron scattering, *J. Mol. Biol.* 331, 21-28.
- [61] Malisauskas M., Zamotin V., Jass J., Noppe W., Dobson M.Ch., Roche A.L., (2003) Amyloid protofilaments from the calcium-binding protein equine lysozyme: formation of ring and linear structures depends on pH and metal ion concentration, *J. Mol. Biol.* 330, 879-890.
- [62] Wang S.S., Chen H.P., Hung T.Y. (2006) Effects of p-benzoquinone and melatonin on amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* . 43, 49-57.
- [63] Wang S., Liu K-N., Lu Y-Ch. (2009) Amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme is inhibited by TCEP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 639-642.
- [64] Wang S., Liu K-N., Lee W-H. (2009) Effect of curcumin on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme, *Biophys. Chem.*, 144, 78-87.
- [65] Stryer L. (1997) *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [66] Biswal B.K., Sukumar N., Vijayan M. (2000) Hydration, mobility and accessibility of lysozyme : structures of a pH 6.5 orthorhombic form and its low-humidity variant and a comparative study involving 20 crystallographically independent molecules, *Acta Cryst.* D56, 1110-1119.
- [67] Ślósarek G., (2005) Badania właściwości fizyko-chemicznych lizozymu za pomocą metod fizycznych opartych na rozpraszaniu promieniowania, w Na pograniczu chemii i biologii (red. H.Koroniak, J. Barciszewski), tom 13, 545-568.
- [68] Gierszewski J., Ślósarek G., (2005) Light scattering studies of ethanol – lysozyme interactions, *Molecular Physics Reports*, 41, 81-88.
- [69] *Poradnik fizyko – chemiczny*. Działy: Ogólny, fizykochemiczny, nieorganiczny, organiczny, analityczny. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowo – Techniczne Warszawa 1974r.
- [70] Gapiński J., Badanie struktury i dynamiki układów supramolekularnych przy pomocy spektroskopii korelacji fotonów. Praca doktorska, Wydział Fizyki UAM, Poznań 1994.
- [71] Rogger A., Norden B, (1997) Circular Dichroism and Linear Dichroism, *Oxford University Press*.

- [72] Provencher S.W., Glocker J., (1981) Estimation of globular protein secondary from circular dichroism, *Biochemistry*, 20, 33-37.
- [73] Anson M.L., Mirsky A.E. (1931) The effect of denaturation on the viscosity of protein systems, *J. Gen. Physiol.* 15, 341-350.
- [74] Tanford C., Kawahara K., Lapanje S., (1967) Protein as random coils. I. Intrinsic viscosities and sedimentation coefficients in concentrated Guanidine hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 729-736.
- [75] Gekko K., Hasegawa Y., (1986) Compressibility – structure relationship of globular proteins. *Biochemistry* 25, 6563-6571.
- [76] Khurana R., Coleman Ch., Zanetti C.I., Carter S.A., Krishana V., Grover R.K., Roy R., Singh S., (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J. Struc. Biol.* 151, 229-238.
- [77] Nicoli D.F., Benedek G.B., (1976) Study of Thermal Denaturation of Lysozyme and Other Globular Proteins by Light Scattering Spectroscopy, *Biopolymers* 15, 2421-2137.
- [78] Tanaka S., Oda Y., Ataka M., Onuca K., Fujiwara S., Yonezawa Y., (2001) Denaturation and aggregation of hen egg lysozyme in aqueous ethanol solution studied by dynamic light scattering, *Biopolymers* 59, 370-379.
- [79] M. Weijers, R.W. Visschers, *Macromolecules* 35, 4753 (2002.)
- [80] Ohnishi S., Koide A., Koide S. (2001) The roles of turn formation and cross-strand interactions in fibrillization of peptides derived from the OspA single-layer  $\beta$ - sheet, *Protein Sci.* 10, 2083–2092.
- [81] Knowles T.P.J., Zahn R. (2006) Enhanced stability of human prion proteins with two disulfide bridges, *Biophys. J.* 91, 1494-1500.
- [82] Szymańska A., Kacprzak K., Ślósarek G. Intermediate Structures in the Process of Hen Egg-White Lysozyme Fibrillation in the Ethanol-Water System – w przygotowaniu.
- [83] Whitmore L., Wallace B.A., (2004) DICHOWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Research* 32, W668-W673.
- [84] Diamod RR, (1974) Real-space refinement of structure of hen egg-white lysozyme. *J. Mol. Biol.* 82 371–391
- [85] Lehmann MS, Mason M, McIntyre GJ, (1985) Study of ethanol-lysozyme interactions using neutron diffraction, *Biochemistry* 24, 5862–5869.
- [86] Deshpande A., Nimsadkar S., Mande S.C. (2005) Effect of alcohols on protein hydration: crystallographic analysis of hen egg-white lysozyme in the presence of alcohols, *Acta Cryst.* D61 1005-1008.

- [87] Kazmirski L.S, Daggett V, (1998) Non-native interactions in protein folding intermediates: molecular dynamics simulations of hen lysozyme, *J. Mol. Biol.* 284 793-806.
- [88] Vernaglia A.B., Huang J., Clar D.E. (2004) Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme, *Biomacromolecules*, 5 1362-1370.
- [89] Liu W., Cellmer T., Keerl D., Prausnitz M.J., Blanch W.H. (2005) Interactions of lysozyme in guanidinium chloride solutions from static and dynamic light scattering measurements, *Biotech. Bioeng.* 90, 482-490.
- [90] Cao A., Hu D., Lai L. (2004) Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme, *Protein Sci.* 13 319-32.
- [91] Goda S., Takano K., Yamagata Y., Nagata R., Akutsu H., Maki S., Namba K., Yutani K. (2000) Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution, *Protein Sci.* 9, 369-375.
- [92] Ansari A., Jones CM., Henry ER., Hofrichter J., Eaton WA. (1992) The role of solvent in the dynamics of rotein conformational changes. *Science*, 26, 1796-1798.
- [93] Price S.W., Rsuchiya F., Arata Y. (2001) Time dependence of aggregation in crystallizing lysozyme solutions probed using NMR self-diffusion measurements, *Biophys. J.* 80, 1585-1590.
- [94] Muschol M., Rosenberger F. (1995) Interaction in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: static and dynamic light scattering results, *J. Chem. Phys.* 103, 10424-10433.
- [95] Areas E.P.G., Areas J.A.G., Hamburger j., Peticolas W.L., Santos P.S. (1996) On the high viscosity of aqueous solution of lysozyme induced by some organic solvents, *J. Coll. Inter. Sci.* 180, 578-589.
- [96] Ahmad F., Salahuddin. (1974) Influence of temperature on the intrinsic viscosities of protein in random coil conformations, *Biochemistry*, 13 245-249.
- [97] Lefebvre J, (1982) Viscosity of concentrated protein solutions, *Rheol. Acta* 21, 620-625.
- [98] Monkos K, (1997) Concentration and temperature dependence of viscosity in lysozyme aqueous solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, 1339, 304-310.
- [99] Pan W., Filobelo L., Pham N.D.Q., Galkin O., Uzunova V.V., Vekilov P.G., (2009) Viscoelasticity in homogeneous protein solutions, *Phys. Rev. Lett.* 102, 058101-1 -0581014.
- [100] Zhou H, (1995) Calculation of Translational Fraction and Intrinsic Viscosity . II. Application to Globular Proteins, *Biophys. J.* 69, 2298-2303.
- [101] Szymańska A., Hornowski T., Ślósarek G., Intermediate state of lysozyme in water - ethanol solution – praca wysłana do druku w *Biorheology*.
- [102] Kamiyama T., Morita M., Kimura R., (2004) Rheological Study of Lysozyme in Dimethyl Sulfoxide + Water Solution at 298.15 K, *J. Chem. Eng. Data.* 49, 1350-1353.

- [103] Harding S.E., (1997) The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 68, 207-262.
- [104] Kamiyama T., Matsusita T., Kimura T., (2003) Volumetric Study of Lysozyme in Dimethyl Sulfoxide + Water Solution At 298.15 K, *J. Chem. Eng. Data.* 48, 1301-1305.
- [105] Smirnovas V., Winter R., Funck T., Dzwolak W, (2006) Protein Amyloidogenesis in the Context of Volume Fluctuations: A Case Study on Insulin, *Chem. Phys. Chem.* 7, 1046-1049.
- [106] Gibson T.J., Murphy R.M. (2006) Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides, *Prot. Sci.* 15, 1133-1141.
- [107] Hellstrand E., Boland B., Walsh D.M., Linse S. (2010) Amyloid  $\beta$ -Protein Aggregation Produces Highly Reproducible Kinetic Data and Occurs by a Two-Phase Process, *ACS Chem. Neurosci.* 1, 13–18.
- [108] He J., Xing Y-F., Huang B., Zhang Y-Z., Zeng Ch-M. Tea Catechins induce the conversion of preformed lysozyme amyloid fibrils to amorphous aggregates, *J. Agric. Food Chem*
- [109] Ohhashi Y., Hagihara Y., Kozhukh G., Hoshino M., Hasegawa K., Yamaguchi I., Naiki H., Goto Y. (2002) The intrachain disulfide bond of beta(2)-microglobulin is not essential for the immunoglobulin fold at neutral pH, but is essential for amyloid fibril formation at acid pH, *J. Biochem.* 131, 45-52.
- [110] Siebert K.J., Troukhanova N.V., Lynn P.Y. (1996) Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* 44, 80-85.
- [111] Hirohata M., Hasegawa K., Tsutsumi- Yasuhara S., Ohhashi Y., Ookoshi T., Ono K., Yamada M., Naiki H. (2007) The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure, *Biochemistry*, 46, 1888-1899.





