

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Jelica R. Milošević

**DIVERZITET PEPTIDNIH SEKVENCI U  
AMILOIDNOM AGREGIRANJU PROTEINA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Jelica R. Milošević

**DIVERSITY OF PEPTIDE SEQUENCES IN  
AMYLOID AGGREGATION OF PROTEINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

**KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:**

**Mentor:**

**Prof. dr Natalija Polović**, vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Članovi komisije:**

**Prof. dr Marija Gavrović-Jankulović**, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Prof. dr Branko Jovčić**

redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Datum odbrane:**

---

## ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki, profesorki dr Nataliji Polović. Prvenstveno na potvrdi da u biohemiji leži velika lepota razumevanja živog sveta koju je pružila na svojim predavanjima na osnovnim studijama, a zatim za podsećanje na to na početku mojih doktorskih studija. Hvala za pronicljivost i prepoznavanje mojih afiniteta, za slobodu i poverenje. Veliko hvala za nesebično deljenje svog znanja, a posebno ideja koje su mnogo doprinele ovom doktoratu i mom naučnom razvoju.

Profesorki dr Mariji Gavrović Jankulović veliko hvala na podršci, pomoći i sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala na poverenju u moj rad na Katedri za biohemiju i poveravanju odgovornih zadataka. Veliko hvala na iskrenim savetima u svim aspektima rada koji su mi mnogo pomogli, kao i na prijatnoj saradnji svih ovih godina.

Profesoru Biološkog fakulteta, dr Branku Jovčiću zahvaljujem se na pomoći prilikom izrade i pisanja doktorske disertacije. Veliko hvala za prijatnu saradnju sa istraživačkom grupom na čelu sa profesorom Jovčićem i svaku dobrodošlicu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Posebnu zahvalnost iskazujem profesoru dr Veletu Teševiću, Dejanu Vučetiću i ostalim kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu za sate provedene u radu na infracrvenom spektrometru, ukazano poverenje, dobrodošlicu, pomoć i prijatne razgovore.

Zahvaljujem se članovima Katedre za biohemiju, kao i ostalim profesorima, asistentima, saradnicima, a posebno dragim tehničarima Hemijskog fakulteta sa kojima sam delila radni prostor, zajedničke brige i probleme ovih godina. Hvala studentima na motivaciji i podsticanju da nalazim novu energiju za ovaj posao i na stalnom podsećanju koliko su nauka i podučavanje lep poziv. Hvala svim dragim ljudima koji su radili u laboratoriji 421 svih ovih godina, kraće ili duže se u njoj zadržali, ali ostavili svoj trag i doprineli prijatnoj atmosferi. Posebno hvala Brankici, Nensi, Tamari i Ani koje su mi na ovom putu postale prijatelji i starim drugarima Fići, Kići i Pešiću za svakodnevnu podršku i trenutke predaha.

I van zgrade Hemijskog fakulteta mnogi su doprineli izradi ove doktorske disertacije savetima, slušanjem, razumevanjem i podrškom. Hvala dragoj prijateljici Mariji, drugoj polovini tima

Marković-Milošević, na međusobnom oslanjanju svih ovih godina od kad je biohemija naš poziv, a koje smo provele pipetirajući, bilo rame uz rame, bilo daleko jedna od druge.

Hvala svim prijateljima, a posebno mojim dečacima, Mari, Mici, Žapcu i Baji za bezrezervno prijateljstvo, razumevanje, ljubav i sve one sate posle posla koji donose radost, a odnose brige. Hvala na savetima koje ste nekad pokušavali da dajete i za stvari koje vam nisu bliske. Hvala što ste uvek tu.

Miloševićima, celoj mojoj brojnoj porodici od najstarijeg do najmlađeg člana hvala na svojoj ljubavi i podršci koju ste pružili. Hvala što ste verovali u mene i kad sam sama sumnjala, hvala na strpljenju i razumevanju koje je često bilo potrebno, kao i na zabrinutim pogledima u dugim noćnim satima rada. Hvala babi i jedno posebno hvala dragom dedi, koji je bio najponosniji na moje uspehe, za svaki zapamćen i zabeležen datum i svaku poklonjenu knjigu.

Najviše od svih zahvaljujem se svom dragom Dekiju. Njegov trud uložen u ovu disertaciju je veliki kao i moj, a njegov ponos i radost su mi davali najveću snagu u završnim fazama pisanja i svim ostalim teškim trenucima. Svaki korak tokom ovih 11 godina na Hemijskom fakultetu napravili smo zajedno. Hvala što nikad nisam morala sama da savladam tehniku i uvek sam mogla da se oslonim na tvoju savršenu preciznost. Hvala za motivisanje da stvari radim tako da na njih budem zaista ponosna na kraju čak i kad za to nemam strpljenja. Hvala što si jedini znao za svaki problem sa kojim sam se suočila i što si pomogao da svaki prevaziđemo zajedno. Hvala na podršci u svim odlukama i zajedništvu u njihovom donošenju. Hvala na bodrenju svakog dana, posebno onih kada eksperimenti pođu po zlu. Hvala na svakom naučenom biohemijskom terminu i hvala na svakom osmehu koji si izmamio predlogom “a da pustiš jedan gel da to provjeriš?” Hvala na beskrajnoj ljubavi. Hvala na zajedničkom odrastanju. Hvala na svemu što nam predstoji. Ova disertacija posvećena je tebi.

## LISTA SKRAĆENICA

<b>AFM</b>	mikroskopija atomskih sila (od eng. <i>Atomic Force Microscopy</i> )
<b>ANS</b>	8-anilino-1-naftalen sulfonat
<b>APS</b>	amonijum-persulfat
<b>ATR</b>	prigušena totalna refleksija (od eng. <i>Attenuated Total Reflectance</i> )
<b>BAPNA</b>	N- $\alpha$ -benzoil-D,L-arginin-4-nitroanilid
<b>BSA</b>	albumin goveđeg seruma (od eng. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CBB</b>	Coomassie Brilliant Blue
<b>CD</b>	cirkularni dihiroizam (od eng. <i>Circular Dichroism</i> )
<b>CPEB</b>	citoplazmatski protein koji se vezuje za poliadenilatne sekvence (od eng. <i>Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein</i> )
<b>CV</b>	zapremina kolone (od eng. <i>column volume</i> )
<b>DLS</b>	dinamičko rasejanje svetlosti (od eng. <i>Dynamic Light Scattering</i> )
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>E64</b>	N-[N-(L-3-transkarboksiiran-2-karbonil)-L-leucil]-agmatin
<b>EDTA</b>	etilendiamin-tetraacetat
<b>ESI</b>	elektron-sprej jonizacija (od eng. <i>Electron Spray Ionization</i> )
<b>FTIR</b>	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (od eng. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
<b>GDU</b>	jedinica digestije želatina (od engl. <i>Gelatin Digestion Unit</i> )
<b>HEWL</b>	lizozim iz kokošnjeg jajeta (od eng. <i>Hen Egg White Lysozyme</i> )
<b>HPLC</b>	tečna hromatografija visokih performansi (od engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>IR</b>	infracrvena spektroskopija (od eng. <i>Infrared Spectroscopy</i> )
<b>LC-MS</b>	tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (od engl. <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i> )
<b>NAC</b>	ne- $\beta$ -amiloidna komponenta (od eng. <i>Non <math>\beta</math>-Amyloid Component</i> )
<b>OVA</b>	ovalbumin
<b>PDB</b>	proteinska banka podataka (od eng. <i>Protein Data Bank</i> )

<b>PEG</b>	polietilen glikol
<b>RP-HPLC</b>	reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (od eng. <i>Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>SAXS</b>	tehnika rasejanja X-zraka pod malim uglom (od engl. <i>Small Angle X-ray Scattering</i> )
<b>SDS</b>	natrijum dodecil-sulfat (od eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS PAGE</b>	natrijum dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (od eng. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SEM</b>	skenirajuća elektronska mikroskopija (od eng. <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
<b>TEM</b>	transmisiona elektronska mikroskopija (od eng. <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>TEMED</b>	tetrametiletildiamin Tioflavin T
<b>Tm</b>	temperatura topljenja (od engl. <i>Melting Temperature</i> )
<b>TMF</b>	tripsinsko mapiranje metodom otiska prsta (od engl. <i>Trypsin Mass Fingerprinting</i> )
<b>TOF</b>	vreme preleta (od engl. <i>Time-of-flight</i> )
<b>Tris</b>	tris(hidroksimetil)aminometan

# Diverzitet peptidnih sekvenci u amiloidnom agregiranju proteina

## SAŽETAK

Kako proteinski biomakromolekuli imaju složenu, ali metastabilnu trodimenzionalnu strukturu, podložni su agregiranju pri različitim promenama uslova okoline. Agregati se odlikuju različitim stepenom uređenosti, od potpuno amorfnih do visoko uređenih amiloidnih fibrila. Svi proteini, bez obzira na strukturne karakteristike manje ili više su podložni agregiranju, a pre više decenija postulirano je da je sposobnost građenja amiloidnih fibrila odlika svih proteina budući da amiloidi predstavljaju globalni minimum energetskog dijagrama uvijanja proteina. Pored ekstremne stabilnosti, amiloidni fibrili su izuzetni i po činjenici da mogu nastati od peptida sa potpuno različitim načinom uvijanja u nativnom stanju, kao što su primeri prirodno neuvijenjenih ili potpuno  $\alpha$ -helikoidnih proteina koji podležu fibrilaciji. Iako se pretpostavlja da svi proteini mogu graditi fibrile, uslovi fibrilacije nisu pronađeni za veliki broj polipeptida niti su potvrđeni kod polipeptida koji imaju više domena i imaju stabilne strukture  $\beta$ -pločica. Paradoksalno, najveći broj proteina sa potvrđenom tendencijom agregacije u nativnom stanju sadrži dominantno  $\alpha$ -helikse ili neuređeni niz. Veliki broj nerasvetljenih pitanja u pogledu uvijanja, pogrešnog uvijanja i agregiranja proteina smanjuje razumevanje uzroka patoloških stanja za koja su ovi fenomeni odgovorni. Potreban je veliki broj fundamentalnih istraživanja usmerenih u ispitivanje mogućnosti građenja fibrila od različitih prekursora, kao i utvrđivanje puta koji omogućava prevazilaženje kinetičke barijere ovog procesa.

Osnovni cilj ove disertacije je ispitivanje podložnosti raznorodnih peptidnih sekvenci amiloidnom agregiranju kako bi fundamentalna pitanja o nativnom i nenativnom uvijanju proteina bila delimično rasvetljena. Za postizanje ovog cilja urađena je komparativna analiza stabilnosti biljnih cistein-proteaza papaina i smeše ficina i ispitivanje uslova destabilizacije ovih proteina, kao i životinjskih rezervnih i zaštitnih proteina, ovalbumina i lizozima. Dobijena nenativna stanja proteina inkubirana su u uslovima u kojima je obezbeđena produžena rastvorljivost kako bi bilo sprečeno stvaranje neuređenih agregata. Preduslov za traženje odgovora na ova pitanja bilo je uspostavljanje metodologije za praćenje formiranja oligomernih intermedijera i zrelih amiloidnih fibrila.



Korišćenjem ovalbumina kao model sistema brzo fibrilirajućeg proteina, a lizozima kao model sistema sporo fibrilirajućeg proteina, optimizovane su procedure njihove fibrilacije kako bi zrele amiloidne, odnosno intermedijarne forme bile korišćene za dalje optimizovanje metodologije za praćenje ovih fenomena. Primenjene su standardne metode za karakterizaciju amiloidnih fibrila – fluorescencija Tioflavina T, mikroskopija atomskih sila i infracrvena spektroskopija. Praćenje fluorescencije proteina, izloženosti hidrofobnih površina ANS fluorescencijom, praćenje formiranja agregata gel filtracijom i praćenje gubitka aktivnosti enzima korišćeni su kao metode za ispitivanje stabilnosti i rasvetljavanje promena koje se dešavaju prilikom destabilizacije model proteina.

Strukturne promene ovalbumina prilikom formiranja zrelih fibrila i lizozima prilikom formiranja oligomernih intermedijera detaljno su okarakterisane infracrvenom spektroskopijom sa preciznim diferenciranjem intramolekulske  $\beta$ -pločice od intermolekulske agregacione  $\beta$ -pločice, kako kvalitativno, tako i metodom dekonvolucije. Dodatno je na ovim model sistemima uspostavljena brza i jednostavna metoda za kvantitativno praćenje formiranja zrelih amiloidnih fibrila i amiloidnih oligomera merenjem normalizovanog intenziteta traka agregacionih  $\beta$ -pločica u Amidnom I regionu. Na osnovu ispitivanja korelacije sa metodom ThT fluorescencije metoda je procenjena kao adekvatna za detekciju zrelih amiloidnih fibrila, ali i za detekciju oligomernih intermedijera koji se ne mogu detektovati fluorescentnom bojom ThT.

Uspostavljena metodologija primenjena je za analizu uslova destabilizacije nativnog uvijanja i uslova amiloidnog agregiranja model polipeptida divergentnih osobina. Za ovaj deo studije model sisteme predstavljaju cistein-proteaze poreklom iz lateksa smokve koje se s obzirom na poreklo i biološku ulogu eksprimiraju u velikom broju različitih izoformi sa različitim procentima sekvencijalne i strukturne homologije, i papain, njihov strukturni homolog koji postoji samo u jednoj izoformi. Prisustvo desetak različitih izoformi ficina je iskorišćeno za ispitivanje potencijala građenja nenativnih agregata u heterogenoj smeši. Po prvi put u ovoj studiji je pokazano da papain može da formira amiloidne fibrile nakon destabilizacije oba domena, kako  $\alpha$ -helikoidnog, tako i stabilnog domena bogatog  $\beta$ -pločicama. Nasuprot papainu, smeša ficina sličnih strukturnih karakteristika pod istim uslovima ne gradi amiloidne fibrile usled heterogenog sastava koji povećava stabilnost i onemogućava uređeno agregiranje.

Pored značaja u objašnjenju mehanizama i kinetike amiloidnog agregiranja, formiranje amiloidnih agregata od najrazličitijih široko dostupnih proteina može imati značaj u pogledu primene kao jeftinih i održivih biomaterijala za namene poput adsorpcije toksičnih teških metala iz prirodnih voda, kao što je pokazano u ovoj studiji.

**Ključne reči:** amiloidni fibrili, oligomeri, agregaciona  $\beta$ -pločica, FTIR spektroskopija, agregiranje, polipeptidi, proteinske sekvence, heterogene smeše proteina, izoforme ficina.

**Naučna oblast:** Biohemija

**Uža naučna oblast:** Strukturna biohemija

# Diversity of peptide sequences in amyloid aggregation of proteins

## ABSTRACT

Biological macromolecules have complex, but metastable 3D structures. Upon conformational changes in different conditions, they are prone to aggregation. Protein aggregates have various organizations, from completely unordered to highly ordered amyloid fibrils. All proteins regardless of their structural characteristics can form aggregates, and it is assumed that every protein can form amyloid fibrils, as they represent the global minimum of protein folding diagram. The amyloid state can be formed out of peptides with various folding types in their native state, from intrinsically disordered to highly  $\alpha$ -helicoidal proteins. Even though it is assumed that each protein can form amyloid fibrils, fibrillation conditions have not been found for many proteins, and it has never been reported that multidomain proteins and proteins with stable  $\beta$ -sheets undergo fibrillation. Paradoxically, the highest number of proteins with a proven tendency of amyloid aggregation has dominantly  $\alpha$ -helices and unordered regions in their native state. There are still many open questions in respect of protein folding, misfolding, and aggregation. The understanding of these phenomena is important to understand the causes of pathological states related to protein misfolding. The tendency of different proteins to form fibrils in various conditions, as well as understanding the pathways taken to overcome the kinetic barrier of amyloid fibrillation are important phenomena to research.

The main aim of this dissertation is the examination of the tendency of different peptide sequences to form amyloid aggregates in order to enlighten fundamental questions about native and nonnative protein folding. Plant cysteine proteases, papain and ficin, as well as animal reserve and protective proteins, ovalbumin and lysozyme, were used as model systems for this study. The stability and aggregation tendency of these proteins was examined in order to achieve prolonged solubility of nonnative states to prevent disordered aggregates formation. The prerequisite for such investigation was to establish a proper methodology for monitoring oligomer intermediates and mature amyloid fibrils formation.

Using ovalbumin as a model system of fast fibrillating protein, and lysozyme as a model system of slow fibrillating protein, the procedures for their fibrillation were optimized. Mature amyloid fibrils and oligomer intermediates formed according to optimized procedures were used for the optimization of methodology for monitoring fibrils and oligomer formation. Standard methods

for characterization of amyloid fibrils, including Thioflavin T fluorescence, Atomic Force Microscopy, and Infrared spectroscopy were applied for amyloid and oligomer detection. Protein fluorescence, hydrophobic patches exposure monitored by ANS fluorescence measurement, aggregates formation monitored by gel filtration, and enzyme inactivation were used as methods for the examination of protein stability in a functional and structural sense.

Ovalbumin structural changes in mature fibrils formation, as well as lysozyme structural changes in oligomer formation, were characterized in detail by infrared spectroscopy suitable for differentiation between intramolecular  $\beta$ -sheet and intermolecular aggregation-specific  $\beta$ -sheet. This method provides the possibility to quantitatively analyze secondary structure changes by deconvolution procedure. These model systems were used to establish a fast and simple method for quantitative monitoring of mature amyloid fibril and amyloid oligomer formation by measurement of normalized intensity of aggregation-specific  $\beta$ -sheet bands in the Amide I region. The method showed great correlation with the results of ThT fluorescence which means suitable for detection of mature amyloid fibrils, and also for detection of oligomer intermediates that cannot be detected using fluorescent dye ThT.

The established methodology was applied for the analysis of destabilization conditions appropriate for amyloid aggregation of other model polypeptides with divergent properties. Model systems used for this part of the study were cysteine proteases from fig latex expressed in multiple isoenzyme forms with different degrees of sequential and structural homology, and papain, their structural homolog expressed as a single polypeptide. The existence of the above ten ficin isoforms was used for the examination of the potential of nonnative aggregates formation in a heterogeneous mixture. In this study, it was reported for the first time that papain can undergo amyloid formation after the destabilization of both,  $\alpha$ -helical, and  $\beta$ -sheet rich domains. Opposite to papain, ficin as a mixture of proteins with similar characteristics does not form amyloid fibrils in the same conditions as heterogeneous composition disables ordered aggregates formation.

Besides the importance of understanding the mechanism and kinetics of aggregation, the formation of amyloid aggregates from various widely available proteins can be significant for their application as cheap and sustainable biomaterials for applications such as adsorption of toxic heavy metal ions from polluted water as was shown in this study.

**Keywords:** amyloid fibrils, oligomers, aggregation  $\beta$ -sheet, FTIR spectroscopy, aggregation, polypeptides, protein sequences, heterogeneous protein mixture, ficin isoforms.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DEO</b> .....	3
2.1. Konformacioni prelazi proteina .....	3
2.1.1. Trodimenzionalna struktura proteina.....	3
2.1.2. Stabilnost nativne strukture proteina .....	4
2.1.3. Put uvijanja proteina.....	5
2.1.4. Denaturacija i pogrešno uvijanje .....	6
2.2. Amiloidni fibrili .....	8
2.2.1. Formiranje amiloidnih fibrila .....	8
2.2.2. Tendencija i uslovi za formiranje amiloidnih fibrila .....	11
2.2.3. Značaj amiloidnih fibrila u patološkim stanjima.....	12
2.2.4. Značaj amiloidnih fibrila kao nanomaterijala.....	15
2.3. Metode za praćenje formiranja fibrila.....	17
2.3.1. Infracrvena spektroskopija .....	19
2.4. Model sistemi amiloidogenih proteina.....	21
2.4.1. Ovalbumin .....	21
2.4.2. Lizozim.....	22
2.5. Model sistemi za ispitivanje potencijala fibrilacije.....	24
2.5.1. Proteolitički enzimi.....	24
2.5.2. Papain: cistein-proteaza papaje .....	25
2.5.3. Ficini: cistein-proteaze lateksa smokve .....	27
<b>3. CILJEVI</b> .....	29
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	32
4.1. Reagensi i rastvori.....	32
4.2. Izolovanje proteina.....	32
4.2.1. Izolovanje ovalbumina .....	32
4.2.1.1. Taložne metode za izolovanje ovalbumina iz jajeta .....	32
4.2.1.2. Analitička reverzno-fazna hromatografija za ispitivanje čistoće proteina.....	32
4.2.2. Izolovanje papaina.....	33

4.2.2.1. Ekstrakcija papaina .....	33
4.2.2.2. Kovalentna hromatografija za prečišćavanje papaina.....	33
4.2.2.3. Prečišćavanje papaina jonoizmenjivačkom hromatografijom .....	34
4.2.3. Izolovanje ficina .....	34
4.2.3.1. Prikupljanje i obrada lateksa smokve – izolovanje ficina.....	34
4.2.3.2. Razdvajanje izoformi ficina jonoizmenjivačkom hromatografijom .....	35
4.2.3.3. Reverzno fazna hromatografija za razdvajanje izoformi ficina .....	35
4.2.3.4. Tripsinsko mapiranje metodom otiska prsta (TMF) za identifikaciju izoformi ...	36
4.2.3.5. Modelovanje 3D strukture .....	37
4.3. Destabilizacija proteina i formiranje amiloida .....	37
4.3.1. Destabilizacija ovalbumina i formiranje amiloidnih fibrila .....	37
4.3.2. Destabilizacija lizozima iz kokošjeg jajeta i formiranje amiloida.....	38
4.3.3. Destabilizacija papaina i ficina u kiseloj sredini i u prisustvu niske koncentracije etanola.....	38
4.3.4. Destabilizacija papaina i ficina u kiseloj sredini i u prisustvu visoke koncentracije etanola uz predtretman ureom .....	38
4.4. Analitičke metode za karakterizaciju proteinskih preparata .....	39
4.4.1. Metode za određivanje koncentracije proteina .....	39
4.4.1.1. Bredfordova metoda.....	39
4.4.1.2. Biuretska metoda .....	40
4.4.2. Elektroforetske metode.....	40
4.4.2.1. Natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE) .....	40
4.4.2.2. Detekcija proteinskih traka .....	42
4.4.2.3. Zimogramska detekcija proteolitičkih enzima .....	42
4.4.2.4. Densitometrijska analiza elektroforetskih gelova.....	43
4.4.3. Eseji sa određivanjem proteolitičke aktivnosti .....	43
4.4.3.1. Esej hidrolize sintetičkog supstrata BAPNA .....	43
4.4.3.2. Kazeinolitički esej.....	44
4.4.3.3. Želatinolitički esej.....	44
4.5. Funkcionalni eseji za praćenje stabilnosti proteaza .....	45
4.5.1. Određivanje pH stabilnosti papaina i ficina .....	45
4.5.2. Kriva termalne inaktivacije .....	46

4.5.3. Određivanje konstanti brzine inaktivacije .....	46
4.5.4. Određivanje aktivacione energije za inaktivaciju papaina i ficina .....	47
4.6. Fluorimetrijske metode za praćenje stabilnosti i strukturnih promena proteina .....	48
4.6.1. Unutrašnja fluorescencija triptofana.....	48
4.6.2. ANS fluorescencija.....	48
4.6.3. ThT fluorescencija.....	49
4.7. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) za praćenje strukturnih promena proteina.....	50
4.7.1. Priprema uzoraka i snimanje infracrvenih spektara .....	50
4.7.2. Kvalitativna analiza spektara.....	50
4.7.3. Korelacija drugih izvoda spektara .....	51
4.7.4. Kvantitativna analiza spektara – dekonvolucija .....	51
4.7.5. Kvalitativna analiza spektara – normalizacija intenziteta .....	51
4.8. Mikroskopija atomskih sila (AFM).....	52
4.9. <i>In silico</i> ispitivanje potencijala za formiranje amiloida .....	52
4.10. Vezivanje jona metala za amiloidne fibrile.....	53
<b>5. REZULTATI</b> .....	54
5.1. Izolovanje i karakterizacija proteina .....	54
5.1.1. Izolovanje ovalbumina .....	54
5.1.2. Izolovanje papaina i smeše ficina.....	55
5.1.3. Razdvajanje izoformi ficina.....	56
5.1.4. Ispitivanje strukture i stabilnosti ficina 1c.....	58
5.2. Formiranje i karakterizacija amiloidnih fibrila brzo fibrilirajućeg proteina – ovalbumina	62
5.2.1. Analiza amiloidogenih peptida ovalbumina .....	62
5.2.2. Formiranje amiloidnih fibrila ovalbumina .....	64
5.2.3. Kvalitativna analiza fibrilacije ovalbumina ATR-FTIR metodom – Amidni I region	66
5.2.4. Kvalitativna analiza fibrilacije ovalbumina ATR-FTIR metodom – Amidni II region .....	69
5.2.5. Kvalitativna analiza fibrilacije ovalbumina ATR-FTIR metodom – Amidni III region .....	70
5.2.6. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara ovalbumina: dekonvolucija Amidnog I regiona .....	71



5.2.7. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara ovalbumina: odnos intenziteta Amidnog I i Amidnog II regiona .....	75
5.3. Formiranje i karakterizacija oligomera sporo fibrilirajućeg proteina – lizozima.....	77
5.3.1. Analiza amiloidogenih peptida lizozima .....	77
5.3.2. Formiranje amiloidnih fibrila lizozima.....	78
5.3.3. Kvalitativna analiza oligomera lizozima ATR-FTIR metodom – Amidni I region ....	80
5.3.4. Kvalitativna analiza fibrilacije lizozima ATR-FTIR metodom – Amidni II region....	83
5.3.5. Kvalitativna analiza fibrilacije lizozima ATR-FTIR metodom – Amidni III region ..	84
5.3.6. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara lizozima: dekonvolucija Amidnog I regiona .....	84
5.3.7. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara lizozima: odnos Amidne I i Amidne II trake .....	86
5.4. Ispitivanje potencijala za formiranje amiloidnih agregata biljnih cistein-proteaza .....	88
5.4.1. Analiza amiloidogenih peptida papaina i ficina 1c .....	88
5.4.2. Uporedna stabilnost papaina, ficina 1c i smeše ficina.....	90
5.4.3. Stabilnost papaina i smeše ficina na različitim pH vrednostima .....	91
5.4.4. Termalna inaktivacija papaina i ficina na pH 3,2.....	91
5.4.5. Stabilnost papaina i ficina u kiselj sredini na niskoj temperaturi .....	93
5.4.6. Destabilizacija papaina i smeše ficina visokim koncentracijama uree.....	97
5.5. Vezivanje jona teških metala za amiloidne fibrile .....	101
<b>6. DISKUSIJA .....</b>	<b>102</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>122</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>126</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>145</b>

## 1. UVOD

Proteini su nosioci velikog broja funkcija u živom svetu, koje obavljaju zahvaljujući njihovim raznovrsnim strukturama. Uvijanje proteina u jedinstvenu trodimenzionalnu strukturu (koja se naziva nativnom) spontan je proces vođen samo aminokiselinskom sekvencom proteina kao što je pokazano u ranim studijama Anfinsena [1]. Varijabilnost peptidnih sekvenci je stoga osnovni preduslov postojanja različitih struktura i posleđično funkcija. Način uvijanja proteina na osnovu informacija sadržanih u sekvenci otvoreno je pitanje koje se zbog svog značaja naziva i drugim delom genetičkog koda. Pored ovog pitanja, poslednjih decenija je otvoreno i pitanje na koji način raznovrsne sekvence mogu zauzeti istu konformaciju polipeptidnog niza prilikom formiranja amiloidnih fibrila [2]. Poznato je da amiloidni fibrili mogu nastati od različitih oligopeptida i polipeptida kao i da imaju uniformnu strukturu bogatu  $\beta$ -pločicama bez obzira na sekvencu [3-9].

Značaj istraživanja ovih pitanja je pre svega fundamentalan, ali je i u osnovi razmevanja patogeneze mnogih bolesti koje su izazvane pogrešnim uvijanjem i amiloidnim agregiranjem proteina [10]. Veliki broj istraživanja usmeren je na ispitivanje patogeneze Alchajmerove, Parkinsonove i sličnih neurodegenerativnih bolesti, kao i potencijalnih terapijskih pristupa. Iako je u poslednjim decenijama u velikoj meri razvijena metodologija za strukturnu analizu proteina, od velikog je značaja razvoj novih metoda za brzu i jednostavnu detekciju i karakterizaciju amiloidnih fibrila i intermedijera njihovog stvaranja, posebno metoda prilagođenih za analizu velikog broja bioloških uzoraka.

Amiloidni fibrili imaju značaj i u pogledu primene budući da predstavljaju biomaterijale izuzetnih mehaničkih i hemijskih svojstava [11, 12]. Niska reaktivnost i visoka stabilnost čine ih pogodnim nanomaterijalima, a sposobnost vezivanja različitih molekula pogodnim izborom za dizajn membrana za selektivnu apsorpciju kontaminanata iz otpadnih voda [13, 14]. Pionirska istraživanja u ovom polju pokazala su sposobnost amiloidnih fibrila pripremljenih *in vitro* od goveđeg  $\beta$ -laktoglobulina da vezuju jone teških metala, koji su česti zagađivači prirodnih voda toksični za živi svet [14, 15].

S obzirom na univerzalnost fenomena amiloidnog agregiranja i na veliki broj nerešenih pitanja u ovoj oblasti, istraživanja koja su u toku mogu imati veliki značaj u oblasti medicine i

biotehnologije. Svaki korak u ispitivanju strukture i stabilnosti proteina, kinetike procesa denaturacije, uvijanja i pogrešnog uvijanja na primeru različitih model sistema vodi bliže odgovorima na otvorena pitanja.

Glavni cilj ove studije je ispitivanje potencijala za formiranje amiloida od životinjskih rezervnih i zaštitnih proteina i biljnih cistein-proteaza koje su odabrane za model sisteme dvodomenskih proteina kombinovanog načina uvijanja. Korišćenjem adekvatnih model sistema ispitan je uticaj diverziteta u sekvencama kod smeše izoformi na efikasnost procesa amiloidogeneze. Pronalaženje uslova za amiloidno agregiranje nativnih proteina može predstavljati iskorak u razumevanju veze sekvencijalne i strukturne raznolikosti proteina sa putevima pogrešnog uvijanja. Za postizanje ovih ciljeva neophodna je ekstenzivna strukturna analiza zarad koje je iskorišćen visok potencijal infracrvene spektroskopije i analize amidnih regiona proteina za detekciju i karakterizaciju oligomera i zrelih amiloidnih fibrila.

U okviru ove doktorske disertacije prvi put je pokazano da je potrebno narušavanje strukture nativnih  $\beta$ -pločica ekstremnom destabilizacijom za usmeravanje proteina sa izrazito stabilnim  $\beta$ -domenima ka putu amiloidnog agregiranja, nasuprot opštem verovanju da je destabilizacija i promena konformacije potrebna samo u  $\alpha$ -helikoidnim i neuređenim regionima. Pokazano je da papain, kao model sistem dvodomenskog proteina sa velikim razlikama između domena u pogledu stabilnosti, moguće prevesti u amiloidnu formu. Takođe je pokazano da veliki diverzitet sekvenci, bez obzira na strukturne odlike koje nisu pokazane kao prepreka u građenju amiloida, može sprečavati ove oblike agregiranja i na taj način kroz heterogenost pružati stabilizaciju smeši proteina. Razlike u tendenciji za amiloidno agregiranje uočene između pojedinačnog polipeptida i smeše polipeptida sa malim varijacijama u sekvenci mogu biti od značaja za objašnjenje pojave ekspresije velikog broja izoformi bez funkcionalnih razlika u sistemima koje karakteriše visoka koncentracija proteina.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1. Konformacioni prelazi proteina

#### 2.1.1. Trodimenzionalna struktura proteina

Proteini su polimeri aminokiselina povezanih peptidnim vezama sa visoko uređenom trodimenzionalnom strukturom. U cilju izučavanja strukture proteina, izvršena je podela po nivoima strukture, od primarne koja podrazumeva aminokiselinsku sekvencu, do kvaternarne koja daje informacije o načinu organizovanja polipeptidnih lanaca kod multisubjedinčnih proteina. Bez obzira na broj polipeptidnih lanaca, svi globularni proteini imaju sekundarnu i tercijarnu strukturu [16].

Sekundarna struktura je definisana kao konformacija polipeptidne kičme odnosno linearnog dela polipeptida koji čine amino i karbonilne grupe povezane preko  $C\alpha$  atoma sa jedne strane i peptidne veze sa druge strane. S obzirom na svojstva peptidne veze delimično dvostrukog karaktera, položaj polipeptidne kičme definisan je vrednostima dva ugla –  $\phi$  i  $\psi$  za koje su zbog sternih smetnji dozvoljeni samo uski opsezi vrednosti definisani Ramačandranovim dijagramom [17]. Kao posledica sternih ograničenja, sekundarne strukture koje razlikujemo su malobrojne –  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -pločica i zavijutak, dok se delovi polipeptidne kičme bez definisane sekundarne strukture nazivaju neuređenim nizom koji se odlikuje promenljivim uglovima veza. U okviru ovih grupa prepoznate su i druge specifične strukture kao što su neuređeni heliks i petlje, kao i različiti tipovi  $\beta$ -pločica. Ove strukture stabilizovane su vodoničnim vezama između elemenata polipeptidne kičme. Pravilnost u formiranju vodoničnih veza diktira uređenost strukture i za posledicu ima hiralnost koja utiče na apsorpciju infracrvene i cirkularno polarizovane svetlosti što je iskorišćeno u metodama za analizu sekundarnih struktura [18].

Kod globularnih proteina, sekundarne strukture ne postoje nezavisno, odnosno van konteksta trodimenzionalne – tercijarne strukture. Ova struktura predstavlja konformaciju polipeptida sa jasno definisanim položajem svakog od atoma. U odnosu na sekundarnu strukturu podrazumeva i položaj svakog bočnog ostatka kao i interakcije među njima koje su daleko raznovrsnije od interakcija između delova polipeptidne kičme [16]. Ovaj strukturni nivo leži u osnovi raznovrsnosti proteina i pruža mogućnost obavljanja najrazličitijih funkcija. Jedinstvena

struktura svakog proteina u kojoj obavlja fiziološku funkciju naziva se nativna i do njenog narušavanja dolazi narušavanjem elemenata bilo sekundarne, bilo tercijarne strukture [19].

### **2.1.2. Stabilnost nativne strukture proteina**

Termodinamika procesa uvijanja proteina od nascentnog polipeptidnog lanca nesumnjivo potvrđuje da je proces u vodenoj sredini spontan, odnosno da su protein stabilni [20]. Ipak, stabilnost proteina je marginalna za šta se potvrde mogu naći svuda u živom svetu. Iako esencijalna za funkcionisanje živog sveta, konformacija proteina može se narušiti pod uticajem različitih fizičkih i hemijskih faktora. To je posledica niske stabilizacije polipeptidnog lanca prilikom uvijanja koja je u kvantitativnom smislu uporediva sa jačinom nekoliko vodoničnih veza (20-65 kJ/mol) [21]. Kako ukupnu stabilnost procesa definiše Gibsova slobodna energija, neophodno je analizirati i entalpijske i entropijske faktore koji doprinose stabilizaciji proteina:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Promena entalpije pri konstantnom pritisku u fiziološkim uslovima svodi se na promenu toplote odnosno može se dovesti u vezu sa formiranjem i narušavanjem međumolekulskih interakcija u datim uslovima. Prilikom uvijanja proteina veliki broj interakcija se formira između elemenata polipeptidnog niza, dok se narušava deo interakcija sa vodom što zbirno dovodi do neznatne promene ovog parametra, sa vrednostima zavisnim od same sekvence [22]. S druge strane, konformaciona entropija, odnosno entropija samog polipeptidnog niza se nužno smanjuje prilikom procesa uvijanja s obzirom na daleko veću uređenost uvijenog globularnog proteina u odnosu na razvijeni niz [23]. Ipak, konformaciona entropija koja negativno utiče na stabilnost proteina savladana je pozitivnom promenom entropije okoline, odnosno vode. U razvijenoj formi, protein je okružen molekulima vode koji efikasno hidratišu polarne regione uz formiranje jakih interakcija, a formiraju klatrate oko nepolarnih delova sekvence što povećava uređenost vode. Visok hemijski potencijal ovakvog stanja čini nativnu formu favorizovanom s obzirom da uvijanjem proteina u kompaktnu globulu hidrofobni regioni bivaju zaklonjeni od vode u unutrašnjosti proteina [24]. Budući da hidrofobni efekat na ovaj način stabilizuje strukturu proteina, ona nastaje spontano samo u vodenoj sredini u kojoj pruža proteinima metastabilno stanje koje se lako može narušiti [25]. Marginalna stabilnost nativne strukture proteina ima veliki

značaj u funkcionalnim aspektima jer omogućava proteinima fine konformacione promene koje leže u osnovi protein-ligand interakcija [26].

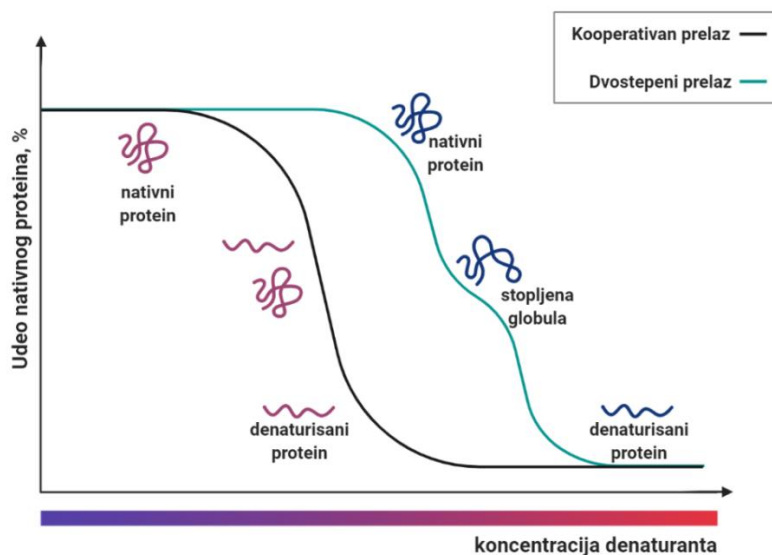
Zaključke o stabilnosti native strukture i informacijama o nativnoj strukturi sadržanim u proteinskoj sekvenci doneo je Anfinsen još 1961. [1, 20, 27]. Do ovih zaključaka došao je kroz seriju eksperimenata vezanih za konformacione prelaze ribonukleaze u prisustvu haotropnih agenasa. Značaj ovog eksperimenta je veliki i zaključci koje je doneo su revolucionarni, ali nisu svi u potpunosti dosledni i primenjivi na sve proteine.

### **2.1.3. Put uvijanja proteina**

Mali jednodomenski proteini kooperativno prelaze iz razvijene u uvijenu formu. Kriva koja opisuje ovakav, reverzibilan process je sigmoidna. Ovakvi rezultati pokazani za veliki broj proteina sugerišu da je uvijanje odnosno razvijanje proteina proces koji se dešava bez stabilnih intermedijera (slika 2.1). Ipak, na mnogim primerima uvijanja odnosno razvijanja proteina uočava se prisustvo makar jednog stabilnog intermedijera, koji je savremenim tehnikama dobro okarakterisan i nosi naziv stopljena globula [28]. Karakteriše se formiranim sekundarnim strukturama, te se njihov sadržaj ne razlikuje značajno od sadržaja sekundarnih struktura native proteina, ali izostaje potpuni hidrofobni efekat što intermedijer čini 20% voluminoznijim [29].

Postoje dva granična modela kojima je mehanizam uvijanja proteina opisan, model kondenzacije oko jezgra i model difuzije i sudara [30]. Prvi model podrazumeva brzo formiranje hidrofobnog jezgra za kojim ubrzo sledi formiranje sekundarnih struktura kao lokalnih uređenja u okviru definisane globule. Ovakav model odgovara malim jednodomenskim proteinima koji se uvijaju bez postojanja stabilnog intermedijera kao što je i pokazano savremenim metodama za praćenje formiranja sekundarnih struktura u realnoj vremenskoj skali. Drugi model podrazumeva lokalna uređenja polipeptidne kičme u karakteristične sekundarne strukture nakon kojih sledi hidrofobni efekat za finalnu stabilizaciju [31]. Prema ovakvom modelu, stopljena globula je intermedijer procesa uvijanja i najčešće se sreće kod velikih proteina (od preko 100 aminokiselinskih ostataka) i višedomenskih proteina u kojima ne postoji jedno jezgro za hidrofobni kolaps i brzu stabilizaciju. Bez obzira na put uvijanja koji može biti blizu jednom od ova dva ekstremna modela ili negde između kako je opisano u modelu nukleacije i kondenzacije [2, 32], uvijanje

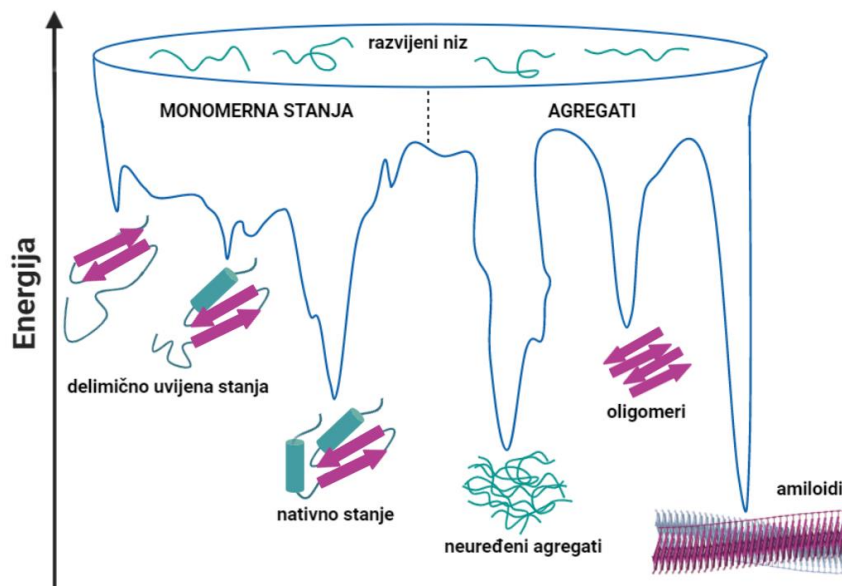
proteina je proces koji se dešava u delovima sekunde u ćeliji što znači da je dirigovan informacijama u sekvenci, a ne pretragom najstabilnije konformacije [33].



**Slika 2.1. Kriva razvijanja proteina karakteristična za kooperativan prelaz i za prelaz sa stabilnim intermedijerom.**

#### 2.1.4. Denaturacija i pogrešno uvijanje

Denaturacija je u proširenoj definiciji svako narušavanje native strukture koje vodi gubitku biološke aktivnosti [34]. Samo u slučaju reverzibilne denaturacije ona podrazumeva potpuno razvijanje proteina do nascentne forme [35]. Ovo je omogućeno samo u uslovima u kojima se sredina drastično razlikuje od fiziološke, odnosno u sredini u kojoj je razvijena forma proteina solubilizovana. S obzirom na postojanje kako polarnih, tako i hidrofobnih regiona u proteinima, razvijanje ne može biti univerzalno postignuto za svaku sekvencu samo promenom polarnosti, ali univerzalna je solubilizacija (i time stabilizacija) razvijene forme proteina u prisustvu haotropa, detergenata i u ekstremno baznoj sredini pH preko 12 [36]. Svi drugi destabilizatori dovode do denaturacije uz moguće agregiranje, zavisno od uslova i sekvence. Denaturacija prema ovoj definiciji podrazumeva i blago narušavanje native strukture bez agregiranja i bez potpunog razvijanja koje se može ogledati u promeni konformacije regiona koji je esencijalan za funkciju proteina [37].



**Slika 2.2. Relativna stabilnost različitih rastvornih i nerastvornih formi proteina.**

Brzo uvijanje proteina u nativnu strukturu *in vivo* je proces katalizovan šaperonima i drugim proteinima koji potpomažu uvijanje proteina [38]. Potreba za ovakvom mašinerijom objašnjena je tek u višedecenijskim dopunama Anfinsenovih eksperimenata. Pre svega, kooperativno uvijanje odnosno razvijanje proteina predstavljeni kao reverzibilan proces nisu u saglasnosti sa mnogim eksperimentalnim rezultatima u kojima se nativno stanje brojnih proteina, uključujući i ribonukleazu gubi. Naime, najveći broj postupaka za narušavanje native strukture proteina nije reverzibilan budući da ne vodi do nastajanja potpuno razvijenog niza [39]. Potpuno razvijen niz je visokoenergetski oblik čije održavanje u vodenoj sredini sprečava entropijski vođen hidrofobni efekat [24, 25]. Niska rastvorljivost delimično razvijenog ili pogrešno uvijenog niza vodi hidrofobnom agregiranju koje se sreće u procesima narušavanja native konformacije, odnosno denaturacije pod uticajem povišene temperature. I drugi destabilizujući faktori često uzrokuju nastanak proteinskih agregata koji se ne mogu reverzibilno vratiti u nativno stanje. Ovakvi oblici denaturacije vode do drugog nedostatka prethodno opisanih modela koji se zadovoljavaju Anfinsenovim postulatima o maksimalnoj stabilizaciji proteina u nativnoj formi. Kao što eksperimentalni dokazi potvrđuju, sve agregacione nenativne forme stabilizovane su u većoj meri od native što čini ove oblike denaturacije ireverzibilnim [35]. Tek postavke modela proširenog energetskog reljefa uključuju sve do sada opisane rastvorne i nerastvorne forme proteina [40]. Ovaj model ne pojednostavljuje uvijanje proteina na svega dva stanja i postojanje

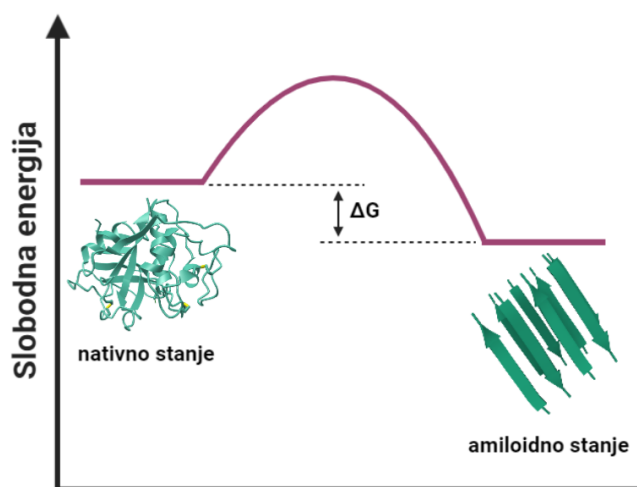


jednog intermedijera, već podrazumeva veliki broj lokalnih minimuma intermedijernih i agregacionih formi, među kojima neke imaju nižu energiju od nativne. Globalni minimum energetskog dijagrama predstavljaju amiloidni fibrili, visoko uređeni agregati bogati  $\beta$ -pločicama (slika 2.2) [41].

## 2.2. Amiloidni fibrili

### 2.2.1. Formiranje amiloidnih fibrila

Amiloidni fibrili su definisani kao visoko uređeni proteinski agregati sa monotonom strukturom ukrštene  $\beta$ -pločice nezavisnom od sekvence [42, 43]. Ovi agregati predstavljaju najstabilnije strukturno stanje proteina i polipeptida (slika 2.3). Prve spekulacije o postojanju fibrilnog stanja svakog proteina datiraju još iz 1935. godine kada amiloidni fibrili *in vivo* još nisu eksperimentalno detektovani i vezuju se za Vilijama Ostburija koji je do ovakvih zaključaka došao kroz interpretaciju rezultata difrakcije X-zraka nativnih globularnih proteina jajeta i njihovih denaturisanih formi [44]. Oko 20 godina kasnije, proteini sa istim strukturnim obrascima pronađeni su *in vivo* i povezani sa patološkim stanjima. Danas je hipoteza o univerzalnoj tendenciji proteina da grade amiloidne fibrile široko prihvaćena i potkrepljena novim dokazima o fibrilaciji različitih model sistema poput lizozima, ovalbumina, hemoglobina, insulina,  $\beta$ -laktoglobulina, humanog i albumina goveđeg seruma [4-8, 45].

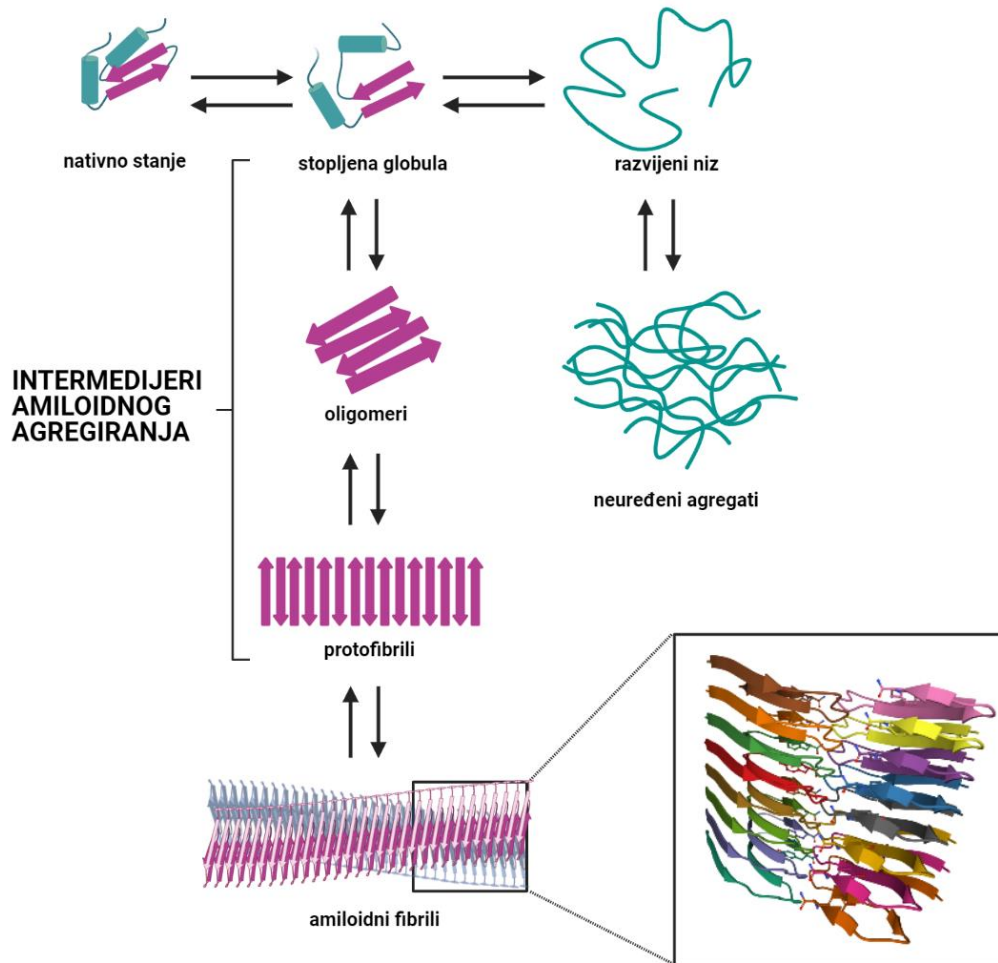


Slika 2.3. Energetski dijagram amiloidnog agregiranja.

S obzirom na položaj amiloida na dnu levka uvijanja proteina (slika 2.2), ne postoji univerzalna putanja za njihovo formiranje [46-48]. Na putu ultimativne stabilizacije u formi amiloidnih fibrila nalaze se brojni intermedijeri (slika 2.4) sa različitim stepenom stabilnosti [49]. Destabilizacija peptida, nativnih proteina ili njihovih proteolitičkih fragmenata vodi ka formiranju monomernih nukleusa fibrilacije [50]. Ovi nukleusi mogu imati karakteristike stopljene globule [39] kao što je pokazano na primeru različitih model sistema [51-53]. Studije praćene masenom spektrometrijom i mikroskopijom pokazale su da u procesu nastanka amiloidnih fibrila od nukleusa fibrilacije prvo nastaju heterogeni oligomerni nizovi koji postepeno zauzimaju sve uređeniju strukturu bogatu  $\beta$ -pločicama koja dalje može da raste u procesu elongacije [10].

Oligomeri koji nastaju u procesu fibrilacije se smatraju toksičnim formama koje uzrokuju patološka stanja povezana sa pogrešnim uvijanjem proteina [10]. Pokazano je da su oligomeri toksična vrsta bez obzira na to da li su formirani *in vitro* [54] ili *in vivo* [55]. Međutim, termin oligomeri se dovodi u vezu sa različitim stanjima. Grupa autora protofibrile naziva oligomernim intermedijerima, dok drugi rezervišu ovaj termin za sferne intermedijere koji prethode fibrilarnim formama. Najšira definicija kao oligomere tretira male aggregate sa 2-20 monomernih jedinica [42]. Slična definicija oligomerno stanje definiše kao stanje koje isključuje 50% proteinskih molekula u monomernom stanju, kao i drugu krajnost gde je više od 50% molekula deo velikog klastera [56].

Put dalje fibrilacije vodi metastabilne oligomere preko štapićastih protofibrila koji predstavljaju prvi intermedijer na ovom putu sa periodičnom strukturom [46, 57]. Protofibrili su jednostruki nizovi koji se helikoidno uvijaju jedan oko drugog u formi ukrštene  $\beta$ -pločice [47] pri formiranju zrelih fibrila [46] čije dimenzije variraju od minimalnih 100 nm, do dužih formi koje prelaze 1  $\mu$ m [58]. Zajedničke karakteristike koje klasifikuju ove strukture kao amiloidne uključuju dijаметar od oko 10 nm (30-120 Å), visok sadržaj  $\beta$ -pločice, difrakcionu sliku ukrštene  $\beta$ -pločice i jezgro rezistentno na vodoničnu izmenu [58]. Struktura amiloidnih vlakana gusto je pakovana i visoko uređena što je odlika i globularne native strukture. Specifičnost amiloidne forme je konformacija paralelne ili antiparalelne  $\beta$ -pločice, sa polipeptidnom kičmom orijentisanom normalno na osu fibrila [59].



**Slika 2.4. Neka od konformacionih stanja polipeptidnog niza: intermedijeri amiloidnog i neuređenog agregiranja.**

Strukturnom analizom amiloidnih formi različitih proteina koji se javljaju u patološkim stanjima, utvrđeno je da je struktura na nivou protofilamenta sa zavojem dužine 24  $\beta$ -pločice zajednička za sve tipove amiloida, dok se viši nivoi organizacije razlikuju [60]. Objašnjenje ove pojave nalazi se u prirodi interakcija koje obezbeđuju različite nivoe strukture amiloidnih fibrila. Vertikalne interakcije između antiparalelnih  $\beta$  nizova izuzetno su jake i smatraju se generičkom osobinom amiloidnih fibrila budući da u ovim interakcijama učestvuje polipeptidna kičma građenjem vodoničnih veza. Interakcije bočnih ostataka, koje obezbeđuju dalje pakovanje protofibrila, nešto su slabije i njihova jačina zavisi od aminokiselinske sekvence [10].

Postojanje stabilnih oligomernih stanja na putu fibrilacije diktira sporiji proces tranzicije ka zrelim fibrilima koji brzo rastu nakon inicijalne konstrukcije [42]. Brzina procesa fibrilacije zavisi od osobina startnog proteina i protokola fibrilacije i može varirati od nekoliko sati do više nedelja.

### **2.2.2. Tendencija i uslovi za formiranje amiloidnih fibrila**

Sama činjenica da je struktura amiloidnih fibrila nezavisna od sekvence, kao i visoka stabilnost amiloida, navode na prirodan zaključak da je amiloidno stanje zajednička osobina svih proteina i da svaki protein pod određenim uslovima može da pređe u amiloidnu formu [10]. Pored ovog uvreženog mišljenja, u istraživanjima je utvrđeno da je tendencija ka nastanku amiloidnih fibrila zavisna od nekoliko faktora koji uključuju naelektrisanje polipeptida, sekvencu, hidrofobnost i sekundarne strukture prisutne u nativnom obliku [50]. Više studija je takođe potvrdilo da je formiranje amiloidnih fibrila posledica inherentnih svojstava polipeptidnog niza koja proističu iz sekvence, a uključuju dužinu, mogućnost sabijanja u kompaktnu strukturu i hiralnost  $\alpha$  ugljenikovog atoma [10].

Broj studija koje prijavljuju sposobnost različitih polipeptidnih nizova da formiraju amiloidne forme nije veliki. Dugački polipeptidni nizovi (duži od 150 aminokiselinskih ostataka) teže podležu amiloidnoj fibrilaciji usled topoloških ograničenja. S obzirom da je dužina prosečnog proteina između 300 i 500 aminokiselinskih ostataka, najčešće se prijavljuje nastanak amiloida od manjih proteina i peptida ili njihovih protolitičkih fragmenata [10].

Što se tiče faktora vezanih za proteinsku sekvencu, značajan je podatak da su polipeptidi sa uzastopnim ostacima glutamina pronađeni u nekim slučajevima naslednih neurodegenerativnih amiloidoza [50]. Ove i druge veze između sekvence i tendencije formiranja amiloidnih fibrila iskorišćene su za razvoj nekoliko algoritama za predviđanje tendencije i brzine kojom različite sekvence agregiraju, kao i mutacija koje rezultuju u povećanoj ili smanjenoj brzini agregiranja. Ovi algoritmi su se pokazali korisnim u određivanju regiona polipeptidnog lanca koji su uključeni u formiranje fibrila [50].

S obzirom na visoku stabilnost amiloidnih vlakana i na sposobnost mnogih proteina da ih grade, može se zaključiti da je kinetička barijera za formiranje amiloida ono što održava proteine u

njihovoj nativnoj formi i da se uslovi pod kojima će protein preći u amiloidnu formu razlikuju zavisno od prirode proteina [10]. Prijavljeni *in vitro* uslovi za formiranje amiloidnih fibrila pokazuju visok nivo diverziteta. Varirajući parametri uključuju koncentraciju proteina, pH, jonsku silu, temperaturu, vreme inkubiranja kao i proteolitičku degradaciju [59]. Bez obzira na ovaj diverzitet, na velikom broju primera, kako *in vivo*, tako i *in vitro*, utvrđeni su određeni obrasci. Pomeranje ravnoteže ka amiloidnoj strukturi često podrazumeva kiselu sredinu (koja favorizuje stanje stopljene globule i time omogućava lakši prelazak kinetičke barijere ka amiloidnim vlaknima) i visoku koncentraciju proteina koja favorizuje intermolekulske interakcije [54]. Keli sa saradnicima je dokazao da prečišćeni transtiretin formira fibrile *in vitro* kada se njegovo nativno stanje nađe u kiseljoj sredini [50] što je kasnije potvrđeno na primeru lizozima, insulina,  $\beta$ -2-microglobulina i ovalbumina [4, 5, 51, 61]. Ovakvi rezultati sugerišu da su konformacione promene indukovane promenom pH dovoljne da pokrenu nukleaciju, dok su dalje asosovanje monomera i elongacija posledica visoke koncentracije proteina.

Takođe je pokazano da male količine amiloidnih fibrila dodate nativnom ili delimično uvijenom proteinu u nekim slučajevima mogu poslužiti kao centar nukleacije [62] čime se fibrilacija značajno ubrzava budući da je faza nukleacije najsporija. Protofibrili su se pokazali visoko efikasnim u ovakvim eksperimentima formiranja amiloidnih vlakana [10].

### **2.2.3. Značaj amiloidnih fibrila u patološkim stanjima**

Pojam amiloida prvi put se javlja sredinom 19. veka za opisivanje agregata uočenih u jetri nakon autopsije. Pojam su uveli Šlejden i Virhou koji su agregate u jetri detektovali nakon bojenja jodom. Nakon utvrđivanja visokog sadržaja azota, eliminisana je pretpostavka da su u pitanju ugljeni hidrati. Utvrđeno je da su u pitanju proteinske, vlaknaste strukture koje u kompleksu sa bojom Kongo crveno ostvaraju karakterističnu interakciju sa polarizovanom svetlošću pa se mogu detektovati primenom mikroskopije [50].

Značajni koraci ka upoznavanju strukture amiloidnih vlakana napravljeni su krajem pedesetih i tokom šezdesetih godina prošlog veka. Snimljene su prve elektronske mikrografije tkiva laboratorijskih životinja sa amiloidnim depoima i uzoraka humanog tkiva dobijenog biopsijom ili *post mortem* i enzimskim tretmanima je utvrđeno da ne sadrže kolagen niti hijaluronsku kiselinu

kako je smatrano [63, 64]. Već prve difrakcione slike ovih struktura iz 1969. godine jasno su pokazale da se amiloidna vlakna predominantno sastoje od  $\beta$ -pločica [65].

Istorija proučavanja amiloidnih fibrila počinje sa medicinskim istraživanjima budući da su amiloidi povezani sa mnogim bolestima koje se svrstavaju u grupu bolesti pogrešnog uvijanja proteina odnosno konformacionih bolesti [66]. Peptidi koji grade amiloidne fibrile odgovorne za nastanak bolesti uglavnom su prirodno neuvijeni peptidi koji kao takvi obavljaju različite uloge u organizmu. Primeri su amiloid- $\beta$  peptid u Alchajmerovoj bolesti,  $\alpha$ -sinuklein u Parkinsonovoj bolesti, amilin u dijabetesu tipa 2, hantingtin u Hantingtonovoj bolesti. Ovi prirodno neuvijeni peptidi često imaju uloge u prenošenju signala i regulaciji zahvaljujući najrazličitijim interakcijama koje ostvaruju sa fiziološkim partnerima. Njihove sekvence su evoluirale tako da omogućavaju rastvorljivost u postojećem neuvijenom obliku, pa ih često odlikuje veliki broj polarnih i naelektrisanih ostataka koji sprečavaju agregiranje u fiziološkim uslovima [10]. Izmene u sekvenci ili izmenjeni faktori sredine favorizuju agregiranje ovih proteina koje pokreće kaskadu patoloških reakcija. Postoje i dalje otvorena pitanja toksičnosti amiloidnih fibrila.

Amiloidoze su klinički poremećaji koji su uzrokovani samim deponovanjem nerastvornih amiloidnih fibrila u ekstracelularnom prostoru [67]. Kod sistemskih amiloidoza, glavni uzrok bolesti je prisustvo velikih količina amiloidnih naslaga u vitalnim organima uključujući jetru, slezinu i bubrege, zatim u zidovima krvnih sudova i vezivnom tkivu. Karakteriše ih prisustvo proteina poznatog kao amiloidna-P komponenta seruma (Ap) koji nastaje iz serum amiloid proteina (serum amiloid P apolipoprotein - SAP), glikoproteina normalno prisutnog u serumu zdravih ljudi [50]. Pored ovog proteina, utvrđeno je prisustvo i drugih proteina ekstracelularnih tečnosti u amiloidnim naslagama kao što su apolipoprotein E,  $\alpha$ 1-antihimotripsin,  $\tau$  protein, membranski proteini (BMP), laminin i kolagen IV [59].

Izazivač Alchajmerove bolesti je  $\beta$ -amiloid prekursor ( $\beta$ -APP) koji u nativnom stanju funkcioniše kao površinski ćelijski receptor koji učestvuje u remodelovanju površine ćelije i u interakcijama sa susednim ćelijama i komponentama ekstracelularnog matriksa. Ovaj protein podleže regulisanoj proteolizi pri čemu se oslobađaju rastvorni fragmenti koji mogu da se jave u konformaciji koja inicira formiranje fibrila. Stepen i brzina fibrilacije zavise od sekvence, koncentracije peptida, kao i sredinskih faktora. Dokazano je da neki genski defekti vode do povećane produkcije, povećane agregacije ili smanjenog uklanjanja amiloidnog- $\beta$  (A $\beta$ ) peptida

[59]. Agregiranju su najpodložniji peptidi na N-terminalnom kraju  $\beta$ -APP. Urađene su brojne studije u kojima su peptidi različite dužine sa izmenama u aminokiselinskoj sekvenci proizvedeni metodama rekombinantne DNK, čime je potvrđena podložnost N-terminalnih sekvenci agregiranju [68].

Parkinsonova bolest se karakteriše inkluzionim telima nazvanim Levijeva telašca u *substantia nigra* [60]. Osnovna komponenta ovih telašca je  $\alpha$ -sinuklein, ali takođe sadrže i druge proteine kao što su šaperoni,  $\alpha$ B-kristalin, klusterin, torzin A, Hsp27 i Hsp70.  $\alpha$ -Sinuklein je presinaptički protein lokalizovan na krajevima aksona koji ima ulogu u razvijanju i održavanju sinaptičkih kontakata. Uzrok Parkinsonove bolesti je deponovanje  $\alpha$ -sinukleina u punoj dužini, dok se kod drugih bolesti, poput Alchajmerove, u depozitima nalaze samo fragmenti ovog proteina poznati kao ne- $\beta$ -amiloidna komponenta (NAC od eng. *non amyloid component*) [59]. Središnji deo  $\alpha$ -sinukleina (iz kog se oslobađa NAC) je hidrofoban, dok N-terminalni kraj ima sekvence karakteristične za amfipatične helikse apolipoproteina. Pripada klasi prirodno neuvijenih proteina, međutim analiza aminokiselinske sekvence i mogućnosti za formiranje različitih sekundarnih struktura ukazuje na mogućnost da ovaj protein ima fiziološkog partnera koji mu omogućava uvijanje u ćeliji u  $\alpha$ -helikse i  $\beta$ -pločice koji sadrže više od 60% aminokiselinskih ostataka [59].

Hantingtonova bolest je autozomalno-dominantni neurodegenerativni poremećaj uzrokovan uzastopnim tripletima koji kodiraju za poliglutaminsku sekvencu u N-terminalnom regionu Hantingtonovog proteina [59]. Hantingtonov protein (hantingtonin) je u nepatološkim stanjima eksprimiran u visokom nivou u neuronima strijatuma. Nalazi se u citoplazmi i predstavlja protein molekulske mase 348 kDa. Deo proteinskog sadržaja vezan je za vezikule ili mikrotubule što ukazuje na ulogu u usidravanju citoskeleta, transportu vezikula ili njihovoj vezi sa organelama i mikrotubulama. Broj ponovaka glutamina u N-terminalnom delu sekvence varira od 10 do 36, dok kod obolelih prelazi ovaj broj sve do mogućih 180 ponovaka. Postoji veza između broja ponovaka i životne dobi u kojoj se simptomi ispoljavaju. Protein ima još jednu specifičnu karakteristiku u vidu 29 ponovaka prolina za koje se takođe smatra da su povezani sa nastankom bolesti [59].

Iako je patogenost amiloidnih prekursora - oligomera potvrđena [54, 55], kliničko-patološke studije pokazuju da kod naslednih sistemskih amiloidoza do nastanka bolesti dolazi tek nakon

akumulacije dovoljne količine naslaga, bez obzira na produženu izloženost amiloidogenim prekursorima [67]. S obzirom na pretpostavljenu ulogu obe forme u patogenezi, potrebne su specifične i osetljive metode za detekciju kako oligomera, tako i zrelih fibrila.

*Post mortem* studije na uzorcima pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti pokazale su da je veliki broj različitih proteina deo amiloidnih plaka [69]. Detektovano je 4000 različitih proteina od kojih je za 40 proteina identifikovanih masenom spektrometrijom pokazano da su u većoj meri zastupljeni u amiloidnim plakama u odnosu na kontrolne uzorke zdravih individua iste starosne dobi [70]. Pored Alchajmerove bolesti, diverzitet peptidnih sekvenci je potvrđen kod različitih amiloidoza, a neki od proteina koji su česti konstituenti plaka su  $\tau$  protein,  $\alpha$ -sinuklein, apolipoprotein E [69]. Aktuelna su ispitivanja protein-protein interakcija između glavnih konstituenata amiloidnih plaka [70, 71], kao i razlike u proteinskom sadržaju plaka kod pacijenata sa različitim stepenom progresije bolesti [72]. Uticaj diverziteta sekvenci na amiloidno agregiranje proteina može imati veliki značaj u razumevanju patogeneze amiloidnih bolesti.

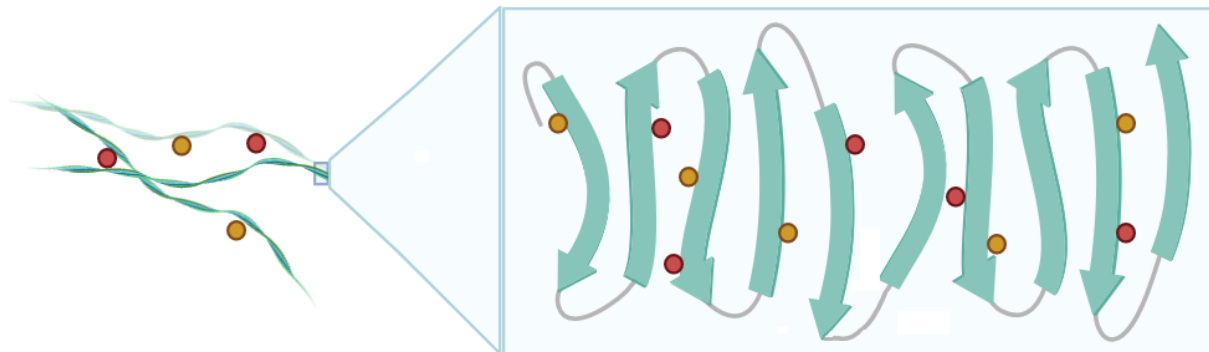
Ipak, nisu svi amiloidi fibrili pronađeni *in vivo* povezani sa patološkim stanjima. Zabeleženo je više proteina koji u amiloidnoj formi obavljaju svoje funkcije i nazivaju se funkcionalnim amiloidima. Primeri su kurli - komponenta ekstracelularnog matriksa uključena u adheziju, agregaciju i stvaranje biofilmova kod *E. coli*, čaplina i hidrofobini koji pomažu formiranje hifa streptomiceta, harpini koje patogene bakterije luče kako bi destabilizovale ćelijsku membranu biljnih ćelija i indukovale ćelijsku smrt, Pmel17 - templat za sintezu melanina, neuronalni CPEB protein (od eng. *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) koji reguliše translaciju, kao i neki peptidni hormoni [73, 74].

#### **2.2.4. Značaj amiloidnih fibrila kao nanomaterijala**

Bez obzira na diverzitet proteina koji služe kao prekursori za formiranje fibrila, zajednička je amiloidna struktura sa gusto pakovanim  $\beta$ -pločicama sa lancima međusobno udaljenim 10-12 Å [75, 76]. Ovakva struktura pruža izuzetnu mehaničku i hemijsku stabilnost, rezistenciju na proteolizu, detergente i visoke temperature i čvrstinu koje čine amiloide nanomaterijalima pogodnim za različite namene [11, 12]. Amiloidni fibrili su efikasno korišćeni kao fundamentalne komponente biomembrana [77], funkcionalnih bionaprava [78, 79], hidrogelova



za kulture ćelija i dopremanje lekova [80, 81], biosenzora [82], funkcionalnih materijala sa visokom biokompatibilnošću i sposobnošću biološkog prepoznavanja [83, 84], kao i materijali za konverziju energije [85].



**Slika 2.5.** Shematski prikaz vezivanja jona teških metala za amiloidne fibrile.

Iako je strukturna osnova fibrila ista, diverzitet ovih nanomaterijala se uočava prilikom njihove organizacije u različite oblike i topologije, zavisno od mehanizma agregiranja [86]. Neki su prepoznati kao nanočestice, nanofibrili, nanotube i 3D platforme [80, 87-89]. Pored uniformnih mehaničkih i varijabilnih topoloških karakteristika, amiloidni fibrili pokazuju diverzitet hemijskih grupa u aminokiselinskim ostacima. Kako su amiloidogene sekvence brojne, različit sastav i organizacija ovih grupa pružaju široku varijabilnost za primene, posebno u pogledu vezivanja raznovrsnih molekula i jona [13, 14].

Poznato je da metalni joni interferiraju sa patogenezom neurodegenerativnih bolesti koje u osnovi imaju formiranje amiloidnih fibrila [90]. *In vitro* je pokazano da su amiloidni fibrili sposobni za vezivanje jona metala i u svom zrelom obliku. Boliseti i Mezenga su objavili nekoliko studija u vezi sa vezivanjem različitih toksičnih metalnih jona iz zagađenih voda za amiloidne fibrile. Fibrili korišćeni u ovim studijama su formirani od  $\beta$ -laktoglobulina sa visokim potencijalom fibrilacije. Dizajnirane su membrane izgrađene od aktivnog uglja i amiloidnih fibrila koje mogu da eliminišu širok spektar metalnih kontaminanata iz industrijskih voda [14]. Površina amiloidnih fibrila sadrži heterogena vezivna mesta pogodna za vezivanje različitih jonskih vrsta kao što su dicijano-aurat i živa-hlorid. Joni kadmijuma (VI) su efikasno uklonjeni iz otpadnih voda korišćenjem amiloidnih fibrila lizozima modifikovanih etilendiaminom [91].

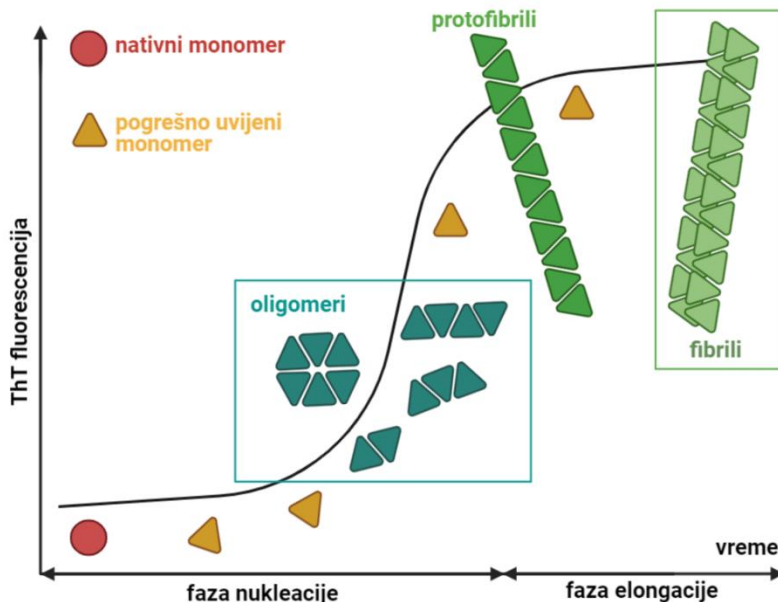
Ove studije potvrđuju da amiloidni fibrili nude širok spektar dostupnih morfologija, veliki odnos površine i zapremine, veliku gustinu vodoničnih veza i prisustvo biokompatibilnih aminokiselina na njihovoj površini [92, 93]. Sve ove osobine ih čine nanomaterijalima budućnosti pogodnim za tretman različitih vidova zagađenja.

### **2.3. Metode za praćenje formiranja fibrila**

Među standardnim tehnikama za praćenje amiloidne fibrilacije, najveću primenu imaju spektroskopske metode koje se zasnivaju na primeni specifičnih fluorescentnih boja koje interaguju sa karakterističnom strukturom amilodnih fibrila – Kongo crveno i Tioflavin T (ThT) [58].

Kongo crveno prvenstveno ima istorijski i medicinski značaj budući da se koristi od 1922. kada je Bennhold prvi put iskoristio za histohemijsko bojenje amiloida. Godine 1927. Divri i Florkin iskoristili su polarizovanu svetlosnu mikroskopiju za posmatranje ovih preparata i utvrđeno je da nastaje izrazito zelena birefringencija prilikom bojenja amiloida ovom bojom, a koja se ne javlja kod drugih fibrilarnih struktura. Ovo je posledica orijentacije planarnih molekula boje paralelno osi amilodnih fibrila [59]. U istraživačke svrhe, uspostavljena je metoda praćenja promene apsorpcionih i fluorescentnih spektara Kongo crvenog usled vezivanja za amiloidne fibrile. Zbog ograničene specifičnosti, danas je gotovo u potpunosti zamenjena fluorescentnom bojom ThT [94].

Odlike koje izdvajaju metodu praćenja vezivanja ThT za fibrile merenjem fluorescencije jesu velika specifičnost za amiloidne forme, kao i jednostavnost same procedure. Ipak, specifičnost vezivanja ThT nije apsolutna. Ova boja prepoznaje brazde u fibrilarnoj strukturi pa se može vezivati i za molekule DNK, ciklodekstrine, ali i micelle detergenata [58]. Ove interferirajuće supstance mogu da dovedu do lažno pozitivnih rezultata, naročito u biološkim uzorcima, pa ograničavaju upotrebu na kontrolisane *in vitro* uslove fibrilacije. Pored ovih ograničenja, interakcija ThT i amilodnih fibrila je zavisna od pH, jonske sile i viskoznosti rastvora [58]. Kao što je prikazano na slici 2.6, ThT pokazuje nizak afinitet prema intermedijernim formama fibrilacije kao što su oligomeri pa nije pogodna metoda za detekciju ovih stanja [58].



**Slika 2.6. Kriva ThT fluorescencije tokom fibrilacije sa intermedijernim stanjima.**

Drugu grupu metoda koje takođe imaju široku primenu čine metode kojima se analiziraju morfološke osobine fibrila. U ovu grupu spadaju dinamičko rasejanje svetlosti (DLS od eng. *dynamic light scattering*) kao i različite metode mikroskopije – mikroskopija atomskih sila (AFM od eng. *atomic force microscopy*), transmisiona elektronska mikroskopija (TEM od eng. *transmission electron microscopy*), skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM od eng. *scanning electron microscopy*) [95].

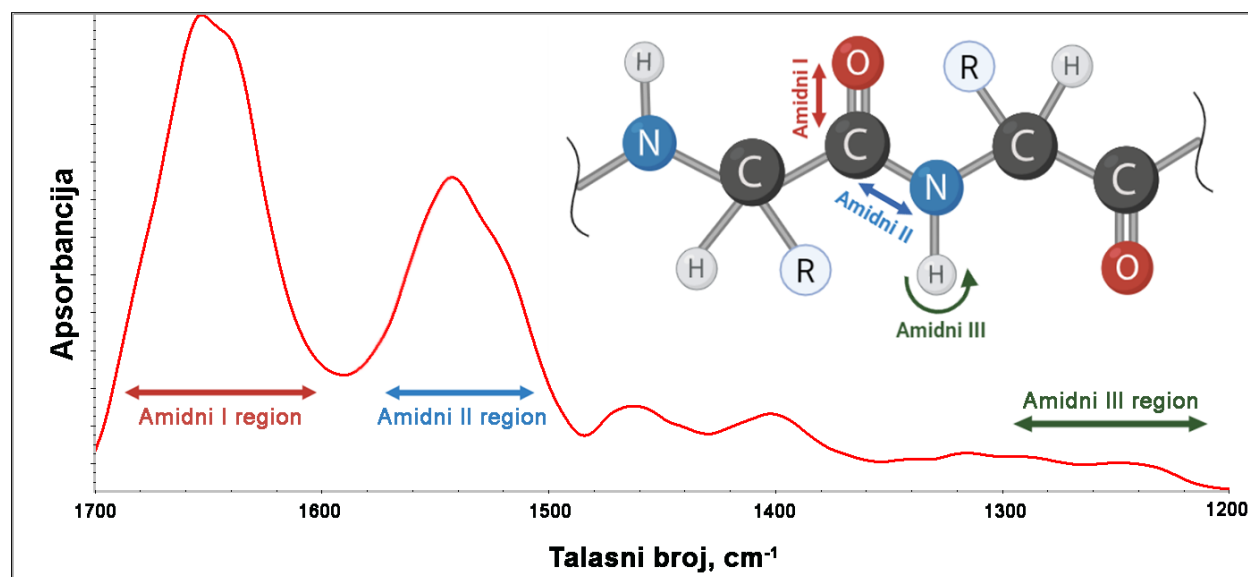
Treću grupu metoda u standardnoj upotrebi čine spektroskopske metode za praćenje promena sekundarnih struktura – cirkularni dihroizam (CD od eng. *circular dichroism*), infracrvena spektroskopija (IR od eng. *infrared spectroscopy*) i Ramanova spektroskopija [96]. S obzirom na veoma izražene promene sekundarnih struktura prilikom amiloidne fibrilacije, ove metode imaju veliki značaj. Tu se posebno izdvaja infracrvena spektroskopija, kao pogodna metoda za analizu proteinskih agregata, uključujući i amiloidne fibrile [97, 98]. S obzirom na visoku osetljivost i mogućnost diferenciranja intramolekulske i intermolekulske  $\beta$ -pločice [95], infracrvena spektroskopija je daleko preciznija u detektovanju amiloidnih fibrila i intermedijera na putu fibrilacije u odnosu na ostale metode za detekciju i određivanje sekundarnih struktura proteina [97, 99]. Razlaganje Amidnog I regiona infracrvenih spektara proteina metodom dekonvolucije pruža mogućnost određivanja tačnog sadržaja sekundarnih struktura [37]. Ova metoda zahteva

operacije u obradi spektara tako da nikad nije dobila široku primenu u analizi velikog broja uzoraka kao što su biološki uzorci za pretragu fibrila i njihovih toksičnih intermedijera [100].

Pored ovih metoda, značajno mesto imaju i metode analize trodimenzionalne strukture kao što je tehnika rasejanja X-zraka pod malim uglom (SAXS od engl. *small angle X-ray scattering*) [101-103].

### 2.3.1. Infracrvena spektroskopija

Određivanje sadržaja sekundarnih struktura proteina analizom infracrvenih spektara datira iz 1950. kada su Eliot i Ambrouz pokazali razliku između apsorpcije sintetičkih polipeptida u konformaciji  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -pločice [104]. Od tada su IR tehnike značajno unapređene uključujući razvoj 2D i vremenski razložene IR spektroskopije što je omogućilo da se infracrveni spektri proteina ekstenzivno analiziraju u Amidnom I regionu za utvrđivanje strukture, stabilnosti, uvijanja, pogrešnog uvijanja proteina, agregiranja, formiranja amiloidnih fibrila i praćenje protein-ligand interakcija [7, 105, 106]. Pored razvoja sofisticiranih tehnika, razvijene su i metode koje se zasnivaju na osnovnim tehničkim rešenjima, ali koriste fenomene kao što je vodonik-deuterijum izmena za precizniju analizu amidnih regiona [107-110].



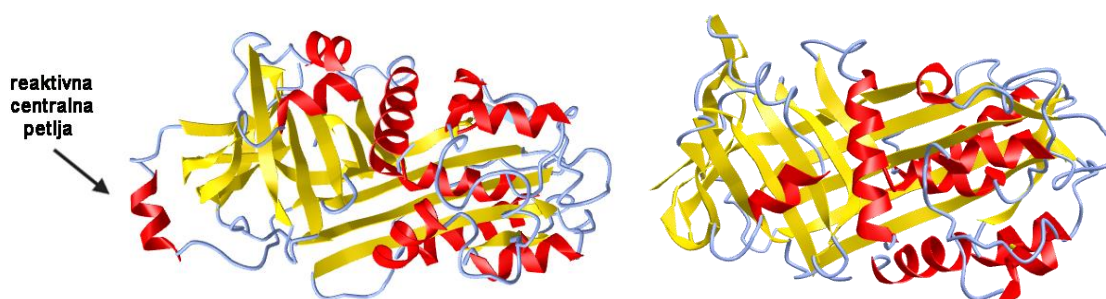
Slika 2.7. Amidni regioni infracrvenog spektra proteina i glavne vibracije odgovorne za apsorpciju.

Za analizu proteina koriste se kako transmisiona, tako i infracrvena spektroskopija sa prigušenom totalnom refleksijom (ATR od eng. *attenuated total reflectance*). Osnova metode se zasniva na uticaju različitih konformacija polipeptidne kičme (kao što su  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -pločica, neuređeni niz, zavijutak) i obrasca vodoničnog vezivanja u ovim konformacijama na energiju vibracija karbonilne grupe koja se odražava na apsorpciju infracrvene svetlosti. Pored polipeptidne kičme, bočni ostaci takođe apsorbuju u amidnim regionima [111]. S obzirom na veliki broj strukturnih elemenata koji doprinose apsorpciji, dolazi do preklapanja traka pa je proces njihovog razdvajanja na pojedinačne konstituentne (dekonvolucija) veoma kompleksan. Pogodan je za analizu sekundarnih struktura kod proteina čije su trodimenzionalne strukture određene kristalografski kako bi postojala adekvatna referentna metoda. Daleko je jednostavnija upotreba IR za praćenje stabilnosti, odnosno strukturnih promena, budući da se one prate u funkciji temperature ili intenziteta nekog drugog destabilizujućeg faktora [112, 113]. Bez obzira na tehnička ograničenja u smislu izbora pufera koji ne interferira u apsorpciji u amidnim regionima i komplikovanu obradu spektra, infracrvena spektroskopija je brza, jeftina i veoma informativna metoda za praćenje strukturnih promena. Mogućnost razlikovanja intramolekulske i intermolekulske  $\beta$ -pločice koja je moguća jedino Ramanovom i IR spektroskopijom čini je jednom od najznačajnijih metoda za praćenje amiloidnog agregiranja [95].

## 2.4. Model sistemi amiloidogenih proteina

### 2.4.1. Ovalbumin

Ovalbumin je rezervni protein koji čini 50% proteinskog sadržaja belanceta i ima ulogu tokom embrionalnog razvića. Pripada proteinskoj superfamiliji serpina od preko 300 homologih proteina koja je naziv dobila po brojnim pripadnicima koji deluju kao inhibitori serin-proteaza [114]. Ovalbumin je kiseli protein pI vrednosti 4,6 i molekulske mase 45 kDa. N-glikozilovan je na položaju Asn293 ugljenohidratnom komponentom koja sadrži 4-6 ostataka manoze i 2-4 N-acetil- $\beta$ -D-glukozamina u ukupnoj molekulskoj masi 1,3-2,1 kDa [8]. Posедуje jedan disulfidni most između ostataka cisteina na pozicijama 73 i 120 koji je izložen rastvaraču, kao i tri slobodne tiolne grupe u unutrašnjosti proteina [8].



**Slika 2.8. Struktura ovalbumina sa reaktivnom centralnom petljom u formi A)  $\alpha$ -heliksa (PDB kod: 1UHG) i B)  $\beta$ -pločice (PDB kod: 1JTI).**

Nativno stanje proteina opisuje se kao kombinacija  $\alpha$ -heliksa (35%) i  $\beta$ -pločice (45%) [8, 115]. S obzirom na visoku zastupljenost u prirodnom izvoru, ovalbumin ima veliku primenu u istraživanjima i biotehnologiji kao emulzifikator, gelirajući agens i kao matriks za *in ovo* eksperimente koji *in vitro* simuliraju uslove visoke koncentracije proteina kakvi vladaju u ćeliji.

Superfamilija serpin proteina odlikuje se karakterističnom konformacionom promenom koja ima značaj za njihovu inhibitornu funkciju. Stanje slobodnog inhibitora se smatra metastabilnim stanjem, budući da tek nakon proteolize serin-proteazom dolazi do oslobađanja reaktivne centralne petlje koja gradi interakcije sa centralnom  $\beta$ -pločicom čime se postiže stabilizacija inhibitora i efikasnija inhibicija enzima [116]. Iako ovalbumin nije inhibitor, ima strukturne odlike ostalih serpin proteina uključujući centralnu antiparalelnu  $\beta$ -pločicu sa pet nizova

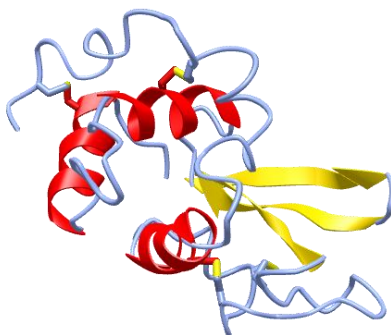
paralelnih osi molekula i reaktivnom centralnom petljom u formi  $\alpha$ -heliksa (slika 2.8A). Kao posledica ovako izuzetnih odlika u pogledu stabilnosti, ovalbumin se može naći u termostabilnoj formi označenoj u literaturi kao S-OVA. Ova forma se detektuje u baznoj sredini i pokazano je da poseduje region petlje insertovan u centralnu  $\beta$ -pločicu (slika 2.8B) [117, 118].

Ovalbumin ima stabilni intermedijer i u kiseljoj sredini. Okarakterisan je kao standardni intermedijer uvijanja/razvijanja – stopljena globula [119-121]. S obzirom na brzo formiranje ovog intermedijera, ovalbumin je sklon formiranju amiloidnih fibrila. Budući da je visoko zastupljen protein u svom prirodnom izvoru, jedan je od najzastupljenijih model sistema za studije amiloidnog agregiranja. Publikovani su različiti protokoli za dobijanje amiloidnih fibrila ovalbumina od kojih neki podrazumevaju inkubiranje u neutralnim uslovima [8], ali najveći broj studija prijavljuje izlaganje niskoj pH vrednosti od oko 2 i visokoj temperaturi tokom nekoliko dana kao pogodne uslove za fibrilaciju [61, 122-124]. Studije pokazuju da je fibrilacija ovalbumina efikasna bez obzira na redukciju disulfidnih mostova [8, 61, 125]. Amiloidni fibrili ovalbumina su veoma dobro okarakterisani u pogledu kinetike formiranja [125], morfologije fibrila koji nastaju [61] i delova peptidne sekvence koji predstavljaju jezgro za fibrilaciju [8]. U pitanju su dva  $\beta$ -niza u strukturi nativnog ovalbumina ( $^{172}\text{MVLVNAIVFK}^{181}$  i  $^{364}\text{FLFCIK}^{369}$ ), kao i deo jednog  $\alpha$ -heliksa ( $^{38}\text{LAMVYL}^{43}$ ) [8]. Proces fibrilacije je opisan kao veoma brz, bez izražene lag faze [125] što je pored pomenute visoke zastupljenosti izdvaja ovalbumin kao model sistem formiranja amiloidnih fibrila.

#### **2.4.2. Lizozim**

Lizozim (EC 3.2.1.17) je antimikrobni enzim sa N-acetilmuramid-glikanhidrolaznom aktivnošću. Katalizuje hidrolizu  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza između N-acetilmuraminske kiseline i N-acetil-D glukozamina čime štiti životinju od gram-pozitivnih bakterija [126]. Lizozim iz kokošnjeg jajeta (HEWL od eng. *hen egg white lysozyme*) ispoljava svoju zaštitnu ulogu tokom embrionalnog razvoja pileta. Globularan je protein mase 14,3 kDa, sa izuzetno visokom pI vrednošću od oko 11 (iako je teorijska 9,32) koja je posledica visoko zastupljenog arginina u aminokiselinskoj sekvenci (8%) i velike perturbacije pKa vrednosti pojedinačnih aminokiselinskih ostataka u okviru 3D strukture [127]. Ima 4 disulfidna mosta u svojoj strukturi. Najveći udeo sekundarnih struktura čine  $\alpha$ -heliksi (oko 40%), sa značajnim udelom neuređenih regiona i malim udelom  $\beta$ -pločice (12%) [126, 128]. Iako je odlika antiparalelne  $\beta$ -pločice visoka stabilnost,  $\beta$ -domen

lizozima je okarakterisan kao delimično struktuiran u kiseljoj sredini i zato podložniji narušavanju od  $\alpha$ -domena [62].



**Slika 2.9. Struktura lizozima (PDB kod: 194L).**

Velika je raznolikost procedura za destabilizaciju i posledično neuređeno ili uređeno agregiranje lizozima. Pokazano je da lizozim ima dva karakteristična konformaciona prelaza, praćena povećanjem izloženosti hidrofobnih površina, koja predstavljaju delimično uvijena stanja [129]. Dok jedno od njih nastaje u kiseljoj sredini na oko pH 2,6 i pokazuje promene u CD spektru, drugo stanje koje nastaje u ekstremno baznoj sredini na pH oko 12,75 ima karakteristike stopljene globule bez značajnih promena u CD spektru [130, 131].

Nenativna forma lizozima ima veliku rastvorljivost, naročito u kiseljoj sredini, kao posledica dominantnog pozitivnog naelektrisanja koje onemogućava agregiranje. Povećanje rastvorljivosti povećava podložnost formiranju neuređenih intermedijera na putu formiranja amiloidnih fibrila. Uslovi koji favorizuju amiloidno stanje variraju od ekstremno kiselih (pH oko 2) [4, 62, 132], koji su zajednički za veliki broj proteina različitih osobina, do ekstremno alkalnih pH iznad 12 [131, 133, 134].

Prijavljene su varijacije pH i temperature inkubiranja sa potpuno različitim efektom na mehanizam fibrilacije [135]. Pokazano je u nekim studijama da u velikoj meri dolazi do fragmentacije lizozima pri formiranju amiloida [97, 136], dok su druge studije pokazale da se ovaj fenomen dešava u daleko manjoj meri [137] ili u potpunosti izostaje [62].

Među različitim protokolima fibrilacije su i inkubiranje u prisustvu visoke koncentracije etanola ili haotropnog agensa [138]. Nenativne forme lizozima pokazuju rastvorljivost u rastvoru etanola



sve do 90% koncentracije [139] dok većina proteina biva kvantitativno isprecipitirana u rastvoru etanola koncentracije iznad 60% bez obzira na konformaciju polipeptidne kičme. Makroskopska precipitacija lizozima u 90% rastvoru etanola ne dešava se danima čak ni pri visokoj koncentraciji proteina [140].

Pokazano je da sintetički peptid koji u nativnoj formi zauzima strukturu antiparalelne  $\beta$ -pločice (sekvence <sup>49</sup>GYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRN<sup>64</sup>) formira fibrile u visokom prinosu [62]. Bez obzira na uslove, fibrilacija lizozima se pokazala kao spor proces sa dugom lag fazom [62, 140-142]. Vreme fibrilacije koje iznosi i do dva meseca [142] čini lizozim dobrim model sistemom za ispitivanje karakteristika intermedijernih stanja [97].

## **2.5. Model sistemi za ispitivanje potencijala fibrilacije**

### **2.5.1. Proteolitički enzimi**

Proteolitički enzimi (proteaze, peptidaze) pokazuju izuzetnu raznolikost u živom svetu. Značaj ovih enzima ogleda se u broju najrazličitijih struktura prilagođenih istoj reakciji – hidrolizi peptidne veze [143]. Proteolitički enzimi su nezamenljiv deo industrije hrane, pića, farmaceutskih proizvoda i deterdženata sa oko 60% ukupne svetske proizvodnje enzima [144].

Brojne su fiziološke uloge proteolitičkih enzima biljaka koje uključuju kako regulatorne tako i odbrambene funkcije [145]. Pored značajne uloge peptidaza u mobilizaciji proteinskih resursa u ćeliji, neophodna je zaštita ćelijskih proteina koji obavljaju različite esencijalne uloge od proteolitičke degradacije. Ovo je obezbeđeno visokom selektivnošću i regulacijom proteolitičkih enzima. Selektivnost i složena regulacija su delimičan odgovor na pitanje zašto je evolucija proizvela tako veliki broj biokatalizatora koji katalizuju istu hemijsku reakciju. Pored razlike u specifičnosti koju donosi tako veliki broj enzima, neophodno je istaći i razlike koje omogućavaju funkcionisanje u različitim uslovima (pH, temperatura, subćelijska/vanćelijska lokalizacija). Procesi proteolize zahtevaju postojanje pouzdanih i finih mehanizama kontrole koji pružaju maksimalnu efikasnost, visoku selektivnost, ali i stabilnost [143].

Prema tradicionalnoj podeli, proteolitički enzimi se dele na osnovu mehanizma katalize na aspartat, cistein, glutamat, serin, treonin-peptidaze, metaloproteinaze i peptidaze nepoznatog tipa katalize. Roulings je sa saradnicima devedesetih godina prošlog veka kreirao MEROPS bazu

podataka o proteolitičkim enzimima u kojoj su peptidaze klasifikovane na osnovu evolutivnog porekla, odnosno na osnovu sličnosti aminokiselinskih sekvenci. Kategorije na osnovu kojih je izvršeno klasifikovanje peptidaza uključuju tipove, familije i klanove definisane na osnovu različitog stepena homologije [146].

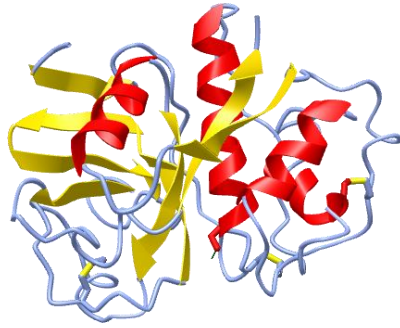
Cistein-proteaze su enzimi koji u aktivnom centru imaju katalitički ostatak cisteina. Ova heterogena grupa proteina različitih strukturnih karakteristika i raznolikog porekla karakteriše se prisustvom katalitičke dijade ili trijade. Nazastupljenija familija je papainska familija C1 cistein-proteaza sa više od 130 poznatih proteina i preko 1600 sekvenci. Pronađene su u najrazličitijim organizmima, od virusa do viših eukariota. Kalpainsi su familija cistein-proteaza koja deli neke zajedničke karakteristike sa papainom pa su stoga svrstani zajedno u klan CA. Filogenetska analiza pokazuje da je raznovrsnost proteina u okviru ovog klana posledica višestruke duplikacije gena od kojih su se neke desile rano tokom evolutivne istorije eukariota [147]. Gotovo svi proteini CA klana pripadaju eukariotima osim bakulovirusne cistein-proteaze i PL proteaze SARS-CoV familije virusa [148]. Eukariotske proteaze nalik papainu dele se u nekoliko evolutivnih grupa. Jedan od važnih parametara na osnovu kojih se ovi enzimi svrstavaju u posebne evolutivne grupe jeste raspored disulfidnih mostova [149].

### **2.5.2. Papain: cistein-proteaza papaje**

Papain (EC 3.4.22.2) je najbolje izučeni predstavnik familije C1, klana CA cistein-proteaza. Prirodno se nalazi u lateksu i u plodu papaje (*Carica papaya*). U aktivnom centru poseduje katalitičku trijadu, sa cisteinom koji zahteva redukujuće uslove kako bi enzim bio u potpunosti aktivan s obzirom na podložnost oksidaciji i građenju intrermolekulskog disulfidnog mosta.

Papain ima molekulsku masu od 23 429 Da u svojoj zreloj formi od 212 aminokiselina s obzirom da se sintetiše u formi zimogena iz kog se odseca propeptid i signalna sekvenca. Enzim je bazan sa pI vrednošću 8,75. Stabilizovan je postojanjem 4 disulfidna mosta [150].

U strukturi papaina uočavaju se dva domena. N-terminalni domen je  $\alpha$ -helikoidan, dok je C-terminalni domen po strukturi antiparalelna  $\beta$ -pločica. Udeo ove dve sekundarne strukture iznosi 26% ( $\alpha$ -heliks), odnosno 25% ( $\beta$ -pločica), dok je ostatak proteina pretežno u formi neuređenog niza koji je zastupljen sa 42% [151].



**Slika 2.10. Struktura papaina (PDB kod: 1BP4).**

Ispitivanja stabilnosti papaina pokazala su veću stabilnost  $\beta$ -domena čija se struktura narušava u daleko ekstremnijim uslovima u odnosu na  $\alpha$ -domen [37, 152]. Bez obzira na stabilnost  $\beta$ -domena, sa delimičnim narušavanjem strukture u pogledu gubitka  $\alpha$ -heliksa, enzim gubi aktivnost [152]. Objašnjenja strukturnih promena prilikom denaturacije papaina i razlike u stabilnosti dva [37, 152], rasvetlela su već dugo poznato svojstvo papaina da pokazuje rezistenciju na natrijum dodecil-sulfat (SDS od eng. *sodium dodecyl sulfate*) i da se potpuna denaturacija u prisustvu SDS dešava tek pri izuzetno visokim temperaturama. Kao posledica rezistencije na SDS, mobilnost proteina u SDS-PAGE ne odgovara molekulskoj masi ukoliko se uzorak ne zagreva na temperaturi bliskoj 100°C [152]. Istraživanje sprovedeno na velikom broju proteina pokazalo je slično ponašanje kod više proteaza koje je korelirano sa rezistencijom istih proteina na proteolizu [152]. Zaključeno je da su u pitanju kinetički inertni proteini, te da je njihova rezistencija na razne destabilizujuće faktore posledica kinetičke, pre nego termodinamičke stabilizacije. Ovaj oblik stabilizacije ogleda se u visokoj vrednosti energije aktivacije za narušavanje nativnog stanja i prevođenje u denaturisano, što se ogleda i u visokoj temperaturi topljenja ( $T_m$  vrednosti) koja iznosi 83°C [153]. Predloženo je da ovaj vid stabilizacije proteina predstavlja vid evolutivne zaštite za sekvence koje su u velikoj meri podložne formiranju agregata, uključujući i amilodine fibrile, u svom pogrešno uvijenom stanju [37, 152]. Ove osobine čine papain interesantnim model sistemom za ispitivanje puteva amiloidnog agregiranja, ali do sada tendencija formiranja amiloida od papaina nije prijavljena u literaturi.

### 2.5.3. Ficini: cistein-proteaze lateksa smokve

Lateks je mlečna tečnost koju proizvode laticiferi, specijalizovane mlečne ćelije kod 10% cvetnica. Zajednička odlika lateksa različitih biljaka je prisustvo velikog broja sekundarnih metabolita. Lateks smokve (*Ficus carica*, varijetet *Brown Turkey*) bogat je cis-1,4-poliizoprenom, proteinima, alkaloidima, terpenoidima, taninima i sterolima [154]. Sve ove komponente čine lateks primarnim oblikom zaštite mladih delova biljke od povrede [154]. Biohemijsku zaštitu pruža veliki broj enzima uključujući proteaze, oksidaze, glukozidaze, fosfataze [154, 155], hitinaze [156] i kolagenaze [157]. S obzirom na bogatstvo cistein-proteazama i drugim enzimima, lateks smokve ima dugu tradiciju upotrebe u tradicionalnoj medicini.

Dominantni proteini lateksa smokve su cistein-proteaze sa zajedničkim nazivom ficin (EC 3.4.22.3). Ovi enzimi pripadaju C1 familiji cistein-proteaza i funkcionalno su bliski papainu iz lateksa papaje i bromelainu iz ananasa. Biljne proteaze iz ove familije imaju fiziološke uloge u odbrani od herbivornih insekata i fitopatogena [158]. Analiza proteinskog sastava ove grupacije proteina ukazuje na veliki broj izoformi ficina. Većina radova prijavljuje postojanje oko 5 izoformi na osnovu broja različitih pikova u jonoizmenjivačkoj hromatografiji [159-161] koja se koristi u pokušajima razdvajanja izoformi više od 50 godina [162]. Poteškoće prilikom razdvajanja i identifikacije izoformi posledica su različitog profila ekspresije ficina tokom perioda zrenja [66], autolize [161] i genomskih/sekvencijalnih razlika između različitih varijeteta i kultivara [163]. Iako su ficinske izoforme uočene pre više od 100 godina, nisu odvojeno kristalizovane sve do 2015. godine [164, 165]. Danas su publikovane 4 strukture ficinskih izoformi označenih kao ficin A (PDB kod: 4YYQ), ficin B (u dve kristalne forme sa PDB kodovima: 4YYR i 4YYs), ficin C (u dve kristalne forme sa PDB kodovima: 4YYU i 4YYV) i ficin D (PDB kod: 4YYW) sa molekulskim masama u opsegu 23848,1-24454,8 Da i pI vrednostima 4,87-8,94. Tercijarne strukture ovih enzima u velikoj meri se podudaraju sa tercijarnom strukturom papaina. Odlikuju ih prisustvo istih strukturnih domena i gotovo identične raspodele sekundarnih struktura [164, 165]. Za ove 4 ficinske izoforme publikovane su i male razlike u osetljivosti na seriju standardnih inhibitora cistein-proteaza [159]. Novije transkriptomске studije pak pokazuju da je ukupan broj eksprimiranih ficinskih izoformi mnogo veći od broja predloženog na osnovu ispitivanja proteinskog sastava [166]. Rezultati analize

proteoma i transkriptoma lateksa smokve se pojavljuju u poslednje tri godine i potvrđuju razliku u ekspresiji ficina između različitih stadijuma zrenja [167] i između različitih organa mlade biljke [166].

Ficin, papain i aktinidin, pripadnici iste familije cistein-proteaza su široko upotrebljavani u različitim industrijskim procesima poput prerade mesa, proizvodnje sira [168] , prerade žitarica [169], pa sve do primene papaina za hidrolizu antitela u istraživačke svrhe. Papain je predložen i kao pogodan enzim za primene u industriji alkoholnih pića za stabilizaciju vina i prevenciju zamućenja usled formiranja proteinskih agregata [170].

Papain i ficin imaju istu katalitičku trijadu cistein-proteaza i dele mehanizam katalize [171]. Mnoge osobine u pogledu funkcije, uključujući transpeptidaznu i esteraznu aktivnost i aktivaciju redukcionim sredstvima, zajedničke su za ficin i papain [172, 173]. Razlike koje su uočene između ovih proteina odnose se na supstratnu specifičnost [152] usled razlike u aminokiselinama koje okružuju supstrat-vezujuće mesto [171]. I u pogledu stabilnosti pokazano je da su oba enzima podložna denaturaciji na pH vrednostima ispod 3 sa dobro opisanim stanjem stopljene globule koje se u kiselj sredini formira [174, 175]. S obzirom na veliku sličnost u pogledu strukture i aktivnosti papaina i ficina, komparativna analiza ova dva model sistema u ovoj studiji pruža uvid u razlike u amiloidnom agregiranju usled diverziteta sekvenci u slučaju ficina, naspram uniformne sekvence jednog polipeptida u slučaju papaina.

### 3. CILJEVI

Kako amiloidni fibrili mogu nastati od različitih proteina koji se kod amiloidnih plaka mogu naći i u heterogenoj smeši, za razumevanje ovih procesa neophodna su istraživanja tendencije raznovrsnih peptidnih sekvenci za formiranje amiloidnih agregata, kao i detaljna analiza strukturnih promena na putu fibrilacije. Izučavanje tendencije peptida različitih svojstava za formiranje amiloidnih agregata od velikog je značaja za razumevanje amiloidogeneze, kako u *in vivo* uslovima relevantnim za patogenezu neurodegenerativnih oboljenja, tako i u *in vitro* uslovima primenjenim za dobijanje amiloidnih nanomaterijala. Glavni cilj ove disertacije je stoga ispitivanje uticaja diverziteta peptidnih sekvenci na amiloidno agregiranje proteina. Kao model sistemi korišćeni su rezervni i zaštitni proteini kokošjeg jajeta – ovalbumin i lizozim, kao i enzimi iz grupe cistein-proteaza papaje i smokve – papain i ficin. Za postizanje opšteg cilja ove studije postavljeno je nekoliko specifičnih ciljeva.

#### 1. Izolovanje proteinskih model sistema i njihova karakterizacija

Prvi cilj je bio izolovanje proteina iz prirodnih izvora ili komercijalnih preparata, izuzev lizozima koji je korišćen kao komercijalni čist protein (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka):

- a) Prečišćavanje ovalbumina iz kokošjeg jajeta (*G. gallus*) taložnim metodama,
- b) Prečišćavanje papaina iz komercijalnog preparata papaje (*C. papaya*) jonoizmenjivačkom hromatografijom,
- c) Priprema smeše izoformi ficina iz lateksa smokve (*F. carica*), razdvajanje izoformi i njihova karakterizacija u pogledu strukture i stabilnosti.

#### 2. Optimizovanje postupka za formiranje amiloidnih fibrila

Za ostvarivanje daljih specifičnih ciljeva, bilo je neophodno optimizovanje procedura za formiranje zrelih amiloidnih fibrila i oligomernih intermedijera od korišćenih model sistema. Za uspostavljanje adekvatnih modela postavljeni su ciljevi:

- a) Razvijanje protokola za brzu fibrilaciju ovalbumina za ispitivanje strukturnih svojstava zrelih amiloidnih fibrila,
- b) Razvijanje protokola za sporu fibrilaciju lizozima za ispitivanje strukturnih svojstava amiloidnih oligomera i zrelih fibrila.

### **3. Mapiranje finih strukturnih promena zrelih fibrila i amiloidnih oligomera infracrvenom spektroskopijom**

Za ispitivanje procesa fibrilacije brzo i sporo-fibrilirajućih proteina, kao jedan od ciljeva postavljeno je detaljno ispitivanje promena u sadržaju sekundarnih struktura u različitim fazama formiranja amiloidnih fibrila ovalbumina i lizozima primenom metode dekonvolucije infracrvenih spektara proteina.

### **4. Optimizovanje metodologije za praćenje formiranja amiloidnih agregata**

Po uspostavljanju model sistema brzo i sporo-fibrilirajućih proteina, cilj ove studije bio je uspostavljanje metodologije pogodne za pretragu uslova za amiloidno agregiranje, ispitivanje strukturnih promena na putu fibrilacije i jednostavnu i pouzdanu detekciju amiloidnih fibrila i oligomernih intermedijera značajnih u dijagnostičke svrhe. S obzirom na veliku specifičnost infracrvene spektroskopije u diskriminisanju između različitih sekundarnih struktura, uključujući i različite forme  $\beta$ -pločica, glavni metodološki cilj je ispitivanje potencijala ATR-FTIR metode za brzo, ekonomično i efikasno kvalitativno i kvantitativno praćenje formiranja amiloidnih oligomera i zrelih fibrila simultanom analizom Amidnog I, Amidnog II i Amidnog III regiona.

### **5. Komparativna stabilnost papaina i smeše ficina**

Sa pretragom uslova za fibrilaciju papaina i smeše ficina kao glavnim ciljem, ispitivana je komparativna stabilnost ova dva model sistema kroz nekoliko definisanih ciljeva:

- a) Ispitivanje inaktivacije papaina i smeše ficina usled gubitka stabilnosti na različitim pH vrednostima,
- b) Ispitivanje kinetike inaktivacije papaina i smeše ficina,
- c) Ispitivanje promene aktivnosti i strukture papaina i smeše ficina na niskim temperaturama, u kiseloj sredini i u prisustvu etanola kao destabilizatora,
- d) Ispitivanje podložnosti papaina i smeše ficina denaturaciji ureom.

## **6. Ispitivanje uslova za amiloidno agregiranje papaina i smeše ficina**

Kako su glavni ciljevi ove studije ispitivanje tendencije formiranja amiloidnih agregata različitih proteina i utvrđivanje razlika u tendenciji formiranja amiloida u odnosu na diverzitet peptida u smeši, jedan od ciljeva ove studije jeste pretraga uslova za amiloidno agregiranje papaina i ficina i ispitivanje razlika u njihovoj tendenciji agregiranja s obzirom na razliku u pogledu heterogenosti polipeptidnog sastava. Ovi model sistemi odabrani su s obzirom na činjenicu da je papain pojedinačni polipeptid, dok je ficin smeša izoformi sličnih strukturnih karakteristika, te stoga dobar model heterogene populacije peptida. Pored toga, papain i ficin pokazuju veliki stepen homologije pa poređenje tendencije amiloidnog agregiranja ova dva model sistema pruža mogućnost utvrđivanja uticaja samog diverziteta sekvenci na amiloidno agregiranje.

## **7. Ispitivanje potencijala amiloidnih fibrila za vezivanje metala**

Ovalbumin, protein podložan brzom formiranju amiloidnih fibrila, odabran je kao model sistem za ispitivanje vezivanja jona teških metala za amiloide. Time je postavljen cilj ispitivanja potencijala amiloidnih fibrila od prirodnih lako dostupnih proteina za pripremu membrana za prečišćavanje otpadnih voda.



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Reagensi i rastvori

Korišćeni reagensi: lizozim iz kokošnjeg jajeta, albumin goveđeg seruma, kazein, L-cistein, L-glicin, Coomassie brilliant blue R-250, Coomassie brilliant blue G-250, Tioflavin T, 8-anilinoftalen-1-sulfonska kiselina, matriks SP-Sepharose, acetonitril za HPLC<sup>1</sup> proizvođača Sigma-Aldrich (Štajnhajm, Nemačka), proteinski marker proizvođača Thermo Scientific (Rokford, SAD). Sve ostale hemikalije su komercijalni proizvodi p.a. čistoće korišćeni bez daljeg prečišćavanja.

### 4.2. Izolovanje proteina

#### 4.2.1. Izolovanje ovalbumina

##### 4.2.1.1. Taložne metode za izolovanje ovalbumina iz jajeta

Ovalbumin iz belanceta kokošnjeg jajeta izolovan je taložnim metodama. Belance je mešano 5 min i proceđeno kroz troslojnu gazu. Globulini su taloženi pri 50% zasićenju amonijum-sulfata. Po dodatku jednake zapremine zasićenog rastvora amonijum-sulfata, precipitat je odvojen centrifugiranjem 30 min na 5000 x g. Iz dobijenog supernatanta je precipitiran ovalbumin podešavanjem pH 2 M sirćetnom kiselinom do izoelektrične tačke (pI) proteina koja iznosi 4,6. Talog je odvojen centrifugiranjem 30 min na 5000 x g i resuspendovan u 50 mM Tris<sup>2</sup>-HCl puferu pH 7. Za dodatno prečišćavanje postupak precipitacije na pI je ponovljen uz prethodno dodavanje jednake zapremine zasićenog amonijum-sulfata koji pospešuje taloženje ovalbumina. Dobijeni rastvor proteina je čuvan na -20°C.

##### 4.2.1.2. Analitička reverzno-fazna hromatografija za ispitivanje čistoće proteina

Preparat ovalbumina analiziran je reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (RP-HPLC od eng. *reverse-phase high performance liquid chromatography*) na Äkta Purifier 10 sistemu (GE Healthcare, Upsala, Švedska). Korišćena je kolona Discovery BIO

---

<sup>1</sup> Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC od eng. *high performance liquid chromatography*)

<sup>2</sup> Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)

Wide Pore C5 dimenzija 10 cm x 4,6 mm, veličine čestica 5  $\mu\text{m}$  (Supelco, Belfont, SAD). Korišćeni su 0,1% rastvor trifluorsirćetne kiseline (rastvor A) i 90% acetonitril sa 0,1% trifluorosirćetnom kiselinom (rastvor B). Za eluciju je korišćen gradijent acetonitrila 0-90%. Radni program za hromatografsko razdvajanje sadržao je sledeće korake i parametre:

protok 1 mL/min

ekvilibracija: 6 zapremina kolone (CV od eng. *column volume*)

nanošenje uzorka: 1 mL

ispiranje nevezanih proteina 2 CV

veličina frakcije: 0,5 mL

gradijent: 0-100% rastvora B, 10 CV

ispiranje kolone: 5 CV rastvora B

Elucija je praćena merenjem apsorbancije na 215 i 280 nm, kao i praćenjem konduktiviteta.

## 4.2.2. Izolovanje papaina

### 4.2.2.1. Ekstrakcija papaina

Papain je ekstrahovan iz komercijalnog liofilizovanog ekstrakta papaje (The British Drug House Ltd, London, UK). Za ekstrakciju proteina iz 5 g suvog praha korišćeno je 100 mL 100 mM Tris-HCl pufera pH 8 sa 100 mM NaCl i 1 mM EDTA<sup>3</sup> (pH 7,2 bez NaCl kod naknadnog prečišćavanja jonoizmenjivačkom hromatografijom). Suspenzija je inkubirana 30 minuta nu ledenom kupatilu uz mešanje na magnetnoj mešalici nakon čega je centrifugirana 15 minuta na 4000 x g na 4°C. Bistri supernatant koncentracije proteina oko 20 mg/mL korišćen je u daljem radu. Po potrebi je dodatno prečišćavan jonoizmenjivačkom ili kovalentnom hromatografijom u cilju uklanjanja pigmenata, proteolitičkih fragmenata i neaktivnog proteina.

### 4.2.2.2. Kovalentna hromatografija za prečišćavanje papaina

Za dodatno prečišćavanje ekstrakta papaina korišćen je matriks Tiol-Sepharose 4B (GE Healthcare, Upsala, Švedska) napakovan u kolonu dimenzija 1 x 10 cm. Za ekvilibraciju matriksa korišćen je 100 mM Tris-HCl pufer pH 8 sa 100 mM NaCl i 1 mM EDTA (20

---

<sup>3</sup> Etilendiamintetraacetat (EDTA)

zapremina kolone) [37]. Po nanošenju uzorka, istim puferom su isprani nevezani proteini (do pada koncentracije proteina određene Bredfordovom metodom na nulu) dok su vezani proteini eluirani istim puferom sa dodatkom 10 mM L-cisteina.

#### 4.2.2.3. Prečišćavanje papaina jonoizmenjivačkom hromatografijom

Nakon opisane ekstrakcije papaina, uzorak je pripremljen za jonoizmenjivačku hromatografiju razblaživanjem 10 puta dejonizovanom vodom u cilju smanjenja jonske sile. Kao matriks korišćen je SP-Sephadex, katjonski izmenjivač sa negativno naelektrisanim sulfopropil grupama. Za bubrenje 6 g matriksa korišćeno je 50 mL 100 mM Tris-HCl pufera pH 7,2 sa 1 mM EDTA zagrejanog na 50°C. Nakon bubrenja, matriks je ispiran 10 mM Tris-HCl puferom pH 7,2 sa 10 mM NaCl do potpune ekvibracije. Za matriks je vezan razblaženi ekstrakt uz blago mućkanje. Nakon 30 minuta inkubiranja, nevezani proteini su ispirani 5 puta zapreminom jednakom zapremini matriksa, do negativnog Bredfordovog testa na prisustvo proteina. Vezani proteini su eluirani 10 mM Tris-HCl puferom pH 7,2 sa 0,5 M NaCl u tri frakcije jednake zapremini kolone. Spojene frakcije vezanih proteina koncentrovane su do koncentracije proteina 15 mg/mL.

### 4.2.3. Izolovanje ficina

#### 4.2.3.1. Prikupljanje i obrada lateksa smokve – izolovanje ficina

Smeša ficina iz koje su izolovane pojedinačne izoforme dobijena je iz lateksa smokve (*Ficus carica*). Svež lateks je prikupljen po zasecanju ploda smokve u različitim fazama zrenja, od 1. maja do 15. avgusta. Stabla sa kojih je lateks prikupljan deo su privatne plantaže u Baru u Crnoj Gori.

Lateks je neposredno pre upotrebe odmrzavan na 4°C i centrifugiran 45 min na 15000 x g na temperaturi 4°C. Veliki deo mase poreklom od nerastvornih fragmenata ćelija i polimerne gume odvojen je centrifugiranjem, a supernatant je odmašćen petroletrom. Ekstrakcija lipidnog materijala petroletrom je ponovljena tri puta, svaki put sa dvostrukom zapreminom lateksa [157]. Po potrebi je za brže odvajanje faza emulzija centrifugirana 2 min na 15000 x g. Nakon celokupnog postupka dobijena je bistra vodena frakcija lateksa visoke koncentracije proteina (10-50 mg/mL) korišćena kao smeša izoformi ficina i skladištena na -20°C do upotrebe. Sastav

izoformi je ispitivan reverzno-faznom hromatografijom za sve uzorke lateksa prema protokolu iz odeljka 4.2.1.2. Za preparativno razdvajanje izoformi jonoizmenjivačkom hromatografijom korišćen je uzorak lateksa prikupljen sredinom juna. Uzorci lateksa prikupljenog tokom avgusta, najbogatiji proteinima, korišćeni su prilikom izolovanja velike količine smeše ficina za praćenje promena i aktivnosti ficinskih izoformi u smeši.

#### 4.2.3.2. Razdvajanje izoformi ficina jonoizmenjivačkom hromatografijom

Izoforme ficina su razdvajane jonoizmenjivačkom hromatografijom na matriksu SP-Sepharose. Korišćena je kolona dimenzija 0,8 x 6 cm napakovana je sa 3 mL matriksa koji je ekvilibrisan sa 30 mM natrijum-citratnim puferom pH 5. Vodena frakcija lateksa razblažena je 10 puta istim puferom nakon čega je 10 mL naneto na kolonu. Nevezani proteini ispirani su sa 5 zapremina kolone početnog pufera. Vezani proteini eluirani su izmenom 30 mM natrijum-citratnih pufera pH 5.0 rastuće koncentracije natrijum-hlorida (50, 100, 150, 200, 250, 400 mM). Zapremina svakog od nanetih pufera bila je 50 mL, a sakupljane su frakcije zapremine 0,3 mL. Koncentracija proteina u frakcijama merena je Bradfordovom metodom i iskorišćena za konstruisanje hromatograma. Vezane frakcije ispod pet najistaknutijih pikova su spojene.

#### 4.2.3.3. Reverzno fazna hromatografija za razdvajanje izoformi ficina

Pored opisane analitičke metode (odeljak 4.2.1.2.) i za preparativno razdvajanje izoformi ficina korišćena je RP-HPLC metoda u uslovima koji omogućavaju očuvanje enzimske aktivnost. Izoforme su razdvojene na istoj koloni - Discovery BIO Wide Pore C5 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) na Äkta Purifier 10 sistemu (GE Healthcare, Upsala, Švedska). Uzorci vezanih frakcija sa jonoizmenjivačke hromatografije razblaženi su 10 puta 10 mM rastvorom amonijum-acetata pre nanošenja na kolonu. Radni program za hromatografsko razdvajanje sadržao je sledeće korake i parametre:

protok 1 mL/min

ekvilibracija: 5 CV

nanošenje uzorka: 1 mL

ispiranje nevezanih proteina 2 CV

veličina frakcije: 0,5 mL

gradijent: 0-100% rastvora B, 10 CV

ispiranje kolone: 7 CV rastvora B

Kao rastvor A korišćen je 25 mM rastvor amonijum-acetata, a kao rastvor B 70% acetonitril sa 25 mM amonijum-acetatom. Za razdvajanje je korišćen gradijent acetonitrila (0-70%) u dužini od 10 zapremina kolone. Prikupljane frakcije su uparavane neposredno nakon hromatografskog razdvajanja korišćenjem vakuum uparivača Thermo Savant DNA120 SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD). Uzorci su resuspendovani u 0,1 mL 30 mM citratnog pufera pH 5 i pripremani za elektroforetsku analizu.

#### 4.2.3.4. Tripsinsko mapiranje metodom otiska prsta (TMF) za identifikaciju izoformi

Frakcije ficina sa jonoizmenjivačke hromatografije podvrgnute su tripsinskom mapiranju masenom spektrometrijom u cilju detekcije izoformi. Frakcije ispod pojedinačnih pikova analizirane su SDS PAG elektroforezom. Prečišćena izoforma obeležena kao frakcija V isečena je iz gela i inkubirana sa 24 sata na 37°C sa 0,001% rastvorom tripsina za masenu spektrometriju (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka) u 100 mM amonijum-bikarbonatnom puferu pH 8. Peptidni fragmenti su dodatno ekstrahovani iz gela inkubiranjem 30 minuta na 37°C sa 50 mL 50% acetonitrila sa 0,1% trifluorosirćetnom kiselinom. Rastvarač je uklonjen uparavanjem pomoću vakuum uparivača Thermo Savant DNA120 SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD). Peptidi su razdvojeni reverzno-faznom hromatografijom (RP-HPLC) na C-18 koloni (RR HT, 1,8 µm, 4,6 x 50 mm) kuplovanj sa Zorbax Eclipse XDB-C18, instaliranoj na 1200 series HPLC sistem (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD). Razdvajanje je urađeno pri segmentiranom gradijentu (5–95% acetonitril 10 min pa 95% acetonitril 5 min). Svi rastvori su sadržali 0,2% mravlje kiseline. Korišćen je maseni spektrometar 6210 Time-of-Flight (TOF) LC-MS<sup>4</sup> system (G1969A, Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) u pozitivnom režimu elektron-sprej jonizacije (ESI, od eng. *electron spray ionization*) sa naponom na vrhu kapilare od 4000 V, naponom fragmentora 200 V i opsegom masa 100-300 m/z. Mase peptida su pretražene naspram sekvenci transkriptoma smokve iz NCBI baze podataka korišćenjem softvera Protein Prospector v 6.2.2 (Univerzitet u Kaliforniji, San Francisko, SAD).

---

<sup>4</sup> Tečna hromatografija – masena spektrometrija (LC-MS od eng. liquid chromatography – mass spectrometry)

#### 4.2.3.5. Modelovanje 3D strukture

Trodimenzionalna struktura ficina 1c modelovana je korišćenjem softvera Phyre 2.0 Server (Imperial College, London, UK) na osnovu sekvence 214 aminokiselina dugog zrelog proteina. Softverski su odabrani srodni proteini iz baze podataka Protein Data Bank (PDB) kao template, među kojima su bili papain, karikain, ficin A i ficin D. Na principima hereustike, struktura ficina 1c je modelovana na osnovu templata, upoređivanja sekvenci, procenta identičnosti među njima, kao i poravnavanja [176].

### **4.3. Destabilizacija proteina i formiranje amiloida**

#### **4.3.1. Destabilizacija ovalbumina i formiranje amiloidnih fibrila**

Ovalbumin izolovan taložnim metodama i rastvoren u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8, preveden je u rastvor HCl pH 2. Za manje zapremine uzorka ovo je urađeno na Sephadex G-25 ili Biogel P6 koloni. Kolone sa oba matriksa bile su zapremine 6 mL, ekvilibrisane rastvorom HCl pH 2. Nanošena je ukupna zapremina od 1 mL uzorka proteina. Na osnovu prethodne kalibracije plavim dekstranom, zapremina od 2 mL elucionog sredstva je propuštena, a zatim su prikupljane frakcije zapremine 0,1 mL u kojima je testirana koncentracija proteina Bredfordovim reagensom na osnovu čega su frakcije spajane.

U slučaju izmene rastvora dijalizom, uzorak proteina je dijalizovan naspram dejonizovane vode (1000 puta veće zapremine) dva puta po sat vremena na sobnoj temperaturi u cilju uklanjanja velike količine soli, nakon čega je dijalizovan 2 sata naspram 1000 puta veće zapremine rastvora HCl pH 2.

Fibrili ovalbumina pripremani su inkubiranjem uzorka proteina koncentracije 6 mg/mL [125] u rastvoru HCl pH 2 [121, 124] u zapremii od 1 ili 1,5 mL u ependorf tubama na 90°C u termobloku BioSan CH-100 (BioSan, Riga, Letonija) 24 h ili 5 dana. Tokom inkubacionog perioda izdvajani su alikvoti u različitim vremenskim intervalima (0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h) za testiranje biohemijskih i biofizičkih karakteristika proteina i praćenje formiranja amiloidnih fibrila.

#### **4.3.2. Destabilizacija lizozima iz kokošnjeg jajeta i formiranje amiloida**

Komercijalni prah lizozima rastvoren je u MiliQ vodi u koncentraciji 60 mg/mL. Rastvor je razblažen dodatkom apsolutnog etanola do finalne koncentracije 90% (V/V) pri čemu je postignuta koncentracija proteina od 6 mg/mL. Rastvor je inkubiran na sobnoj temperaturi uz blago mešanje na magnetnoj mešalici tokom 60 dana. Manje zapremine uzoraka inkubirane su u ependorf tubama uz mešanje na magnetnoj mešalici opremljenoj rotacionom pločom. Tokom prva 4 dana inkubiranja izdvajani su alikvoti (nakon 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) za biohemijske i biofizičke analize oliugomernih stanja.

#### **4.3.3. Destabilizacija papaina i ficina u kiseloj sredini i u prisustvu niske koncentracije etanola**

Uzorci papaina i ficina u koncentraciji 0,3 mg/mL pripremani su razblaživanjem uzoraka koncentracije proteina 10 mg/mL u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8 50 mM natrijum-tartaratnim puferom pH 3,2. Pripremani su uzorci bez etanola, sa 5% i 12% etanola i inkubirani na 4°C. Tokom inkubacionog perioda alikvoti su izdvajani nakon 5, 24, 48, 96, 168, 264, 360, 528 sati. U ovim alikvotima je određena opšta proteolitička aktivnost naspram kazeina kao supstrata (odjeljak 4.4.3.2). Za svaki uzorak pripremana je odgovarajuća kontrola sa adekvatnom koncentracijom etanola. Set analognih alikvota sa istim sadržajem etanola analiziran je u istim vremenskim tačkama infracrvenom spektroskopijom (odjeljak 4.7.1). Ovi uzorci su umesto u natrijum-tartaratnom puferu pripremani u rastvoru HCl pH 3,2 zbog interferiranja signala tartarata sa signalima proteina u Amidnom I regionu.

#### **4.3.4. Destabilizacija papaina i ficina u kiseloj sredini i u prisustvu visoke koncentracije etanola uz predtretman ureom**

Uzorci papaina i smeše ficina koncentracije 24 mg/mL rastvoreni u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8 dijalizovani su naspram rastvora HCl pH 3 dva sata u cilju izmene rastvarača. U dijalizovani rastvor dodata je urea do finalne koncentracije 8 M uz podešavanje koncentracije proteina na 6 mg/mL. Uzorci su inkubirani u prisustvu uree preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon 16 h urea je uklonjena dvostrukom dijalizom u trajanju od po sat vremena naspram 200 puta veće zapremine rastvora HCl pH 3. Po uklanjanju uree, rastvori proteina su skoncentrovani na

ultrafiltracionim ćelijama za centrifugiranje sa veličinom pora 3000 Da do koncentracije 6 mg/mL. Deo rastvora je dodatno skoncentrovan 10 x nakon čega je dodat etanol do 90% koncentracije. Finalno je u rastvore zapremine 1 mL dodato 26  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptetoetanol do koncentracije 355 mM odnosno rastvor HCl pH 3 u jednakoj zapremini u uzorke koji su inkubirani u neredukujućim uslovima. Svi uzorci su inkubirani 24 h na sobnoj temperaturi, a alikvoti su izdvajani nakon 1, 2, 4 h i čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  do prikupljanja i analize svih uzroaka merenjem ThT fluorescencije i snimanjem ATR-FTIR spektara.

## **4.4. Analitičke metode za karakterizaciju proteinskih preparata**

### **4.4.1. Metode za određivanje koncentracije proteina**

#### 4.4.1.1. Bredfordova metoda

Koncentracija proteina određivana je Bredfordovom metodom [177] uz korišćenje albumina goveđeg seruma (BSA od eng. *bovine serum albumin*) za pripremu standardnih rastvora. Rastvori korišćeni za izvođenje Bredfordove metode su:

1. Bredfordov reagens: 0,125% (m/V) CBB G-250, 19% (V/V) etanol, 42,5% fosforna kiselina,
2. Standardni rastvori BSA: pripremani u koncentracijama iz tabele 4.1 od polaznog rastvora BSA koncentracije 1 mg/mL.

Bredfordov reagens je pripreman u etanolu uz mešanje i naknadno dodavanje vode i fosforne kiseline nakon potpunog rastvaranja. Pripremljen reagens je pre upotrebe razblaživan pet puta dejonizovanom vodom i filtriran kroz standardni filter papir. Za određivanje koncentracije korišćene su dve metode, makro metoda za koncentracije u opsegu 0,1-1 mg/mL u kojoj je odmeravano 5  $\mu$ L uzorka i 200  $\mu$ L Bredfordovog reagensa, i mikro metoda za opseg koncentracija 0,01-0,1 mg/mL u kojoj je odmeravano 20  $\mu$ L uzorka i 200  $\mu$ L reagensa u bunare mikrotitar pločice. Nakon 5 minuta inkubiranja merena je apsorbancija na talasnoj dužini 620 nm korišćenjem čitača za mikrotitar pločice LKB Micro plate reader 5060-006 (GDV, Rim, Italija). Slepa proba je pripremana mešanjem 5, odnosno 20  $\mu$ L dejonizovane vode sa 200  $\mu$ L reagensa. Svako merenje, uključujući slepe probe i standardne rastvore, urađeno je u triplikatu.



**Tabela 4.1. Koncentracije standardnih rastvora BSA za Bredfordovu metodu.**

<b>Makro metoda (mg/mL)</b>	<b>Mikro metoda (mg/mL)</b>
0,10	0,010
0,25	0,025
0,50	0,050
0,75	0,075
1,00	0,100

#### 4.4.1.2. Biuretska metoda

Rastvori korišćeni za određivanje koncentracije proteina biuretskom metodom su:

1. Biuretski reagens: 0,3% (m/V) bakar-sulfat, 1,2% (m/V) natrijum kalijum-tartarat, 6% (m/V) natrijum-hidroksid,
2. Standardni rastvori BSA koncentracije 1, 2, 3, 4 i 5 mg/mL.

Uzorci u zapremini od 0,5 mL mešani su sa 2,5 mL biuretskog reagensa. Nakon 20-30 minuta u mraku merena je apsorbanacija na 540 nm korišćenjem uniSPEC 2 spektrofotometra (Lab Logistics Group GmbH, Mekenhajm, Nemačka). Kao slepa proba korišćena je dejonizovana voda. Linearnom regresijom dobijena je kalibraciona prava kao zavisnost apsorbanacije od koncentracije proteina.

#### 4.4.2. Elektroforetske metode

Elektroforeze su rađene na sistemima za horizontalnu elektroforezu Hoefer mighty small SE 245 (Hoefer, Holiston, SAD) i Biostep Gel Electrophoresis Tank Vertical GV202 (Burkhartsdorf, Nemačka) po originalnoj Lemlijevoj proceduri [178].

##### 4.4.2.1. Natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)

Za pripremu gelova, uzoraka i izvođenje SDS PAGE pripremljeni su sledeći rastvori:

1. Monomerni rastvor: smeša akrilamida i bisakrilamida u kojoj je zbirna koncentracija ovih supstanci 30%, a 2,7% ukupne mase čini bisakrilamid,
2. Pufer za gel za razdvajanje: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8,
3. Pufer za gel za koncentrovanje: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8,

4. Rastvor detergent: 10% (m/V) SDS,
5. Inicijator polimerizacije: 10% (m/V) amonijum-persulfat (APS),
6. Rastvor za nadslojavanje: n-butanol zasićen vodom,
7. Pufer za pripremu uzoraka 5x koncentrovan: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% (V/V) glicerol, 10% (m/V) SDS, 0,1% (m/V) brom fenol plavo, 25% (V/V) β-merkaptetoetanol,
8. Pufer za elektroforezu: 0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS.

Za razdvajanje je korišćen 10% gel za razdvajanje i 4% gel za koncentrovanje koji su pripremani od navedenih komponenti prema protokolima prikazanim u tabelama 4.6 i 4.7.

**Tabela 4.6. Sastav SDS poliakrilamidnih gelova pripremanih za elektroforezu na Biostep Gel Electrophoresis Tank Vertical GV202.**

Komponente	10% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
AA	2 mL	0,4 mL
Tris-HCl pH 8,8	1,25 mL	-
Tris-HCl pH 6,8	-	0,75 mL
Voda	1,65 mL	1,8 mL
TEMED <sup>5</sup>	2,5 µL	1,5 µL
SDS	50 µL	30 µL
APS	25 µL	15 µL
Finalna zapremina	5 mL	3 mL

**Tabela 4.7. Sastav SDS poliakrilamidnih gelova pripremanih za elektroforezu na Hoefer mighty small sistemu.**

Komponente	10% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
AA	4,8 mL	0,8 mL
Tris-HCl pH 8,8	3 mL	-
Tris-HCl pH 6,8	-	1,5 mL
Voda	4 mL	3,6 mL
TEMED	6 µL	3 µL
SDS	120 µL	60 µL
APS	60 µL	30 µL

Između staklenih ploča fiksiranih u nosaču sa distancerima (eng. *spacer*), debljine 0,75 mm (Hoefer mighty small sistem) odnosno 1 mm (Biostep Gel Electrophoresis Tank Vertical GV202), nalivani su rastvori za gelove za razdvajanje. Gelovi su nakon nalivanja nadslojeni zasićenim rastvorom n-butanola. Po završetku polimerizacije, gelovi su ispirani dejonizovanom

<sup>5</sup> Tetrametiletilendiamin (TEMED)

vodom, osušeni i nadslojeni rastvorom gelova za koncentrovanje uz uranjanje “češlja” za pripremu bunara za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije, formirani su bunari za nalivanje uzoraka koji su ispirani dejonizovanom vodom. Sendvič staklenih ploča između kojih se nalazi polimerizovan gel unošen je u kadu za elektroforezu, nalivan pufer za elektroforezu u za to predviđene odeljke kade. Mikrošpicom su nanošeni uzorci u bunare. Uzorci su prethodno pripremani mešanjem sa 5x koncentrovanim puferom za uzorke u odnosu 4:1. Po dodatku pufera za uzorke na gelove na kojima su bojeni ukupni proteini, uzorci su inkubirani 10 min na 95°C. Nanošena je zapremina od 20 do 60 µL uzoraka u bunare zavisno od koncentracije proteina. Koncentrovanje proteina izvođeno je pri konstantnom naponu od 80 V. Pri prelasku uzoraka u gel za razdvajanje, napon je povećavan na 120 - 200 V. Po završetku elektroforeze, ploče su razdvajane, gelovi ispirani dejonizovanom vodom i bojeni kako bi se detektovale proteinske trake.

#### 4.4.2.2. Detekcija proteinskih traka

Po završetku elektroforetskog razdvajanja, proteinske trake su vizualizovane bojom Coomassie Brilliant Blue (CBB). Prva faza u ovom postupku bojenja je fiksiranje proteina rastvorom 50% (V/V) metanola i 10% (V/V) sirćetne kiseline. Nakon 10 minuta inkubiranja u ovom rastvoru, gel je inkubiran u 0,25% (m/V) rastvoru boje CBB u 50% (V/V) metanolu i 10% (V/V) sirćetnoj kiselini 15 minuta. Za obezbojavanje gela i kontrastiranje proteinskih traka korišćen je rastvor za fiksiranje izmenjen 2 puta uz inkubiranje 10 minuta. Za potpuno obezbojavanje pozadine gelovi su inkubirani u rastvoru 7% (V/V) sirćetne kiseline u kom su čuvani.

#### 4.4.2.3. Zimogramska detekcija proteolitičkih enzima

Za zimogramsku detekciju proteolitičkih enzima urađena je želatinska SDS PAG elektroforeza. Rastvori su pripremani na isti način kao za klasičnu SDS PAGE. Za pripremu gelova korišćeni su protokoli dati u tabelama 4.6 i 4.7, uz dodatak želatina do finalne koncentracije 0,1% (m/V) kako bi se postigla kopolimerizacija sa želatinom. Ovaj procenat želatina u gelu postignut je odmeravanjem 0,3% (m/V) rastvora želatina [179] u dejonizovanoj vodi umesto vode za pripremu gelova za razdvajanje. Gelovi za koncentrovanje pripremani su na isti način kao za klasičnu SDS PAGE. Uzorci su pripremani mešanjem u odnosu 4:1 sa puferom za pripremu

uzoraka. Pre nanošenja na gelove, inkubirani su 30 min na 60°C. Razdvajanje je rađeno pri konstantnoj jačini struje od 25 mA.

Za detekciju traka primenjavana je tehnika inverznog bojenja bojom CBB u kojoj se dobija plavo obojenje gela sa želatinom i prozirne trake koje ukazuju na proteolitičku aktivnost enzima iz uzorka. Po završetku elektroforetskog razdvajanja, gelovi su ispirani dejonizovanom vodom i inkubirani preko noći (oko 16 h) u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8 sa 20 mM L-cisteinom. Nakon prekonoćnog inkubiranja, gelovi su obojeni CBB prema protokolu iz odeljka 4.4.2.2.

#### 4.4.2.4. Densitometrijska analiza elektroforetskih gelova

Gelovi su densitometrijski analizirani korišćenjem programa GelAnalyzer 19.1<sup>6</sup> sa opcijom analize pojedinačnih traka. Za upoređivanje intenziteta pojedinačnih traka uzorci su nanošeni na gelove u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost intenziteta traka dobijenih densitometrijskom analizom triplikata.

### 4.4.3. Eseji sa određivanjem proteolitičke aktivnosti

#### 4.4.3.1. Esej hidrolize sintetičkog supstrata BAPNA

Sintetički supstrat BAPNA (N- $\alpha$ -benzoil-D,L-arginin-4-nitroanilid) je korišćen za određivanje aktivnosti ficina i papaina. Reakcione smeše su pripremane mešanjem 50  $\mu$ L rastvora enzima koncentracije 1 mg/mL sa 50  $\mu$ L 100 mM Tris-HCl pufera pH 8,0 i 100  $\mu$ L 2 mM rastvora supstrata BAPNA u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8 koji sadrži 10 mM L-cistein i 5% (V/V) dimetilsulfoksida (DMSO) u bunarima mikrotitar pločica. Inkubirane su 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su reakcije prekidane dodatkom 100  $\mu$ L 50% (V/V) sirćetne kiseline. Apsorbancija oslobođenog p-nitroanilina merena je na 405 nm korišćenjem uređaja LKB Microplate reader 5060-006 (GDV, Rim, Italija). Jedna jedinica enzimske aktivnosti definisana je kao količina enzima koja oslodi 1  $\mu$ mol p-nitroanilina po minutu. Ekstinkcioni koeficijent korišćen za određivanje koncentracije p-nitroanilina iznosi 8800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

---

<sup>6</sup> www.gelanalyzer.com, Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc

#### 4.4.3.2. Kazeinolitički esej

Za određivanje kazeinolitičke aktivnosti papaina i ficina korišćeni su uzorci proteina koncentracije 0,1 mg/mL. Reakcione smeše sadržale su 50  $\mu$ L rastvora enzima i 250  $\mu$ L 0,65% (m/V) rastvora kazeina u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8 sa 10 mM L-cisteinom. Nakon 30 minuta inkubiranja na 37°C, reakcije su zaustavljene dodatkom 100  $\mu$ L 10% (m/V) trihlorsirćetne kiseline. Staloženi kazein odvojen je centrifugiranjem 15 minuta na 12000 x g. Apsorbancija supernatanta na 280 nm merena je na uniSPEC 2 spektrofotometru (Lab Logistics Group GmbH, Mekenhajn, Nemačka). Sva merenja urađena su u triplikatu. Jedna arbitrarna jedinica kazeinolitičke aktivnosti definisana je kao količina enzima koja dovodi do povećanja apsorbancije na 280 nm za jednu jedinicu po minutu reakcije [157]. Specifična aktivnost izražena je kao broj arbitrarnih jedinica po miligramu proteina u uzorku.

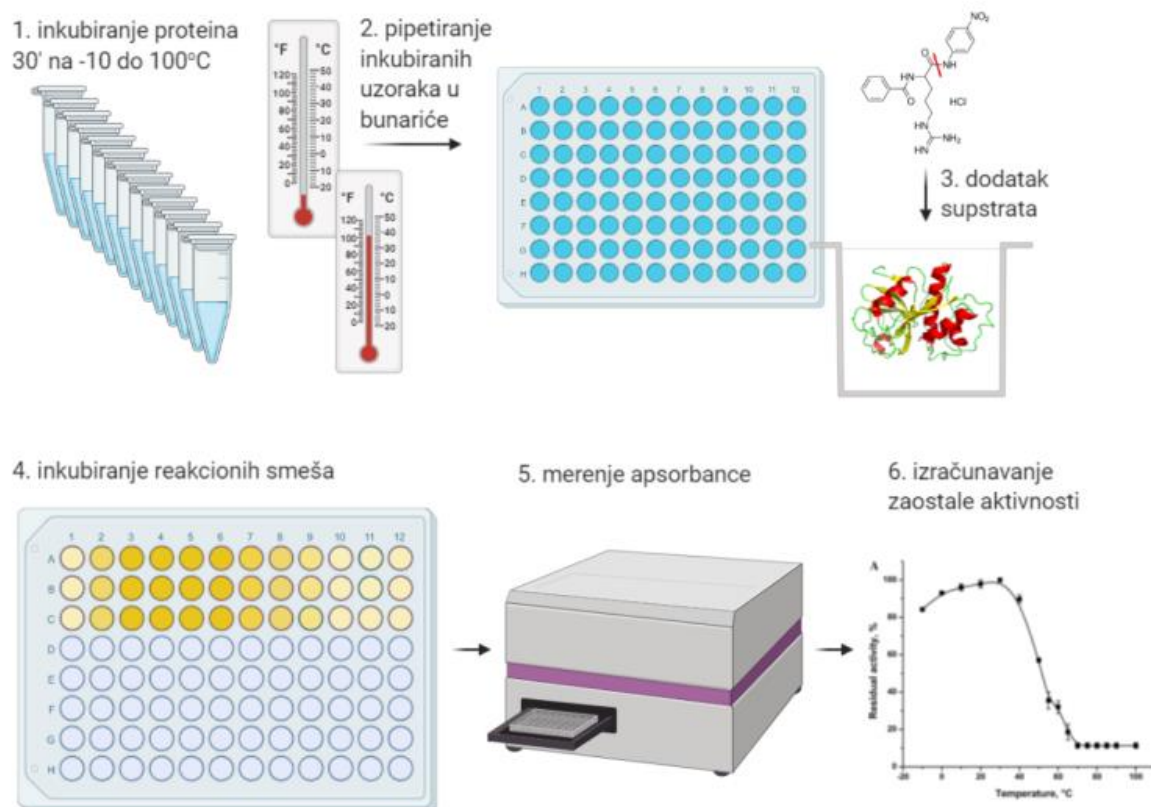
#### 4.4.3.3. Želatinolitički esej

Aktivnost izoformi ficina u hidrolizi želatina merena je ninhidrinskom metodom [179]. Reakcione smeše su pripremane mešanjem 10  $\mu$ L uzorka proteina koncentracije oko 1 mg/mL sa 100  $\mu$ L rastvora želatina koncentracije 20 mg/mL u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8. Nakon 5 h inkubiranja na 37°C, reakcije su zaustavljane dodatkom 110  $\mu$ L 20% (m/V) polietilen glikola (PEG) 6000 i inkubiranjem 1 h na 4°C. Smeše su nakon inkubiranja centrifugirane 30 min na 12000 x g na temperaturi 4°C. Pripreman je svež ninhidrinski rastvor koji sadrži 2% (m/V) ninhidrina, 50% (m/V) propilen-glikola, 0,16% (m/V) kalaj-hlorida u 50 mM citratnom puferu pH 5. Za određivanje koncentracije hidrolitičkih proizvoda, 10  $\mu$ L supernatanta je razblaženo dva puta vodom i dodato je 200  $\mu$ L rastvora ninhidrina. Smeše su inkubirane 15 minuta na 100°C. Po hlađenju do sobne temperature, 400  $\mu$ L 1-propanola je dodato u smeše, nakon čega je celokupni rastvor dva puta razblažen 100 mM Tris-HCl puferom pH 8. Merena je apsorbancija na 540 nm. Sva merenja urađena su u triplikatu. Jedna jedinica želatinolitičke aktivnosti (GDU od eng. *gelatin digestion unit*) definisana je kao količina enzima koja oslobađa peptide iz želatina čija je boja koja se dobija u reakciji sa ninhidrinom ekvivalentna boji koju u istoj reakciji daje 1 mmol glicina za reakciono vreme od 5 h. Za ovakvo određivanje aktivnosti konstruisana je kalibraciona prava mešanjem rastvora glicina u opsegu koncentracija 1-8  $\mu$ M sa rastvorom ninhidrina.

## 4.5. Funkcionalni eseji za praćenje stabilnosti proteaza

### 4.5.1. Određivanje pH stabilnosti papaina i ficina

Razblaženi uzorci proteina koncentracije oko 0,1 mg/mL su inkubirani u puferima različite pH 30 minuta na sobnoj temperaturi (22°C). Korišćeni su 50 mM natrijum-citratni pufer (pH 3-6), 50 mM natrijum-fosfatni pufer (pH 7), 50 mM Tris-HCl pufer (pH 8 i 9) i 50 mM natrijum-glicinatni pufer (pH 10). Aktivnost svakog uzorka je određena korišćenjem kazeina kao supstrata, na optimalnoj pH vrednosti, prema postupku opisanom u poglavlju 4.4.3.2. Za poređenje, određena je aktivnost netretiranog uzorka koncentracije 0,1 mg/mL u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8, neinkubiranog na sobnoj temperaturi. Rezidualna aktivnost nakon inkubiranja na različitim pH vrednostima izračunata je kao odnos enzimske aktivnosti tretiranog uzorka i netretiranog uzorka istog proteina i izražena procenatualno. Sva merenja su urađena u triplikatu.



Slika 4.1. Konstrukcija krive termalne denaturacije.

#### 4.5.2. Kriva termalne inaktivacije

Rastvori papaina i ficina koncentracije 0,5 mg/mL u 50 mM natrijum-tartaratnom puferu pH 3,2 inkubirani su na temperaturama -10, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 i 100°C 30 minuta. Nakon hlađenja do sobne temperature određena je enzimaska aktivnost prema supstratu BAPNA prema protokolu iz poglavlja 4.4.3.1. Rezidualna aktivnost je izračunata procentualno u odnosu na netretirani uzorak i grafički prikazana u zavisnosti od temperature [152]. Sva merenja urađena su u triplikatu.

#### 4.5.3. Određivanje konstanti brzine inaktivacije

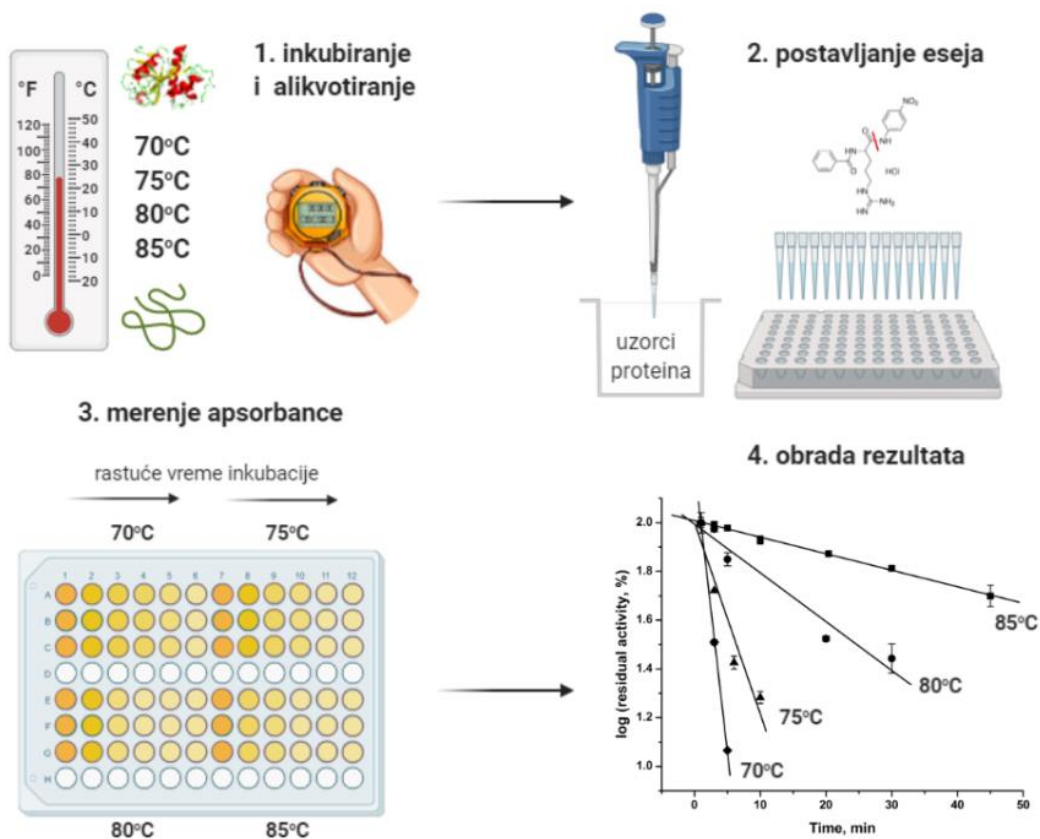
Konstante brzine inaktivacije ficina i papaina u kiseljoj sredini određene su na različitim temperaturama - 45, 50, 55 i 60°C u 50 mM natrijum-tartaratnom puferu pH 3,2 prema prethodno opisanom postupku [152]. Uzorci su inkubirani na navedenim temperaturama i alikvoti su uzimani nakon 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45 minuta i ohlađeni do sobne temperature. Nakon hlađenja, određena je aktivnost svakog alikvota naspram supstrata BAPNA prema protokolu iz odeljka 4.4.3.1. Rezidualna aktivnost je izračunata kao odnos aktivnosti inkubiranih uzoraka i početnog uzorka izražena u procentima.

Dobijene vrednosti su prevedene u logaritam sa osnovom 10 i predstavljena je zavisnost logaritma rezidualne aktivnosti od vremena:

$$\log (\text{rezidualna aktivnost, \%}) = -\frac{k}{2,303} \times t$$

gde je k konstanta brzine inaktivacije, a t vreme inkubiranja.

Iz vrednosti nagiba dobijenih pravih izračunate su vrednosti konstante brzine inaktivacije (k) enzima na svakoj od temperatura.



Slika 4.2. Praćenje kinetike inaktivacije proteina.

#### 4.5.4. Određivanje aktivacione energije za inaktivaciju papaina i ficina

Aktivaciona energija za inaktivaciju papaina i ficina određena je primenom Arnijusovog dijagrama na kom je predstavljena sledeća zavisnost:

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + C$$

gde je  $k$  konstanta brzine inaktivacije,  $T$  temperatura izražena u kelvinima,  $E_a$  energija aktivacije za process,  $R$  univerzalna gasna konstanta ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), a  $C$  konstanta.



## **4.6. Fluorimetrijske metode za praćenje stabilnosti i strukturnih promena proteina**

### **4.6.1. Unutrašnja fluorescencija triptofana**

Unutrašnja fluorescencija triptofana korišćena je za snimanje spektara proteina u različitim denaturišućim uslovima. Od denaturanata korišćena je urea i povišena temperatura. Spektri su snimani na PerkinElmer LS 50 spektrofluorimetru (PerkinElmer, Valtam, USA). Za eksperimente denaturacije ureom uzorci su inkubirani u prisustvu različitih koncentracija uree (0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 i 2,0 M) u 50 mM natrijum-fosfatnom puferu preko noći. Spektri su snimani na temperaturama 10, 20, 30, 40 i 50°C. Za ekscitaciju je korišćena svetlost talasne dužine 295 nm sa ekscitacionim slitom promera 8,5 nm, dok je emisija praćena u opsegu od 300 do 450 nm sa emisionim slitom promera 3,3 nm i brzinom skeniranja od 60 nm/min. Korišćena je kiveta širine 1 cm. Na osnovu spektara su očitavane vrednosti maksimalne emisije (između 355 i 357 nm u svim uzorcima) korišćene za konstrukciju krivih denaturacije u zavisnosti od koncentracije uree, odnosno temperature.

### **4.6.2. ANS fluorescencija**

Za snimanje emisionih spektara 8-anilino-1-naftalen sulfonata (ANS) u prisustvu proteina iz uzoraka pripremane su smeše koje su sadržale 200 µL 8 mM rastvora ANS, 1900 µL 100 mM Tris-HCl pufera pH 8 i 100 µL uzorka proteina u koncentraciji 0,6 mg/mL. Emisioni spektri u opsegu 400 do 600 nm su snimani na spektrofluorimetru FluoroMax-4 Jobin Yvon (Horiba, Lonžimo, Francuska) uz ekscitaciju svetlošću talasne dužine 390 nm sa slitom promera 5 nm. Dobijeni spektri su korigovani za vrednosti slepe probe – pufera. Svi spektri snimani su u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja.

Za merenje vrednosti fluorescencije na maksimumu emisije (480 nm) korišćen je instrument Tecan Infinite m200 PRO (Tecan, Manedorf, Švajcarska). Smeše su pripremane pipetiranjem 20 µL 8 mM rastvora ANS, 190 µL 100 mM Tris-HCl pufera pH 8 i 10 µL uzorka proteina u koncentraciji 0,06-6 mg/mL. Razblaženja su pripremana tako da intenziteti budu u mernom opsegu instrumenta.

Prilikom karakterizacije Ficina 1c, izloženost hidrofobnih površina praćenjem ANS fluorescencije urađena je na PerkinElmer LS 50 spektrofleurimetru (PerkinElmer, Valtman, SAD). Protein u koncentraciji 0,03 mg/mL je inkubiran jedan sat u prisustvu 1 M uree na sobnoj temperaturi. ANS je dodat u finalnoj koncentraciji 12 mM nakon čega su snimani emisioni spektri u opsegu 400 do 600 nm sa emisionim slitom 15 nm, uz ekscitaciju na 380 nm sa ekscitacionim slitom 5 nm, pri brzini skeniranja 60 nm/min. Isti tretman ureom primenjen je i u prisustvu 50 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 7 i 50 mM natrijum-glicinatnog pufera pH 3.

#### **4.6.3. ThT fluorescencija**

Za snimanje emisionih spektara ThT u prisustvu proteina iz uzoraka pripremane su smeše koje su sadržale 200  $\mu$ L 0,1 mM rastvora ThT, 1800  $\mu$ L 100 mM Tris-HCl pufera pH 8 i 200  $\mu$ L uzorka proteina u koncentraciji 0,6 mg/mL. Emisioni spektri u opsegu 450 do 550 nm su snimani na spektrofleurimetru FluoroMax-4 Jobin Yvon (Horiba, Longjumeau, Francuska) uz ekscitaciju svetlošću talasne dužine 440 nm sa slitom promera 5 nm. Dobijeni spektri su korigovani za vrednosti slepe probe – pufera. Svi spektri snimani su u triplikatu, a srednje vrednosti su prikazane kao rezultat.

Za merenje vrednosti fluorescencije na maksimumu emisije (480 nm) korišćen je instrument Tecan Infinite m200 PRO (Tecan, Manedorf, Švajcarska). Smeše su pripremane pipetiranjem 20  $\mu$ L 0,1 mM rastvora ThT, 180  $\mu$ L 100 mM Tris-HCl pufera pH 8 i 20  $\mu$ L uzorka proteina u koncentraciji 0,06-6 mg/mL. Razblaženja su pripremana tako da intenziteti budu u mernom opsegu instrumenta.

## **4.7. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) za praćenje strukturnih promena proteina**

### **4.7.1. Priprema uzoraka i snimanje infracrvenih spektara**

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom rađena je u režimu umanjene ukupne refleksije (ATR, od eng. *attenuated total reflectance*). Spektri proteina u srednjem IR regionu (400 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) snimani su pri rezoluciji 2  $\text{cm}^{-1}$  na uređaju Nicolet 6700 FTIR (Thermo Scientific, Valtam, SAD) sa DTGS KBr detektorom sa termoelektričnim hlađenjem. Uzorci zapremine 1,5 do 10  $\mu\text{L}$  nanošeni su na dijamantski kristal (Smart Orbit, Thermo Scientific, Valtam, SAD) i uparavani strujom argona. Zapremina je varirana tako da masa proteina uparenog u vidu tankog filma na kristalu bude oko 10  $\mu\text{g}$ . Svaki spektar je dobijen sakupljanjem 64 snimaka. Spektri su obrađeni u softveru OMNIC, verzija 7.0 (Thermo Scientific, Valtam, SAD). Nad svim spektrima su primenjene iste osnovne tehnike obrade – automatska ATR korekcija za dijamantski kristal i automatska korekcija bazalne linije. Po potrebi je uklanjan šum u istom softveru, sa faktorom 4821  $\text{cm}^{-1}$  odnosno 6750  $\text{cm}^{-1}$ .

### **4.7.2. Kvalitativna analiza spektara**

Analizirani su Amidni I (1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ ), Amidni II (1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ ) i Amidni III (1330-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) region spektara. Za detaljniju analizu korišćen je i drugi izvod spektara u Amidnom I regionu. Za dobijanje ovih izvedenih spektara, korišćen je Savicki-Golej drugi izvod u 7 tačaka trećeg polinomskog reda. Najistaknutije trake u spektrima dodeljene su sekundarnim strukturama na osnovu drugog izvoda spektara i literaturnih podataka. Položaj traka sekundarnih struktura karakterističnih za native proteine se razlikovao od model sistema do model sistema i detaljnije je objašnjen u poglavlju Rezultati. Pored sekundarnih struktura karakterističnih za native proteine, u velikom broju uzoraka analizirane su agregacione  $\beta$ -pločice detektovane u regionima 1610-1630  $\text{cm}^{-1}$  i 1690-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.7.3. Korelacija drugih izvoda spektara

Za poređenje spektara tretiranih proteina naspram početnog, nativnog uzorka, određen je koeficijent korelacije između njihovih drugih izvoda. Korelacioni koeficijent je računat na osnovu sledeće formule:

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

gde su  $x$  i  $y$  apsorbancije dva spektra koji se upoređuju na svakoj vrednosti talasnog broja ( $i$ ).

#### 4.7.4. Kvantitativna analiza spektara – dekonvolucija

Za određivanje procentualnog sadržaja sekundarnih struktura ispitivanih proteina, rađena je Furijeova samodekonvolucija Amidnog I regiona primenom softvera OMNIC. Pri razlaganju spektara na pojedinačne komponente – Lorencijeve krive, zadate su vrednosti širine pika na polovini njegove visine koja je iznosila  $13 \text{ cm}^{-1}$  i faktor povećanja rezolucije koji je iznosio 2,4 [152]. Pojedinačne krive su ukapane u zbirnu krivu velike podudarnosti sa polaznim spektrom. Površina ispod pojedinačnih krivih deljena je sa sumom površine svih dobijenih pikova u cilju izračunavanja udela svake sekundarne strukture, odnosno procentualne zastupljenosti date sekundarne strukture.

#### 4.7.5. Kvalitativna analiza spektara – normalizacija intenziteta

Za određivanje tendencije zauzimanja određene sekundarne strukture određeni su intenziteti apsorpcije na karakterističnim trakama i podeljeni sa intenzitetom maksimuma u Amidnom II regionu ( $1539\text{-}1544 \text{ cm}^{-1}$ ). Maksimum Amidnog II regiona korišćen je kao interni standard za adekvatno poređenje intenziteta pojedinačnih traka između uzoraka. Dobijene normalizovane vrednosti tj. odnos intenziteta Amidne I i Amidne II trake predstavlja tendenciju zauzimanja određene sekundarne strukture.

#### **4.8. Mikroskopija atomskih sila (AFM)**

Mikroskopija atomskih sila (AFM, od eng. *atomic force microscopy*) urađena je u tapkajućem režimu korišćenjem uređaja BioScope Resolve (Bruker, Bilerika, SAD). Uzorci proteina su razblaženi do koncentracije 10 µg/mL Mili Q vodom i naneti na komercijalne Mica diskove (model SD-101, Bruker, Bilerika, SAD) od liskuna. Nakon vezivanja za disk, uzoci su isprani Mili Q vodom i osušeni strujom azota. Mikroskopije su napravljene korišćenjem softvera Nanoscope 8.10 koji je korišćen i za određivanje dužine i dijametra amiloidnih fibrila.

#### **4.9. *In silico* ispitivanje potencijala za formiranje amiloida**

Za ispitivanje potencijala za formiranje amiloida i detektovanje amiloidogenih peptida ovalbumina, lizozima, papaina i ficina 1c korišćeni su alati ZipperDB, TANGO i PASTA.

Alatu ZipperDB pristupano je preko internet adrese:

<https://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/intro>

Korišćenjem opcije napredna pretraga za cele proteine unete su sekvence zrelih proteina bez signalnih peptida i propeptida preuzete iz Uniprot baze: ovalbumin - P01012 (OVAL\_CHICK), lizozim - P00698 (LYSC\_CHICK), papain - P00784 (PAPA1\_CARPA) i ficin 1c - A0A6N0C805 (A0A6N0C805\_FICCA). Dobijeni rezultati preuzeti su u vidu slika na kojima je grafički prikazana energija svakog od aminokiselinskih ostataka kada bi se našla u strukturi amiloidne β-pločice.

TANGO alat je korišćen uz navođenje preciznih uslova fibrilacije. Unošene su sekvence zrelih lanaca i navođene su vrednosti temperature, jonske sile, pH vrednosti i koncentracije proteina primenjene u eksperimentima fibrilacije (odjeljak 4.3). Tendencija za formiranje agregacione β-pločice data je kroz parametar „Agg“. Vrednosti ovog parametra više od 1 uzimane su kao visoka tendencija za fibrilaciju [180].

PASTA alat je korišćen za pretragu amiloidogenih peptida sa optimalnim vrednostima energije koja iznosi -5 Pasta energetske jedinice odnosno -5,96 kcal/mol. Na ovaj način postignuta je osetljivost od 43,6% i specifičnost 5,1%. Kao rezultat prikazana je sekvenca sa oznakama kojoj sekundarnoj strukturi je pripisan svaki od ostataka (paralelna i antiparalelna agregacija,

neagregirajući region, neuređeni region, uređeni region,  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -pločica, upredena zavojnica). U ovoj studiji su razmatrani samo delovi sekvence označeni kao paralelne i antiparalelne agregacije.

#### **4.10. Vezivanje jona metala za amiloidne fibrile**

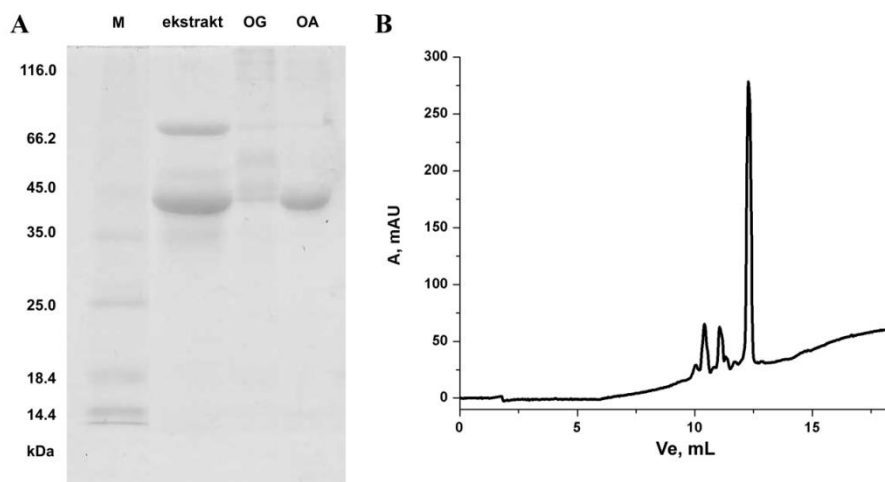
Amiloidni fibrili ovalbumina pripremani su po opisanoj proceduri (odjeljak 4.3.1) zagrevanjem na 90°C u rastvoru HCl pH 2 pet dana. Dobijeni fibrili su precipitirani centrifugiranjem 15 min pri gravitacionoj sili 18000 x g. Precipitati su osušeni u vakuum uparivaču Thermo Savant DNA120 SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD) pre merenja mase. Rastvori soli teških metala (50 mg/L olovo-acetata i 5 mg/L kadmijum-hlorida) naneti su na 10 mg amiloidnih fibrila. Pripremani su kako uzorci u prisustvu soli samo jednog od metala, tako i smeša soli oba metala. Smeše su intenzivno mešane 5 minuta nakon čega su amiloidni fibrili uklonjeni centrifugiranjem 15 min pri gravitacionoj sili 18000 x g. Supernatant je korišćen za određivanje koncentracije nevezanih jona metala korišćenjem atomskog apsorpcionog spektrometra Perkin-Elmer 2380 (Agilent Technologies, Santa Klara, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Izolovanje i karakterizacija proteina

#### 5.1.1. Izolovanje ovalbumina

Ovalbumin korišćen za formiranje amiloidnih fibrila izolovan je iz belanceta kokošnjeg jajeta taložnim metodama. Nakon taloženja globulinskih proteina pri 50% zasićenju amonijum-sulfata, ovalbumin kao dominantan protein koji zaostaje u supernatantu, taložen je podešavanjem pH na 4,6, odnosno na pI vrednost ovog proteina. Korak taloženja na izoelektričnoj tački je ponovljen, nakon čega je ispitivana čistoća dobijenog preparata reverzno-faznom hromatografijom na C5 koloni. Na slici 5.1 prikazani su SDS-PAGE elektroforegram koji prati proces prečišćavanja (A), kao i reverzno-fazni hromatogram kojim je ispitana homogenost preparata (B).



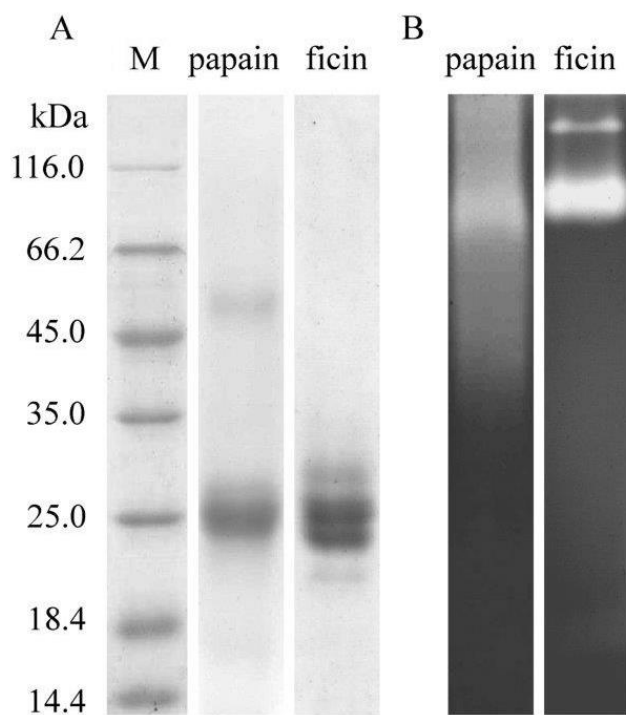
**Slika 5.1. Rezultati prečišćavanja ovalbumina iz belanceta jajeta: A) SDS-PAGE elektroforegram (M – marker proteini poznatih molekularnih masa, OG – ovoglobulini, OA – ovalbumin); B) Reverzno-fazna hromatografija na C5 koloni za ispitivanje homogenosti prečišćenog ovalbumina (Ve – eluciona zapremina, A – apsorbancija na 215 nm).**

Na osnovu elektroforegrama utvrđeno je da je veliki broj traka prisutan u početnom ekstraktu, odnosno puferisanom rastvoru belanceta, kao i prisustvo jedne dominantne trake na poziciji 45 kDa koja odgovara ovalbuminu u finalnom uzorku dobijenom taložnim metodama. Reverzno-fazna hromatografija pokazala je prisustvo jednog dominantnog pika ovalbumina i dva manja pika koji potiču od nečistoća. Stepenn čistoće je određen poređenjem površine ispod

ovalbuminskog pika sa totalnom površinom ispod krive koršćenjem Unicorn softvera (Cytiva, Marlboro, SAD) i dobijena je vrednost od oko 90%.

### 5.1.2. Izolovanje papaina i smeše ficina

Papain je ekstrahovan iz komercijalnog liofilizovanog ekstrakta papaje (The British Drug House Ltd, London, England) Tris-HCl puferom pH 8 u prisustvu EDTA. Dodatno prečišćavanje postignuto je jonoizmenjivačkom hromatografijom na SP-Sephadex matriksu.



**Slika 5.2. A) SDS-PAGE i B) zimogram sa želatinom kopolimerizovanim u 12% poliakrilamidni gel za razdvajanje (M – marker proteini poznatih molekulskih masa).**

Smeša ficina pripremljena je iz lateksa prikupljenog otkidanjem zrelog ploda smokve. Centrifugiranjem su uklonjene gumaste materije, a lipofilni molekuli ekstrakcijom petroletrom. Dobijena je vodena frakcija visokog sadržaja proteina (20-60 mg/mL zavisno od perioda zrenja ploda) razblažena po potrebi 50 mM Tris-HCl puferom pH 8.

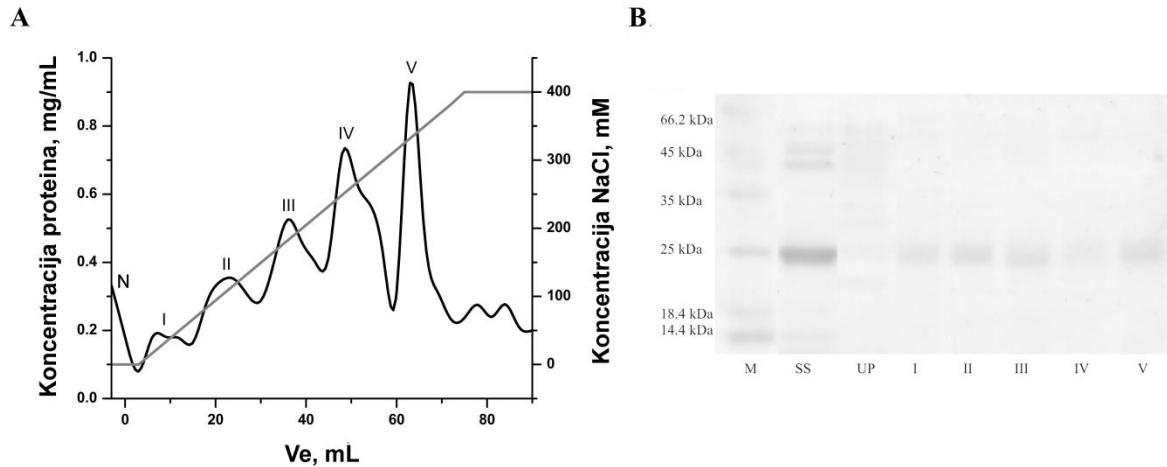
Prečišćeni papain kao i smeša ficina pokazuju na SDS-PAGE elektroforegramu molekulske mase oko 24 kDa (slika 5.2A). U uzorku papaina, pored dominantne trake na 25 kDa detektuje se i



slabija traka na oko 50 kDa. U slučaju ficina postoji nekoliko diskretnih traka bliskih molekulskih masa u rasponu 22-30 kDa koje predstavljaju različite izoforme ficina (prilog 1). Zimogramska detekcija (slika 5.2B) pokazuje proteolitičku aktivnost kako papaina, tako i smeše ficina prema želatinu kao supstratu.

### **5.1.3. Razdvajanje izoformi ficina**

Reverzno faznom hromatografijom pokazano je prisustvo velikog broja izoformi ficina u vodenoj frakciji lateksa (prilog 2). U cilju razdvajanja izoformi prisutnih u lateksu smokve prikupljenom tokom meseca juna, primenjena je jonoizmenjivačka hromatografija na katjonskom jonoizmenjivaču, SP-Sephadex. Hromatografija je urađena u kiseloj sredini na pH 5, a vezani proteini su eluirani rastućom koncentracijom natrijum-hlorida (0-400 mM). Kao što je prikazano na slici 5.3A, hromatografskim razdvajanjem je dobijeno pet glavnih pikova vezanih proteina različite površine. Najzastupljeniji proteini u smeši su eluirani pod pikovima IV i V. Trake proteina detektovanih u spojenim frakcijama ispod pikova I-IV (slika 5.3B) pokazuju relativnu mobilnost od oko 25 kDa kao što je očekivano za izoforme ficina (prilog 1). Spojene frakcije ispod svakog od pikova analizirane su u pogledu ukupne proteolitičke aktivnosti naspram kazeina kao supstrata i želatinolitičke aktivnosti (tabela 5.1). Pik V sa elucionom zapreminom 65 mL je u najvećoj meri odvojen od ostalih pikova i simetričan što ukazuje da se pod njim nalazi samo jedna izoforma. Ova izoforma čini 21,5% sadržaja proteina u analiziranom lateksu. Proteini eluirani ispod svih pet dominantnih pikova, kao i nevezani proteini, pokazuju proteolitičku aktivnost što ukazuje na to da su u pitanju izoforme ficina. Želatinolitička aktivnost u većoj meri varira između različitih frakcija. Najbaznija izoforma eluirana pod pikom V ima kazeinolitičku aktivnost koja iznosi 24 U/mg, dok želatinolitička aktivnost iznosi 84 GDU/mg. Odnos opšte proteolitičke i želatinolitičke aktivnosti je daleko niži kod nevezane frakcije i prve vezane frakcije.



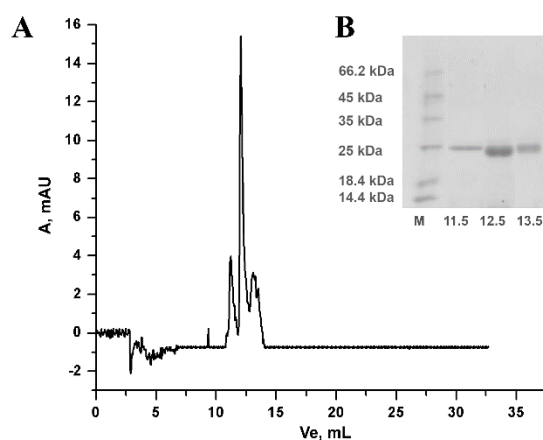
**Slika 5.3. A) Hromatografsko razdvajanje proteina lateksa na SP-Sephadex koloni ekvilibrisanoj 30 mM natrijum-citratnim puferom pH 5. Vezani proteini eluirani su gradijentom 0-0,4 M NaCl u istom puferu. Koncentracija proteina određena je Bredfordovom metodom. B) SDS PAGE analiza eluiranih izoformi ispod svakog od pikova u 12% gelu za razdvajanje (M – marker proteini poznatih molekulskih masa, SS – početni uzorak, UP – nevezani proteini, I-V - vezani proteini eluirani ispod glavnih pikova).**

**Tabela 5.1. Specifična aktivnost frakcija lateksa smokve dobijenih razdvajanjem jonoizmenjivačkom hromatografijom. Aktivnost je merena naspram kazeina i želatina kao supstrata (N – frakcija nevezanih proteina, I-V – frakcije vezanih proteina).**

Uzorak ispod pika	Prinos, %	Opšta proteolitička aktivnost, U/mg	Želatinolitička aktivnost, GDU/mg
UP	9,5	11,9 ± 0,6	190 ± 4
I	6,7	25 ± 1	132 ± 3
II	13,3	27,3 ± 0,8	83 ± 5
III	18,8	21,5 ± 0,5	101 ± 4
IV	23,5	24,2 ± 0,6	39 ± 2
V	21,5	24,0 ± 0,4	84 ± 3

Homogenost izoforme pod pikom V ispitana je reverzno-faznom hromatografijom na C5 koloni. Hromatogram i elektroforegram prikazani na slici 5.4 pokazuju prisustvo jedne dominantne izoforme (85-90% zastupljenosti) i dve nečistoće niže zastupljenosti. Frakcije ispod pikova su podvrgnute tripsinskom mapiranju u cilju identifikacije izoforme ficina korišćenjem programa Protein Prospector za analizu masa dobijenih peptida. Za poređenje korišćeno je 11 ficinskih

izoformi opisanih na osnovu analize transkriptoma (prilog 1). Najveće preklapanje je pronađeno između prečišćene izoforme ficina i izoforme ficina označene kao ficin 1c uz pokrivenost sekvence 48,6% što predstavlja 105 od 216 aminokiselinskih ostataka (prilog 3). Pronađeno je 14 preklapajućih peptida od kojih je 7 peptida specifičnih za ficin 1c. Peptidi prepoznati kod drugih izoformi, ficina 1a i ficina 3, nisu se pokazali kao specifični za date izofome, a pokrivenost sekvenci ovih proteina je daleko manja i iznosi oko 14% (prilog 3). Ficin 1c je na osnovu sekvence bazan protein čija je teorijski određena pI vrednost 8,64 (prilog 1) što je u saglasnosti sa elucijom pri visokoj jonskoj sili ( $> 0,3 \text{ M}$ ) u jonoizmenjivačkoj hromatografiji (slika 5.3A). Izoforme ficina izolovane iz drugog kultivara smokve obeležne kao ficin B, C i D prepoznate su sa pokrivenošću sekvence u opsegu 12-20% (prilog 3).

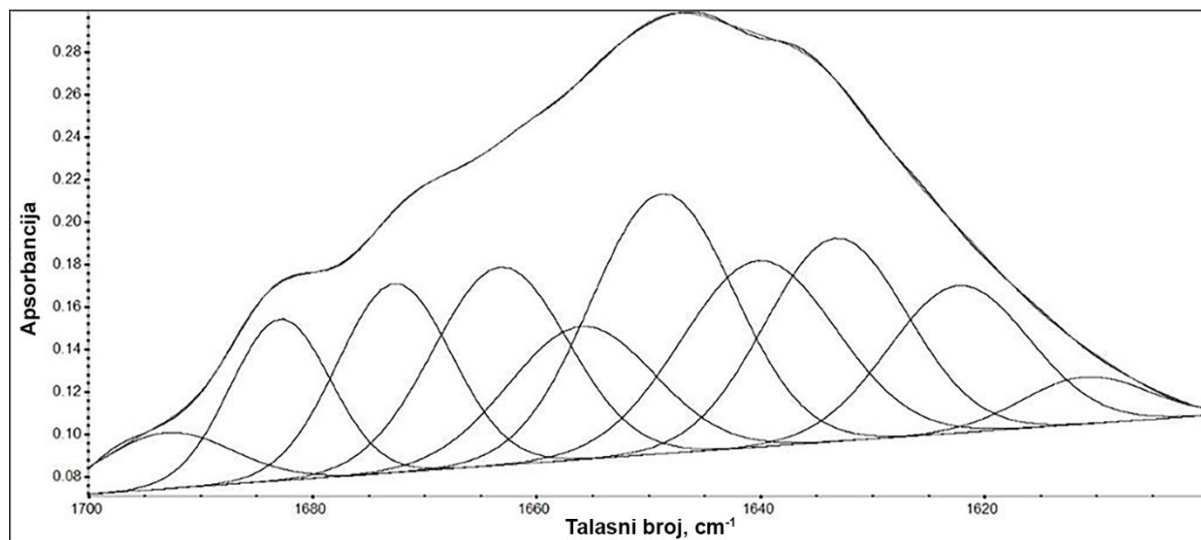


**Slika 5.4.** A) Reverzno-fazna hromatografija izoforme ficina izolovane jonoizmenjivačkom hromatografijom (pik V). Hromatografija je urađena na koloni Discovery BIO Wide Pore C5 dimenzija 10 cm x 4,6 mm na HPLC sistemu. Proteini su eluirani u 0-70% gradijentu acetonitrila u 25 mM rastvoru amonijum-acetata. B) SDS PAGE analiza frakcija ispod pikova u 12% gelu za razdvajanje (M – marker proteini poznatih molekulskih masa, 11,5, 12,5 i 13,5 – elucione zapremine uzoraka u mL).

#### 5.1.4. Ispitivanje strukture i stabilnosti ficina 1c

Identifikovana izoforma ficin 1c okarakterisana je u pogledu određivanja sadržaja sekundarnih struktura infracrvenom spektroskopijom i modelovanja trodimenzionalne strukture. Infracrveni spektar prečišćene izoforme je analiziran metodom dekonvolucije. Spektar ficina 1c u Amidnom

I regionu razložen na pojedinačne komponente prikazan je na slici 5.5. Trake su dodeljene sekundarnim strukturama prema literaturnim podacima za srodne proteine [37, 181-185], a dobijeni procenti sekundarnih struktura dati su u tabeli 5.2.

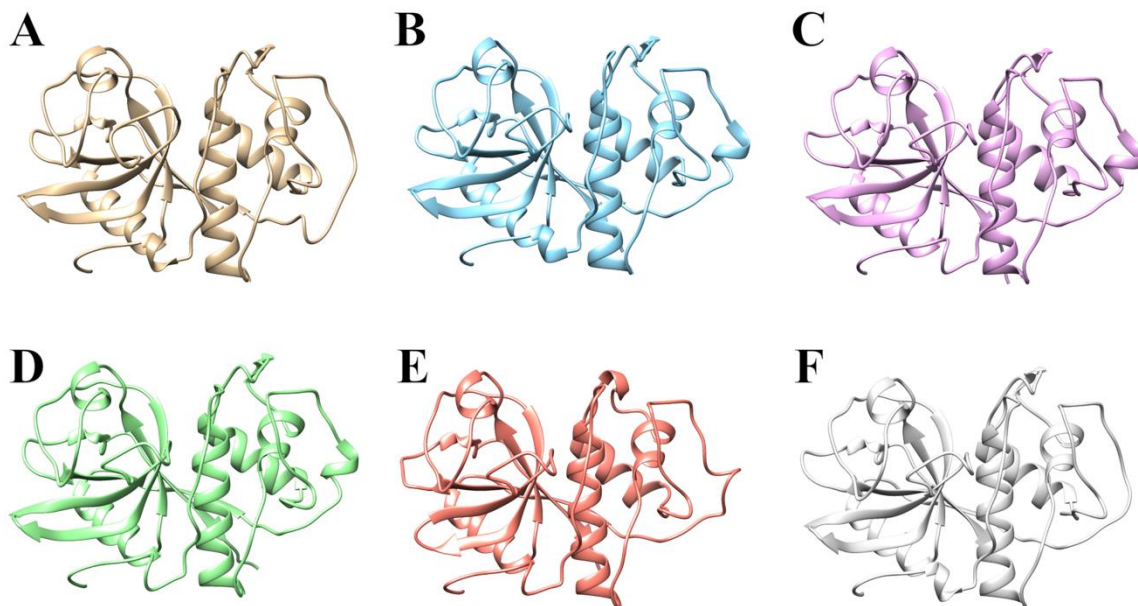


Slika 5.5. Originalni IR spektar i fitovani IR spektar ficina 1c dobijen iz razloženih pojedinačnih pikova.

Tabela 5.2. Sadržaj sekundarnih struktura ficina i srodnih cistein-proteaza.

Protein	Sadržaj sekundarnih struktura, %				
	$\beta$ -pločica	$\alpha$ -heliks	Zavijutak	Neuređeni niz	Greška/referenca
Smeša izoformi ficina	25,8	28,2	19,3	26,7	2,3
Ficin 1c	25,6	23,4	18,1	32,9	0,8
Ficin A	22-26	19-24	18-19	35-40	[159]
Ficini B-D	22-24	19-23	18	36-40	[159]
Papain	20	29	18	38	[159]
Karikain	20	26	15	42	[159]

Podaci iz tabele 5.2 pokazuju da se sadržaji  $\beta$ -pločice (25,6%) i  $\alpha$ -heliksa (23,4%) ficina 1c ne razlikuju u odnosu na sadržaj istih sekundarnih struktura ficina izolovanih iz *F. carica* varijetet *Chetoui* čije su tercijarne strukture poznate i čije su sekvence u velikoj meri podudarne s obzirom na veliku evolutivnu bliskost (prilozi 4 i 5). Celokupan sadržaj sekundarnih struktura ficina 1c je takođe sličan sadržaju sekundarnih struktura srodnih cistein-proteaza – papaina i karikaina.

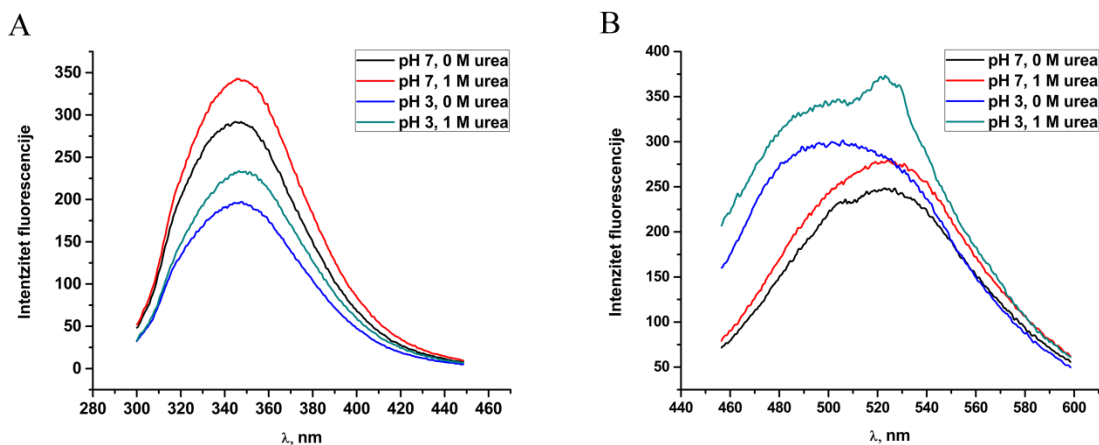


**Slika 5.6. 3D strukture A) ficina 1c (model); B) ficina D (PDB 4YYW); C) ficina C (PDB 4YYU); D) ficina B (PDB 4YYS); E) papain (PDB 1KHQ) i F) ficina A (PDB 4YYQ).**

Model 3D strukture zrelog ficina 1c formiran je korišćenjem servera Phyre 2.0. Svi korišćeni templati pokrivaju 99% sekvence ficina 1c. Informacije o biblioteci templata date su u tabeli u prilogu 4. Gotovo svi aminokiselinski ostaci (99%) modelovani su sa 100% pouzdanosti. Struktura ficina 1c modelovana sa dimenzijama:  $X = 52,538 \text{ \AA}$ ,  $Y = 60,697 \text{ \AA}$ ,  $Z = 42,676 \text{ \AA}$  prikazana je na slici 5.6A. Pored modelovane strukture ficina 1c prikazane su i tercijarne strukture ficina A-D, kao i papaina koji pokazuju visok stepen sekvencijalne homologije i evolutivne bliskosti (prilozi 5 i 6). Način uvijanja analiziranog proteina prepoznat je kao tipični način uvijanja za cistein-proteaze srodne papainu. Razlikuju se dva domena od kojih je jedan dominantno  $\alpha$ -helikoidni, a drugi je bogat  $\beta$ -pločicama. Uočena razlika između modelovane strukture ficina 1c i struktura ficina B, C i D je nedostatak kratkog heliksa u središnjem delu neuređenog regiona u  $\alpha$ -helikoidnom domenu. Isti heliks nedostaje u strukturi ficina A i papaina.

Ispitana je stabilnost ficina 1c u neutralnoj i kiseljoj sredini (pH 3) i u prisustvu haotropnog agensa – 1 M uree (slika 5.7). Promene uzrokovane prisustvom haotropna i sniženjem pH su praćene snimanjem emisionih spektara proteina (slika 5.7A) i emisionih spektara ANS (slika 5.7B) u prisustvu različito tretiranih uzoraka ficina 1c. Promena pH dovodi do pada intenziteta

emisije, dok prisustvo uree dovodi do povećanja intenziteta emisije bez obzira na pH vrednost. Oba destabilizujuća faktora, kisela sredina i prisustvo uree i nezavisno i u kombinaciji dovode do povećane izloženosti hidrofobnih površina što je uočeno porastom intenziteta ANS fluorescencije u svim uzorcima u odnosu na uzorak u neutralnoj sredini i bez uree.



Slika 5.7. A) Emisioni spektri ficina 1c i B) Emisioni spektri ANS u prisustvu ficina 1c na pH 7 i pH 3 bez uree i u prisustvu 1 M uree.

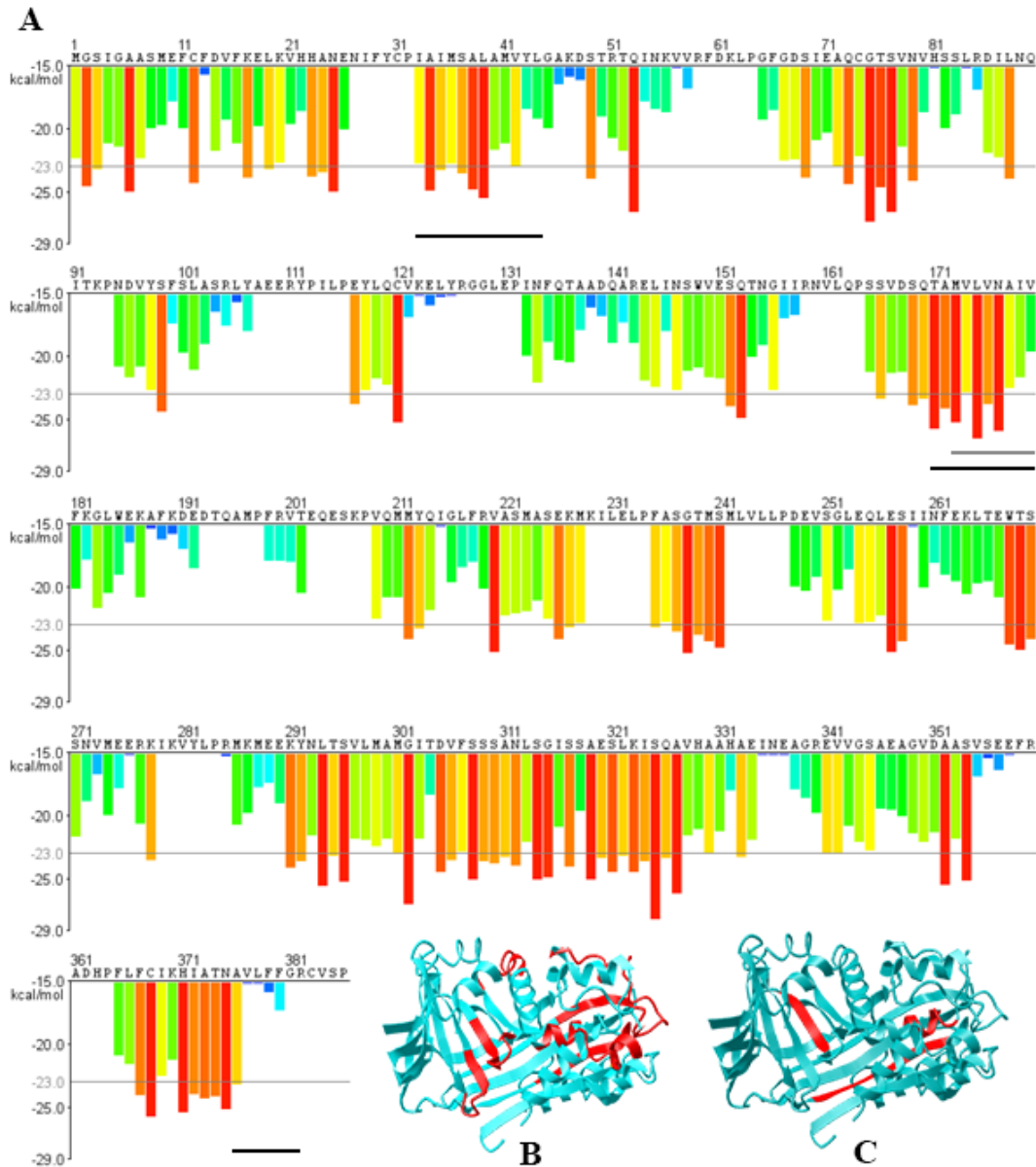
## **5.2. Formiranje i karakterizacija amiloidnih fibrila brzo fibrilirajućeg proteina – ovalbumina**

Za razvoj metodologije i procedura za detekciju i analizu agregacionih formi proteina, korišćeni su proteini kokošnjeg (*Gallus gallus*) jajeta – ovalbumin i lizozim kao model sistemi proteina koji grade amiloidne fibrile. Ovalbumin je korišćen kao model sistem brzo-fibrilirajućeg proteina.

### **5.2.1. Analiza amiloidogenih peptida ovalbumina**

Za predviđanje peptida u sekvenci ovalbumina pogodnih za građenje agregacionih  $\beta$ -pločica korišćeni su alati ZipperDB, TANGO i PASTA. Rezultati analize sekvence ovalbumina ZipperDB alatom dati su na slici 5.8A. Vrednosti energije za svaki aminokiselinski ostatak prikazane su grafički na y-osi pri čemu je tendencija za formiranje amiloidnih fibrila izražena i bojom (od najslabije – plave do najizraženije – crvene). Segmenti u kojima 6 ili više uzastopnih aminokiselinskih ostataka ima visoku tendenciju ka formiranju amiloidnih fibrila (energiju u strukturi amiloidne  $\beta$ -pločice nižu od praga koji iznosi -23 kcal/mol) označeni su na slici 5.8B crvenom bojom u okviru 3D strukture. Sa druge strane, peptidi ovalbumina koji su okarakterisani korišćenjem alata TANGO kao podložni formiranju agregacionih  $\beta$ -pločica u uslovima pH 2, 90°C i pri koncentraciji proteina 6 mg/mL obeleženi su crnom linijom na prikazu sekvence na slici 5.8A, dok su segmenti procenjeni kao pogodni za građenje agregata bogatih  $\beta$ -pločicama korišćenjem alata PASTA označeni sivom linijom.

Svaki od pomenutih alata prepoznao je peptid u regionu 173-181, niz u okviru veće antiparalelne  $\beta$ -pločice, kao sekvencu visokog potencijala za građenje okosnice amiloidne strukture. Tačna sekvenca ovog peptida, odnosno prvi i poslednji aminokiselinski ostatak koji ulaze u njegov sastav razlikuju se kod rezultata dobijenih različitim alatima. S druge strane, postoje regioni koji su prepoznati kao amiloidogeni samo jednom od metoda, kao što je slučaj sa sekvencom 304-326 prepoznatom samo korišćenjem alata ZipperDB ili sekvence između 376-381 prepoznatom alatom TANGO. Poređenja radi, na slici 5.8C prikazana je struktura ovalbumina sa crveno obeleženim eksperimentalno određenim amiloidogenim peptidima [8].

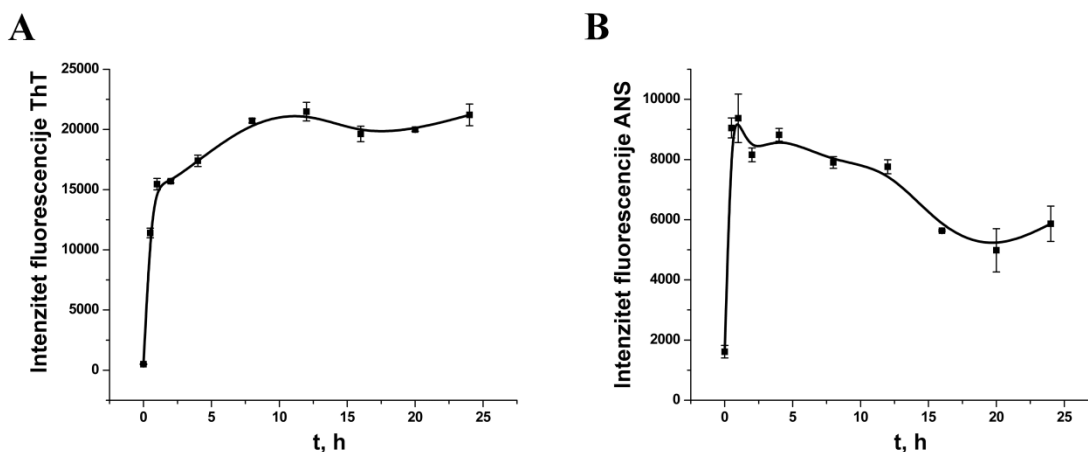


**Slika 5.1.** A) Energija fibrilacije aminokiselinskih ostataka ovalbumina predviđena ZipperDB alatom: crvenom bojom su obeleženi ostaci čija energija fibrilacije je niža od definisanog praga (-23 kcal/mol). Crnom linijom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom TANGO, a sivom peptidi predviđeni alatom PASTA. B) i C) Trodimenzionalna struktura ovalbumina, PDB kod 1JTI. Slika je kreirana korišćenjem programa iCn3D: Web-based 3D Structure Viewer – NCBI (Rokvil, SAD), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html>. Crvenom bojom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom ZipperDB (B) i eksperimentalno određeni peptidi iz literaturih podataka (C).



### 5.2.2. Formiranje amiloidnih fibrila ovalbumina

Za dobijanje amiloidnih fibrila, ovalbumin je inkubiran u koncentraciji 6 mg/mL u kiseloj sredini (pH 2) pri visokoj temperaturi (90°C) tokom 24 h. Proces fibrilacije praćen je merenjem fluorescencije boje ThT specifične za amiloidne forme i ANS koja ukazuje na izloženost hidrofobnih površina. Promena ThT fluorescencije (slika 5.9A) sa vremenom inkubiranja ima oblik hiperbole sa značajnim skokom fluorescencije u toku prvog sata, praćenim sporijim rastom sve to dostizanja platoa nakon 4 sata zagrevanja. Tokom 24 sata inkubiranja, ThT fluorescencija raste oko 20000 puta. ANS fluorescencija (slika 5.9B) pokazuje jednako intenzivan rast nakon prvog sata inkubiranja, ali suprotno od ThT fluorescencije, produženo inkubiranje dovodi do pada intenziteta fluorescencije uz dostizanje konstantne vrednosti nakon 16 sati zagrevanja ovalbumina.

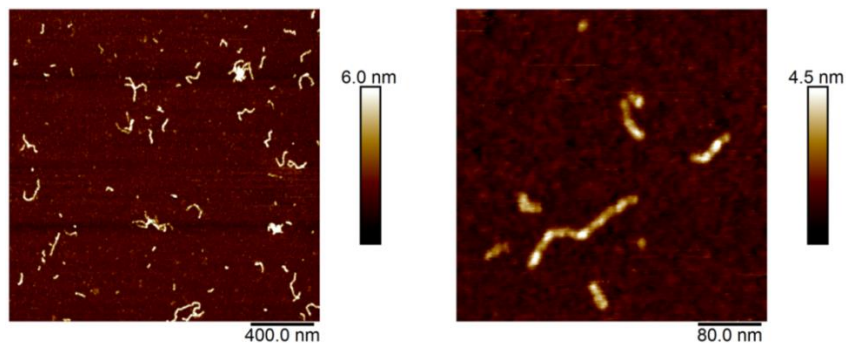


Slika 5.9. Praćenje formiranja amioda ovalbumina tokom 24 h u rastvoru HCl pH 2 na 90°C merenjem intenziteta fluorescencije A) ThT, B) ANS sa vremenom.

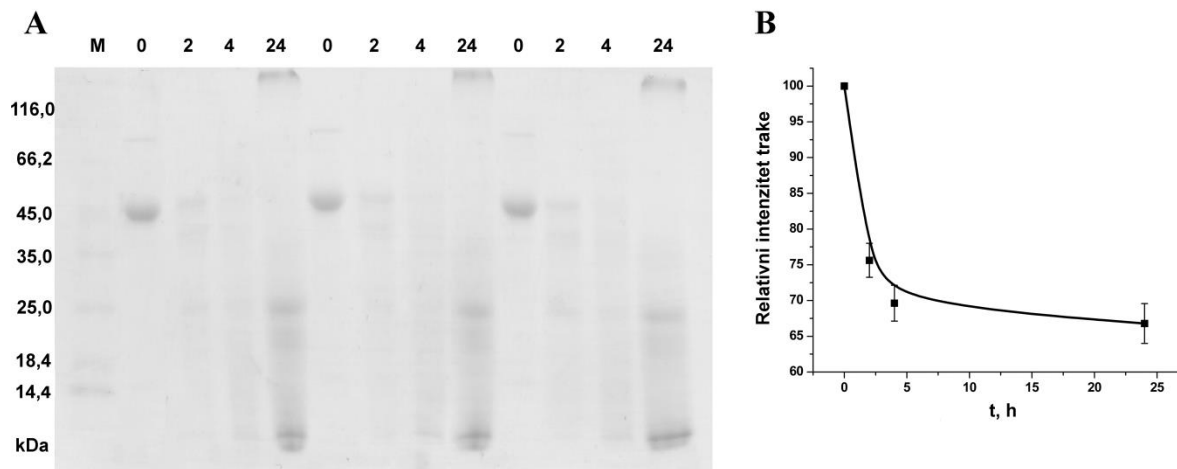
Za dalju potvrdu amiloidne forme agregata snimljena je mikroskopija atomskih sila uzoraka ovalbumina inkubiranih 24 sata na 90°C. Na mikroskopijama prikazanim na slici 5.10 uočavaju se zreli fibrili dijametra oko 10 nm i dužine u rasponu 50 do 200 nm.

Stabilnost agregata dodatno je ispitana SDS-PAG elektroforezom. Uzorci inkubirani različito vreme na povišenoj temperaturi i sniženoj pH vrednosti pripremani su u denaturišućem puferu uz zagrevanje na 95°C. Slika 5.11A pokazuje da se traka monomernog ovalbumina na 45 kDa

postepeno gubi, a da se pojavljuju fragmenti manjih molekulske mase. Nakon 2 sata inkubiranja traka monomernog ovalbumina je i dalje prisutna, ali sa daljim inkubiranjem potpuno nestaje uz pojavljivanje trake na samoj granici između gelova za razdvajanje i koncentrovanje koja ukazuje na stabilne agregate rezistentne na SDS i  $\beta$ -merkaptoetanol na 95°C. Paralelno sa pojavom intenzivne trake agregata na granici gelova, detektuju se i trake manje molekulske mase od mase nativnog ovalbumina koje ukazuju na fragmentaciju proteina.



**Slika 5.10.** Mikroskopija atomskih sila uzorka ovalbumina inkubiranog 24 h na pH 2 i 90°C.



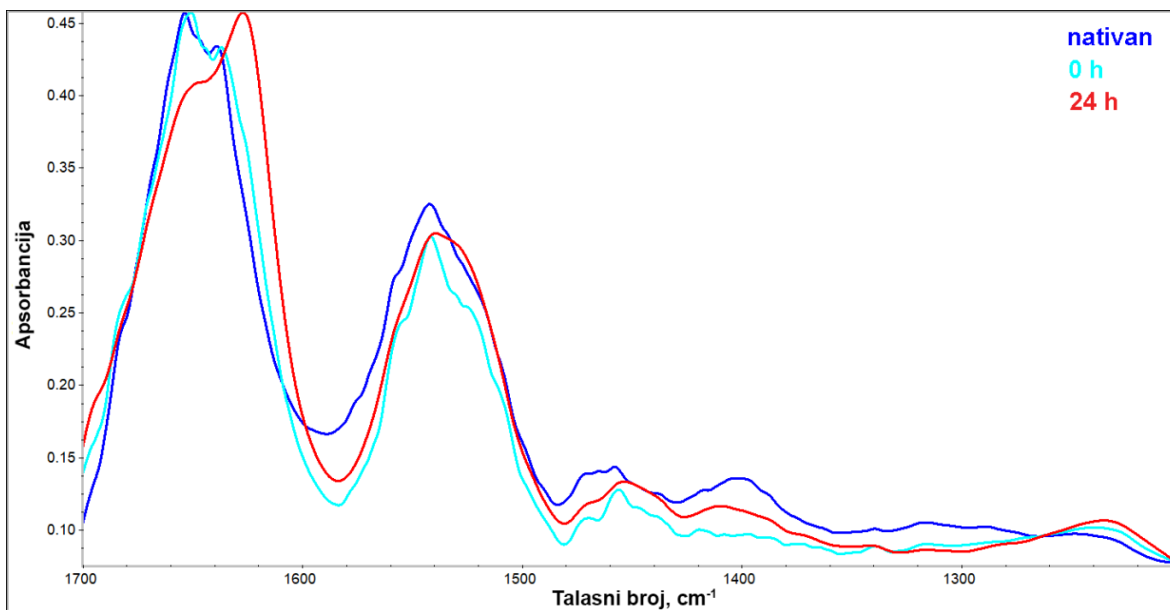
**Slika 5.11.** SDS-PAGE uzoraka ovalbumina inkubiranih na pH 2 i 90°C: A) Elektroforegram (M – molekularni markeri poznatih masa, 0-24 vreme inkubiranja); B) Densitometrijska analiza trake nativnog ovalbumina (45 kDa) na osnovu triplikata elektroforetskih uzoraka.

Densitometrijskom analizom u programu GelAnalyzer 19.1 praćen je intenzitet trake nativnog ovalbumina (slika 5.11B) i utvrđeno je da se sa vremenom ova traka gubi i da kriva pokazuje

oblik parabole koja odgovara trendu promene ThT fluorescencije s obzirom na najveći intenzitet promene u prvom satu inkubiranja i postepeno postizanje platoa do kraja inkubacionog perioda od 24 h.

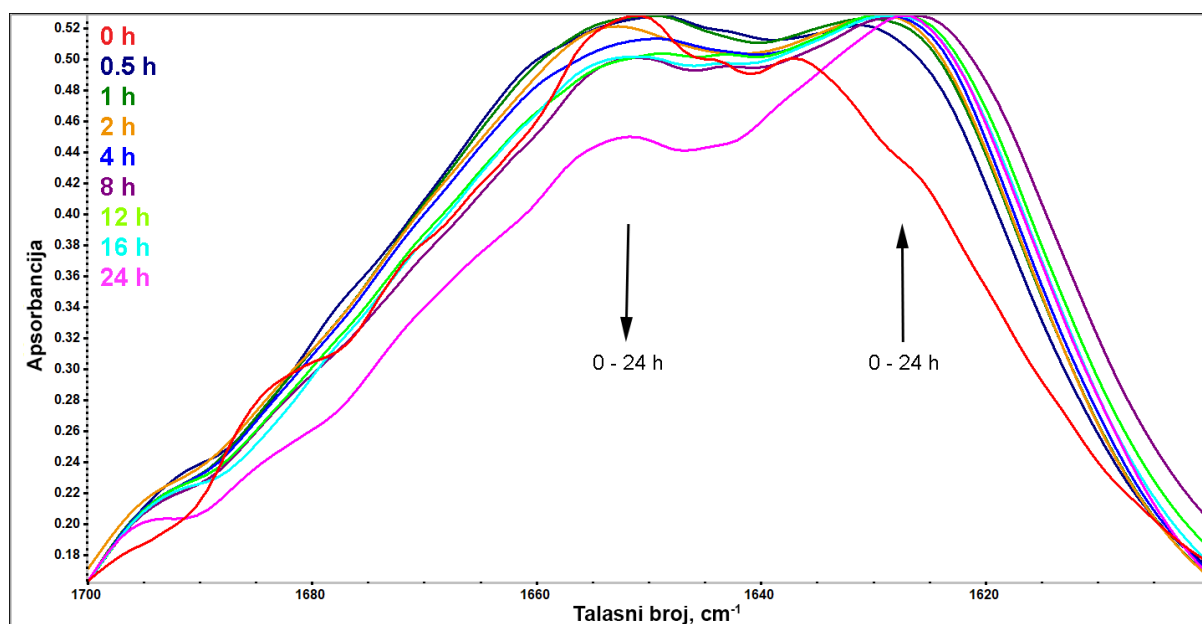
### 5.2.3. Kvalitativna analiza fibrilacije ovalbumina ATR-FTIR metodom – Amidni I region

Za detaljnu analizu strukturnih promena na putu fibrilacije ovalbumina primenjena je ATR-FTIR metoda. Spektri ovalbumina snimani su nakon različitog vremena inkubiranja u destabilizujućim uslovima. Analizirani su Amidni I, Amidni II i Amidni III region koji su zajedno prikazani na slici 5.12. Celokupni region od 1200 do 1700  $\text{cm}^{-1}$  prikazan je za uzorak ovalbumina u dejonizovanoj vodi pH 7, početni uzorak ovalbumina u rastvoru HCl pH 2 i uzorak ovalbumina inkubiran 24 časa na 90°C u rastvoru pH 2. Uočava se da ne postoje značajne razlike u obliku spektra ovalbumina u neutralnoj i kiseljoj sredini ni u jednom od amidnih regiona. Sa druge strane, zagrevanjem ovalbumina na 90°C dolazi do značajnih promena u celokupnom spektru. Globalna tendencija ovih promena može se okarakterisati porastom intenziteta u regionima nižih talasnih brojeva, sa posebno izraženim trakama na rubnim oblasnima Amidnog I i Amidnog III regiona. Radi detaljnijeg uvida u promene koje se dešavaju, analizirani su pojedinačni amidni regioni.



Slika 5.12. Amidni regioni ovalbumina u rastvoru pH 7 (nativan), u rastvoru pH 2 pre inkubiranja na 90°C (0 h) i nakon 24 sata inkubiranja na ovoj temperaturi (24 h).

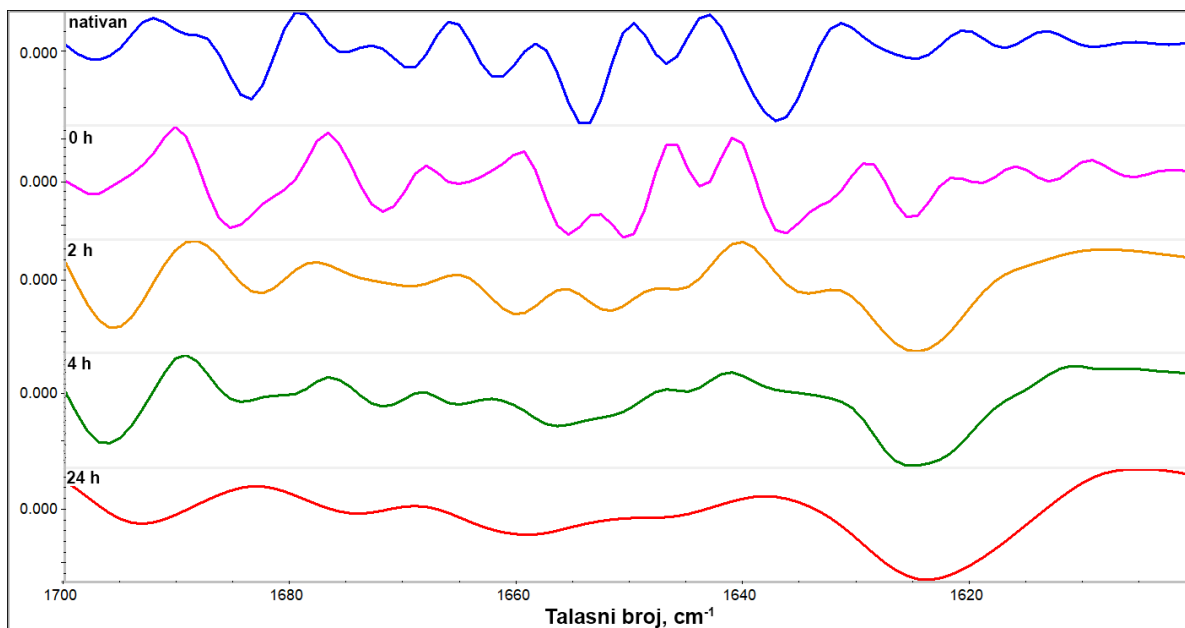
Amidni I region ( $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) spektara ovalbumina inkubiranog 0-24 h u kiseljoj sredini i na povišenoj temperaturi prikazan je na slici 5.13. Sa produženim vremenom inkubiranja u destabilizujućim uslovima, izgled spektara se značajno menja u ovom regionu. Najizraženije promene su postepen pad apsorbanције u regionu  $1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$  u kom se nalaze trake  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza [186], kao i porast apsorbancije u regionu  $1610\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  u kom se nalazi traka agregacione  $\beta$ -pločice [61]. Uočava se preklapanje spektara između 0,5 i 2 h inkubiranja, praćeno izraženijim promenama nakon 4 h i ponovnim preklapanjem spektara u periodu 8-20 h. Finalno, nakon 24 h izdvaja se spektar u velikoj meri izmenjen u odnosu na prethodne. U cilju preciznog utvrđivanja tačnih talasnih brojeva na kojima se uočavaju promene spektara, generisani su drugi izvodi svakog od spektara u Amidnom I regionu.



**Slika 5.13. Amidni I region uzoraka ovalbumina inkubiranih 0-24 h na pH 2 i  $90^{\circ}\text{C}$ .**

Derivatizacija je rađena sa Savicki-Golej filterom čime su dobijeni drugi izvodi u 7 tačaka trećeg polinomskog reda. Ovom operacijom omogućeno je lakše utvrđivanje položaja traka kao lokalnih minimuma drugih izvoda kao što je prikazano na slici 5.14. U početnom uzorku ovalbumina pre zagrevanja izraženi su minimuni na pozicijama:  $1636\text{ cm}^{-1}$  (intramolekulska  $\beta$ -pločica [186, 187]),  $1646\text{ cm}^{-1}$  (neuređeni niz [186]),  $1653\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -heliks [186]),  $1662\text{-}1675\text{ cm}^{-1}$  (neuređene strukture [188]) i  $1682\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -zavijutak [189]). Pored ovih izraženih minimuma, detektuju se i slabiji minimuni na oko  $1625$  i  $1695\text{ cm}^{-1}$  koji potiču od agregacionih

intermolekulskih  $\beta$ -pločica [95, 111, 122, 136] kao i slabo izražen minimum na  $1611\text{ cm}^{-1}$  koji je identifikovan kao pik poreklom od bočnih nizova [111]. U uzorcima inkubiranim na povišenoj temperaturi uočava se postepen gubitak trake  $\alpha$ -heliksa na  $1653\text{ cm}^{-1}$ , da bi nakon 24 h gotovo potpuno izostala. Gubitak ovog minimuma tokom prvih 4 sata inkubiranja praćen je povećanjem minimuma u bliskoj oblasti – na oko  $1662$  i  $1646\text{ cm}^{-1}$  koji odgovaraju neuređenim strukturama [186], kao i u manjoj meri pojavom minimuma na  $1625$  i  $1695\text{ cm}^{-1}$  koji predstavljaju agregacione  $\beta$ -pločice. Već nakon 30 minuta na povišenoj temperaturi uočljivi su ovi minimumi koji se dodatno produbljuju sa produženim inkubiranjem i to na račun trake na  $1653\text{ cm}^{-1}$  koja postepeno nestaje. Kao rezultat, drugi izvod finalnog uzorka ovalbumina inkubiranog 24 sata u ovim uslovima sadrži samo dva izražena minimuma na pozicijama karakterističnim za agregacione  $\beta$ -pločice. Samim tim, poređenje drugih izvoda pruža nedvosmisleno kvalitativnu potvrdu promena u izgledu proteinskog spektra. Za delimičnu kvantitativnu potvrdu razlika između spektara, određeni su korelacioni koeficijenti kojima je poređen drugi izvod potpuno nativnog uzorka ovalbumina na pH 7 sa drugim izvodima uzorka na pH 2 na početku inkubacionog perioda (0 h), kao i uzoraka inkubiranih 4 h, 16 h i 24 h na povišenoj temperaturi. Rezultati su prikazani u Tabli 5.1.



**Slika 5.14. Drugi izvod Amidnog I regiona uzoraka ovalbumina inkubiranih 0-24 h na pH 2 i  $90^{\circ}\text{C}$  i nativnog uzorka u vodi pH 7.**

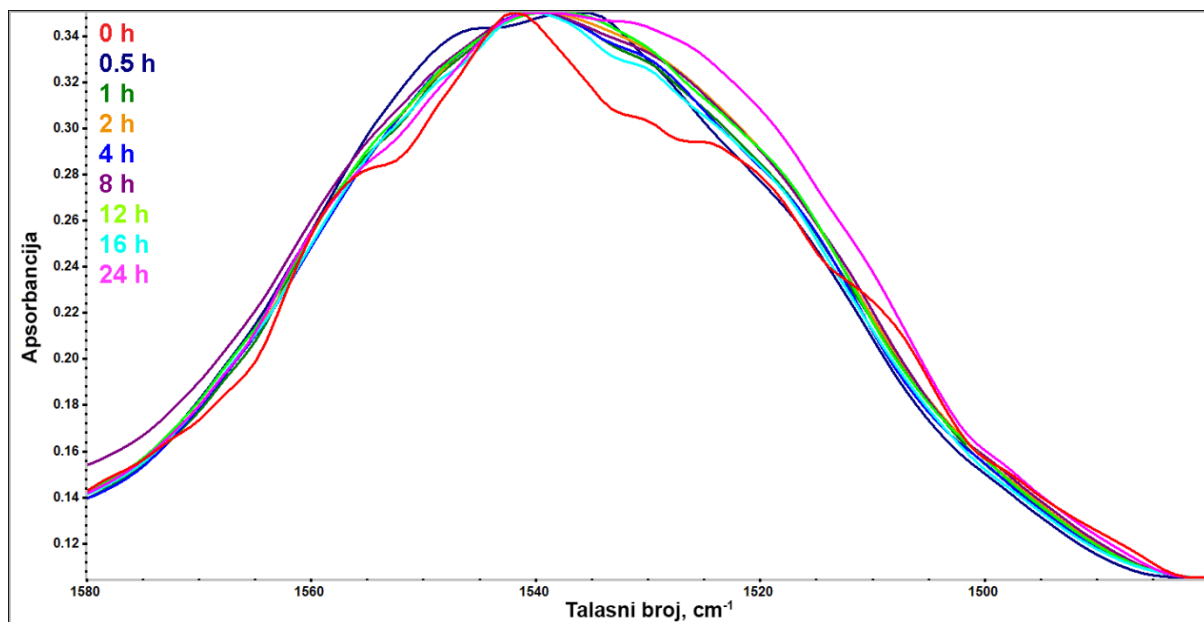
Korelacioni koeficijenti prikazani u tabeli 5.1 ukazuju na veliku promenu u sadržaju sekundarnih struktura indukovanu drastičnim uslovima sredine u kojima je ovalbumin inkubiran. Sama promena pH vrednosti dovodi do velikih promena u Amidnom I regionu spektra koje se mnogo bolje uočavaju poređenjem drugih izvoda (koeficijent korelacije 0,49). Dodatni stres indukovani zagrevanjem na 90°C dalje doprinosi dramatičnoj promeni u FTIR spektru već tokom prvih dva sata. Dalje promene u periodu 2-24 sata, utvrđene poređenjem drugih izvoda, nisu u toj meri izražene (korelacioni koeficijenti 0,17-0,13).

**Tabela 5.3. Koeficijenti korelacije između drugog izvoda nativnog ovalbumina pH 7 i uzoraka inkubiranih 0-24 h na pH 2 i 90°C.**

Vreme inkubiranja na pH 2 i 90°C	Korelacioni koeficijent
0 h	0,49
2 h	0,17
4 h	0,17
24 h	0,13

#### **5.2.4. Kvalitativna analiza fibrilacije ovalbumina ATR-FTIR metodom – Amidni II region**

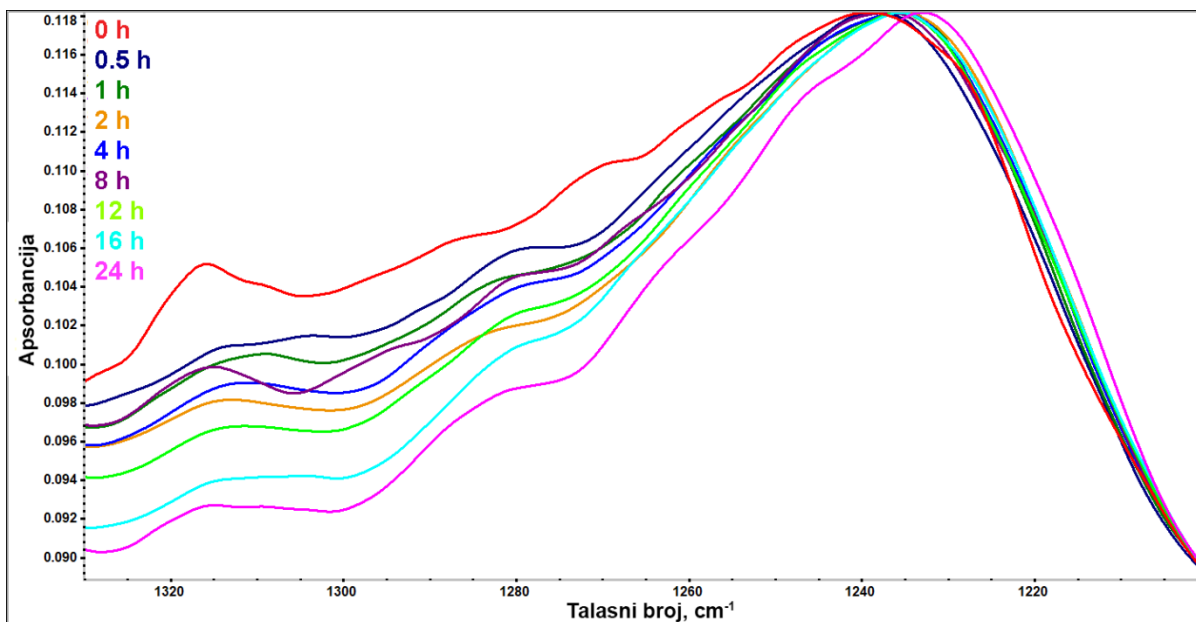
Analizom Amidnog II regiona ( $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ ) uočene su daleko manje razlike između spektara različitih uzoraka (slika 5.15). Svi spektri uzoraka ovalbumina inkubiranih različito vreme na povišenoj temperaturi imaju isti položaj maksimuma na oko  $1535-1540\text{ cm}^{-1}$ . Početni, nezagrevan uzorak se odlikuje nešto manjom površinom u odnosu na zagrevane uzorke, ali dalje razlike između uzoraka inkubiranih različito vreme nisu uočljive.



Slika 5.15. Amidni II region uzoraka ovalbumina inkubiranih 0-24 h na pH 2 i 90°C.

### 5.2.5. Kvalitativna analiza fibrilacije ovalbumina ATR-FTIR metodom – Amidni III region

Amidni III region (1200-1350 cm<sup>-1</sup>) ovalbumina u kiseljoj sredini se značajno menja sa vremenom inkubiranja na 90°C (slika 5.16). Ukupne vrednosti apsorbancije su značajno niže nego u Amidnom I regionu što ukazuje na nižu osetljivost, ali pri koncentraciji ovalbumina 6 mg/mL postepeni pad trake na 1320 cm<sup>-1</sup> koja se pripisuje  $\alpha$ -heliksu [190] je veoma izražen i stepen ovog pada korelira sa vremenom inkubiranja. Pored trake  $\alpha$ -heliksa uočljiva je traka  $\beta$ -zavijutka u regionu 1270-1285 cm<sup>-1</sup>, čiji je položaj u skladu sa literaturnim podacima, kao i dominantna traka koja odgovara  $\beta$ -pločici koja se prema literaturnim podacima nalazi u regionu 1220-1240 cm<sup>-1</sup> [191]. U slučaju ovalbuminskih spektara prikazanih na slici 5.16, položaj ove trake se pomera ka nižim talasnim brojevima sa vremenom inkubiranja, od početnih 1235 cm<sup>-1</sup> na 1230 cm<sup>-1</sup> kod uzorka inkubiranog 24 sata. Ove promene su u skladu sa promenama koje su uočene u Amidnom I regionu.



Slika 5.16. Amidni III region uzoraka ovalbumina inkubiranih 0-24 h na pH 2 i 90°C.

### 5.2.6. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara ovalbumina: dekonvolucija Amidnog I regiona

ATR-FTIR metoda je ispitana u pogledu mogućnosti kvantitativnog praćenja formiranja amiloidnih fibrila ovalbumina. Strukturne promene koje se dešavaju na putu amiloidnog agregiranja ispitivane su kvantitativnom analizom Amidnog I regiona FTIR spektara. Metodom dekonvolucije je određen sadržaj sekundarnih struktura uzoraka inkubiranih 0, 2, 4 i 24 h u uslovima pH 2 i 90°C, kao i uzorka ovalbumina u vodi (pH 7). Amidni I region spektara je razložen na pojedinačne konstituente tako da se njihov zbir u najvećoj mogućoj meri preklapa sa originalnim spektrom (originalni i fitovani spektri prikazani u prilogu 8). Dobijeni pikovi su dodeljeni sekundarnim strukturama na osnovu literaturnih podataka za ovalbumin ili srodne proteine. Pozicije maksimuma pikova i njihove relativne površine izvedeni su iz dekonvolucije i prikazani u tabeli 5.4. Na osnovu prikazanih podataka uočava se da pored promene površine ispod pojedinačnih pikova, odnosno udela sekundarnih struktura, dolazi i do malih promena u njihovom položaju. Agregaciona  $\beta$ -pločica detektovana je pod pikovima čiji se maksimumi nalaze u rasponu 1624 do 1626  $\text{cm}^{-1}$ , kao i na višoj frekvenciji sa talasnim brojem u opsegu 1693 do 1696  $\text{cm}^{-1}$ . Za razliku od intermolekulske agregacione  $\beta$ -pločice, intramolekulska  $\beta$ -pločica detektovana je u užem opsegu između talasnih brojeva 1636-1638  $\text{cm}^{-1}$ . Pozicija  $\alpha$ -heliksa



detektovana je u opsegu 1656-1658  $\text{cm}^{-1}$ . Od neuređenih struktura razlikuju se neuređeni niz sa karakterističnim apsorpcionim maksimumom između 1646 i 1648  $\text{cm}^{-1}$  i neuređeni heliks na 1668-1671  $\text{cm}^{-1}$ . Zavijutak je detektovan na pozicijama 1679-1685  $\text{cm}^{-1}$ . Procentualno izražena površina ispod pomenutih pikova u odnosu na sumu površina svih pikova ukazuje na zastupljenost date sekundarne strukture. S obzirom na pojavu više traka koje odgovaraju jednoj sekundarnoj strukturi u tabeli 5.5 je dat pregledan sadržaj sekundarnih struktura u istim uzorcima, kao i sadržaj sekundarnih struktura nativnog ovalbumina određen iz tercijarne strukture dobijene difrakcijom X-zraka<sup>7</sup>. Sadržaj sekundarnih struktura u neutralnim uslovima je uporediv sa vrednostima izvedenim iz kristalne strukture [192]. Ukupni sadržaj  $\beta$ -pločice dobijen metodom dekonvolucije iznosi 36%, dok je procenat dobijen iz kristalne strukture 37,9%. Procenti  $\alpha$ -heliksa i zavijutka se takođe dobro poklapaju (26% i 26,3%, 7% i 7,7%), kao i ukupni procenat neuređenih struktura (31% i 28,1%).

**Tabela 5.4. Dodeljivanje traka ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) u Amidnom I regionu sekundarnim strukturama i relativna površina (P, %) ispod pojedinačnih pikova u odnosu na ukupnu površinu Amidnog I regiona za spektre nativnog ovalbumina i spektre ovalbumina u rastvoru HCl pH 2 zagrevane na 90 °C 0, 2, 4 ili 24 sata.**

nativan ova		0 h		2 h		4 h		24 h		dodeljivanje traka	
$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	P, %	$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	P, %	$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	P, %	$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	P, %	$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	P, %	sekundarna struktura	Ref.
1626	11,7	1626	17,1	1626	22,8	1624	25,0	1625	30,2	agregaciona	[95, 111, 122, 136]
1638	22,2	1637	19,3	1637	17,2	1636	14,6	1637	16,5	$\beta$ -pločica	[186, 187]
1648	12,2	1647	15,8	1648	13,8	1646	13,9	1647	12,9	neuređeni niz	[186]
1658	26,9	1657	21,5	1658	20,2	1657	19,5	1656	16,1	$\alpha$ -heliks	[186]
1671	19,1	1669	15,1	1671	16,5	1670	15,8	1668	12,0	neuređeni heliks	[188]
1685	6,8	1681	9,1	1683	5,5	1683	7,7	1679	7,0	Zavijutak	[186]
1696	2,1	1691	2,1	1694	4,0	1696	3,5	1693	5,3	agregaciona	[95, 111, 122, 136]

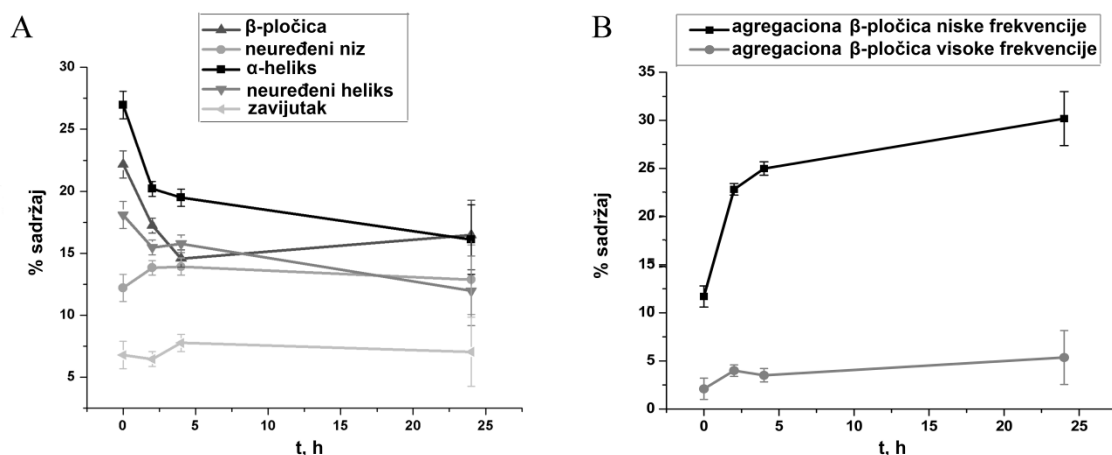
Grafički prikaz sadržaja sekundarnih struktura (slika 5.17) pokazuje da se među sekundarnim strukturama karakterističnim za nativni ovalbumin, najveći pad u procesu fibrilacije uočava kod  $\alpha$ -heliksa i intramolekulske  $\beta$ -pločice, koje su ujedno i najzastupljenije sekundarne strukture nativnog ovalbumina (slika 5.17A). Od neuređenih struktura, značajan pad je uočen samo u sadržaju neuređenog heliksa. Apsorbancija tokom inkubiranja raste u regionu traka agregacione  $\beta$ -pločice visoke i niske frekvencije (slika 5.17B). Porast sadržaja agregacione  $\beta$ -pločice sa

<sup>7</sup> UniProt ulaz UniProtKB - P01012 (OVAL\_CHICK)

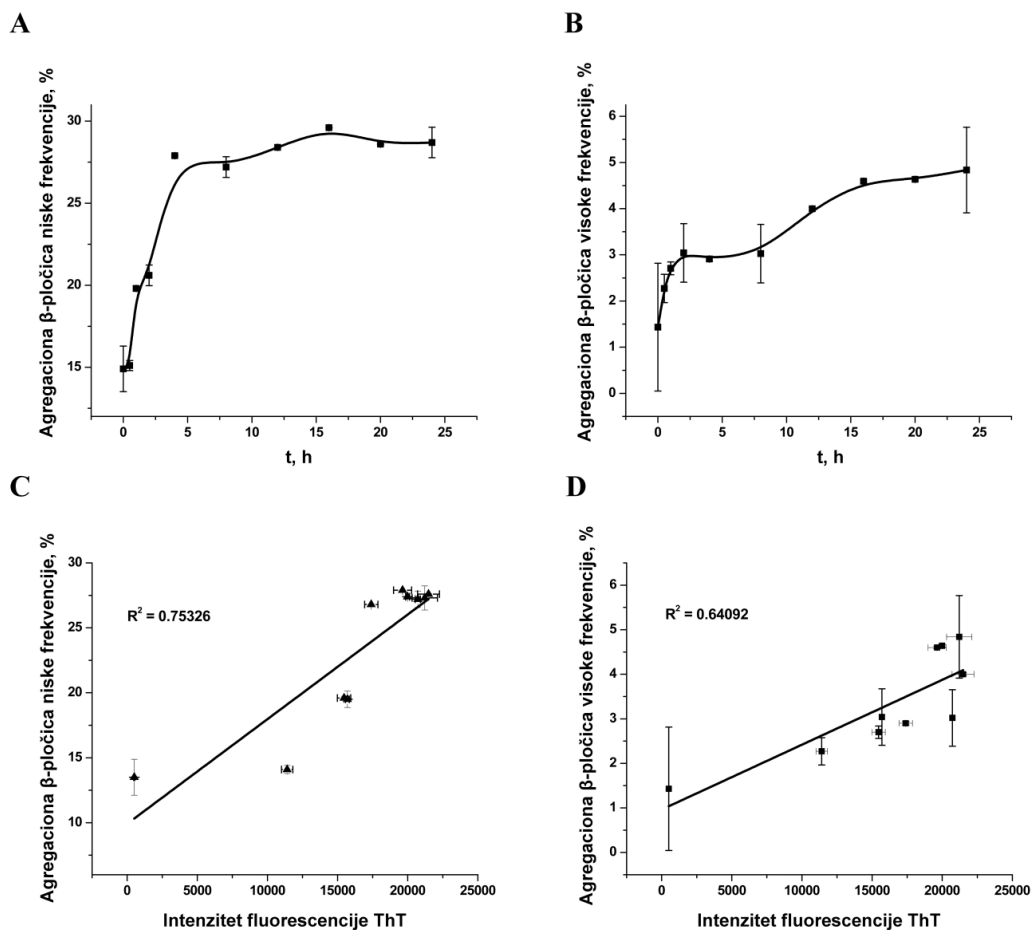
vremenom inkubiranja ima oblik hiperbole koji asocira na promenu intenziteta ThT fluorescencije. Ovi rezultati pokazali su da je metoda praćenja sadržaja agregacione  $\beta$ -pločice potencijalno pogodna metoda za kvantitativno praćenje formiranja amiloidnih fibrila. Za proveru ove hipoteze, ispitana je korelacija ove metode sa standardnom metodom za praćenje formiranja fibrila – intenzitetom ThT fluorescencije u istim uzorcima.

**Tabela 5.5. Sadržaj sekundarnih struktura nativnog i tretiranog ovalbumina određen metodom dekonvolucije Amidnog I regiona i difrakcijom X-zraka nativnog ovalbumina.**

uzorak ovalbumina	$\beta$ -pločica	agregaciona $\beta$ -pločica	$\alpha$ -heliks	neuređeni niz + zavijutak	greška
<b>pH 7</b>	22,2	13,8	26,9	37,0	2,7
<b>0 h, pH 2, 90°C</b>	19,3	19,2	21,5	40,0	1,1
<b>2 h, pH 2, 90°C</b>	17,2	26,8	20,2	35,8	1,2
<b>4 h, pH 2, 90°C</b>	14,6	28,5	19,5	37,4	0,7
<b>24 h, pH 2, 90°C</b>	16,5	35,5	16,1	31,9	2,8
<b>difrakcija X-zraka</b>	37,9	/	26,3	35,8	/



**Slika 5.17. Promena sadržaja sekundarnih struktura tokom inkubiranja ovalbumina u kiseloj sredini i na visokoj temperaturi: A) procenat sekundarnih struktura karakterističnih za nativni ovalbumin, B) procenat agregacionih  $\beta$ -pločica.**



**Slika 5.18.** Promena u sadržaju agregacione β-pločice tokom inkubacionog perioda na pH 2 i 90°C dobijena dekonvolucijom trake na A) niskoj frekvenciji (1625 cm<sup>-1</sup>) i B) visokoj frekvenciji (1695 cm<sup>-1</sup>). Korelacija između intenziteta ThT fluorescencije i sadržaja agregacione β-pločice C) niske frekvencije (1625 cm<sup>-1</sup>) i D) visoke frekvencije (1695 cm<sup>-1</sup>).

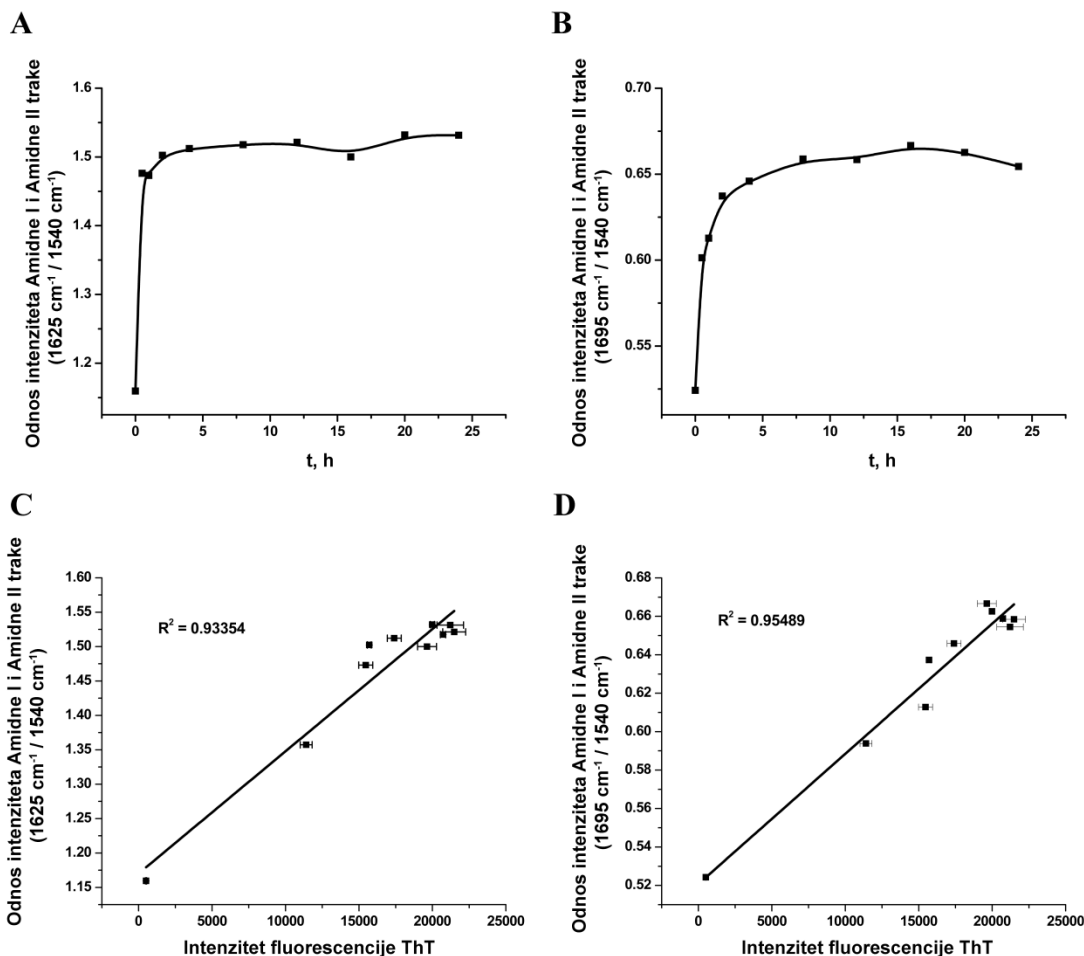
Za detaljnije ispitivanje potencijala za kvantitativno praćenje procesa fibrilacije određivanjem sadržaja agregacione β-pločice, dekonvolucija je primenjena na većem broju uzoraka tokom perioda inkubiranja (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 20, 24 h). Za sve uzorke ovalbumina određen je samo sadržaj agregacionih β-pločica i prikazan u zavisnosti od vremena inkubiranja (slike 5.18A i 5.18B). Obe krive imaju oblik hiperbole koja je u većoj meri pravilna kod praćenja trake agregacione β-pločice niske frekvencije s obzirom na manje ukupne greške kao posledica viših vrednosti apsorbcancije. Delimična korelacija između rezultata dekonvolucije i intenziteta ThT fluorescencije postoji i kod praćenja agregacione β-pločice na višoj i na nižoj vrednosti talasnog

broja (slike 5.18C i 5.18D), ali vrednosti korelacionog koeficijenta nisu naročito visoke (0,75 i 0,64). Ovakvi rezultati analize metode ukazuju da ATR-FTIR ima visok potencijal za kvantitativno praćenje formiranja amiloida, ali dekonvolucija nije u potpunoj korelaciji sa metodom ThT fluorescencije koja se smatra zlatnim standardom u ovoj oblasti.

### **5.2.7. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara ovalbumina: odnos intenziteta Amidnog I i Amidnog II regiona**

Iako korisna u određivanju sadržaja sekundarnih struktura, dekonvolucija se nije pokazala kao pogodna metoda za kvantitativno praćenje formiranja fibrila s obzirom na slabu korelaciju sa fluorescencijom ThT. Iz tog razloga primenjena je druga metoda za praćenje promena u spektrima tokom fibrilacije koja se takođe zasniva na praćenju porasta agregacione  $\beta$ -pločice visoke i niske frekvencije. Kako bi mogla da se poredi tendencija zauzimanja sekundarne strukture poređenjem apsorbancije na određenoj vrednosti talasnog broja, neophodna je normalizacija ove apsorbancije korišćenjem internog standarda. Kao interni standard odabrana je traka u Amidnom II regionu koja odgovara maksimumu apsorpcije i nalazi se na  $1540\text{ cm}^{-1}$ . Ova traka je odabrana za normalizaciju nakon što je utvrđeno da se ne menja usled denaturacije i fibrilacije (slika 5.15). Izračunat je odnos intenziteta traka u Amidnom I regionu koje odgovaraju agregacionoj  $\beta$ -pločici ( $1625$  i  $1695\text{ cm}^{-1}$ ) sa intenzitetom trake na  $1540\text{ cm}^{-1}$ . Normalizovane vrednosti su prikazane grafički u zavisnosti od vremena inkubiranja ovalbumina u uslovima niske pH i visoke temperature (slike 5.19A i 5.19B). Kao i prethodno analizirane krive porasta ThT i ANS fluorescencije i praćenje gubitka trake nativnog ovalbumina SDS PAGE metodom, uočava se da je kritičan korak u formiranju amiloida tokom prvog sata inkubiranja na  $90^\circ\text{C}$  dok je do dvadesetčetvrtog sata inkubiranja dostignut plato. Kako se ovaj trend poklapa sa porastom ThT fluorescencije (slika 5.9A), jednostavna metoda praćenja odnosa Amidne I i Amidne II trake ima potencijal da bude adekvatna kvantitativna metoda za praćenje formiranja amiloida. Za potvrdu relevantnosti ove analitičke metode, ispitana je korelacija vrednosti intenziteta ThT fluorescencije za svaki od uzoraka sa normalizovanim intenzitetima traka koje odgovaraju agregacionim  $\beta$ -pločicama (slike 5.19C i 5.19D). Korelacioni koeficijenti koji iznose 0,934 za praćenje agregacione  $\beta$ -pločice niske frekvencije i 0,955 za praćenje agregacione  $\beta$ -pločice visoke frekvencije ukazuju na odlično poklapanje trendova praćenih obema metodama, što

analizu normalizovanih traka u Amidnom I regionu čini pogodnom metodom za kvantitativno praćenje formiranja zrelih amiloidnih fibrila.



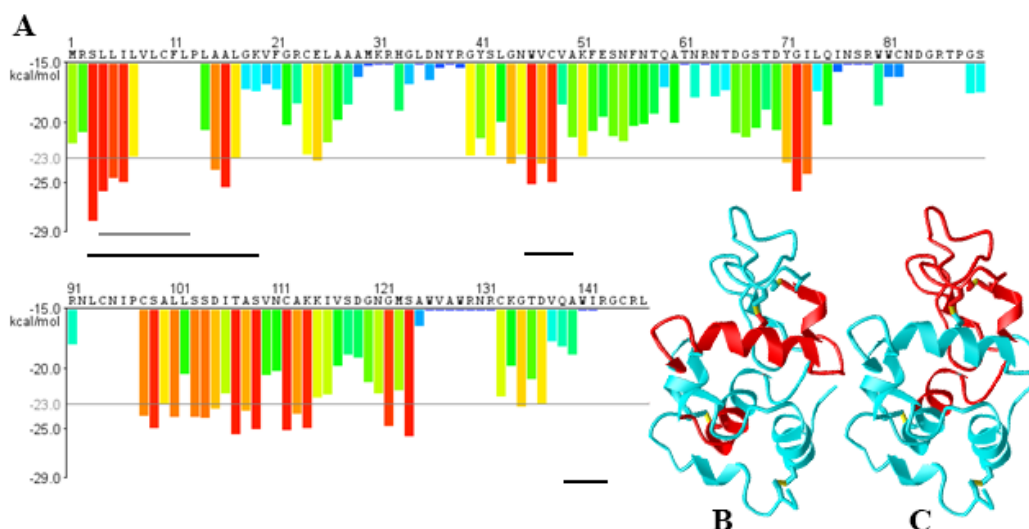
**Slika 5.19.** Promena u normalizovanom intenzitetu traka agregacione  $\beta$ -pločice zasnovanom na odnosu intenziteta karakteristične Amidne I trake i Amidne II trake tokom inkubiranja ovalbumina na niskoj pH i povišenoj temperaturi: A) odnos intenziteta  $1625\text{ cm}^{-1} / 1540\text{ cm}^{-1}$ , B) odnos intenziteta  $1695\text{ cm}^{-1} / 1540\text{ cm}^{-1}$ . Korelacija između intenziteta ThT fluorescencije i normalizovanog intenziteta trake agregacione  $\beta$ -pločice C) niske frekvencije ( $1625\text{ cm}^{-1}$ ) i D) visoke frekvencije ( $1695\text{ cm}^{-1}$ ).

### 5.3. Formiranje i karakterizacija oligomera sporo fibrilirajućeg proteina – lizozima

Za razliku od ovalbumina, lizozim je kao model sporo fibrilirajućeg proteina korišćen za analizu strukturnih promena u ranim fazama fibrilacije i razvoj metodologije za detekciju ranih intermedijera amiloidnog agregiranja.

#### 5.3.1. Analiza amiloidogenih peptida lizozima

Sekvenca lizozima analizirana je korišćenjem alata ZipperDB, TANGO i PASTA. Detektovani su potencijalno amiloidogeni peptidi prikazani na slici 5.20A. Sva tri alata prepoznaju u N-terminalnom regionu peptid visoke tendencije za građenje amilodinih fibrila. Pored ovog peptida, istaknut je i kraći peptid između 44. i 51. ostatka prepoznat i ZipperDB i TANGO metodom, kao i dugački segment 98-124 koji je prepoznat jedino korišćenjem alata ZipperDB.

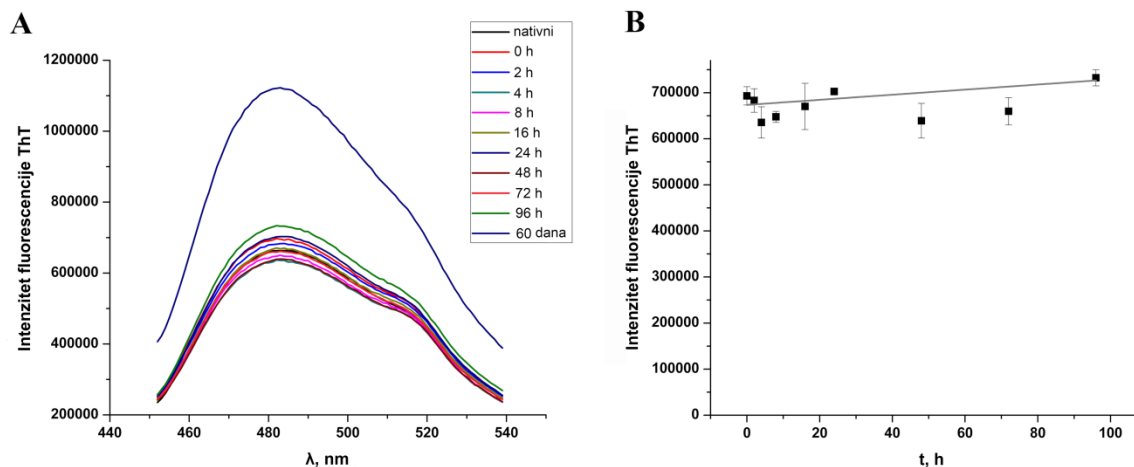


Slika 5.20. A) Energija fibrilacije aminokiselinskih ostataka lizozima predviđena ZipperDB alatom. Crvenom bojom su obeleženi ostaci čija energija fibrilacije je niža od definisanog praga (-23 kcal/mol). Crnom linijom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom TANGO, a sivom peptidi predviđeni alatom PASTA. B) i C) Trodimenzionalna struktura lizozima, PDB kod 194L. Slika je kreirana korišćenjem programa iCn3D: Web-based 3D Structure Viewer – NCBI (Rokvil, SAD), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html>. Crvenom bojom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom ZipperDB (B) i eksperimentalno određeni peptidi iz literaturih podataka (C).

Na osnovu slike 5.20B uočava se da su potencijalno amiloidni regioni predviđeni alatom ZipperDB uglavnom delovi  $\alpha$ -heliksa. Slika 5.20C pak prikazuje region lizozima za koji je eksperimentalno potvrđeno proteolizom i masenom spektrometrijom da ulazi u sastav amiloidnih fibrila lizozima [4]. Delovi sekvence se poklapaju sa predviđenim  $\alpha$ -heliksima, ali takođe su prisutni i delovi neuređenog niza koji nisu predviđeni kao amiloidogeni na osnovu sekvence.

### 5.3.2. Formiranje amiloidnih fibrila lizozima

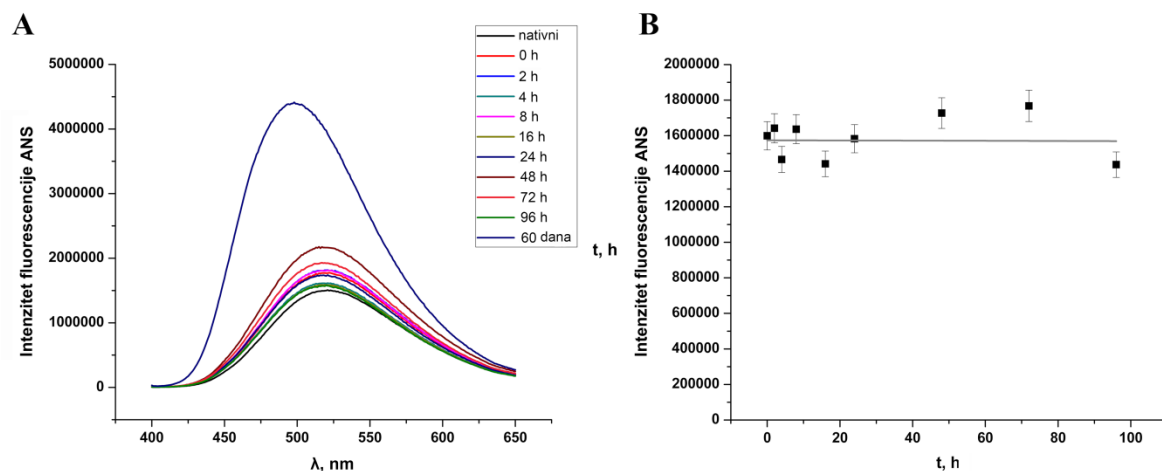
Prečišćen lizozim (Sigma-Aldrich, Stejnhejm, Nemačka) iz kokošjeg jajeta inkubiran je 60 dana u destabilizujućim uslovima – 90% rastvoru etanola u cilju formiranja amiloidnih fibrila. Uzorci koncentracije proteina 6 mg/mL inkubirani su na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. S obzirom na značaj model sistema za detekciju inicijalnih promena na putu ka amiloidnoj formi, analizirani su uzorci prikupljeni tokom prvih 4 dana inkubiranja.



**Slika 5.21. Emisioni spektri ThT u prisustvu uzoraka nativnog lizozima i lizozima inkubiranog u 90% rastvoru etanola; B) Intenzitet fluorescencije ThT na emisionom maksimumu tokom prvih 4 dana inkubiranja.**

Promene ilustrovane na slici 5.21 praćene su merenjem fluorescencije ThT i ANS u prisustvu uzoraka inkubiranih u 90% etanolu tokom 4 dana. Pored ovih uzoraka analiziran je i uzorak potpuno nativnog lizozima u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8 kao i potpuno amiloidni uzorak dobijen šezdesetodnevnom inkubiranjem u prisustvu 90% etanola. Rezultati ovih analiza prikazani su na slikama 5.21 i 5.22. Na osnovu spektara prikazanih na slikama 5.21A i 5.22A

može se uočiti da promena intenziteta fluorescencije ThT i ANS nije intenzivna tokom prvih dana inkubiranja lizozima u destabilizujućim uslovima. Promena u intenzitetu ThT fluorescencije do koje dolazi nakon 60 dana inkubiranja je veoma izražena i ukazuje na prelazak u amiloidnu formu.

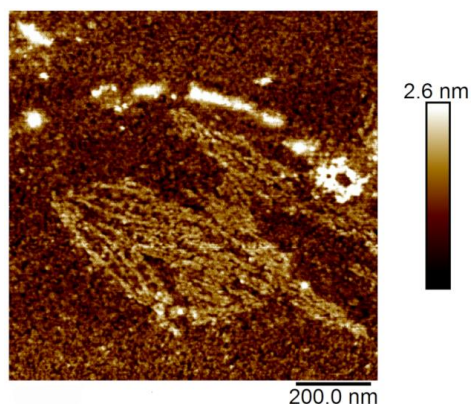


**Slika 5.22. Emisioni spektri ANS u prisustvu uzoraka nativnog lizozima i lizozima inkubiranog u 90% rastvoru etanola; B) Intenzitet fluorescencije ANS na emisionom maksimumu tokom prvih 4 dana inkubiranja.**

Emisioni spektri ANS tokom prvih nekoliko dana u 90% etanolu ne razlikuju se u velikoj meri u odnosu na veliku promenu u intenzitetu fluorescencije zabeleženu nakon 60 dana inkubiranja. Rezultati prikazani na slici 5.22A pokazuju da do velikog izlaganja hidrofobnih površina lizozima dolazi tek u amiloidnoj formi, ali ne i u intermedijarnim formama detektovanim tokom prvih dana inkubiranja. Grafici predstavljeni na slikama 5.21B i 5.22B prikazuju intenzitet fluorescencije na maksimumu emisije ThT, odnosno ANS u zavisnosti od vremena inkubiranja. Odnose se samo na prvih 4 dana i pokazuju linearnu promenu sa nagibom 0 što sugerise na to da promena u fluorescenciji gotovo da ne postoji, odnosno da se spektri snimljeni tokom prvih 4 dana inkubiranja ne razlikuju značajno.

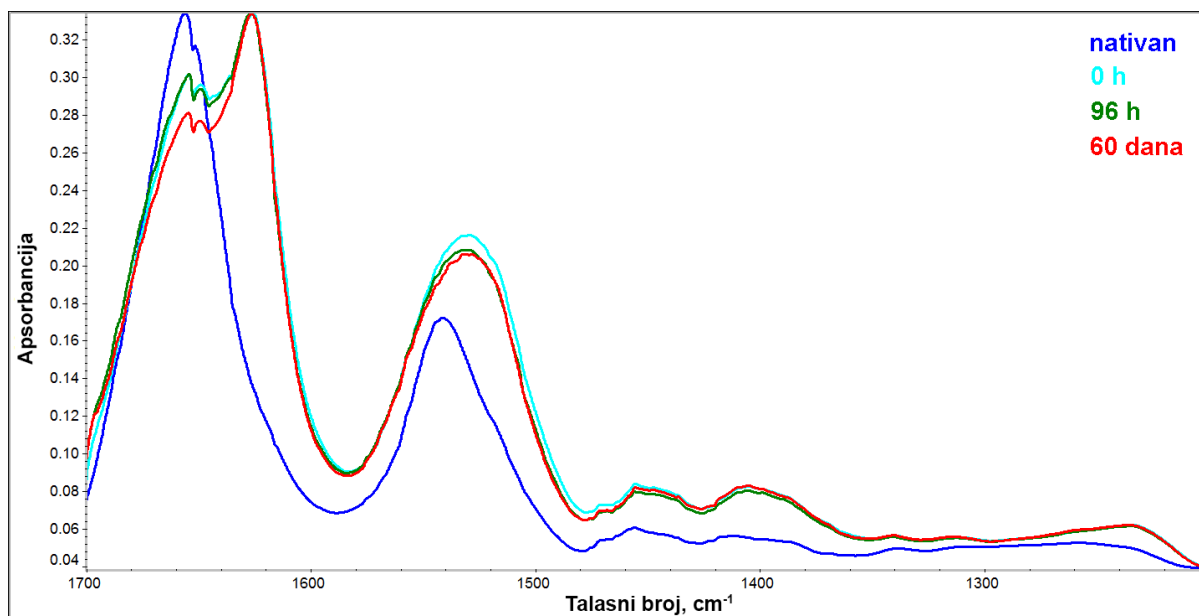
Morfologija uzorka lizozima inkubiranog 4 dana u 90% etanolu analizirana je mikroskopijom atomskih sila. Prikaz mikroskopije sa slike 5.23 ukazuje na postojanje heterogene populacije formi lizozima sa najvećom zastupljenošću oligomera. Prisutni su i kratki fibrili širine 1-3 nm.





**Slika 5.23. Mikroskopija atomskih sila uzorka lizozima inkubiranog 4 dana u 90% etanolu.**

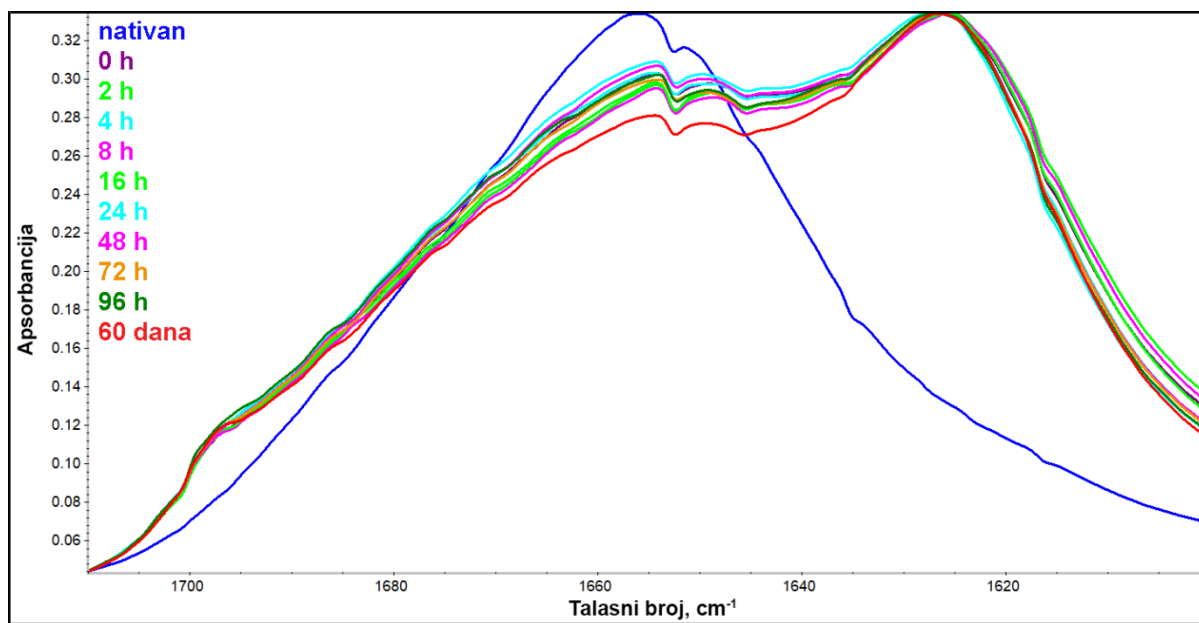
### 5.3.3. Kvalitativna analiza oligomera lizozima ATR-FTIR metodom – Amidni I region



**Slika 5.24. Amidni regioni nativnog lizozima u vodenom rastvoru i uzorka lizozima inkubiranih u 90% etanolu tokom različitih vremenskih intervala.**

U cilju analize strukturnih promena lizozima tokom inkubiranja u 90% rastvoru etanola, snimani su FTIR spektri. Na slici 5.24 prikazana su sva tri amidna regiona kako nativnog uzorka u vodenom rastvoru, tako i ključnih uzoraka u prisustvu 90% etanola. Spektri uzoraka inkubiranih u prisustvu etanola pokazuju značajan pomeraj u odnosu na spektar nativnog proteina. Ove promene su naročito izražene u Amidnom I regionu koji je konformaciono najosetljiviji.

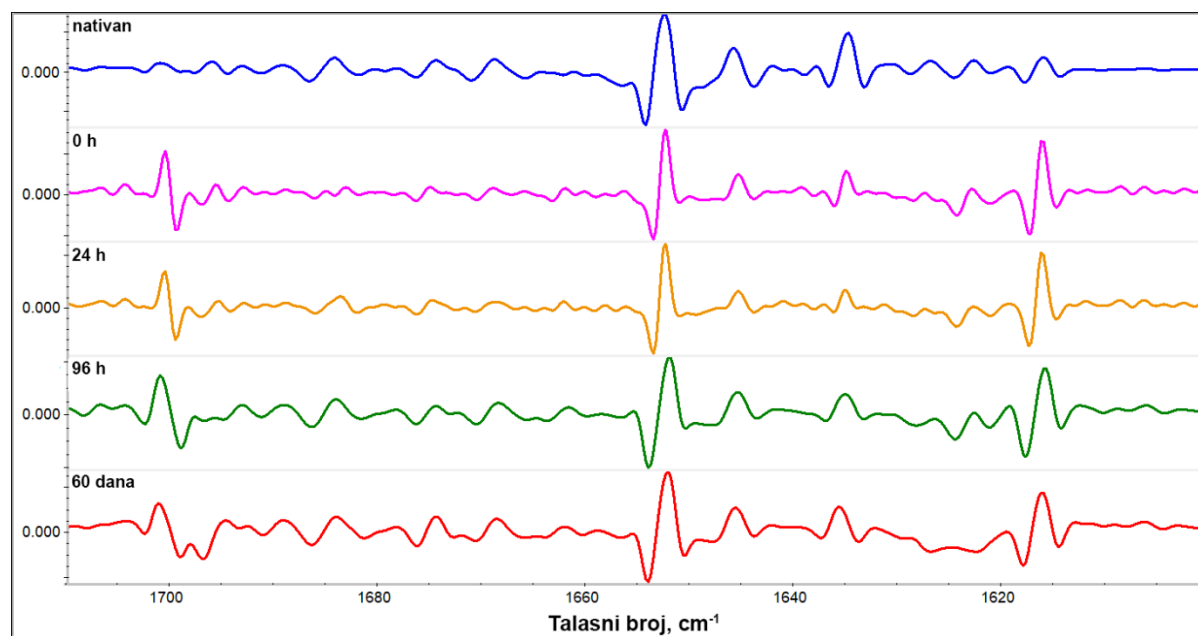
Promene se mogu okarakterisati pomerajem maksimuma ka nižim talasnim brojevima čime je celokupni oblik spektra u ovom regionu promenjen. U Amidnom II i Amidnom III regionu, izražene su razlike između nativnog uzorka i uzoraka u etanolu, ali naizgled bez značajnije promene oblika spektra. Za detaljniju analizu, amidni regioni su analizirani pojedinačno.



**Slika 5.25. Amidni I region nativnog lizozima i lizozima inkubiranog u 90% etanolu. Vreme inkubiranja za svaki od spektara dato je u legendi.**

Amidni I region kao konformaciono najzavisniji u najvećoj meri pruža uvid u tendenciju promene sekundarnih struktura tokom destabilizacije lizozima (slika 5.25). Spektar nativnog lizozima odlikuje se izraženim trakama na oko  $1650\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju  $\alpha$ -heliksi i neuređenom nizu [98]. Promene u spektru koje se uočavaju sa drastičnim smanjenjem polarnosti okruženja (dodatkom etanola do 90% koncentracije) ogledaju se u pomeraju maksimuma ka nižim talasnim brojevima (crveni pomeraj) i izmenom odnosa intenziteta traka u celom regionu. Kao posledica ovih promena, izgled spektra se značajno menja i postaju dominantne trake koje odgovaraju agregacionim  $\beta$ -pločicama na talasnim brojevima oko  $1620$  i  $1700\text{ cm}^{-1}$  [99] na račun smanjenja traka  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza ( $1645\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ ). Trake koje odgovaraju sekundarnim strukturama nativnog lizozima ne gube se u potpunosti kao posledica ravnoteže između različitih formi proteina, uključujući i nativnu. Pojava traka agregacionih  $\beta$ -pločica u

kombinaciji sa rezultatima mikroskopije atomskih sila ukazuje na postojanje intermedijera amiloidne fibrilacije. Iako je opisan spektar dobijen neposredno nakon rastvaranja lizozima u 90% rastvoru etanola, dalji uzorci izdvojeni nakon produženog inkubiranja u ovim uslovima pokazuju veoma sličan izgled spektra. Razlike se uočavaju tek u uzorku sa zrelim amiloidnim fibrilima inkubiranim 2 meseca u prisutvu etanola, u kom trake koje odgovaraju nativnim sekundarnim strukturama dodatno opadaju. Međutim, ni ove razlike nisu u velikoj meri izražene s obzirom na dug vremenski period između 4. i 60. dana inkubiranja.



**Slika 5.26. Drugi izvod Amidnog I regiona nativnog uzorka lizozima i uzoraka inkubiranih u 90% etanolu 0 h do 60 dana.**

Za preciznije očitavanje pozicija traka analizirani su drugi izvodi Amidnog I regiona FTIR spektara. S obzirom na veliko preklapanje spektara u periodu 0-96 h inkubiranja, analizirani su drugi izvodi odabranih spektara: nativnog lizozima u vodenom rastvoru, početnog uzorka u 90% etanolu, kao i uzoraka inkubiranih 24 h, 96 h i 60 dana u 90% etanolu (slika 5.26). Na osnovu drugog izvoda jasno se očitavaju pozicije  $\alpha$ -heliksa u spektru nativnog lizozima na  $1654\text{ cm}^{-1}$ , kao i neuređenog niza na  $1644\text{ cm}^{-1}$  koje u rastvoru 90% etanola opadaju. Paralelno sa ovim promenama raste minimum koji odgovara agregacionoj  $\beta$ -pločici na  $1618\text{ cm}^{-1}$  [98, 99]. Koeficijenti korelacije između drugog izvoda spektra nativnog lizozima i destabilizovanih

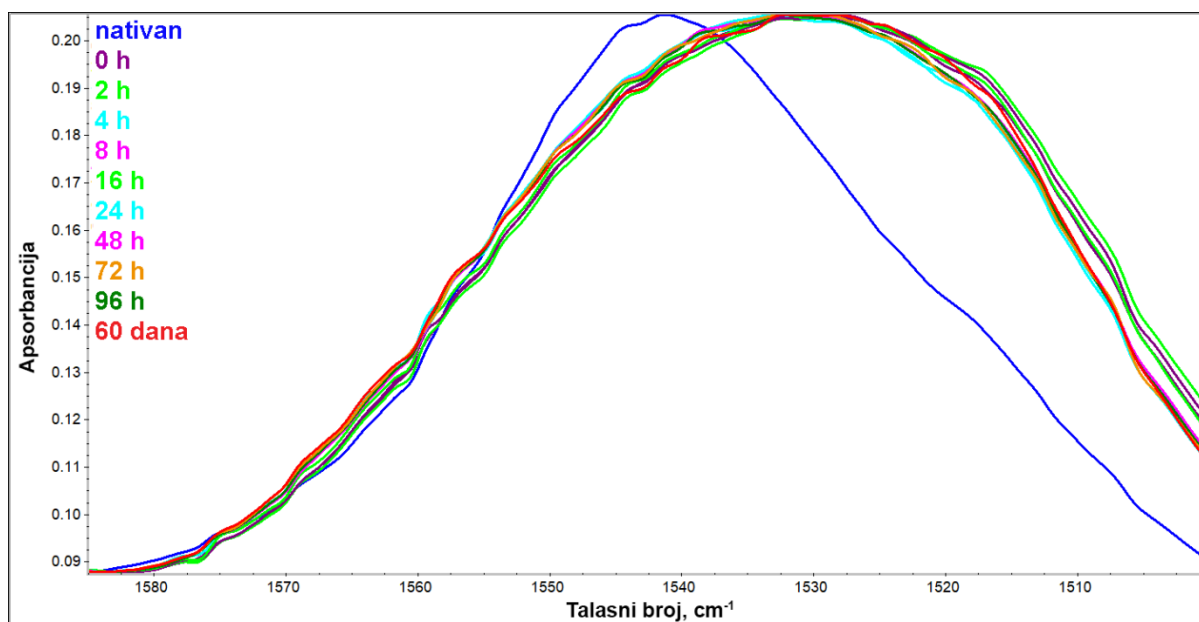
uzoraka lizozima prikazani su u tabeli 5.6. Ovi rezultati kvantitativno potvrđuju da se promene sekundarnih struktura u najvećoj meri dešavaju prilikom same promene rastvarača, a nakon toga se dalje veoma sporo menjaju.

**Tabela 5.6. Koeficijenti korelacije drugih izvoda nativnog lizozima i tretiranih uzoraka lizozima.**

Uzorak (vreme inkubiranja u 90% etanolu)	Korelacioni koeficijent
0 h	0,68
24 h	0,68
96 h	0,65
60 dana	0,64

### 5.3.4. Kvalitativna analiza fibrilacije lizozima ATR-FTIR metodom – Amidni II region

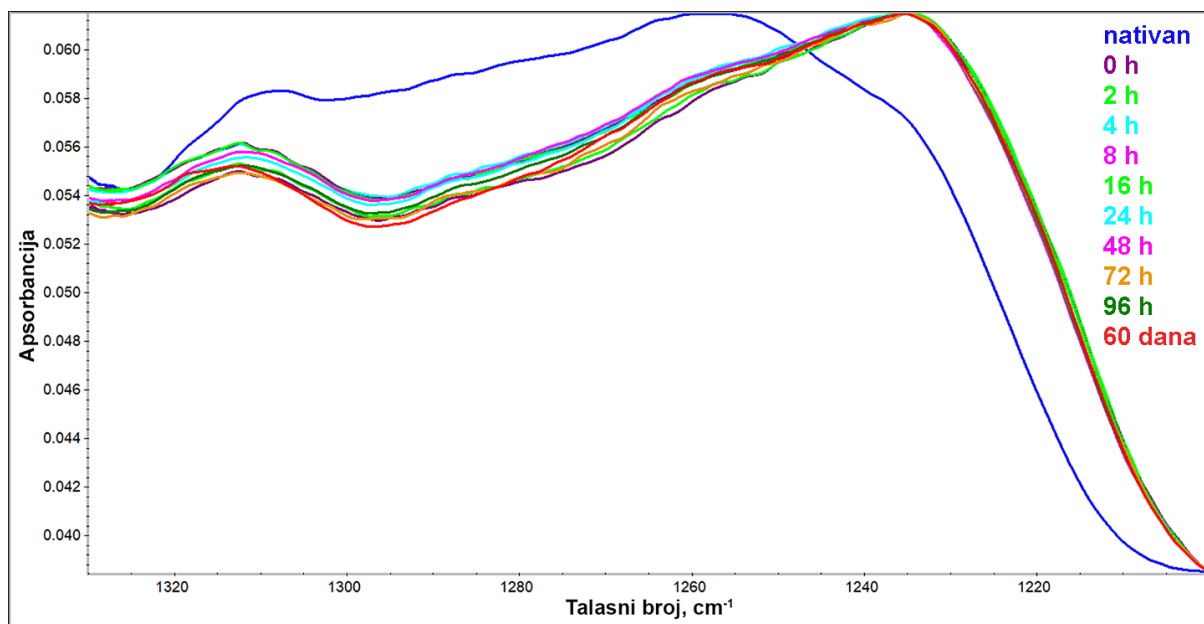
Iako su promene u Amidnom I regionu veoma izražene, u Amidnom II regionu uočen je samo blagi pomeraj maksimuma sa  $1550\text{ cm}^{-1}$  na  $1540\text{ cm}^{-1}$  između nativnog lizozima i lizozima u rastvoru etanola (slika 5.27). Zabeležene promene u Amidnom II regionu se mogu pripisati promeni polarosti rastvarača, te stoga produženo inkubiranje lizozima u istim uslovima nije izazvalo dodatne promene u spektru.



**Slika 5.27. Amidni II region nativnog lizozima i lizozima inkubiranog u 90% etanolu. Vreme inkubiranja za svaki od spektara dato je u legendi.**

### 5.3.5. Kvalitativna analiza fibrilacije lizozima ATR-FTIR metodom – Amidni III region

Spektri lizozima u Amidnom III regionu prikazani su na slici 5.28. U spektru nativnog lizozima uočavaju se trake koje odgovaraju  $\alpha$ -heliksi ( $1310\text{ cm}^{-1}$ ), neuređenom nizu ( $1257\text{ cm}^{-1}$ ) i  $\beta$ -pločici ( $1236\text{ cm}^{-1}$ ) [193, 194]. Sa promenom rastvarača, spektar se pomera ka traci koja odgovara  $\beta$ -pločici, uz gubitak traka  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza. Spektar nativnog proteina i spektri destabilizovanog proteina se razlikuju u velikoj meri, ali dalje promene tokom produženog vremena inkubiranja nisu izražene s obzirom na nisku osetljivost Amidnog III regiona.



Slika 5.28. Amidni III region nativnog lizozima i lizozima inkubiranog u 90% etanolu. Vreme inkubiranja za svaki od spektara dato je u legendi.

### 5.3.6. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara lizozima: dekonvolucija Amidnog I regiona

Iako i sama kvalitativna analiza Amidnog I regiona ukazuje na promene na nivou sekundarne strukture prilikom građenja oligomera lizozima, primenjena je metoda dekonvolucije za kvantitativno ispitivanje sadržaja sekundarnih struktura. Amidni I region je razložen na pojedinačne konstituente (prilog 9). Pojedinačne komponente su dodeljene različitim sekundarnim strukturama prema prethodno publikovanim podacima za spektre lizozima

rastvorenog u vodenoj sredini [98], spektre dobijene praćenjem vodonik-deuterijum izmene [108-110], spektre homologog humanog lizozima [97], kao i spektre drugih proteina i amilodnih fibrila [37, 188]. Sekundarnim strukturama su dodeljene sledeće trake: 1616–1628  $\text{cm}^{-1}$  (agregaciona  $\beta$ -pločica), 1630–1640  $\text{cm}^{-1}$  (intramolekulska  $\beta$ -pločica), 1642–1649  $\text{cm}^{-1}$  (neuređeni niz), 1650–1660  $\text{cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -heliks), 1660–1690  $\text{cm}^{-1}$  (zavijutak i neuređene strukture), 1692–1700  $\text{cm}^{-1}$  (agregaciona  $\beta$ -pločica). Određena je površina ispod svakog pika i ukupna površina ispod celokupnog Amidnog I regiona kao zbir površina pojedinačnih pikova. U tabeli 5.7. dat je pregled pozicija pojedinačnih pikova, dodeljivanje ovih pikova različitim sekundarnim strukturama na osnovu literaturnih podataka, kao i površina ispod pikova. Sadržaj sekundarnih struktura prikazan u tabeli 5.8 predstavlja procenatualni udeo površine karakterističnih pikova u totalnoj površini Amidnog I regiona. U tabeli su pored dobijenih vrednosti prikazani i rezultati izvedeni iz difrakcije X-zraka nativnog lizozima dobijeni na osnovu podataka iz UniProt baze<sup>8</sup>. Rezultati difrakcione analize i dekonvolucije spektra nativnog lizozima se dobro poklapaju. Dominantna sekundarna struktura u uzorku nativnog lizozima je  $\alpha$ -heliks sa 41,7% prema rezultatima dekonvolucije, dok rezultati difrakcione analize daju podatak od 42,6%. Promenom polarnosti sredine, procenat  $\alpha$ -heliksa pada na oko 20%, dok je dalji pad indukovano produženim inkubiranjem u 90% rastvoru etanola gotovo zanemarljiv. Ukupni sadržaj  $\beta$ -pločice u nativnom lizozimu se takođe slaže sa rezultatima difrakcione analize. Sadržaj intramolekulske  $\beta$ -pločice predstavlja oko 10% bez obzira na uslove i vreme inkubiranja, dok se sadržaj intermolekulske agregacione  $\beta$ -pločice povećava sa prelaskom u etanolni rastvor sa 8,6 na 29,7%. Trend promene se nastavlja i nakon 24 sata inkubiranja kada sadržaj intermolekulske agregacione  $\beta$ -pločice dostiže 34,7%. Sa daljim inkubiranjem trend postaje sporiji i zadržava se u sličnoj meri do 4. dana ukazujući na stabilno intermedijerno stanje. Tek finalni uzorak inkubiran 60 dana u ovim destabilizujućim uslovima pokazuje značajan skok u sadržaju agregacione  $\beta$ -pločice koji iznosi 38,2%. Rezultati dekonvolucije jasno sugerišu da je porast u sadržaju agregacione  $\beta$ -pločice nakon inicijalne promene rastvarača posledica drastičnog smanjenja sadržaja  $\alpha$ -heliksa, ali da se u produženom periodu inkubiranja u ovim uslovima dodatni porast u sadržaju agregacione  $\beta$ -pločice u većoj meri može pripisati smanjenom sadržaju neuređenog niza i zavijutka (pad sa 38 na oko 32%).

---

<sup>8</sup> UniProtKB - P00698 (LYSC\_CHICK)

**Tabela 5.7. Dodeljivanje traka ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) u Amidnom I regionu sekundarnim strukturama i relativna površina (P, %) ispod pojedinačnih pikova u odnosu na ukupnu površinu Amidnog I regiona za spektre nativnog lizozima i spektre lizozima u 90% rastvoru etanola.**

$\nu$ , $\text{cm}^{-1}$	P, %					sekundarna struktura	Ref.
	nativan	0 h	24 h	96 h	60 dana		
1616-1628	6,6	27,3	32,0	31,7	35,5	agregaciona $\beta$ -pločica	[37, 97, 98]
1630-1640	10,3	10,5	10,1	10,2	10,3	$\beta$ -pločica	[37, 97, 98, 110, 188]
1642-1649	12,5	19,2	14,5	14,2	14,7	neuređeni niz	[37, 97, 98]
1650-1660	41,7	21,8	22,8	21,8	19,6	$\alpha$ -heliks	[37, 98, 108, 110, 188]
1660-1676	13,0	7,0	6,2	6,7	7,0	neuređeni heliks	[37, 98, 188]
1676-1690	13,9	11,7	11,7	12,0	10,2	zavijutak	[37, 188]
1692-1700	2,0	2,4	2,7	3,4	2,7	agregaciona $\beta$ -pločica	[37]

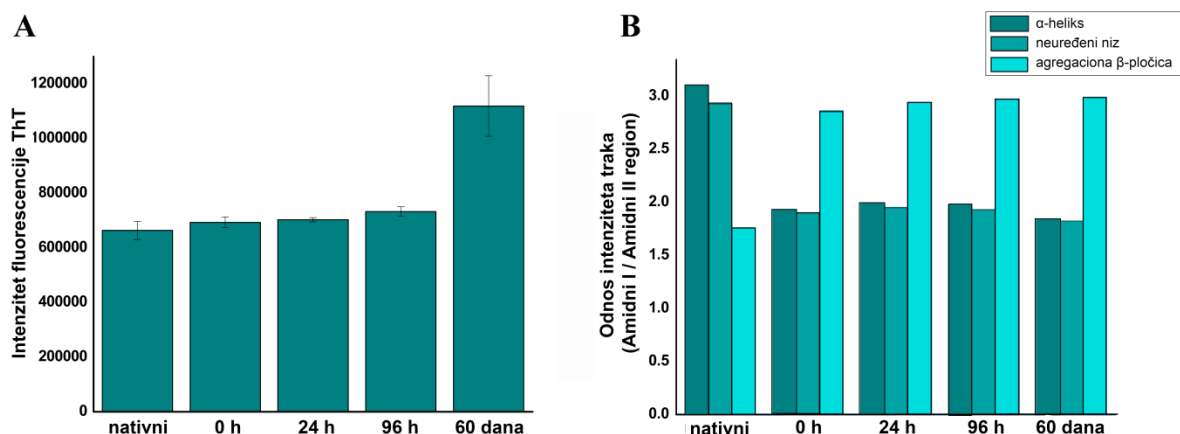
**Tabela 5.8. Sadržaj sekundarnih struktura uzoraka lizozima određen dekonvolucijom ATR-FTIR spektara u Amidnom I regionu i literaturni podaci dobijeni difrakcijom X-zraka [128].**

uzorak lizozima	$\beta$ -pločica	agregaciona $\beta$ -pločica	$\alpha$ -heliks	neuređeni niz + zavijutak	greška
nativan	10,3	8,6	41,7	39,4	1
0 h, 90% etanol	10,5	29,7	21,8	38	0,8
24 h, 90% etanol	10,1	34,7	22,8	32,4	0,6
96 h, 90% etanol	10,2	35,1	21,8	32,9	1,1
60 dana, 90% etanol	10,3	38,2	19,6	31,9	0,8
difrakcija X-zraka	18,7	/	42,6	38,7	/

### 5.3.7. Kvantitativna analiza ATR-FTIR spektara lizozima: odnos Amidne I i Amidne II trake

Pored komplikovane i zahtevne metode dekonvolucije koja iziskuje složenu matematičku analizu spektara, primenjena je i jednostavnija metoda za kvantitativnu analizu spektara. Tendencija zauzimanja različitih sekundarnih struktura praćena je određivanjem odnosa intenziteta trake date sekundarne strukture u Amidnom I regionu sa maksimumom u Amidnom II regionu koji je korišćen kao interni standard. Metoda je primenjena za praćenje promena u tendenciji zauzimanja sledećih sekundarnih struktura:  $\alpha$ -heliksa ( $1654 \text{ cm}^{-1}$ ), neuređenog niza ( $1644 \text{ cm}^{-1}$ ) i agregacionih  $\beta$ -pločica (suma intenziteta traka na  $1620$  i  $1698 \text{ cm}^{-1}$ ). Intenziteti na nabrojanim talasnim brojevima deljeni su sa intenzitetom Amidnog II maksimuma na poziciji između  $1542 \text{ cm}^{-1}$  za nativni lizozim u vodenom rastvoru i na poziciji  $1534 \text{ cm}^{-1}$  za uzorke lizozima u 90% etanolu. Na ovaj način je praćen trend promene sekundarnih struktura tokom perioda inkubiranja kao što je prikazano na slici 5.29B. Tendencija zauzimanja sekundarne strukture agregacione  $\beta$ -

pločice prikazana je kao zbir intenziteta traka na visokoj i niskoj frekvenciji ( $1622\text{ cm}^{-1}$  i  $1698\text{ cm}^{-1}$ ) normalizovan na intenzitet Amidne II trake. U cilju poređenja trenda promene sekundarnih struktura sa porastom intenziteta fluorescencije ThT, i ove vrednosti su date za iste uzorke na slici 5.29A.



**Slika 5.29. A) Intenzitet ThT fluorescencije i B) odnos Amidna I/Amidna II traka za nativni, 0 h, 24 h, 96 h i 60 dana inkubirani lizozim u 90% rastvoru etanola.**

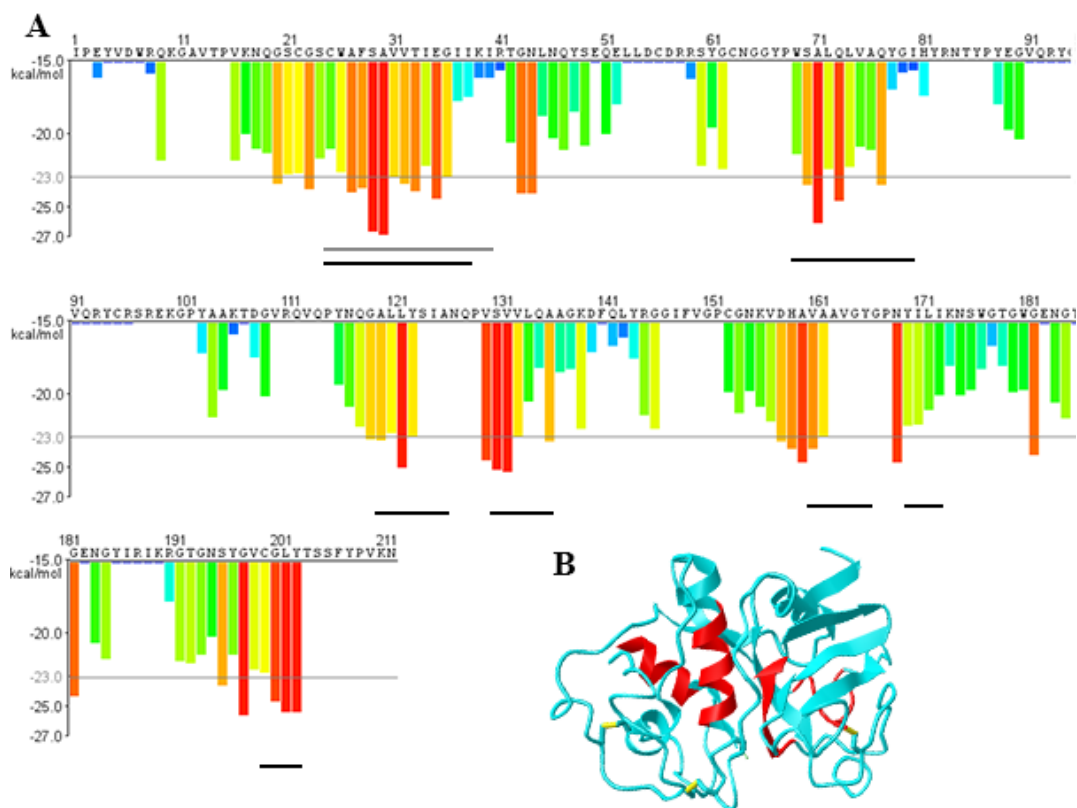
I ova metoda potvrđuje tendenciju zauzimanja agregacione  $\beta$ -pločice u uslovima visoke koncentracije etanola koja je veoma izražena već kod intermedijarnih stanja detektovanih tokom prva 4 dana inkubiranja. Istovremeno, tendencija formiranja sekundarnih struktura karakterističnih za nativni lizozim ( $\alpha$ -heliksa, intramolekulske  $\beta$ -pločice i neuređenog niza) opada. Sa druge strane, intenzitet ThT fluorescencije raste u značajnijoj meri tek nakon 60 dana inkubiranja lizozima u ovim uslovima, dok je promena tokom prva 4 dana u nivou greške merenja. Ovakva analiza FTIR spektara sugerise na gotovo trenutni prelazak lizozima iz nativnog u intermedijerno oligomerno stanje sa promenom polarosti okruženja. Trend nastanka agregacionih  $\beta$ -pločica tokom početnih faza fibrilacije lizozima i građenja oligomernih intermedijera praćen ovom metodom nije u dobroj korelaciji sa promenom intenziteta ThT fluorescencije u istim uzorcima (prilog 10). Iako metoda pokazuje visoku korelaciju kod praćenja formiranja amiloidnih fibrila brzo-fibrilirajućeg ovalbumina, kod formiranja oligomera lizozima ovo nije slučaj. Ovi rezultati potvrđuju da je praćenje tendencije zauzimanja agregacione  $\beta$ -pločice ATR-FTIR spektroskopijom specifičnija metoda za detekciju oligomernih stanja od metode praćenja ThT fluorescencije.



## 5.4. Ispitivanje potencijala za formiranje amiloidnih agregata biljnih cistein-proteaza

Po uspostavljanju metodologije za praćenje formiranja amiloidnih fibrila i oligomera na proteinima jajeta, ispitana je mogućnost fibrilacije proteina iz klase cistein-proteaza – papaina iz ploda papaje (*Carica papaya*) i ficina iz lateksa smokve (*Ficus carica*).

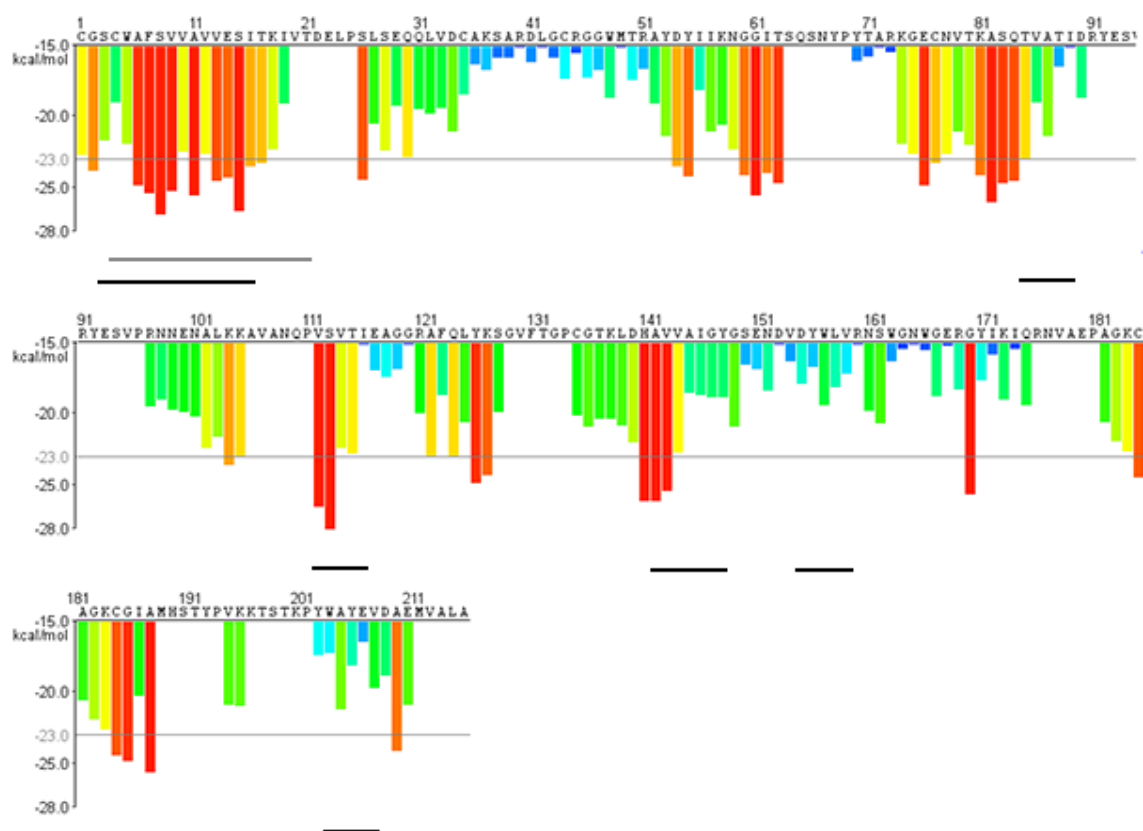
### 5.4.1. Analiza amiloidogenih peptida papaina i ficina 1c



Slika 5.30. A) Energija fibrilacije aminokiselinskih ostataka papaina predviđena ZipperDB alatom: crvenom bojom su obeleženi ostaci čija energija fibrilacije je niža od definisanog praga (-23 kcal/mol). Crnom linijom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom TANGO, a sivom peptidi predviđeni alatom PASTA. B) Trodimenzionalna struktura papaina, PDB kod 1BP4. Slika je kreirana korišćenjem programa iCn3D: Web-based 3D Structure Viewer – NCBI (Rokvil, SAD), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html>. Crvenom bojom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom ZipperDB.

Sekvence papaina i ficina 1c analizirane su u cilju pretrage amiloidogenih peptida korišćenjem alata ZipperDB, TANGO i PASTA. Detektovani su potencijalno amiloidogeni peptidi prikazani na slikama 5.30 i 5.31. Sva tri alata prepoznaju dug segment u N-terminalnom regionu papaina visoke tendencije za građenje amilodinih fibrila. Pored ovog peptida, istaknuti su i kraći peptidi na pozicijama 70-77 i 129-136 prepoznati i ZipperDB i TANGO alatom. Na osnovu slike 5.30B uočava se da su potencijalno amiloidni regioni predviđeni alatom ZipperDB delovi dva  $\alpha$ -heliksa, ali i jedne  $\beta$ -pločice.

U slučaju ficina 1c prepoznat je veoma dugačak N-terminalni segment sa preko 10 aminokiselinskih ostataka sa energijom pogodnom za građenje amiloidnih  $\beta$ -pločica (slika 5.15). Ovaj region prepoznat je kao amiloidogen pomoću sva tri alata. Takođe, delovi sekvence oko 60. i oko 80. aminokiselinskog ostatka pokazuju veliki potencijal za formiranje fibrila.

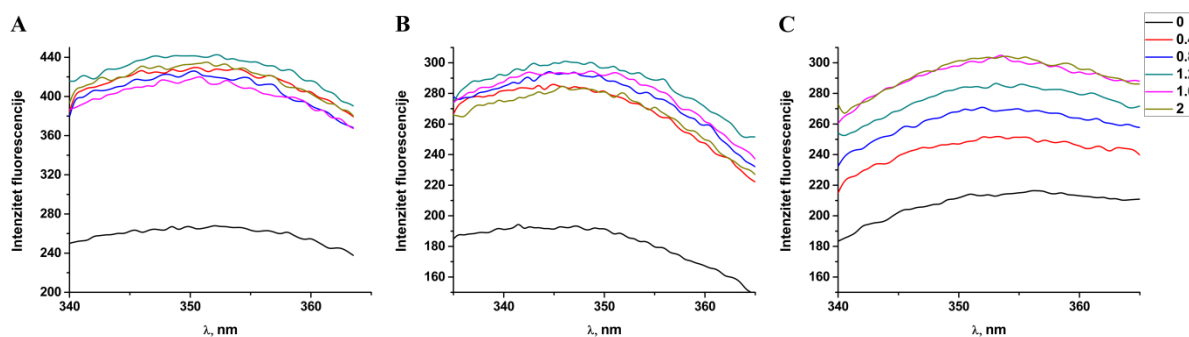


**Slika 5.31. A) Energija fibrilacije aminokiselinskih ostataka ficina 1c predviđena ZipperDB alatom: crvenom bojom su obeleženi ostaci čija energija fibrilacije je niža od definisanog praga (-23 kcal/mol). Crnom linijom su obeleženi amiloidogeni peptidi predviđeni alatom TANGO, a sivom peptidi predviđeni alatom PASTA.**

### 5.4.2. Usporedna stabilnost papaina, ficina 1c i smeše ficina

Stabilnost papaina, prečišćene izoforme ficina i smeše izoformi ficina praćena je snimanjem fluorescentnih spektara proteina u destabilizujućim uslovima. Uzorci proteina inkubirani su u prisustvu različitih koncentracija uree u opsegu temperature 10-50°C. Koncentracija uree je varirana u opsegu 0-2 M. Na slici 5.32 prikazani su spektri papaina, ficina 1c i smeše ficina inkubirani preko noći u rastvorima različite koncentracije uree. Primeri spektara sa slike snimljeni su pri temperaturi od 40°C.

Povećanje koncentracije uree dovodi do povećanja intenziteta fluorescencije kod sva tri uzorka proteina. Ipak, trend povećanja intenziteta fluorescencije nije potpuno isti. Kod papaina (slika 5.32A) i ficina 1c (slika 5.32B) promena intenziteta fluorescencije sa porastom koncentracije uree prati isti trend. Već 0,4 M urea dovodi do značajnog skoka u intenzitetu fluorescencije koji se sa daljim povećanjem koncentracije do 2 M ne menja. Za razliku od ovih uzoraka pojedinačnih izoformi, uzorak smeše ficina pokazuje postepeni porast intenziteta fluorescencije sa porastom koncentracije uree (slika 5.32C).



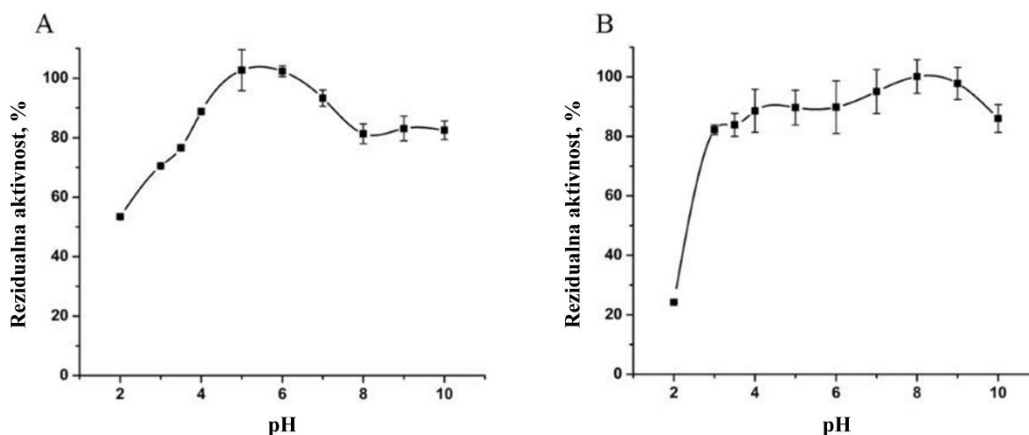
Slika 5.32. Emisioni spektri A) papaina, B) ficina 1c i C) smeše ficina u prisustvu 0-2 M uree snimljeni na 40°C.

S obzirom na identično ponašanje papaina i ficina 1c u ispitivanju stabilnosti u prisustvu uree, u daljim analizama stabilnosti i tendencije agregiranja korišćen je papain kao model pojedinačnog polipeptidnog lanca i smeša ficina kao sistem koji se sastoji iz više izoformi.

### 5.4.3. Stabilnost papaina i smeše ficina na različitim pH vrednostima

Ispitana je pH stabilnost papaina i smeše ficina i rezultati su prikazani na slici 5.33. Za merenje rezidualne aktivnosti korišćen je kazein kao supstrat. Rezultati ukazuju na veću stabilnost ficina u široj oblasti pH u odnosu na papain. Više od 80% aktivnosti ficina je zadržano nakon 30 minuta inkubiranja na pH vrednostima u opsegu 3 do 10. Na pH vrednosti ispod 2 i ficin i papain gube najveći deo svoje aktivnosti. Na pH vrednostima 3 i 9 ficin se pokazao nešto stabilnijim.

Za razliku od ficina, pH stabilnost papaina opisana je zvonastom krivom ukazujući na užu opseg stabilnosti. Ovakve razlike se mogu objasniti postojanjem jednog polipeptidnog lanca papaina i smeše izoformi ficina različitog opsega stabilnosti koje doprinose ukupnoj stabilnosti smeše.



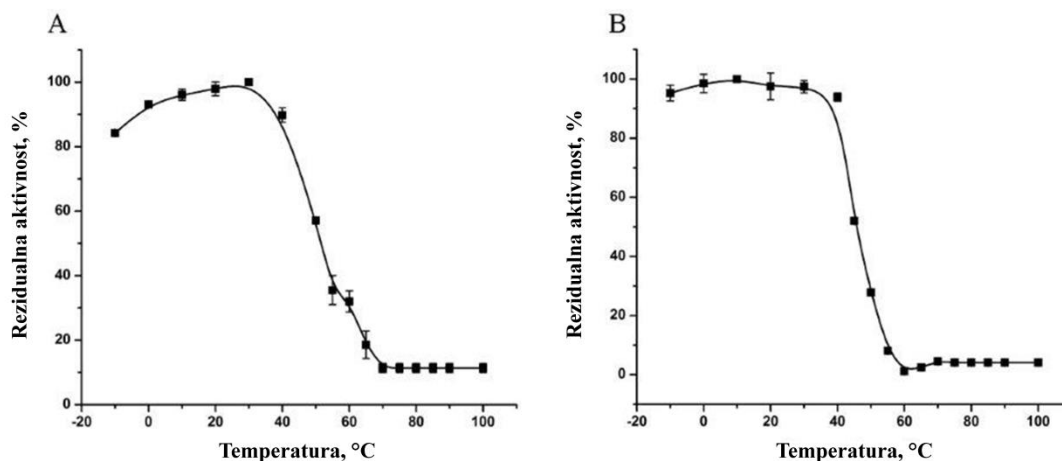
**Slika 5.33. Efekat pH na stabilnost A) papaina i B) ficina. Rezidualna aktivnost nakon inkubiranja 30 minuta na sobnoj temperaturi u puferima različite pH određena je naspram kazeina kao supstrata.**

### 5.4.4. Termalna inaktivacija papaina i ficina na pH 3,2

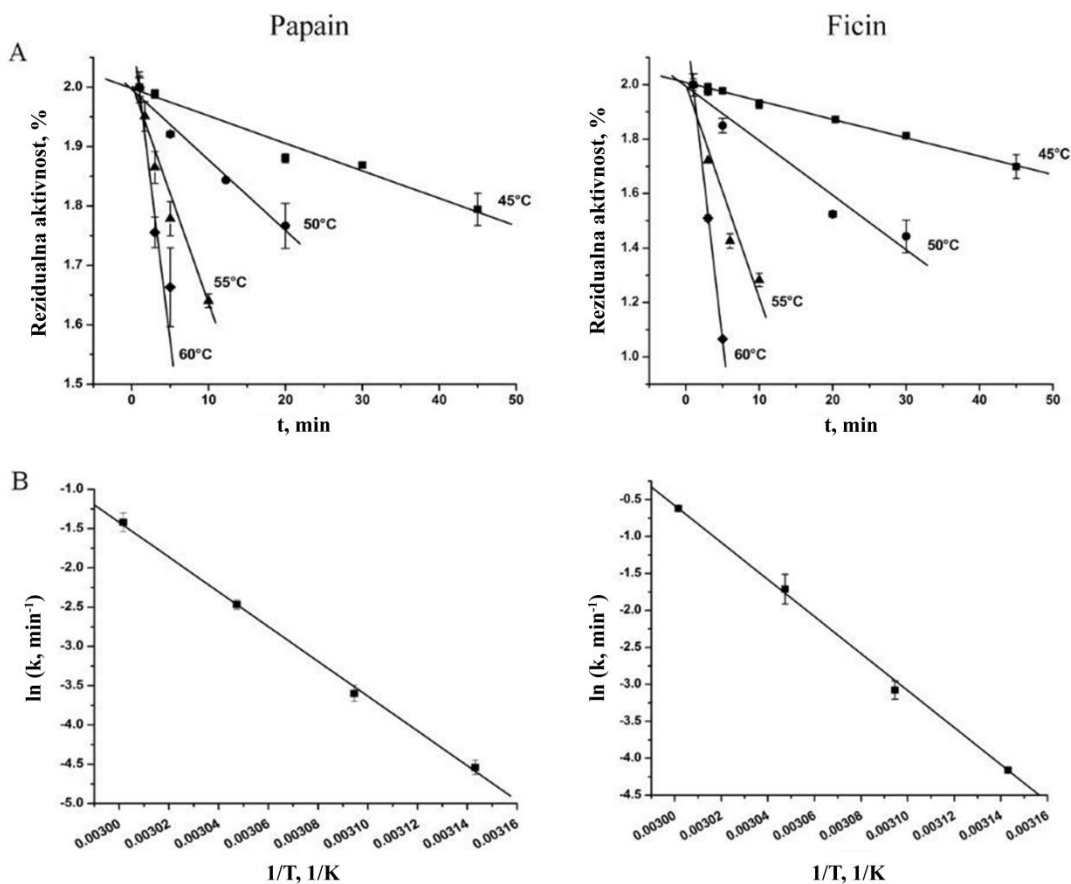
Termalna inaktivacija papaina i ficina u kiseljoj sredini (u 50 mM natrijum-tartaratnom puferu pH 3,2) praćena je merenjem rezidualne aktivnosti nakon inkubiranja 30 minuta na različitim temperaturama. Rezultati su prikazani u formi krivih termalne inaktivacije prikazanih na slici 5.34. Krive inaktivacije, kako papaina, tako i ficina imaju oblik sigmoide na osnovu kog je utvrđena temperatura topljenja,  $T_m$  (papain  $51,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$ , ficin  $45,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Najveća razlika u stabilnosti uočava se u oblasti temperatura nižih od  $25^\circ\text{C}$  (slika 5.34). U slučaju papaina, 16%

aktivnosti je izgubljeno na temperaturi oko 0°C. Sa druge strane, u slučaju ficina pad rezidualne aktivnosti na niskim temperaturama je znatno manji (5%).

Za praćenje kinetike inaktivacije ova dva enzima u kiseloj sredini praćen je pad rezidualne aktivnosti sa vremenom inkubiranja na temperaturama 45, 50, 55, 60°C. Alikvoti rastvora papaina i ficina su uzorkovani u periodu od 45 minuta i na osnovu određene rezidualne aktivnosti konstruisani su semi-logaritamski grafici inaktivacije (slika 5.35A). Konstante brzine inaktivacije određene na osnovu nagiba ovih grafika prikazane su u tabeli 5.9. Na osnovu vrednosti konstanti brzine inaktivacije konstruisan je Arenijusov grafik (slika 3.35B). Vrednosti aktivacionih energija ( $E_a$ ) za termalnu inaktivaciju papaina i ficina na pH 3,2 dobijene su iz Arenijusovog grafika i iznose, redom,  $184 \pm 8$  kJ/mol ( $R^2 = 0,997$ ) i  $208 \pm 3$  kJ/mol ( $R^2 = 0,999$ ). S obzirom na ove vrednosti  $E_a$ , ficin se pokazao kao značajno stabilniji od papaina u kiseloj sredini.



**Slika 5.34. Krive termalne inaktivacije A) papaina i B) ficina. Aktivnost je određena naspram kazeina kao supstrata nakon inkubiranja 30 minuta na određenoj temperaturi i izražena kao procenat rezidualne aktivnosti.**



Slika 5.35. A) Termalna inaktivacija papaina i ficina u temperaturnom opsegu 45-60°C na pH 3,2. B) Arenijusov grafik - zavisnost konstante brzine inaktivacije enzima od recipročne vrednosti temperaure za papain i ficin.

Tabela 5.9. Konstante brzine inaktivacije ( $k$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) papaina i ficina na različitim temperaturama.

temperatura, °C	45	50	55	60
<b>papain</b>	0,0046 ± 0,0005	0,012 ± 0,002	0,037 ± 0,003	0,10 ± 0,02
<b>ficin</b>	0,0068 ± 0,0002	0,02 ± 0,003	0,08 ± 0,02	0,234 ± 0,007

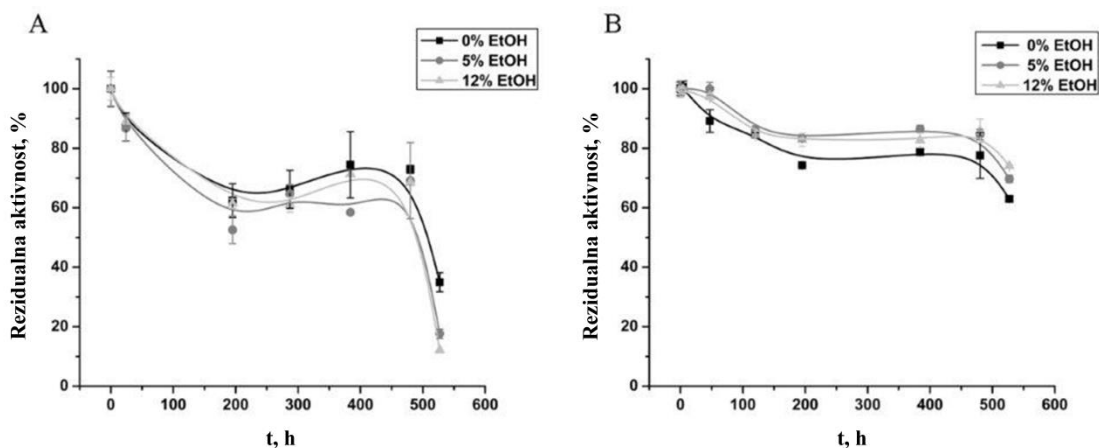
#### 5.4.5. Stabilnost papaina i ficina u kiseljoj sredini na niskoj temperaturi

Budući da su i papain i ficin skloni taloženju sa promenom pH i polarnosti sredine, odabrani su uslovi u kojima ne dolazi do vidljive precipitacije za ispitivanje produžene stabilnosti i potencijala za građenje amiloidnih fibrila. Stabilnost papaina i ficina je praćena tri nedelje na

temperaturi 4°C u 50 mM natrijum-tartaratnom puferu pH 3,2. Postavljeni su uzorci bez etanola, kao i uzorci u istom puferu sa 5% odnosno 12% (V/V) etanola. Uzorci alikvotirani u različitim vremenskim intervalima inkubiranja analizirani su u pogledu rezidualne kazeinolitičke aktivnosti, kao i u pogledu strukturnih promena metodama gel filtracije, FTIR spektroskopije, ThT i ANS fluorimetrije.

Rezultati praćenja rezidualne aktivnosti papaina i smeše ficina tokom tri nedelje prikazani su na slici 5.36. Trend pada rezidualne aktivnosti je isti u svim uzorcima oba enzima bez obzira na koncentraciju etanola. Uočava se postojanje stabilnog intermedijernog stanja između 150 i 500 h inkubiranja kod oba enzima. Ovaj intermedijer pokazuje oko 90% rezidualne aktivnosti u slučaju ficina i oko 70% u slučaju papaina.

Nakon 500 sati inkubiranja, rezidualna aktivnost papaina značajno opada i iznosi 15% za uzorak sa 12% etanolom, 20% za uzorak sa 5% etanolom i 30% za uzorak bez etanola. Sa druge strane, rezidualna aktivnost smeše ficina nakon tri nedelje inkubiranja je gotovo tri puta veća u odnosu na rezidualnu aktivnost papaina. Dalje su ispitane strukturne promene tokom perioda inkubiranja za pronalaženje objašnjenja različitog ponašanja ova dva model sistema.



**Slika 5.36. Rezidualna aktivnost A) papaina i B) ficina tokom inkubiranja na 4°C u 50 mM natrijum-tartaratnom puferu pH 3,2 sa 0, 5 i 12% etanola.**

Snimani su FTIR spektri uzoraka papaina i ficina pre inkubiranja na niskoj temperaturi i nakon 3 nedelje inkubiranja. Kvalitativna analiza Amidnog I regiona ukazuje na izraženije promene

sekundarnih struktura papaina nego ficina tokom skladištenja na niskim temperaturama. Trake su dodeljene pojedinačnim sekundarnim strukturama na osnovu literaturnih podataka kao što je prikazano u tabeli 5.10. Tendencija zauzimanja sekundarnih struktura praćena je određivanjem odnosa intenziteta trake karakteristične za datu sekundarnu strukturu u Amidnom I regionu (1652  $\text{cm}^{-1}$   $\alpha$ -heliks; 1632  $\text{cm}^{-1}$   $\beta$ -pločica; 1641  $\text{cm}^{-1}$  neuređeni niz; 1680  $\text{cm}^{-1}$   $\beta$ -zavijutak; 1617 i 1697  $\text{cm}^{-1}$  agregaciona  $\beta$ -pločica) i Amidne II trake (1544  $\text{cm}^{-1}$ ). Za svaki od uzoraka inkubiranih 3 nedelje u destabilizujućim uslovima, dobijene vrednosti normalizovanih intenziteta traka su podeljene sa vrednostima normalizovanih intenziteta u adekvatnom početnom uzorku. Na taj način su dobijeni odnosi koji ukazuju na trend promene sadržaja date sekundarne strukture. Za uzorke u kojima nisu uočene promene sekundarnih struktura nakon tri nedelje inkubiranja, odnos normalizovanog intenziteta i normalizovanog intenziteta početnog uzorka je 1. U slučaju opadanja sadržaja određene sekundarne strukture, dobijene su vrednosti manje od 1, dok su za sekundarne strukture čiji sadržaj raste dobijene vrednosti veće od 1.

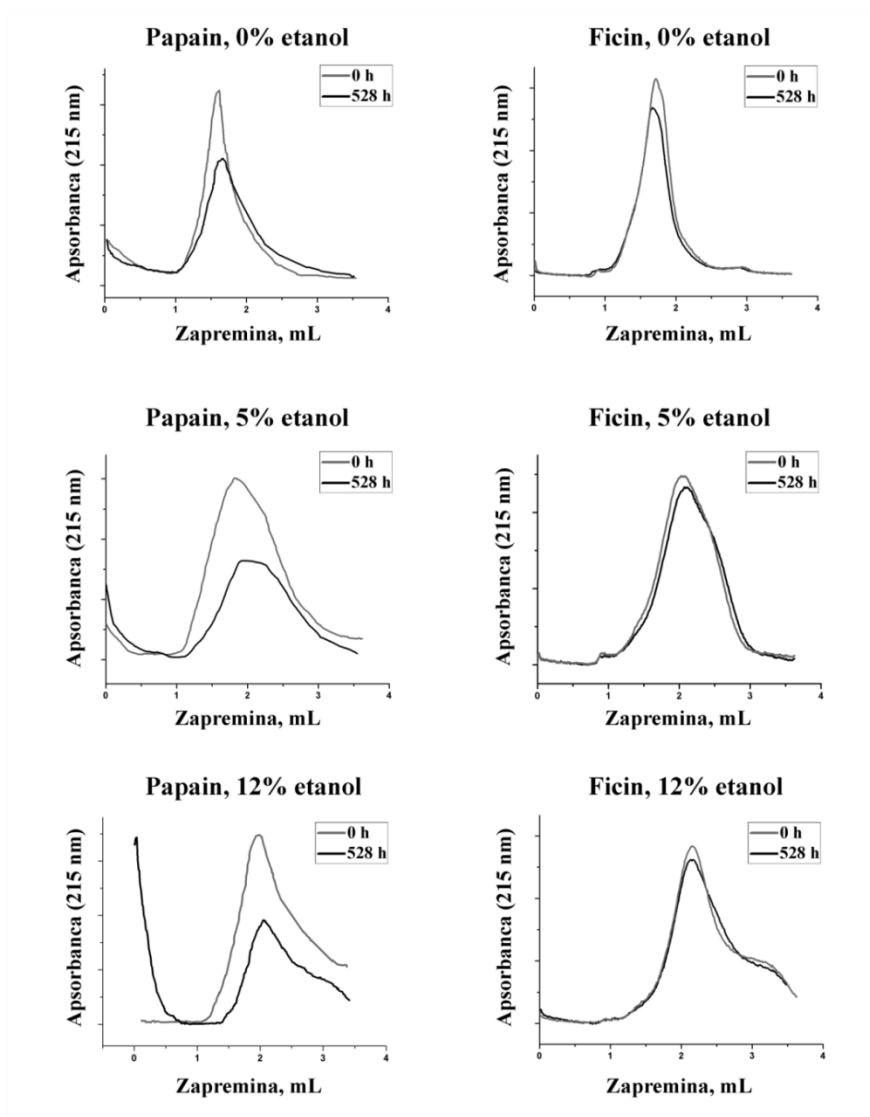
**Tabela 5.10. Tendencija promene sadržaja sekundarnih struktura papaina i ficina nakon inkubiranja 3 nedelje na 4°C u kiseloj sredini sa ili bez etanola. Trake u Amidnom I regionu su dodeljene sekundarnim strukturama na osnovu citiranih referenci.**

papain	sekundarna struktura	v, $\text{cm}^{-1}$	Referenca	stepen očuvanosti sekundarne strukture		
				0% etanol	5% etanol	12% etanol
	$\beta$ -pločica	1632	[182]	0,96	0,95	0,94
neuređeni niz	1641	[182]	0,98	0,97	0,89	
$\alpha$ -heliks	1652	[181]	0,96	0,95	0,83	
$\beta$ -zavijutak	1680	[182]	1,12	1,11	1,09	
agregaciona $\beta$ -pločica	1617, 1697	[183-185]	1,07	1,11	1,05	
ficin	sekundarna struktura	v, $\text{cm}^{-1}$	Referenca	stepen očuvanosti sekundarne strukture		
				0% etanol	5% etanol	12% etanol
	$\beta$ -pločica	1632	[182]	0,96	1,02	0,99
	neuređeni niz	1641	[182]	0,93	0,97	0,99
	$\alpha$ -heliks	1652	[181]	0,96	0,97	0,98
	$\beta$ -zavijutak	1680	[182]	1,05	1,00	1,05
agregaciona $\beta$ -pločica	1617; 1697	[183-185]	1,02	1,01	1,00	

U uzorcima papaina, tronedeljni period inkubiranja na 4°C doveo je do porasta u sadržaju agregacione  $\beta$ -pločice i zavijutka i do pada u sadržaju  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza. Smanjenje udela sekundarnih struktura karakterističnih za nativan papain i porast udela  $\beta$ -strukture ukazuju na denaturaciju i delimičnu agregaciju s obzirom na porast u agregacionoj  $\beta$ -pločici (1,07; 1,11 i 1,05 za rastuće koncentracije etanola). Za potvrdu formiranja agregata primenjena je analitička



gel filtracija, a dobijeni hromatogrami su prikazani na slici 5.37. Kao što se može uočiti na osnovu hromatograma, nakon 3 nedelje na niskoj temperaturi, hromatografski profil papaina se menja, deo površine osnovnog pika se gubi i detektuje kao povišena vrednost apsorbancije u mrtvoj zapremini kolone što ukazuje na pojavu agregata. Denaturacija na niskim temperaturama i agregiranje papaina objašnjavaju izražen gubitak aktivnosti od 70-80% (slika 5.33A).



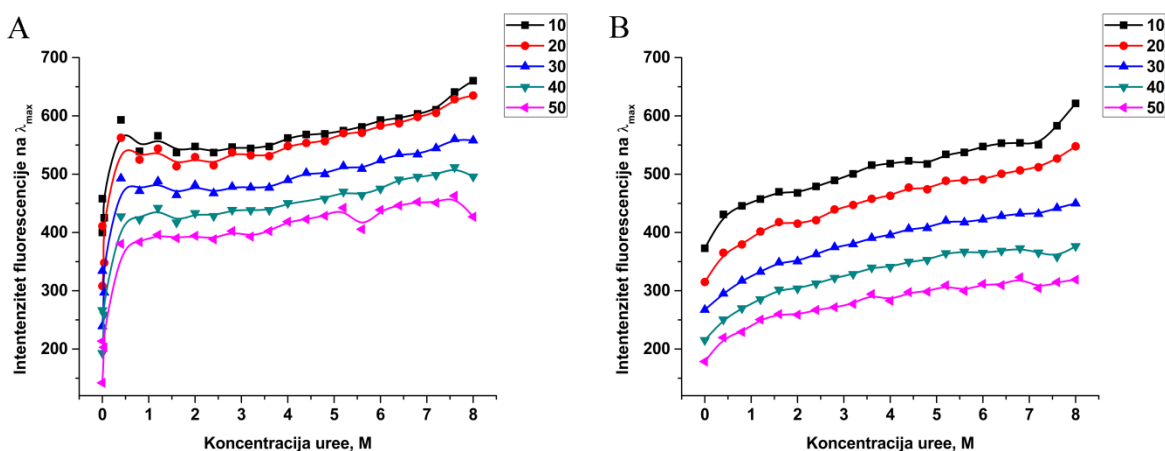
**Slika 5.37. Hromatogrami uzoraka papaina i ficina pre i posle inkubiranja na 4°C i pH 3,2 pri različitim koncentracijama etanola analiziranih gel filtracijom.**

Za razliku od papaina, u uzorcima ficina značajne promene sekundarnih struktura nisu uočene (tabela 5.10), kao ni razlika u hromatografskom profilu (slika 5.34). Nije uočen porast u sadržaju

agregacione  $\beta$ -pločice, te rezultati dobijeni kombinacijom metoda ukazuju na očuvanje strukture i aktivnosti ficina u uslovima snižene temperature, kisele sredine, kao i prisustva etanola.

#### 5.4.6. Destabilizacija papaina i smeše ficina visokim koncentracijama uree

Dalje je ispitana destabilizacija papaina i smeše ficina u prisustvu visokih koncentracija uree. Emisioni spektri uzoraka papaina i smeše ficina sa ureom u opsegu koncentracija 0-8 M su snimljeni na temperaturama 10-50°C. Krive denaturacije papaina i smeše ficina ureom prikazane su na slici 5.38. Krive denaturacije papaina (slika 5.38A) pokazuju intenzivan porast fluorescencije u prisustvu uree do 0,4 M koncentracije. Dalji porast koncentracije uree sve do 7,6 M ne utiče na fluorescenciju papaina. Tek pri višim koncentracijama i pri nižim temperaturama (10-20°C) uočava se dalji porast intenziteta fluorescencije. Prilikom denaturacije smeše ficina ureom, porast fluorescencije sa porastom koncentracije uree je u većoj meri postepen (slika 5.38B). Ne uočava se inicijalni drastični skok fluorescencije kao u slučaju papaina, ali do finalne 8 M koncentracije uree, ukupna promena fluorescencije kod papaina i smeše ficina je uprediva.

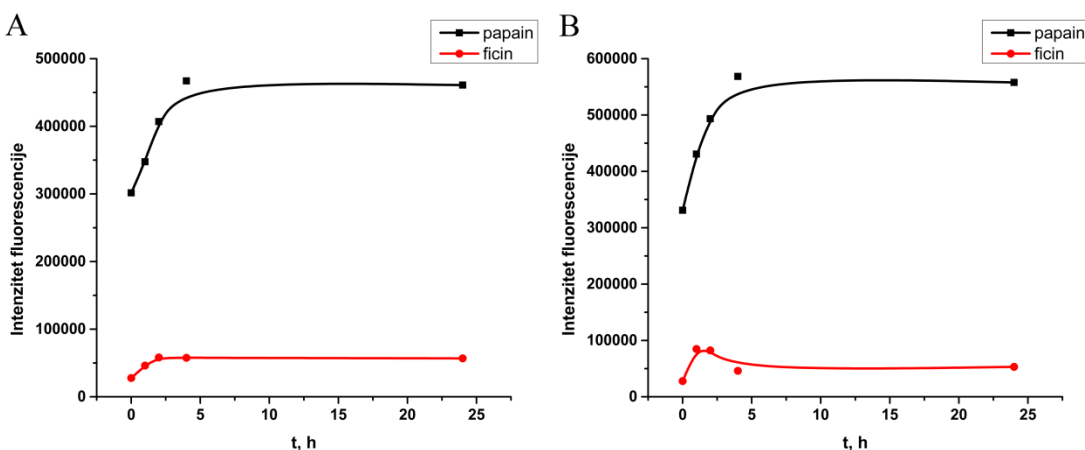


Slika 5.38. Krive denaturacije A) papaina, B) smeše ficina ureom (0-8 M) snimane u opsegu temperatura 10-50°C.

S obzirom na rezultate analize stabilnosti papaina i smeše ficina u prisustvu uree, ispitan je potencijal ovih proteina za formiranje amiloidnih fibrila nakon predtretmana ureom. Rastvori papaina i smeše ficina koncentracije 6 mg/mL u rastvoru HCl pH 3 inkubirani su u prisustvu 8 M uree preko noći na sobnoj temperaturi. Po uklanjaju uree nakon 16 h, postavljeni su uzorci u:

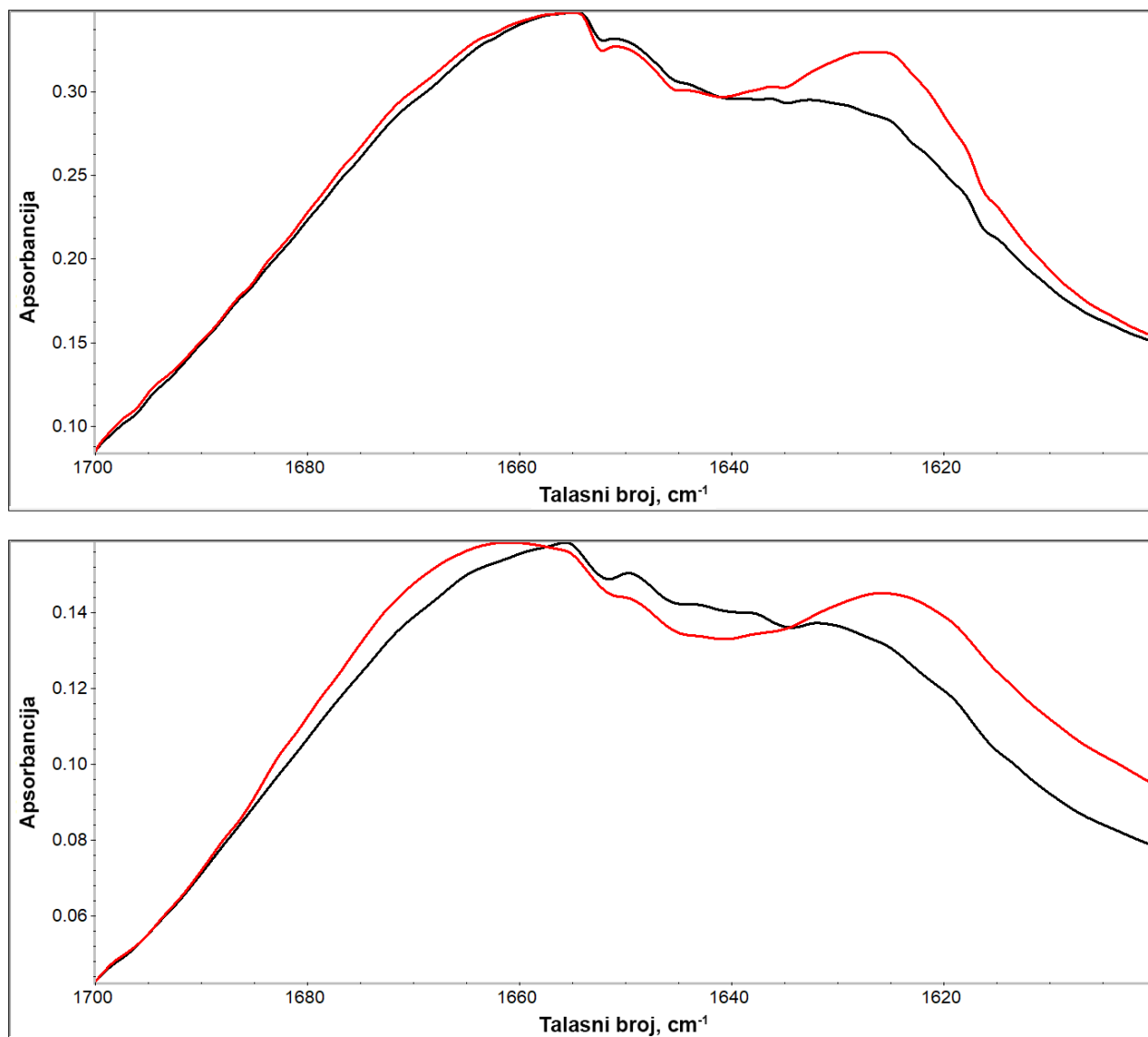
- 1) Rastvoru HCl pH 3
- 2) Rastvoru HCl pH 3 sa 355 mM  $\beta$ -merkaptoetanolom
- 3) 90% etanolu u rastvoru HCl pH 3
- 4) 90% etanolu u rastvoru HCl pH 3 sa 355 mM  $\beta$ -merkaptoetanolom.

Uzorci su inkubirani 24 h na sobnoj temperaturi uz izdvajanje alikvota koji su analizirani merenjem ThT fluorescencije i snimanjem infracrvenih spektara. Rezultati ThT fluorescencije za uzorke papaina i ficina inkubiranih u 90% rastvoru etanola prikazani su na slici 5.39. Na osnovu slike se može uočiti veliki porast fluorescencije ThT sa vremenom kod uzoraka papaina, bez obzira na prisustvo redukcionog sredstva. Intenzitet fluorescencije gotovo dvostruko raste u toku prva 4 sata inkubiranja papaina, nakon čega se ne beleži dalji porast. U slučaju ficina postoji daleko manji porast intenziteta fluorescencije u uzorcima bez redukcionog sredstva, dok u prisustvu redukcionog sredstva ne postoji pravilan trend, odnosno nakon inicijalnog porasta intenziteta fluorescencije nakon 2 h inkubiranja sledi pad do početnih vrednosti.



**Slika 5.39. Praćenje formiranja amiloida papaina i smeše ficina merenjem intenziteta fluorescencije ThT tokom 24 h inkubiranja u 90% rastvoru etanola u kiseljoj sredini: A) bez redukcionog sredstva, B) u prisustvu 355 mM  $\beta$ -merkaptoetanola.**

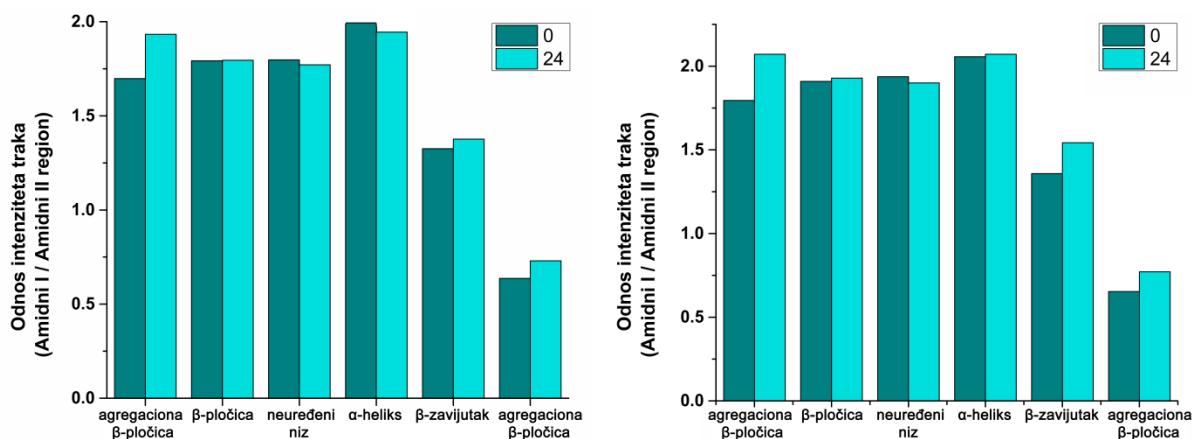
Rezultati ThT fluorescencije dobijeni za proteine inkubirane u rastvoru HCl pH 3 bez prisustva etanola prikazani su u prilogu 11 i odlikuju se delimičnim porastom intenziteta fluorescencije nakon prvog sata inkubiranja u svim uzorcima, nakon čega sledi pad ispod početnih vrednosti.



**Slika 5.40. Amidni I region ATR-FTIR spektara A) papaina i B) ficina pre i nakon 24 h inkubiranja na sobnoj temperaturi u 90% rastvoru etanola sa 355 mM  $\beta$ -merkaptetanolom.**

Rezultati dobijeni merenjem ThT fluorescencije papaina potvrđeni su metodom ATR-FTIR spektroskopije. Na slici 5.40A dati su spektri papaina inkubiranih u uslovima visoke koncentracije etanola i u prisustvu redukcionog sredstva. Detektuje se porast udela agregacione  $\beta$ -pločice na oko 1625  $\text{cm}^{-1}$ . Kod spektara ficina (5.40B) uočavaju se veoma slične promene u spektru, nasuprot rezultatima ThT fluorescencije u kojoj nije uočena značajna promena. Dalje su izračunati odnosi intenziteta traka u Amidnom I regionu i Amidne II trake (slika 5.41). Analizirane su trake karakteristične za agregacione  $\beta$ -pločice detektovane na talasnim brojevima

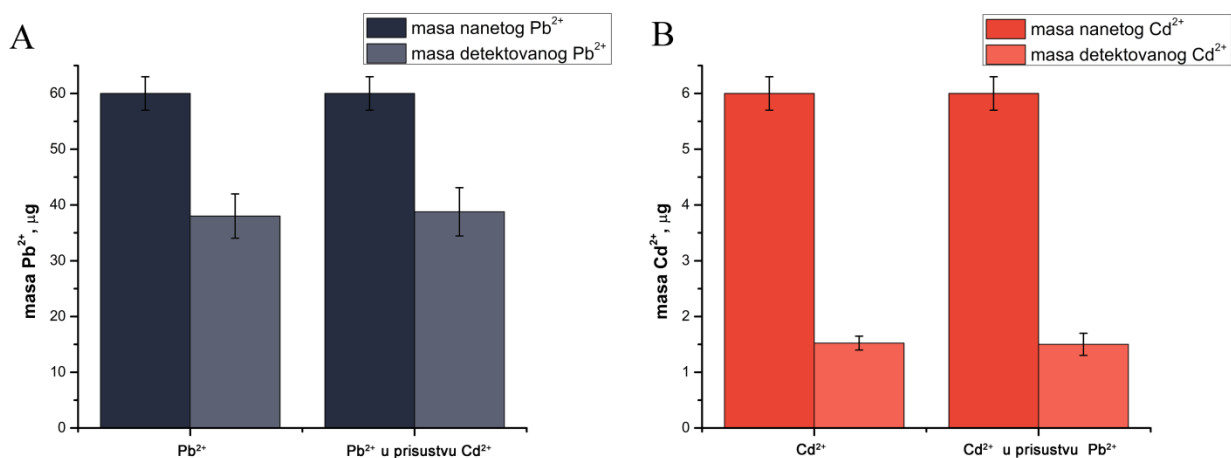
1625 i 1695  $\text{cm}^{-1}$  [95, 122], intramolekulsku  $\beta$ -pločicu (1632  $\text{cm}^{-1}$ ) [182], neuređeni niz (1641  $\text{cm}^{-1}$ ) [182],  $\alpha$ -heliks (1652  $\text{cm}^{-1}$ ) [181] i  $\beta$ -zavijutak (1680  $\text{cm}^{-1}$ ) [182]. Kod oba proteina uočava se porast u tendenciji zauzimanja agregacione  $\beta$ -pločice koji se ogleda u porastu normalizovanih intenziteta obe trake karakteristične za ovu sekundarnu strukturu. Istovremeno blago opada tendencija zauzimanja sekundarnih struktura karakterističnih za nativni papain,  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza. Takođe je zabeležen porast tendencije zauzimanja  $\beta$ -zavijutka koji je izraženiji kod ficina.



**Slika 5.41. Odnos Amidna I/Amidna II traka za uzorke A) papaina i B) ficina nakon destabilizacije ureom i inkubiranja 24 h u 90% etanolu u prisustvu  $\beta$ -merkaptetanola.**

## 5.5. Vezivanje jona teških metala za amiloidne fibrile

Ispitano je vezivanje jona teških metala za amiloidne fibrile ovalbumina. Korišćeni su rastvori olovo-acetata i kadmijum-hlorida koji su nanošeni na dehidratisane amiloidne fibrile. Nakon petominutnog inkubiranja amiloida i rastvora jona metala uz mešanje, fibrili su uklonjeni centrifugiranjem nakon čega je metodom atomske apsorpcione spektrometrije određena koncentracija metala koja je zaostala u rastvoru. Prikazani rezultati na slici 5.41 potvrđuju vezivanje jona olova i kadmijuma za amiloidne fibrile u istoj meri bez obzira na to da li je amiloidni fibril tretiran rastvorom samo jednog od metala ili istovremeno rastvorima oba metala. Preračunavanjem dobijenih rezultata na  $\mu\text{g}$  vezanog metala po  $\text{mg}$  fibrila, dobijaju se vrednosti 1,3 za olovo i 0,3 za kadmijum.



**Slika 5.41. Masa jona A) Pb<sup>2+</sup> i B) Cd<sup>2+</sup> nanetih na amiloid (tamno) i detektovana (svetlo) nakon centrifugiranja i uklanjanja fibrila.**

## 6. DISKUSIJA

Model sistemi ove studije izolovani su iz svojih prirodnih izvora ili iz komercijalnih preparata nepotpune čistoće. S obzirom na visoku zastupljenost u belancetu kokošjeg jajeta (*Gallus gallus*), ovalbumin je izolovan isključivo taložnim tehnikama do 90% homogenosti kao što je potvrđeno reverzno-faznom hromatografijom (slika 5.1). Drugi model sistem iz kokošjeg jajeta, lizozim, korišćen je kao komercijalni protein bez daljeg prečišćavanja.

Papain, cistein-proteaza iz papaje (*Carica papaya*) izolovan je hromatografskim metodama iz komercijalnog preparata u kom je dominantan protein, ali uz prisutne proteolitičke fragmente i deo neaktivnog proteina. Homogenost papaina potvrđena je detekcijom trake molekulske mase oko 24 kDa (slika 5.2), dok je aktivnost prečišćenog proteina potvrđena zimogramskom detekcijom. S obzirom na kopolimerizaciju želatina sa poliakrilamidom u pripremi gelova i na kinetičku inertnost pri uslovima denaturacije u pripremi uzoraka na nižoj temperaturi za zimogramsku detekciju [152], pozicije traka u dvema različitim elektroforetskim tehnikama se ne poklapaju. Ovakva pojava je u skladu sa opisanim ponašanjem papaina i drugih kinetički inetrnih proteina rezistentnih na SDS čija se potpuna denaturacija postiže samo zagrevanjem na veoma visokim temperaturama [195]. Kao posledica kinetičke inertnosti papaina, na elektroforetskom gelu se uočava i traka delimično denaturisane forme na poziciji od oko 50 kDa kao što je pokazano u prethodnim studijama [152].

Ficin, cistein-proteaza iz smokve (*Ficus carica*) dobijen je iz lateksa ove biljke uz prethodno uklanjanje gumastih materija centrifugiranjem i lipidnih komponenti ekstrakcijom petroletrom. Dobijena vodena frakcija koncentracije proteina 20-60 mg/mL pokazuje na elektroforetskom gelu veliki broj diskretnih traka (slika 5.2) bliskih molekulskih masa oko 24 kDa kao što je prijavljeno i u prethodnim studijama [159, 164]. Najnoviji transkriptomski podaci prijavljuju postojanje 11 ficinskih izoformi (ficini 1a-c, 2a-c, 3-5, 6a-b) u lateksu *F. carica* varijetet *Masui Dauphine* (prilog 1), dok su prijavljene 4 trodimenzionalne strukture ficinskih izoformi izolovanih iz *F. carica* varijetet *Chetoui* deponovanih u PDB bazi. Heterogen sastav lateksa potvrđen je reverzno-faznom hromatografijom, a potvrđeno je da pored različitih kultivara, različit sastav izoformi pokazuju i uzorci lateksa prikupljeni u različitom periodu sezone zrenja (prilog 2). Detektovane su razlike u broju izoformi, kao i u njihovoj relativnoj zastupljenosti između različitih uzoraka. S obzirom na pokazanu veću kazeinolitčku aktivnost u ranijim

fazama zrenja smokve [66], za preparativno razdvajanje izoformi ficina korišćen je lateks prikupljen sredinom juna. Razdvajanje je urađeno jonoizmenjivačkom hromatografijom s obzirom na jednaku masu izoformi i daleko veću razliku u pI vrednostima (prilog 1) i na prethodno prijavljene efikasne procedure razdvajanja izoformi na katjonskim izmenjivačima [159-161]. Hromatografija je urađena u kiseloj sredini (pH 5) u cilju prevencije autolize serin i cistein-proteaza usled protonovanja katalitičkih aminokiselinskih ostataka [157, 160].

Razlike u hromatogramu (slika 5.3) u odnosu na prethodno publikovane rezultate uočene su u pogledu relativne zastupljenosti frakcija, što potvrđuje veliku razliku u hromatografskom profilu ficina u zavisnosti od vremena prikupljanja lateksa kao i od kultivara. Razdvojene frakcije razlikuju se i u pogledu odnosa opšte proteolitičke i kolagenolitičke aktivnosti (tabela 5.1). Opšta proteolitička aktivnost merena naspram prirodnog supstrata kazeina koji ima široku upotrebu za merenje aktivnosti proteaza [157, 160, 196], dovodi se u vezu sa zaštitom od insekata i gljiva kao što je pokazano za papain [158]. S druge strane, želatin sa karakterističnom sekvencom Pro-Hyp-Gly korišćen je kao supstrat za procenu aktivnosti prema matriksu vezivnog tkiva [196] u čijoj hidrolizi je najpotentnija nevezana frakcija u kojoj se s obzirom na kiselu pI vrednost očekuje prisustvo prethodno opisane kolagenaze [157]. Ficinske frakcije takođe pokazuju različite nivoe želatinolitičke aktivnosti što je u skladu sa potvrdama doprinosa aktivnosti cistein-proteaza iz smokve u ukupnoj želatinolitičkoj aktivnosti [197].

Za razliku od prethodnih studija u kojima je najkiselija izoforma najefikasnije razdvojena i okarakterisana u kontekstu supstrate specifičnosti, u ovoj studiji je od detektovanih 5 pikova najbolje razdvojena najbaznija izoforma (slika 5.3) čija je čistoća potvrđena kao 85-90% reverzno-faznom hromatografijom (slika 5.4). Ova izoforma je identifikovana na osnovu rezultata peptidnog mapiranja nakon tripsinske digestije kao ficin 1c (prilog 3). Prepoznato je 14 preklapajućih peptida koji pokrivaju 48,6% sekvence, a među kojima je 7 peptida specifičnih za datu izoformu. U manjoj meri prepoznati su i peptidi ficina 1a i 3 što nije iznenađujuće s obzirom na veliki procenat identičnosti sekvenci i blisku evolucionu povezanost ovih izoformi sa izoformom ficin 1c (prilozi 4 i 5).

Identifikovana izoforma ficin 1c je okarakterisana u pogledu sadržaja sekundarnih struktura (tabela 5.2) koje ukazuju na gotovo jednaku zastupljenost  $\alpha$ -heliksa (25,6%) i  $\beta$ -pločica (23,4%). Celokupni sadržaj sekundarnih struktura, kao i njihova organizacija u trodimenzionalnu strukturu

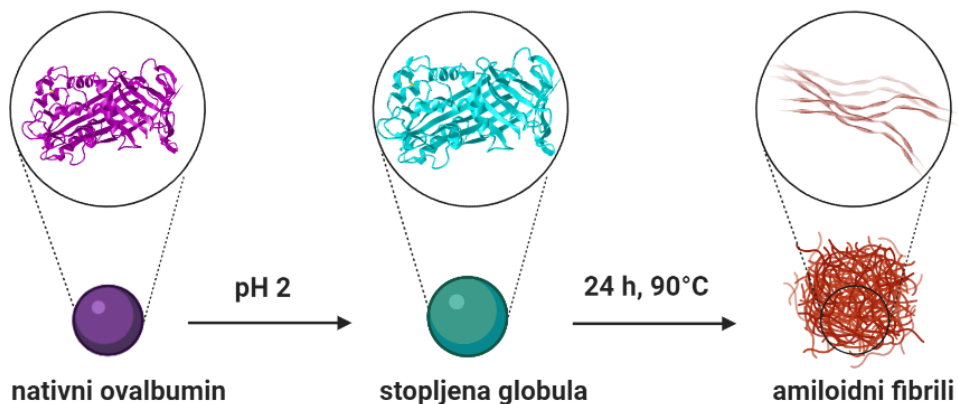


modelovanu uz pomoć Phyre2 servera, ukazuje na veliku sličnost sa poznatim 3D strukturama ficina A, B, C i D, kao i sa srodnim cistein-proteazama poput papaina (slika 5.6, prilog 4). Velika strukturna sličnost sa papainom ogleda se i u analizama stabilnosti ficina 1c u kiseljoj sredini i u prisustvu haotropna. Kao i u slučaju opisane kisele isoforme ficina [160, 174], i kod ficina 1c se u kiseljoj sredini znatno povećava izloženost hidrofobnih površina (slika 5.7), kao i u prisustvu haotropnog agensa. Slični rezultati u pogledu destabilizacije druge, neidentifikovane izoforme ficina [172] potvrđuju veću podložnost denaturaciji u prisustvu uree u kiseljoj sredini, odnosno potvrđuju formiranje stabilnog intermedijera stopljene globule na pH 3 detektovano kod kisele izoforme [160, 174]. Sličan uticaj niskih koncentracija haotropna [153, 198-200] i formiranje stopljene globule u kiseljoj sredini [175] opisani su i kod papaina. Objašnjenje sličnog ponašanja papaina, ficina 1c i ostalih opisanih izoformi ficina leži u njihovoj evolutivnoj srodnosti (prilog 5) sličnostima u 3D strukturi (slika 5.6), rasporedu domena, sadržaju sekundarnih struktura (tabela 5.2), očuvanosti hidrofobnog jezgra u pomenutim uslovima i konzervaciji ostataka cisteina koji formiraju disulfidne mostove (prilog 6).

Po izolovanju model sistema, analizirane su njihove stabilnosti i podložnost ka formiranju amiloidnih fibrila. Iako se smatra da je formiranje amiloidnih fibrila zajednička osobina svih proteina i peptida [201-203], nije veliki broj polipeptidnih lanaca prirodno uvijenih proteina od kojih su prijavljeni *in vitro* formirani amiloidi. Među model sistemima su najčešći kratki peptidi značajni i zbog svoje uloge u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja kao što su amiloid  $\beta$  i  $\alpha$ -sinuklein [3, 9]. Od polipeptida sa definisanom tercijskom strukturom u nativnom obliku, pokazano je da amiloide formiranju ovalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, humani i kokošji lizozim, insulin, i albumin humanog i goveđeg seruma [4-8, 45]. Uslovi i kinetika fibrilacije u velikoj meri variraju među različitim model sistemima. U ovoj studiji odabran je ovalbumin iz kokošnjeg jajeta kao model sistem za formiranje zrelih amiloidnih fibrila koje je potvrđeno u velikom broju studija [8, 61, 124, 204]. Ovaj protein poseduje veliki broj peptida podložnih formiranju amiloidnih agregacionih  $\beta$ -pločica kao što je pokazano uporednom analizom pomoću alata ZipperDB, Tango i Pasta (slika 5.8A). Ovi alati koriste različite pristupe i predstavljaju smernicu sa često lažno pozitivnim rezultatima s obzirom da nijedan nije u potpunosti precizan i imaju ograničenja u pogledu specifičnosti i osetljivosti [180]. Peptidi prepoznati ZipperDB metodom koja se zasniva na fitovanju aminokiselinske sekvence u poznatu amiloidnu strukturu karakterističnu za sekvencu NNQQNY, nalaze se u različitim regionima koji imaju sekundarne

strukture  $\alpha$ -heliksa,  $\beta$ -pločice, ali i neuređenog niza u nativnom ovalbuminu (slika 5.8B). Kako je ovalbumin jedan od proteina sa veoma dobro okarakterisanim procesom fibrilacije [61, 125] peptidi koji u najvećoj meri doprinose formiranju amilodnih fibrila i predstavljaju okosnicu ove monotone uređene strukture su i eksperimentalno određeni. Ovi peptidi (slika 5.8C) delovi su dve antiparalelene  $\beta$ -pločice i jednog  $\alpha$ -heliksa [8]. Eksperimentalno potvrđena sklonost ovog proteina da u kiseljoj sredini za kratko vreme koje se meri u danima gradi amiloide fibrile iskorićena je u ovoj studiji za razvijanje model sistema brzo-fibrilirajućeg proteina za analizu zrelih fibrilnih formi i razvijanje metodologije za njihovo detektovanje.

Snimanjem krive denaturacije ovalbumina u kiseljoj sredini UV spektroskopijom detektovano je stanje intermedijera stabilnog u opsegu 60-80°C (prilog 7) koji odgovara opisanom stanju stopljene globule favorizovane u kiseljoj sredini [119-121]. Upravo kisela sredina koja vodi stanju stopljene globule dovodi do građenja amiloidnih fibrila pri povišenoj temperaturi, kao što je prijavljeno u velikom broju studija [61, 122-124]. Kombinacija ovih uslova primenjena je i u ovoj studiji sa ciljem optimizacije kratkog protokola za formiranje zrelih fibrila ovalbumina (slika 6.1).



**Slika 6.1. Shema građenja amiloidnih fibrila ovalbumina.**

Nativan protein je u kiseljoj sredini preveden u intermedijarno stanje stopljene globule koje je rastvorno u ekstremnim uslovima pH 2. Intermedijer je dalje preveden u stanje amiloidnih fibrila inkubiranjem na temperaturi 90°C. Prelaz sa stanja stopljene globule na stanje zrelih fibrila u slučaju ovalbumina dešava se u primenjenim uslovima veoma brzo kao što je potvrđeno profilom

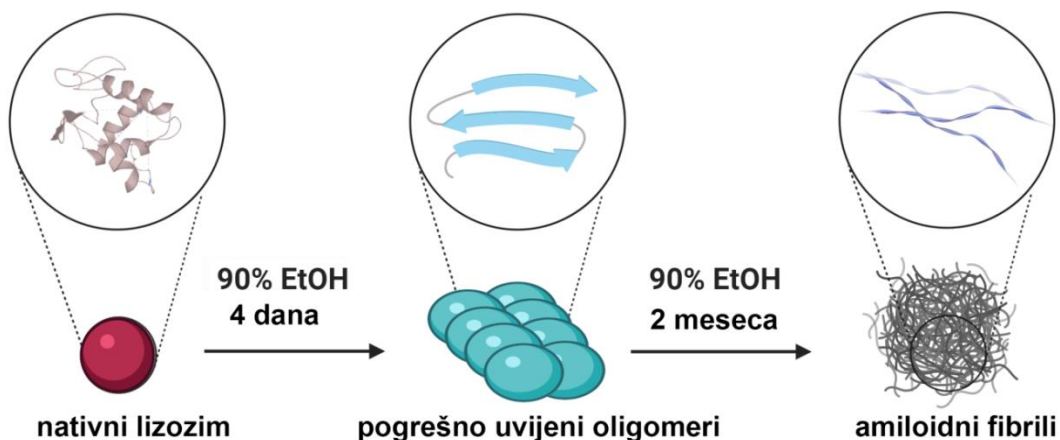
ThT fluorescencije koji je opisan hiperbolom i samim tim izostankom lag faze (slika 5.9A) [125, 205]. Porast ThT fluorescencije je indikator formiranja amiloidnih fibrila sa najučestalijom primenom s obzirom na visok stepen specifičnosti prema amiloidnoj formi agregata. S obzirom na to da ThT pokazuje veoma nisku specifičnost prema intermedijarnim formama na putu građenja amiloidnih fibrila [58], nagli porast fluorescencije ukazuje na formiranje fibrila već nakon dva sata inkubiranja. Kao dokaz prisustva zrele fibrilne forme uzet je ulazak u plato ThT fluorescencije. Paralelno sa porastom ThT fluorescencije, tokom prva dva sata zabeležen je veliki porast u izloženosti hidrofobnih površina (slika 5.9B). Jansen i saradnici su prethodno publikovali studiju u kojoj je pokazano da je fibrilacija ovalbumina na povišenoj temperaturi praćena negativnom hidratacijom koja povećava izloženost hidrofobnih površina i posledično ANS fluorescenciju [206] što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije. Nakon 4 sata inkubiranja ThT fluorescencija ulazi u plato, dok ANS fluorescencija beleži pad ukazujući na hidrofobnu stabilizaciju dobijenih fibrila detektovanu u periodu 16-24 h [187, 207, 208]. Formiranje zrelih fibrila nakon 24 sata inkubiranja, pokazano pojavom platoa u profilu ThT fluorescencije, potvrđeno i metodom AFM mikroskopije (slika 5.10) sa kriterijumom od 100 nm dužine za zrelu fibrilnu formu [58].

Kao dodatna potvrda formiranja zrelih fibrila rezistentnih na SDS na povišenoj temperaturi detektovane su proteinske trake velike molekulske mase na granici između gelova za razdvajanje i koncentrovanje u SDS PAG elektroforezi (slika 5.11) kao što je pokazano i u prethodnim studijama [3, 209, 210]. Pojava ove trake praćena je gubitkom trake monomernog proteina. U toku prva dva sata rastvorni monomerni oblik se nalazi u ravnoteži sa fibrilima koji su detektovani na granici gelova za razdvajanje i koncentrovanje [56]. Pored ovih karakteristika, u gelu se uočava veliki broj traka koje nisu jasno definisane, što se može objasniti fragmentacijom ovalbumina u uslovima pH 2 i povišene temperature kao što je predloženo u radu koji su publikovali Lara i saradnici [61]. Kombinacija ekstremnih destabilizujućih faktora omogućila je fibrilaciju ovalbumina u roku od 24 sata što je najkraće do sada prijavljeno vreme za formiranje zrelih fibrila. Ovako brzo formiranje fibrila postignuto u ovoj studiji čini ovalbumin pogodnim model sistemom za mapiranje promena sekundarnih struktura prilikom formiranja zrelih fibrila infracrvenom spektroskopijom.

Kao drugi model sistem za praćenje amiloidogeneze korišćen je lizozim čija je fibrilacija potvrđena pri različitim uslovima [131-133, 138, 139]. Veliki deo sekvence procenjen je kao sklon građenju amiloidnih fibrila (slika 5.20), a eksperimentalno je potvrđeno da je u centru formiranja amiloidnih fibrila kratka  $\beta$ -pločica [62].

Za razliku od ovalbumina, formiranje amilodinih fibrila lizozima je spor proces čija brzina zavisi od spore nukleacije i za koji je pokazano da u uslovima visoke koncentracije etanola traje i do 2 meseca [140, 141]. Slika 6.2. daje shematski prikaz uslova fibrilacije primenjenih u ovoj studiji koji su zasnovani na prethodno opisanim fazama fibrilacije lizozima [139-141]. Promene uočene tokom destabilizacije lizozima u uslovima 90% etanola na sobnoj temperaturi podrazumevaju prisustvo stabilnih oligomernih intermedijera koji su detektovani u početnim danima inkubiranja kao što je pokazano i u detaljnoj studiji kinetike fibrilacije lizozima [140]. Pokazano je da su intermedijarne forme koje se javljaju u lag fazi detektovane sve do 5-9 dana inkubiranja u pojedinačnim eksperimentima. Kako je u ovoj studiji definisana uloga lizozima kao model sistema za utvrđivanje metodologije za detekciju oligomernih intermedijera na putu fibrilacije proteina i mapiranje finih strukturnih promena koje vode formiranju oligomera i zrelih fibrila, posebna pažnja je posvećena analizi uzoraka dobijenih tokom prvih 4 dana u destabilizujućim uslovima s obzirom da je pokazano da je to period lag faze fibrilacije lizozima koja je opisana sigmoidnom krivom [140]. Osim toga, analiziran je i potpuno nativan uzorak lizozima u vodenom rastvoru, kao i potpuno amiloidni uzorak u cilju komparativne analize uočenih promena kod oligomera i zrelih fibrila. Upravo poređenjem sa amiloidnim uzorkom koji dovodi do velikog porasta ThT fluorescencije, u ovoj, kao i u drugim studijama [140, 142] uočava se da se ona ne menja značajno tokom prvih 4 dana inkubiranja (slike 5.21) odnosno da praćenje ThT fluorescencije nije pogodna metoda za detekciju oligomera [58]. ANS fluorescencija, za razliku od primera ovalbumina, kontinuirano raste sve do pojave zrelih fibrila (slika 5.22) što nije neobično s obzirom na uslove fibrilacije sa visokom koncentracijom etanola koji podrazumeva smanjenu polarnost okoline i time sprečava hidrofobni kolaps [211] za dodatnu stabilizaciju fibrila koji je kod ovalbumina uočen padom ANS fluorescencije u periodu 16-24 sata inkubiranja. Izostanak porasta kako ThT tako i ANS fluorescencije (slike 5.21B i 5.22B) u početnom stadijumu koji odgovara lag fazi fibrilacije razlikuje kinetiku fibrilacije lizozima od kinetike fibrilacije uočene kod ovalbumina. Finalno, prisustvo oligomera u uzorku inkubiranom 4 dana potvrđeno je mikroskopijom atomskih sila. Ova metoda je značajna u analizi kako zrelih fibrila

[140, 212] tako i oligomernih stanja [100, 213, 214]. Na slici 5.23. uočeno je postojanje ravnoteže između fibrilnih formi različitog prečnika i dužine koji se ne mogu svrstati u zrele fibrile koje karakteriše dužina od 100 nm i prečnik oko 10 nm [58]. Po morfologiji i dimenzijama, dominantne forme lizozima predstavljaju oligomerne intermedijere pogrešnog uvijanja što potvrđuju mikroskopije prijavljene u procesu fibrilacije kako lizozima [99], tako i ataksina [100].



**Slika 6.2. Shematski prikaz fibrilacije lizozima u 90% etanolu.**

Po uspostavljanju model sistema zrelog fibrila i oligomernih intermedijera čije je prisustvo potvrđeno standardnim tehnikama (AFM i merenje ThT fluorescencije) urađena je sistematska analiza infracrvenih spektara ovalbumina i lizozima u cilju mapiranja finih strukturnih promena na putu formiranja amiloidnih fibrila. ATR-FTIR ima veliki značaj u analizi sekundarnih struktura proteina. Ova metoda ima veliku prednost nad ostalim metodama u radu sa nerastvornim uzorcima kao što su membranski proteini, amiloidni i drugi agregati koji nisu pogodni za analizu ostalim spektroskopskim metodama. Pored toga, ova metoda ima veliku prednost u diskriminiranju između intramolekulske i intermolekulske – agregacione  $\beta$ -pločice što je posebno značajno kod model sistema koji u sastavu sekundarnih struktura u nativnom stanju imaju  $\beta$ -pločice, kao što je slučaj sa model sistemima ove studije.

Infracrveni spektri su analizirani kako u kvalitativnom, tako i u kvantitativnom pogledu simultanom analizom Amidnog I, Amidnog II i Amidnog III regiona (slike 5.12 i 5.24) koji

oslikavaju konformaciju i okruženje polipeptidne kičme odnosno amidnih veza koje je održavaju [111] i u kojima se mogu detektovati promene konformacije proteina.

Amidni I region se proteže u opsegu  $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  i predstavlja region u IR spektru proteina sa najvećom osetljivošću za analizu sekundarnih struktura. Trake u ovom regionu su posledica C=O istežućih vibracija peptidne veze sa manjim uticajem CN istežućih vibracija van ravni, CCN deformacionih vibracija i NH savijanja u ravni [111]. Svaka sekundarna struktura doprinosi apsorpciji u definisanom opsegu talasnih brojeva, te izgled spektra u Amidnom I regionu pruža detaljan uvid u konformaciono stanje polipeptidne kičme. Drastične promene u sadržaju sekundarnih struktura uočene su i prilikom fibrilacije ovalbumina (slika 5.13) i prilikom formiranja, kako oligomera, tako i zrelih fibrila lizozima (slika 5.25). Dominantne sekundarne strukture ovih formi proteina su agregacione intermolekulske  $\beta$ -pločice. Najintenzivnija traka karakteristična za agregacione  $\beta$ -pločice nalazi se u opsegu talasnih brojeva  $1611\text{ cm}^{-1}$  [215] i  $1628\text{ cm}^{-1}$  [5] kod različitih proteina. Kod ovalbumina detektovana je na poziciji  $1625\text{ cm}^{-1}$ , dok je kod lizozima položaj ove trake na  $1620\text{ cm}^{-1}$ . Pored trake agregacione  $\beta$ -pločice niske frekvencije, detektovana je i traka agregacione  $\beta$ -pločice visoke frekvencije kod oba proteina, na pozicijama  $1695\text{ cm}^{-1}$  za ovalbumin i  $1698\text{ cm}^{-1}$  za lizozim. Intenziteti ovih traka rastu na račun pada intenziteta traka sekundarnih struktura karakterističnih za nativno stanje. Položaj traka različitih sekundarnih struktura u velikoj meri varira između različitih proteina [188] kao i između različitih konformacionih stanja jednog proteina [37, 216]. Iz tog razloga su pozicije traka sekundarnih struktura određivane precizno na osnovu drugih izvoda spektara (slike 5.14 i 5.26). Položaji maksimuma određeni na ovaj način iskorišćeni su za detaljniju kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Detaljnija kvalitativna analiza ukazuje na to da sadržaj agregacione  $\beta$ -pločice raste na račun smanjenja sadržaja  $\alpha$ -heliksa, intramolekulske  $\beta$ -pločice i neuređenog niza, kako kod ovalbumina, tako i kod lizozima. Kvalitativne promene sa izraženim  $\beta$ -pomerajem detektovane u spektru ovalbumina slažu se sa drugim studijama koje su pokazale gubitak sekundarnih struktura karakterističnih za nativni ovalbumin, kako u uslovima visoke temperature [8, 61], tako i prilikom fibrilacije ovalbumina u prisustvu acetonitrila i trifluorosirćetne kiseline [208, 217]. Kod lizozima, uz razlike u položaju karakterističnih traka, sličan trend promene je utvrđen prilikom formiranja oligomera kod kojih je intenzitet traka koje odgovaraju  $\alpha$ -heliksu i neuređenom nizu značajno smanjen, dok se pozicija  $\beta$ -pločice pomera ka nižim talasnim brojevima budući da je u oligomernom stanju dominantno intramolekulska [99].

U slučaju analize spektara lizozima u Amidnom I regionu uočena je velika sličnost između spektara oligomera detektovanih tokom prvih 4 dana inkubiranja i spektra zrelog amiloida. Preklapajući spektri ukazuju na promenu gotovo svih sekundarnih struktura sa destabilizacijom lizozima u prisustvu 90% etanola u toku prvih par dana. Pojava traka agregacionih  $\beta$ -pločica zajedno sa rezultatima mikroskopije atomskih sila ukazuje na postojanje intermedijera amiloidne fibrilacije. Ovako značajne promene u Amidnom I regionu čine ATR-FTIR pogonom metodom za detekciju oligomera. Slični rezultati pokazani su u studiji fibrilacije lizozima u kiseloj sredini gde je takođe uočeno veliko preklapanje spektara oligomera i zrelih fibrila [99, 218].

Pored utvrđivanja pozicija traka, drugi izvod ima značajnu ulogu u poređenju spektara i kvalitativnoj potvrdi promena u sadržaju sekundarnih struktura, ali i kvantitativnom utvrđivanju ovih razlika na osnovu korelacionog koeficijenta između drugih izvoda različitih spektara. Korelacioni koeficijenti drugih izvoda ključnih spektara prikupljenih tokom fibrilacije i spektara nativnih ovalbumina i lizozima dati u tabelama 5.3 i 5.6 ukazuju na visok stepen transformacije proteina u pogledu sadržaja sekundarnih struktura s obzirom na korelacione koeficijente od oko 0,65 kod lizozima i 0,13 kod ovalbumina dobijne prilikom poređenja nativnog i amiloidnog uzorka. Ipak, ovaj vid kvantitativne analize daje samo dopunu kvalitativne analize Amidnog I regiona.

Pomeranjem ka nižim talasnim brojevima nailazi se na Amidni II region u opsegu  $1500-1600^{-1}$  koji nastaje kao posledica NH savijanja u ravni i CN istežućih vibracija [111, 191, 219]. Ovaj region je daleko manje osetljiv na promene u sadržaju sekundarnih struktura. U Amidnom II regionu, promene u spektru ne oslikavaju promene u sadržaju sekundarnih struktura, ali javljaju se kao posledica izmene vodonik-deuterijum [108-110]. U slučaju ove izmene mogu se detektovati pomeraji od oko  $100\text{ cm}^{-1}$  [108] što nije detektovano ni u spektrima ovalbumina, ni u spektrima lizozima. Mali uticaj promena u sekundarnim strukturama na vibracije odgovorne za Amidnu II traku čine ovaj region pogodnim internim standardom za poređenje intenziteta traka u Amidnom I regionu između različitih uzoraka, kao što je prijavljeno u prethodnim studijama [152, 219, 220]. Prilikom fibrilacije ovalbumina uočene su veoma male razlike između spektara u Amidnom II regionu (slika 5.15) sa pozicijom maksimuma između  $1535$  i  $1540\text{ cm}^{-1}$ . U spektrima lizozima (slika 5.27), usled velike promene polarnosti okruženja, u Amidnom II

regionu je uočen pomeraj u odnosu na potpuno nativni uzorak, ali ova promena se na položaj maksimuma odražava neznatno (1550 do 1540  $\text{cm}^{-1}$ ).

Za razliku od Amidnog II regiona, Amidni III region (1200–1350  $\text{cm}^{-1}$ ) oslikava promene u sadržaju sekundarnih struktura. Posledica je kombinacije NH savijanja i CN istežućih vibracija, uz manji doprinos C=O savijanja u ravni i CC istežućih vibracija [111, 193]. Ove vibracije su u većoj meri konformaciono zavisne. Značaj ovog regiona ipak umanjuje niska apsorbancija u odnosu na Amidni I i Amidni II region. Ovaj nedostatak ima manji značaj kod uzoraka proteina visoke koncentracije kao što je slučaj sa uzorcima korišćenim za formiranje amiloidnih fibrila u ovoj studiji, s obzirom na koncentraciju proteina 6 mg/mL. Iz ovog razloga i s obzirom na velike promene u sadržaju sekundarnih struktura, prilikom građenja amiloida uočavaju se značajne promene u Amidnom III regionu (slike 5.16 i 5.28). Kvalitativno gledano, promene u ovom regionu deluju izraženije od promena u Amidnom I regionu. Ipak, analiza Amidnog I regiona pruža mogućnost diskriminiranja između intermolekulske i intramolekulske  $\beta$ -pločice karakteristične za native forme. Zbog veće osetljivosti i traka sekundarnih struktura sa izraženim maksimumima, Amidni I region pruža i dodatnu mogućnost za kvantitativno praćenje promena sekundarnih struktura tokom procesa fibrilacije. Kod Amidnog III regiona, neke od sekundarnih struktura prepoznate su kao lokalni minimumi u spektru pa je proces razlaganja na pojedinačne komponente za kvantitativnu analizu znatno otežan.

U Amidnom I regionu metoda dekonvolucije spektra na pojedinačne konstituente je moguća i često primenjena za određivanje sadržaja sekundarnih struktura kako nativnih proteina [100], tako i nenativnih [37, 221] formi, uključujući i amiloidne fibrile [97, 191, 222, 223]. Nedavno je publikovana studija u kojoj je dekonvolucija Amidnog I regiona korišćena za procenu sadržaja sekundarnih struktura ataksina-3 u nativnom stanju i za razlikovanje od termalno tretiranog uzorka čija je amiloidna forma potvrđena različitim metodama [95]. S obzirom na zahtevnu tehniku dekonvolucije i postupak dodeljivanja traka sekundarnim strukturama, mali broj studija se bavi određivanjem sadržaja sekundarnih struktura u tretiranim uzorcima ovom metodom [97]. U ovoj studiji metoda dekonvolucije je primenjena na većem broju uzoraka prikupljenih na putu amiloidne fibrilacije. Pojedinačni pikovi, dobijeni razlaganjem brojnih uzoraka, razlikuju se kako u pogledu površine, tako i u pogledu položaja maksimuma. U pojedinim uzorcima pojavljuju se nove trake, odnosno neke od traka izostaju kao što je prikazano tabelama 5.4 i 5.7. Udeo



površine svakog od razloženih pikova u ukupnoj površini Amidnog I regiona korišćen je kao podatak o procentu sadržaja date strukture. S obzirom na pojavljivanje nekoliko traka koje odgovaraju istoj sekundarnoj strukturi, sadržaj sekundarnih struktura je dobijen sabiranjem udela površina ispod odgovarajućih pikova (tabele 5.5 i 5.8). Prikazani rezultati dekonvolucije kako nativnog ovalbumina, tako i lizozima poklapaju se sa rezultatima difrakcije X-zraka kristalizovanih proteina. Brzi prelaz u amiloidnu formu kod ovalbumina praćen je dramatičnom promenom u sadržaju sekundarnih struktura (slika 5.17) tako da se u uzorku inkubiranom 24 sata na 90°C 33% polipeptidne kičme nalazi u konformaciji agregacione  $\beta$ -pločice, dok preostalih 67% zauzima prolazne konformacije. Kako je poznato da se amiloidni fibrili isključivo sastoje iz  $\beta$ -pločica [10], postojanje značajnog procenta drugih sekundarnih struktura sugerise na ukupan prinos fibrilacije. Naime, prethodne studije na model sistemu lizozima pokazale su da delovi primarne strukture koji nisu podložni fibrilaciji mogu hidrolizovati [97] što objašnjava fragmentaciju uočenu u SDS PAGE analizi agregata ovalbumina, kao i u prethodno publikovanoj studiji [61]. Za razliku od procenta  $\alpha$ -heliksa i intramolekulske  $\beta$ -pločice koje se gube u korist formiranih intermolekulskih  $\beta$ -pločica, neuređene strukture nisu narušene značajno (slika 5.17). Bioinformatička analiza velikog broja raznorodnih proteina i njihovih amiloidogenih sekvenci pokazala je da upravo ovakvi regioni često nisu skloni fibrilaciji odnosno da je sekvenca neuređenih regiona na površini proteina izmenjena kao vid evolutivne zaštite proteina od agregiranja [180].

U slučaju lizozima,  $\alpha$ -heliks kao dominantna sekundarna struktura nativnog lizozima u najvećoj meri se gubi prilikom građenja oligomera i zrelog amiloida (tabela 5.8). Veoma slične promene u sadržaju sekundarnih struktura utvrđene su metodom dekonvolucije FTIR spektara u studiji fibrilacije lizozima u kiseloj sredini na povišenoj temperaturi [98]. Kao i u pomenutoj studiji, razlika između nativnog i amiloidnog lizozima podrazumeva porast agregacione  $\beta$ -pločice za oko 30%, pad neuređenog niza za oko 10% i heliksa za oko 20%. U uslovima visoke koncentracije etanola, CD spektroskopija je primenjena za određivanje sadržaja sekundarnih struktura u studiji koju su publikovali Goda i saradnici [142]. Ukupne promene u sadržaju  $\beta$ -pločice (20%) nakon 24 h inkubiranja su slične kao u ovoj studiji (26%). Bez obzira na ovu sličnost, postoje velike razlike u rezultatima dobijenim CD spektroskopijom nativnog lizozima i podataka dobijenih na osnovu difrakcije X-zraka, cirkularnog dihiroizma sa sinhrotronom radijacijom [126, 128] i infracrvene spektroskopije prikazane u ovoj studiji koji se međusobno dobro poklapaju.

Zahtevna metoda dekonvolucije FTIR spektara nije pogodna za analizu velikog broja uzoraka. Iz tog razloga je razvijena brža i jednostavnija metoda za kvantitativno praćenje tendencije formiranja agregacionih  $\beta$ -pločica tokom fibrilacije. U postupku dekonvolucije se površina ispod pojedinačnih pikova normalizuje u odnosu na ukupnu površinu Amidnog I regiona kako bi se dobio procentualni podatak o sadržaju sekundarnih struktura uporediv između različitih uzoraka. Metoda koja je predložena ovom studijom je poređenje intenziteta značajnih traka u Amidnom I regionu normalizovanih u odnosu na Amidnu II traku. Uvođenjem ovog internog standarda dobija se matematički jednostavniji model za kvantitativno praćenje tendencije zauzimanja sekundarnih struktura [3, 209, 210], ali bez mogućnosti određivanja njihovog tačnog procenta.

U cilju primene obe metode za praćenje kinetike fibrilacije upoređeni su kvantitativni podaci dobijeni merenjem intenziteta ThT fluorescencije sa podacima o sadržaju agregacionih  $\beta$ -pločica utvrđenih dekonvolucijom, odnosno sa podacima o tendenciji njihovog formiranja u uzorcima ovalbumina (slike 5.18 i 5.19). Odvojeno su praćene trake agregacione  $\beta$ -pločice niske ( $1625\text{ cm}^{-1}$ ) i visoke frekvencije ( $1695\text{ cm}^{-1}$ ) obema metodama. Korelacija je potvrđena kod sva četiri praćena trenda, sa različitim vrednostima korelacionih koeficijenata. Sve četiri krive potvrđuju kinetiku opisanu hiperbolom porasta ThT fluorescencije sa vremenom inkubiranja ovalbumina na povišenoj temperaturi (slika 5.9). I kod krivih koje prate porast agregacione  $\beta$ -pločice maksimum se dostiže već na oko 4 sata inkubiranja. Korelacioni koeficijenti dobijeni za metodu dekonvolucije (0,75326 i 0,64092) daleko su manji od korelacionih koeficijenata dobijenih prilikom praćenja normalizovanih traka agregacione  $\beta$ -pločice u Amidnom I regionu (0,93354 i 0,95489). Ovakvi rezultati ukazuju na veću relevantnost metode praćenja odnosa Amidne I i Amidne II trake za kvantitativno praćenje formiranja amiloidnih fibrila brzo-fibrilirajućeg model sistema ovalbumina. Prilikom formiranja oligomernih intermedijera sporo-fibrilirajućeg lizozima, ovakva korelacija izostaje u početnim fazama fibrilacije (slika 5.29 i prilog 10) što je očekivano s obzirom na nizak afinitet tioflavina T prema oligomernom stanju [58]. Odnos Amidnih I i Amidnih II intenziteta pruža bolji uvid u formiranje oligomera od ThT fluorescencije, koji se na osnovu informacije o tendenciji zauzimanja agregacione  $\beta$ -pločice formiraju gotovo trenutno po promeni polarnosti rastvarača.

Uspostavljena metodologija za jednostavnu detekciju kako zrelih fibrila, tako i oligomera, iskorišćena je za ispitivanje potencijala papaina i ficina za građenje amiloidnih fibrila. Ispitana je

stabilnost papaina, ficina 1c i smeše izoformi ficina u različitim destabilizujućim uslovima u cilju pretrage uslova za potencijalno amiloidno agregiranje proteina. Bioinformatičkim metodama pokazano je da oba proteina imaju nekoliko peptida sa tendencijom građenja amiloida (slike 5.30A i 5.31) za koje je na primeru papaina pokazano da su uglavnom delovi  $\alpha$ -heliksa (slika 5.30B).

Sličnosti u stabilnosti ficina 1c i papaina potvrđene su snimanjem fluorescentnih spektara proteina u uslovima rastuće koncentracije uree do 2 M. U eksperimentu su poređene stabilnosti papaina, ficina 1c i smeše ficina (slika 5.32) i pokazano je da je uticaj uree na papain i ficin 1c potpuno isti dok smeša ficina pokazuje nešto veću stabilnost. Razlika u stabilnosti smeše i pojedinačnih polipeptida ogleda se u postepenim strukturnim perturbacijama smeše sa porastom koncentracije uree, dok su kod papaina i ficina 1c izražene značajne perturbacije ogledane u porastu intenziteta emisije već pri 0,4 M koncentraciji uree. Ova potvrda sličnog ponašanja ficina 1c i papaina pri destabilizujućim uslovima, odnosno velike razlike kod smeše ficina, dovela je do razdvajanja dva definisana model sistema – papaina kao pojedinačnog polipeptidnog lanca i smeše divergentnih polipeptida – ficina. Stabilnost ova dva model sistema u različitim uslovima ispitivana je višestrukim pristupom – biohemijski: praćenjem inaktivacije odnosno gubitka aktivnosti u različitim destabilizujućim uslovima i biofizički: praćenjem strukturnih promena snimanjem fluorescentnih i infracrvenih spektara.

Merenje pH stabilnosti papaina naspram smeše ficina je potvrdilo da je smeša ficina stabilnija kako u baznim, tako i u kiselim uslovima sve do pH 2 kada oba proteina gube aktivnost (slika 5.33) s obzirom na dokazano narušavanje njihove tercijarne strukture [174, 224]. Tako je odabrana kisela sredina pH 3 u kojoj je već opisano stanje stopljene globule model sistema [174, 175], s obzirom ulogu stoljene globule na putu amiloidne fibrilacije proteina i na izražene razlike u stabilnosti papaina i smeše ficina na ovoj pH vrednosti.

S obzirom na opisanu kinetičku barijeru u denaturaciji papaina [195], na odabranoj pH vrednosti 3,2 ispitana je kinetika inaktivacije, kako papaina, tako i smeše ficina (slika 5.35). Utvrđeno je da je energija aktivacije za termalnu inaktivaciju papaina daleko niža ( $184 \pm 8$  kJ/mol) od energije aktivacije za isti proces kod ficina ( $208 \pm 3$  kJ/mol). Razlike između ovih vrednosti su u mnogo većoj meri izražene u odnosu na vrednosti prijavljene za inaktivaciju ovih proteina u neutralnoj sredini (papain 214 i ficin 210 kJ/mol) [171].

Razlike u stabilnosti potvrđene su konstruisanjem krivih termalne inaktivacije (slika 5.34) u kojima se uočava da je najveća razlika u stabilnosti između papaina i smeše ficina na niskim temperaturama. Gubitak 16% aktivnosti papaina na oko 0°C je u saglasnosti sa spektroskopskim rezultatima gubitka 15% native strukture usled denaturacije na niskim temperaturama i strukturnih promena u korist intramolekulskih  $\beta$ -pločica i formiranja agregata [152].

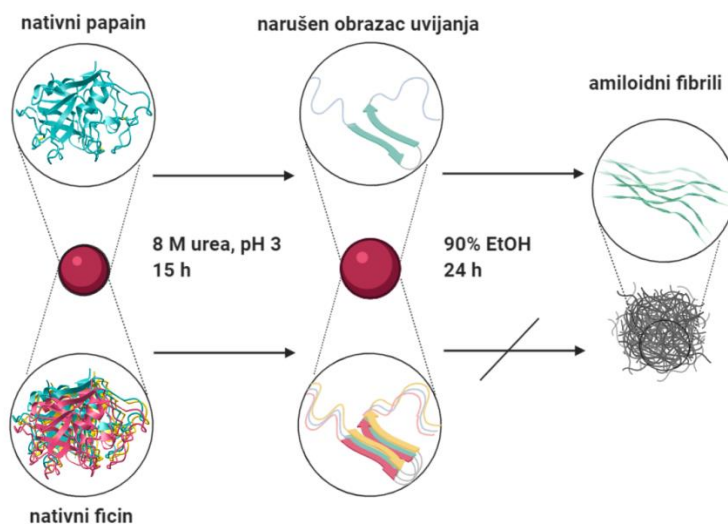
Pomenuti rezultati doveli su do formulisanja uslova za ispitivanje tendencije formiranja amiloda papaina i smeše ficina u kiselj sredini (pH 3,2), na sniženoj temperaturi (4°C) bez prisustva etanola i u prisustvu etanola kao dodatnog destabilizatora u koncentraciji 5% odnosno 12%.

Pokazalo se da su rezultati u saglasnosti sa prethodno pokazanom stabilizacijom smeše ficina u odnosu na pojedinačni polipeptid – papain. Potvrđeno je postojanje intermedijera u kiselj sredini stabilnog između 150 i 500 sati inkubiranja na 4°C, sa 90% rezidualne aktivnosti kod ficina, odnosno 70% rezidualne aktivnosti kod papaina (slika 5.36). Visok stepen rezidualne aktivnosti intermedijera u ovoj studiji nije neobičan s obzirom na prethodno prijavljene rezultate, kako ANS fluorescencije kojom je potvrđeno očuvanje elemenata native strukture [174, 175, 224, 225], tako i aktivnosti koja je u velikoj meri očuvana u stanju stopljene globule papaina i ficina [174, 224]. Nakon 500 sati inkubiranja, aktivnost oba proteina opada značajno i iznosi 20-30% rezidualne aktivnosti za papain, zavisno od koncentracije etanola i oko 60% za ficin, bez obzira na koncentraciju etanola. Snimanjem IR spektara uzoraka inkubiranih 3 nedelje potvrđeno je agregiranje u uzorcima kod kojih je pokazan veliki gubitak aktivnosti od oko 70-80% (slika 5.36). U slučaju papaina, izraženiji pad rezidualne aktivnosti u uzorcima inkubiranim u prisustvu etanola korelira sa izraženijim porastom zastupljenosti agregacione  $\beta$ -pločice i zavijutka, uz smanjenje udela  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza (tabela 5.10). Pored porasta u sadržaju agregacionih  $\beta$ -pločica, agregiranje je potvrđeno i rezultatima gel filtracije (slika 5.37). Uočene promene u skladu su sa literaturom koja potvrđuje promenu sekundarnih struktura usled denaturacije na niskim temperaturama uzrokovane skladištenjem proteina na 4°C. Ove promene obično se ogledaju u intenzivnom gubitku neuređenog niza i  $\alpha$ -heliksa uz očuvanje intramolekulske  $\beta$ -pločice i pojavu agregacione  $\beta$ -pločice [37, 221, 226]. Takođe, uočene promene su u skladu sa pokazanom razlikom u stabilnosti između  $\alpha$  i  $\beta$  domena papaina. Naime pokazano je da je  $\alpha$ -helikoidni domen podložniji denaturaciji i agregiranju, kako na povišenoj temperaturi, tako i prilikom zamrzavanja i odmrzavanja [37, 152].

U slučaju ficina, kao što je i rezidualna aktivnost očuvana, očuvan je i sadržaj sekundarnih struktura budući da su uočene veoma male razlike u spektrima pre i posle tronedeljnog inkubiranja. Razlike nisu uočene ni u elucionim zapreminama detektovanim gel filtracijom (slika 5.37). Izostanak agregacione  $\beta$ -pločice dovodi do očuvanja, kako strukture, tako i aktivnosti smeše ficina nakon produženog skladištenja na niskim temperaturama (tabela 5.10, slika 5.36). Ovakvi rezultati potvrđuju hipotezu da je smeša ficina, s obzirom na prisustvo većeg broja izoformi, u manjoj meri podložna formiranju agregaciono-specifične  $\beta$ -pločice u odnosu na papain. Za prečišćenu izformu ficina označenu kao ficin A pokazano je da je podložna građenju agregata bogatih  $\beta$ -pločicama na sobnoj temperaturi u prisustvu inhibitora [161]. Izostanak nenativnog agregiranja u slučaju smeše izoformi ficina verovatno je posledica snižene sposobnosti polipeptida sa različitim sekvencama da formiraju nukleuse agregiranja. Rezultati ispitivanja stabilnosti smeše ficina i papaina na 4°C ukazuju na veću rezistenciju smeše proteina divergentnih sekvenci na denaturaciju na niskim temperaturama i agregiranje pri niskoj koncentraciji etanola. Postoje studije koje govore u prilog povećanoj stabilnosti proteina u prisustvu niske koncentracije etanola na sniženim temperaturama [227]. Ovaj fenomen objašnjen je formiranjem interakcija između alkohola i nepolarnih regiona na površini proteina koje ometa agregiranje destabilizovanih oblika proteina. Ovakve odlike smeše ficina u odnosu na papain čine ovaj protein pogodnim za primenu u procesima u kojima su potrebne stabilne i aktivne proteaze, a podrazumevaju uslove kisele sredine, niske temperature proizvodnih procesa i prisustva etanola. Ovakvi uslovi se sreću u procesu pravljenja vina u kom se proteaze koriste za sprečavanje zamućenja koje je posledica taloženja proteina iz alkoholnih pića na sniženim temperaturama [170] ili sinteze peptida u vodenorganskim sistemima [228-230].

Kako je utvrđeno da pri povišenoj temperaturi dolazi do intenzivnog formiranja neuređenih agregata papaina i ficina, a da pri sniženoj temperaturi u kiselj sredini dolazi do veoma sporog formiranja agregacione  $\beta$ -pločice u slučaju papaina i još sporije u slučaju ficina, bez porasta fluorescencije ThT, komparativna stabilnost ova dva model sistema ispitana je u ekstremnijim uslovima. Metoda fluorescentne spektroskopije pokazala je da porast koncentracije uree sve do 8 M dovodi do denaturacije oba model proteina kroz dvostepeni proces kod papaina i kroz postepeni prelaz bez jasno definisanih intermedijarnih stanja kod smeše ficina (slika 5.38). Kod papaina je detektovan veliki skok intenziteta fluorescencije pri veoma niskim koncentracijama haotropa što je posledica narušavanja strukture manje stabilnog  $\alpha$ -helikoidnog domena sklonog

strukturnim perturbacijama [152]. Nakon prvog prelaza koji se dešava već pri 0,4 M koncentraciji uree, dalji porast intenziteta fluorescencije nije detektovan sve do 7,6 M uree što ukazuje na stabilno intermedijerno stanje. Stabilniji domen bogat  $\beta$ -pločicama nije narušen sve do 7,6-8 M koncentracije uree kada se uočava nagli porast fluorescencije pri temperaturama 10 i 20°C. Kako je poznato da je intermedijerno stanje pri denaturaciji papaina ima narušenu sekundarnu strukturu  $\alpha$ -helikoidnog domena [37, 152], rezultati denaturacije ureom ukazuju na destabilizaciju domena izgrađenog od  $\beta$ -pločica tek pri veoma visokoj koncentraciji uree što je u saglasnosti sa potvrđama o izuzetnoj stabilnosti ovakvog tipa uvijanja [195]. Iako papain poseduje izuzetno stabilan  $\beta$ -domen, aktivno mesto se nalazi na dodiru dva domena pa se sa narušavanjem strukture  $\alpha$ -domena narušava i aktivnost ovog proteina [151]. Za razliku od papaina, smeša izoformi ficina ne odlikuje se toliko izraženim porastom fluorescencije (slika 5.38B) pri nižim koncentracijama uree. U celokupnom opsegu koncentracija uree 0-8 M, porast fluorescencije je postepen, ali kao i na primeru papaina, značajniji porast fluorescencije doveden u vezu sa destabilizacijom  $\beta$ -domena uočen je tek pri koncentracijama 7,6-8 M i to na temperaturama 10 i 20°C.

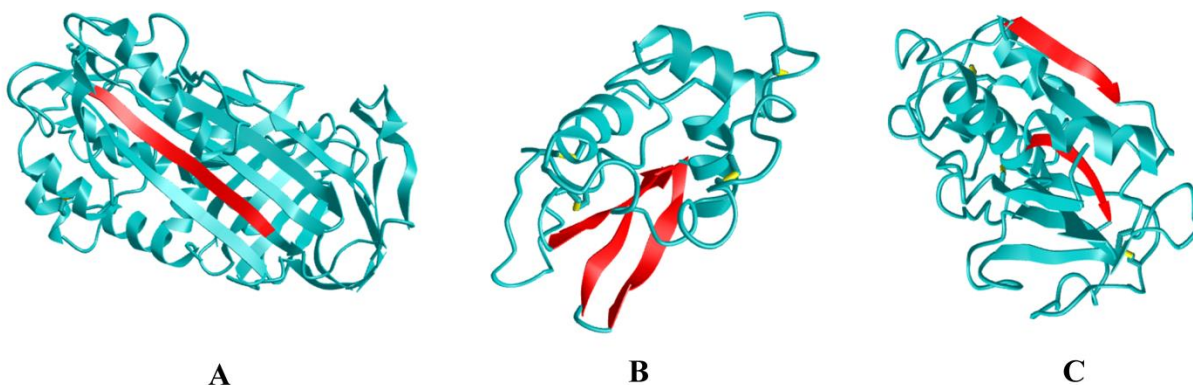


**Slika 6.3. Shematski prikaz fibrilacije papaina i ficina nakon destabilizacije ureom.**

Iako  $\beta$ -pločice nativnih proteina, kao na primeru ovalbumina često predstavljaju centre formiranja monotonih amiloidnih  $\beta$ -pločica, u slučaju papaina je pokazano da nije svaka  $\beta$ -pločica pogodna da postane centar ovakvog uvijanja. Pretpostavljeno je da kompaktna struktura

celog  $\beta$ -domena ne pogoduje formiranju amiloidnih fibrila s obzirom na razliku u načinu organizacije  $\beta$ -pločica između nativnog domena papaina i samih fibrila. Iz tog razloga je isproban protokol fibrilacije papaina i ficina nakon prethodnog tretiranja 8 M ureom. Pokazano je da 8 M urea ne dovodi do formiranja platoa potpuno razvijenog proteina ni kod papaina ni kod ficina (slika 5.38), kao i da su, očekivano, promene u strukturi ficina pri denaturaciji ureom postepenije u odnosu na promene u strukturi papaina. Nakon ovakve destabilizacije pokazano je na osnovu merenja ThT fluorescencije i IR spektara da papain u uslovima kisele sredine i visoke koncentracije etanola formira amiloidne strukture (slike 5.39 i 5.40A). Nedvosmislen porast ThT fluorescencije nije detektovan bez prethodnog tretmana ureom i pokazao se kao nezavisan od prisustva redukcionog sredstva. Time je pokazano da papain može da formira amiloidne fibrile, ali je neophodna destabilizacija njegovog ekstremno stabilnog  $\beta$ -domena. Analiza normalizovanih intenziteta traka u Amidnom I regionu (slika 5.41B) potvrđuje veliku tendenciju formiranja agregacione  $\beta$ -pločice na račun blagog pada sekundarnih struktura karakterističnih za nativan papain. S obzirom na male razlike između rezultata fibrilacije u redukujućim i neredukujućim uslovima, može se zaključiti da disulfidni mostovi ne igraju ključnu ulogu u stabilizaciji i povećanju rigidnosti  $\beta$ -domena.

Po uspostavljanju tri model sistema amiloidogenih proteina, uočavaju se pravilnosti u brzini njihove fibrilacije i u strukturnim karakteristikama. Naime, ovalbumin se odlikuje prisustvom dugačke antiparalelne  $\beta$ -pločice u centralnom regionu, okružene helikoidnim i neuređenim strukturama. Budući da su helikoidni i neuređeni regioni podložniji destabilizaciji, očekivano je brzo narušavanje ovih struktura u kiseljoj sredini na povišenoj temperaturi. Ono što rezultati ove studije sugerišu je da stabilna antiparalelna  $\beta$ -pločica (slika 6.4), za koju je pokazano da sadrži jedan od ključnih peptida za formiranje amiloidnih fibrila ovalbumina [8] svojom pozicijom stimuliše brzu perturbaciju narušenih strukturnih elemenata u smeru formiranja  $\beta$ -nizova koji se vodonično vezuju za jezgro i tako dovode do ekstremno stabilnog amiloidnog uvijanja pri ekstremnim sredinskim faktorima primenjenim pri fibrilaciji ovalbumina koji omogućavaju prevazilaženje kinetičke barijere.



**Slika 6.4. Struktura nativnog A) ovalbumina (1JIT), B) lizozima (194L) i C) papaina (1BP4) sa crveno obeleženim centralnim antiparalelnim  $\beta$ -pločicama.**

Sa druge strane, sporo-fibrilirajući model sistem lizozim odlikuje se prisustvom kratke  $\beta$ -pločice koja je u manjoj meri strukturirana [62], i koja bioinformatičkim alatima nije okarakterisana kao značajno amiloidogena. Izostanak centralnog elementa odgovarajuće konformacije smanjuje efikasnost postizanja konformacije polipeptidne kičme pogodne za amiloidno agregiranje. S obzirom na ekstremnu baznost ovog proteina, velika količina pozitivnog naelektrisanja sprečava njegovo agregiranje u neuređenoj formi, pa je omogućena produžena rastvorljivost za postepeno savladavanje kinetičke barijere amiloidnog uvijanja.

Papain pak obiluje  $\beta$ -pločicama među kojima su pogodni kandidati za centralnu antiparalelnu  $\beta$ -pločicu za amiloidno uvijanje obeleženi na slici 6.4C. Najizraženija poteškoća prilikom korišćenja papaina kao model sistema je savladavanje velike kinetičke barijere njegove denaturacije [195] odnosno denaturacije njegovog domena bogatog  $\beta$ -pločicama [37, 152], pošto tek delimično narušavanje ovog stabilnog jezgra omogućava korišćenje polipeptidne kičme za formiranje amiloidnih  $\beta$ -pločica oko centralnog nenarušenog segmenta. Ovaj pretpostavljen model mogao bi da objasni kinetiku amiloidnog agregiranja svakog od tri model sistema budući da je po destabilizaciji  $\beta$ -domena papain još jedan brzo-fibrilirajući model sistem sa centralnom antiparalelnom  $\beta$ -pločicom.

Smeša ficina, pak, bez obzira na destabilizaciju  $\beta$ -domena ne podleže intenzivnom formiranju amiloida kao papain (slika 5.39). Blaži porast ThT fluorescencije u nekim od uzoraka je uočen, ali i dalje ne dovoljan za potvrdu amiloidnog agregiranja, niti prati trend koji ukazuje na



dovršenu fibrilaciju. Blago povećanje ThT moglo bi se objasniti tendencijom neke od izoformi ka formiranju intermolekulskih  $\beta$ -pločica, ali proces se ne dešava u meri u kojoj se pri istim uslovima dešava sa papainom. Rezultati strukturne analize FTIR spektroskopijom pokazuju da se promena sekundarnih struktura dešava i kod ficina i to u meri uporedivoj sa papainom (slike 5.40B i 5.41B). Izražena promena sadržaja sekundarnih struktura bez značajnog povećanja ThT fluorescencije ukazuje na potencijalno formiranje oligomera, kao što je pokazano pri formiranju oligomernih intermedijera u fibrilaciji lizozima. Makar neka od ficinskih izoformi u ispitivanim uslovima zauzima konformaciono stanje koje pogoduje formiranju amiloidnih fibrila, ali ne dolazi do povezivanja ovih intermedijera u dugačke fibrilne forme. Pretpostavljeni mehanizam stabilizacije smeše ficina je posledica smanjene sposobnosti polipeptida različitih sekvenci da formiraju jezgra amiloidnog agregiranja. Postepeno razvijanje izoformi ficina u odnosu na razvijanje papaina i ficina 1c podržava hipotezu da diverzitet sekvenci obezbeđuje prevenciju agregiranja i pruža stabilizaciju proteina. Kako sve izoforme doprinose osobinama smeše, odnosno lateksa smokve, ekspresija velikog broja izoformi u nezreloj smokvi može biti korisna ne samo u pogledu šire supstratne specifičnosti već i u pogledu povišene stabilnosti koja pruža bolju zaštitu plodu u periodu zrenja kada je biljka podložna napadu parazita i herbivora.

Amiloidni fibrili tradicionalno se smatraju monotonim strukturama koji mogu nastati od svih peptidnih sekvenci [44]. Posmatrani kao jednolični lanci izuzetne stabilnosti, plastičnosti i čvrstine [11], amiloidni fibrili bez obzira na izvor imaju veliki potencijal za primenu kao nanomaterijali različitih namena. Jedna od odlika ovih materijala koja im pruža veliki potencijal za raznovrsne primene jeste osobina vezivanja jona teških metala [14, 15]. U ovoj studiji pokazano je na primeru jona kadmijuma i olova, koji su odabrani zbog toksičnosti i česte zastupljenosti u otpadnim vodama [231], da amiloidni fibrili ovalbumina imaju visok afinitet ka ovim jonima čak i prilikom kratkog vremena inkubiranja rasvora jona metala i dehidratiranih fibrila kakvo je korišćeno u ovom radu. S obzirom na sposobnost vezivanja jona teških metala, amiloidni fibrili imaju potencijal za primenu u njihovom uklanjanju iz otpadnih voda (slika 5.41). Kapacitet vezivanja jona  $Pb^{2+}$ , viši oko 4 puta od kapaciteta vezivanja jona  $Cd^{2+}$  može biti posledica nižeg jonskog radijusa olova u vodenoj sredini (4.01 Å) u odnosu na jonski radijus kadmijuma (4.26 Å) [232]. Tretiranje amiloidnih fibrila smešom jona olova i kadmijuma pokazalo je da postoje različita vezivna mesta ovih metala na površini amiloida, s obzirom da je

vezivanje nepromenjeno u odnosu na probe u kojima je amiloid tertiran samo jednim metalnim jonom.

Iako je sekundarna struktura amiloida monotona i zajednička za amiloidne fibrile nastale iz različitih model sistema, kako kratkih peptida, tako i polipeptida koje se u svojoj biološkoj sredini uvijaju u globularnu formu, neke od osobina poput kinetike fibrilacije su zavisne od sekvence peptida od kojih nastaju. Tako se pokazalo da sekvenca može imati uticaja i na sposobnost vezivanja različitih teških metala kao što je pokazano na primeru jona olova koji se u većoj koncentraciji vezuje za fibrile u odnosu na jone kadmijuma. Rezultati u pogledu mogućnosti proteina kombinovanog načina uvijanja poput papaina da grade amiloidne fibrile, kao i razlike u pogledu vezivanja različitih metalnih jona od strane amiloidnih fibrila, ukazuju na potencijal za dizajn fibrilnih nanomaterijala različite selektivnosti prema metalnim jonima što bi otvorilo velike mogućnosti praktične primene.

## 7. ZAKLJUČCI

Glavni zaključak ove studije je da diverzitet peptidnih sekvenci obezbeđen eksprimiranjem heterogene populacije proteinskih izoformi doprinosi stabilizaciji smeše i smanjuje tendenciju formiranja amiloidnih agregata u odnosu na pojedinačne peptide. Ovaj zaključak izveden je iz detaljne studije amiloidnog agregiranja ovalbumina, lizozima, papaina i smeše ficina koji su podvrgnuti različitim destabilizujućim uslovima nakon čega su praćene njihove strukturne promene.

### 1. Izolovanje proteinskih model sistema i njihova karakterizacija

a) Ovalbumin je efikasno izolovan iz belanceta kokošnjeg jajeta isključivo taložnim metodama uz 90% čistoće.

b) Papain je prečišćen iz komercijalnog preparata papaje jonoizmenjivačkom hromatografijom čime je dobijen elektroforetski homogen preparat proteina visoke enzimske aktivnosti.

c) Iz lateksa smokve dobijena je smeša ficinskih izoformi visoke enzimske aktivnosti. Najbaznija izoforma ficina prisutnog u ranom lateksu smokve (*F. carica*) je izoforma ficin 1c identifikovana u transkriptomu smokve, protein teorijske pI 8,64. Enzim je aktivan u hidrolizi različitih prirodnih supstrata, budući da pokazuje visok stepen opšte proteolitičke aktivnosti i u manjoj meri želatinolitičku aktivnost. Izolovani protein ima isti sadržaj sekundarnih struktura i način uvijanja kao druge poznate ficinske izoforme i homologni protein - papain. Ficin 1c ima tendenciju ka formiranju stopljene globule u kiseljoj sredini na pH 3 i opštu stabilnost uporedivu sa papainom.

### 2. Optimizovanje postupka za formiranje amiloidnih fibrila

a) Uspostavljen je najkraći protokol za fibrilaciju ovalbumina na pH 2 i 90°C nakon 24 h inkubiranja. Time je formiran model sistem brzo-fibrilirajućeg proteina za mapiranje strukturnih promena u procesu formiranja zrelih amiloidnih fibrila.

b) Uspostavljen je protokol za formiranje oligomernih intermedijera amiloidnog agregiranja lizozima u 90% rastvoru etanola nakon 4 dana inkubiranja. Time je uspostavljen model sistem

sporo-fibrilirajućeg proteina za mapiranje strukturnih promena u procesu formiranja, kako amiloidnih oligomera, tako i zrelih fibrila.

### **3. Mapiranje finih strukturnih promena zrelih fibrila i amiloidnih oligomera infracrvenom spektroskopijom**

a) Pokazano je da u strukturi ovalbumina nakon 24 h inkubiranja na pH 2 i 90°C čak 33% polipeptidne kičme zadobija konformaciju agregacione  $\beta$ -pločice na račun postepenog gubitka ostalih sekundarnih struktura u toku 24 h. Time je pokazano da je prinos amiloidnog agregiranja za 24 h inkubiranja veći od 30%.

b) Pokazano je na osnovu sadržaja sekundarnih struktura da je ukupan prinos zrelih amiloidnih fibrila lizozima i nakon 2 meseca inkubiranja u 90% rastvoru etanola značajno manji od ukupnog prinosa zrelih amiloida ovalbumina. Promena sadržaja sekundarnih struktura dešava se brzo po promeni uslova, ali je postupak formiranja amiloidnih fibrila spor. Oligomerni intermedijeri detektovani su nakon 4 dana inkubiranja. Sadržaj sekundarnih struktura oligomera je gotovo identičan sadržaju sekundarnih struktura zrelih amiloidnih fibrila sa visokom zastupljenošću agregacione  $\beta$ -pločice koja se formira na račun narušavanja  $\alpha$ -heliksa i neuređenog niza.

### **4. Optimizovanje metodologije za praćenje formiranja amiloidnih agregata**

a) Pokazano je da je ATR-FTIR pogodna metoda za snimanje infracrvenih spektara kako nativnih proteina, tako i amiloidnih agregata i intermedijera na putu fibrilacije.

b) Simultana analiza Amidnog I i Amidnog III regiona infracrvenih spektara pruža kvalitativni uvid u globalne promene sekundarnih struktura, kako u stanju oligomernih intermedijera, tako i u stanju zrelih fibrila.

c) Metoda dekonvolucije može se koristiti za kvantitativno praćenje formiranja amiloidnih fibrila ispitivanjem sadržaja sekundarnih struktura u različitim uzorcima tokom inkubiranja proteina u destabilizujućim uslovima.

d) Praćenje odnosa Amidne I i Amidne II trake je brza, jednostavna i pouzdana metoda za procenu tendencije formiranja odnosno narušavanja različitih sekundarnih struktura.

e) Amidni II region može se koristiti kao interni standard za normalizaciju intenziteta traka u Amidnom I regionu. Praćenje traka agregacionih  $\beta$ -pločica visoke i niske frekvencije, određivanjem odnosa intenziteta trake u Amidnom I regionu i Amidne II trake, korelira sa promenama ThT fluorescencije pri brznoj fibrilaciji proteina (koeficijenti korelacije 0,93354 i 0,95489) i pogodna je metoda za kvantitativno praćenje formiranja zrelih amiloidnih fibrila i detekciju završetka procesa amiloidnog agregiranja.

f) Praćenje normalizovanih intenziteta traka agregacionih  $\beta$ -pločica pogodna je metoda za detekciju oligomernih intermedijera amiloidnog agregiranja veće specifičnosti od metode merenja ThT fluorescencije. S obzirom na specifičnost i jednostavnost ova metoda ima potencijalnu primenu na biološkim uzorcima.

## **5. Komparativna stabilnost papaina i smeše ficina**

a) Smeša izoformi ficina različitih pI vrednosti zadržava svoju biološku aktivnost u širem opsegu pH vrednosti u odnosu na papain, kako u kiseljoj, tako i u baznoj sredini.

b) U kiseljoj sredini smeša ficina ima veću kinetičku barijeru za termalnu inaktivaciju od papaina.

c) Na osnovu ispitivanja stabilnosti funkcionalnim i strukturnim esejima zaključeno je da je smeša ficina stabilnija od pojedinačnog polipeptida – papaina pri skladištenju u kiseljoj sredini na niskim temperaturama i u prisustvu niskih koncentracija etanola. Papain je u većjoj meri podložan denaturaciji i agregiranju od ficina.

d) Smeša ficina stabilnija je od papaina, kao i od ficina 1c, u uslovima rastuće koncentracije uree. Stabilnost smeše ficina se ogleda u postepenim konformacionim prelazima s obzirom na doprinos različitih polipeptida ukupnoj stabilnosti. Smeša izoformi je manje podložna denaturaciji od pojedinačne izoforme, kako ficina 1c, tako i papaina, što je moguća prednost divergentne evolucije proteaza lateksa.

## **6. Ispitivanje uslova za amiloidno agregiranje papaina i smeše ficina**

a) Papain kao pojedinačni polipeptid formira amiloidne agregate u 90% rastvoru etanola nakon destabilizacije stabilnog domena bogatog  $\beta$ -pločicama 8 M ureom kako je potvrđeno merenjem

ThT fluorescencije i praćenjem tendencije promena sekundarnih struktura. Raskidanje disulfidnih mostova nije neophodan korak u formiranju amiloidnih agregata papaina.

b) Ficin kao smeša polipeptida različitih sekvenci ne formira amiloidne fibrile u uslovima u kojima papain formira amiloidne agregate. Heterogena populacija izoformi je stabilizovana usled smanjene tendencije agregiranja, uključujući i amiloidno agregiranje.

### **7. Ispitivanje potencijala amiloidnih fibrila za vezivanje metala**

a) Amiloidni fibrili vezuju jone teških metala - olova i kadmijuma sa preferencijanim vezivanjem jona olova koje odlikuje manji jonski radijus. Joni olova i kadmijuma se vezuju nezavisno, za različita vezivna mesta na površini amiloidnih fibrila što ukazuje na potencijalnu primenu za simultano uklanjanje jona različitih teških metala iz otpadnih voda.

## LITERATURA

1. Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH, Jr. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961; 47(9): 1309-14.
2. Dill KA, Bromberg S, Yue K, Fiebig KM, Yee DP, Thomas PD, et al. Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 1995; 4(4): 561-602.
3. Sarroukh R, Cerf E, Derclaye S, Dufrene YF, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, et al. Transformation of amyloid beta(1-40) oligomers into fibrils is characterized by a major change in secondary structure. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2011; 68(8): 1429-38.
4. Frare E, Polverino De Laureto P, Zurdo J, Dobson CM, Fontana A. A highly amyloidogenic region of hen lysozyme. *Journal of Molecular Biology*. 2004; 340(5): 1153-65.
5. Bouchard M, Zurdo J, Nettleton EJ, Dobson CM, Robinson CV. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2000; 9(10): 1960-7.
6. Jayawardena N, Kaur M, Nair S, Malmstrom J, Goldstone D, Negron L, et al. Amyloid fibrils from hemoglobin. *Biomolecules*. 2017; 7(2): 37.
7. de la Arada I, Seiler C, Mantele W. Amyloid fibril formation from human and bovine serum albumin followed by quasi-simultaneous Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and static light scattering (SLS). *European Biophysics Journal: EBJ*. 2012; 41(11): 931-8.
8. Tanaka N, Morimoto Y, Noguchi Y, Tada T, Waku T, Kunugi S, et al. The mechanism of fibril formation of a non-inhibitory serpin ovalbumin revealed by the identification of amyloidogenic core regions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(7): 5884-94.
9. Li Y, Zhao C, Luo F, Liu Z, Gui X, Luo Z, et al. Amyloid fibril structure of alpha-synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Research*. 2018; 28(9): 897-903.
10. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014; 15(6): 384-96.
11. Lamour G, Nassar R, Chan PHW, Bozkurt G, Li J, Bui JM, et al. Mapping the broad structural and mechanical properties of amyloid fibrils. *Biophysical Journal*. 2017; 112(4): 584-94.

12. Cherny I, Gazit E. Amyloids: not only pathological agents but also ordered nanomaterials. *Angewandte Chemie*. 2008; 47(22): 4062-9.
13. Li D, Furukawa H, Deng H, Liu C, Yaghi OM, Eisenberg DS. Designed amyloid fibers as materials for selective carbon dioxide capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(1): 191-6.
14. Bolisetty S, Mezzenga R. Amyloid-carbon hybrid membranes for universal water purification. *Nature nanotechnology*. 2016; 11(4): 365-71.
15. Bolisetty SR, N; Zeder, C; Orozco, MN; Mezzenga R. Efficient purification of arsenic-contaminated water using amyloid-carbon hybrid membranes. *Chemical Communication*. 2017; 53(42): 5714-7.
16. Berg JMT, J. L.; Stryer, L. Protein Structure and Function. In: Freeman WH, editor. *Biochemistry*. New York 2002.
17. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*. 1963; 7(1): 95-9.
18. Efimov AV. Chirality and Handedness of Protein Structures. *Biochemistry Moscow*. 2018; 83: S103-S10.
19. Stirling PC, Lundin VF, Leroux MR. Getting a grip on non-native proteins. *EMBO reports*. 2003; 4(6): 565-70.
20. Anfinsen CB, Scheraga HA. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Advances in protein chemistry*. 1975; 29: 205-300.
21. Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K. Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1996; 10(1): 75-83.
22. Baldwin RL. Weak Interactions in Protein Folding: Hydrophobic Free Energy, van der Waals Interactions, Peptide Hydrogen Bonds, and Peptide Solvation, Protein. *Folding Handbook: Wiley-VCH Verlag GmbH*; 2008. p. 127-62.
23. Doig AJ, Sternberg MJ. Side-chain conformational entropy in protein folding. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1995; 4(11): 2247-51.
24. Spolar RS, Ha JH, Record MT, Jr. Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(21): 8382-5.



25. Lins L, Brasseur R. The hydrophobic effect in protein folding. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995; 9(7): 535-40.
26. Lee C, Park SH, Lee MY, Yu MH. Regulation of protein function by native metastability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97(14): 7727-31.
27. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973; 181(4096): 223-30.
28. Malhotra PU, J. B. . How cooperative are protein folding and unfolding transitions? *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2016; 25(11): 1924-41.
29. Rami BR, Udgaonkar JB. Mechanism of formation of a productive molten globule form of barstar. *Biochemistry*. 2002; 41(6): 1710-6.
30. Karplus M, Weaver DL. Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 1994; 3(4): 650-68.
31. Fersht AR. Nucleation mechanisms in protein folding. *Current opinion in structural biology*. 1997; 7(1): 3-9.
32. Nölting BA, D. A. How General Is The Nucleation–Condensation Mechanism? *Proteins*. 2008; 73(3): 754-64.
33. Levinthal C. Are There Pathways for Protein Folding? *Extrait du Journal de Chimie Physique*. 1968; 65(1): 44-5.
34. Gianni S, Jemth P. Protein folding: Vexing debates on a fundamental problem. *Biophysical chemistry*. 2016; 212: 17-21.
35. Ibarra-Molero BS-R, J.M. . Irreversible Protein Denaturation. In: Watts RG, editor. *European Biophysical Societies (eds) Encyclopedia of Biophysics*. Berlin: Springer; 2018.
36. Kumar D. Protein Refolding/Renaturation. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*. 2011. p. 765-84.
37. Raskovic B, Popovic M, Ostojic S, Andelkovic B, Tesevic V, Polovic N. Fourier transform infrared spectroscopy provides an evidence of papain denaturation and aggregation during cold storage. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2015; 150: 238-46.
38. Johnson JLC, E. A. Protein Folding In Vivo: Unraveling Complex Pathways. *Cell*. 1997; 90(2): 201-4.

39. Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochimica et biophysica acta*. 2004; 1739(1): 5-25.
40. Wolynes PG, Onuchic JN, Thirumalai D. Navigating the folding routes. *Science*. 1995; 267(5204): 1619-20.
41. Adamcik J, Mezzenga R. Amyloid Polymorphism in the Protein Folding and Aggregation Energy Landscape. *Angewandte Chemie*. 2018; 57(28): 8370-82.
42. Arosio P, Knowles TP, Linse S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*. 2015; 17(12): 7606-18.
43. Tufail SO, M; Kazmi, S; Balyan, R; Khalsa, J. K; Faisal, S. M; Sherwani, M. A; Gatoo, M. A; Umar, M. S; Zubair, S. . Amyloid form of ovalbumin evokes native antigen-specific immune response in the host: prospective immuno-prophylactic potential. *The Journal of biological chemistry*. 2015; 290(7): 4131-48.
44. Astbury WT, Dickinson S, Bailey K. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *The Biochemical journal*. 1935; 29(10): 2351-60.1.
45. Hamada D, Dobson CM. A kinetic study of beta-lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2002; 11(10): 2417-26.
46. Buell AK, Dobson CM, Knowles TP. The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays in biochemistry*. 2014; 56: 11-39.
47. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual review of biochemistry*. 2017; 86: 27-68.
48. Cordeiro Y, Macedo B, Silva JL, Gomes MPB. Pathological implications of nucleic acid interactions with proteins associated with neurodegenerative diseases. *Biophysical reviews*. 2014; 6(1): 97-110.
49. Breydo L, Uversky VN. *Molecular Mechanisms of Protein Misfolding*. Editor(s): Uversky VN, Lyubchenko YL. Bio-nanoimaging. Academic Press. 2014: 1-14.
50. Rambaran RN, Serpell LC. Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion*. 2008; 2(3): 112-7.
51. Skora L, Becker S, Zweckstetter M. Molten globule precursor states are conformationally correlated to amyloid fibrils of human beta-2-microglobulin. *Journal of the American Chemical Society*. 2010; 132(27): 9223-5.

52. Agocs G, Szabo BT, Kohler G, Osvath S. Comparing the folding and misfolding energy landscapes of phosphoglycerate kinase. *Biophysical journal*. 2012; 102(12): 2828-34.
53. Pedrote MM, de Oliveira GAP, Felix AL, Mota MF, Marques MA, Soares IN, et al. Aggregation-primed molten globule conformers of the p53 core domain provide potential tools for studying p53C aggregation in cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2018; 293(29): 11374-87.
54. Gharibyan AL, Zamotin V, Yanamandra K, Moskaleva OS, Margulis BA, Kostanyan IA, et al. Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways. *Journal of molecular biology*. 2007; 365(5): 1337-49.
55. Kaye R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2013; 33 Suppl 1:S67-78.
56. Urbic T, Najem S, Dias CL. Thermodynamic properties of amyloid fibrils in equilibrium. *Biophysical chemistry*. 2017; 231: 155-60.
57. Kodali R, Wetzel R. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Current opinion in structural biology*. 2007; 17(1): 48-57.
58. Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, Buchner J, Ramirez-Alvarado M, Naiki H, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2017; 24(1): 1-16.
59. Uversky VNT, A; Gillespie, J.R; Fink, A.L. . Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Part I. Systemic amyloidoses. *Medical Science Monitor*. 1999; 5(5): 1001-12.
60. Ghahghaei AF, N. Review: structure of amyloid fibril in diseases. *J Biomedical Science and Engineering*. 2009; 2(5): 345-58.
61. Lara C, Gourdin-Bertin S, Adamcik J, Bolisetty S, Mezzenga R. Self-assembly of ovalbumin into amyloid and non-amyloid fibrils. *Biomacromolecules*. 2012; 13(12): 4213-21.
62. Krebs MR, Wilkins DK, Chung EW, Pitkeathly MC, Chamberlain AK, Zurdo J, et al. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain. *Journal of molecular biology*. 2000; 300(3): 541-9.
63. Cohen AS, Calkins E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*. 1959; 183(4669): 1202-3.
64. Cohen AS, Calkins E. The Isolation of Amyloid Fibrils and a Study of the Effect of Collagenase and Hyaluronidase. *The Journal of cell biology*. 1964; 21(3): 481-6.

65. Eanes ED, Glenner GG. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 1968; 16(11): 673-7.
66. Raskovic B, Lazic J, Polovic N. Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; 96(2): 576-82.
67. Pepys MB. Amyloidosis. *Annual review of medicine*. 2006; 57: 223-41.
68. Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et biophysica acta*. 2000; 1502(1): 16-30.
69. Liao L, Cheng D, Wang J, Duong DM, Losik TG, Gearing M, et al. Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(35): 37061-8.
70. Xiong F, Ge W, Ma C. Quantitative proteomics reveals distinct composition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*. 2019; 15(3): 429-40.
71. Stewart KL, Radford SE. Amyloid plaques beyond A $\beta$ : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophysical reviews*. 2017; 9(4): 405-19.
72. Drummond E, Nayak S, Faustin A, Pires G, Hickman RA, Askenazi M, et al. Proteomic differences in amyloid plaques in rapidly progressive and sporadic Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*. 2017; 133(6): 933-54.
73. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry*. 2006; 75: 333-66.
74. Greenwald J, Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*. 2010; 18(10): 1244-60.
75. Hamley IW. Peptide fibrillization. *Angewandte Chemie*. 2007; 46(43): 8128-47.
76. Tycko R, Wickner RB. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy. *Accounts of chemical research*. 2013; 46(7): 1487-96.
77. Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(5): 2230-4.

78. Adler-Abramovich L, Aronov D, Beker P, Yevnin M, Stempler S, Buzhansky L, et al. Self-assembled arrays of peptide nanotubes by vapour deposition. *Nature nanotechnology*. 2009; 4(12): 849-54.
79. Hauser CA, Maurer-Stroh S, Martins IC. Amyloid-based nanosensors and nanodevices. *Chemical Society reviews*. 2014; 43(15): 5326-45.
80. Yan C, Pochan DJ. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society reviews*. 2010; 39(9): 3528-40.
81. Jacob RS, Ghosh D, Singh PK, Basu SK, Jha NN, Das S, et al. Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation. *Biomaterials*. 2015; 54: 97-105.
82. Li C, Adamcik J, Mezzenga R. Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. *Nature nanotechnology*. 2012; 7(7): 421-7.
83. Jacob RS, George E, Singh PK, Salot S, Anoop A, Jha NN, et al. Cell Adhesion on Amyloid Fibrils Lacking Integrin Recognition Motif. *The Journal of biological chemistry*. 2016; 291(10): 5278-98.
84. Buchanan LE, Carr JK, Fluit AM, Hoganson AJ, Moran SD, de Pablo JJ, et al. Structural motif of polyglutamine amyloid fibrils discerned with mixed-isotope infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(16): 5796-801.
85. Ryu J, Kim SW, Kang K, Park CB. Mineralization of self-assembled peptide nanofibers for rechargeable lithium ion batteries. *Advanced materials*. 2010; 22(48): 5537-41.
86. Kelly JW. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current opinion in structural biology*. 1998; 8(1): 101-6.
87. Uljijn RV, Smith AM. Designing peptide based nanomaterials. *Chemical Society reviews*. 2008; 37(4): 664-75.
88. Dehsorkhi A, Castelletto V, Hamley IW. Self-assembling amphiphilic peptides. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2014; 20(7): 453-67.
89. Lara C, Handschin S, Mezzenga R. Towards lysozyme nanotube and 3D hybrid self-assembly. *Nanoscale*. 2013; 5(16): 7197-201.
90. Rufo CM, Moroz YS, Moroz OV, Stohr J, Smith TA, Hu X, et al. Short peptides self-assemble to produce catalytic amyloids. *Nature chemistry*. 2014; 6(4): 303-9.
91. Leung WHL, W. H; Chan P. H. Amyloid fibrils as rapid and efficient nano-biosorbents for removal of dye pollutants. *RSC Advances*. 2015; 5(109): 90022-30.

92. Knowles TP, Buehler MJ. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nature nanotechnology*. 2011; 6(8): 469-79.
93. Knowles TP, Mezzenga R. Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Advanced materials*. 2016; 28(31): 6546-61.
94. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Bioscience reports*. 2019; 39(1): BSR20181415.
95. Cristovao JS, Henriques BJ, Gomes CM. Biophysical and Spectroscopic Methods for Monitoring Protein Misfolding and Amyloid Aggregation. *Methods in molecular biology*. 2019; 1873: 3-18.
96. Kurouski D, Van Duyne RP, Lednev IK. Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: a review. *The Analyst*. 2015; 140(15): 4967-80.
97. Frare E, Mossuto MF, de Laureto PP, Tolin S, Menzer L, Dumoulin M, et al. Characterization of oligomeric species on the aggregation pathway of human lysozyme. *Journal of molecular biology*. 2009; 387(1): 17-27.
98. Chaari A, Fahy C, Chevillot-Biraud A, Rholam M. Insights into Kinetics of Agitation-Induced Aggregation of Hen Lysozyme under Heat and Acidic Conditions from Various Spectroscopic Methods. *PloS one*. 2015; 10(11): e0142095.
99. Zou Y, Hao W, Li H, Gao Y, Sun Y, Ma G. New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach. *The journal of physical chemistry B*. 2014; 118(33): 9834-43.
100. Ruggeri FS, Longo G, Faggiano S, Lipiec E, Pastore A, Dietler G. Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation. *Nature communications*. 2015; 6: 7831.
101. Eisenberg DS, Sawaya MR. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annual review of biochemistry*. 2017; 86: 69-95.
102. Morris KL, Serpell LC. X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils. *Methods in molecular biology*. 2012; 849: 121-35.
103. Dobson CM. Biophysical Techniques in Structural Biology. *Annual review of biochemistry*. 2019; 88: 25-33.
104. Elliott A, Ambrose EJ. Structure of synthetic polypeptides. *Nature*. 1950; 165(4206): 921-2.
105. Jackson M, Mantsch HH. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1995; 30(2): 95-120.

106. Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V. Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. *Biophysical journal*. 2006; 90(8): 2946-57.
107. Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Sub-cellular biochemistry*. 1994; 23: 405-50.
108. Du KS, J; Song, X; Chen, H; Feng, W; Ji, P. Interaction of Ionic Liquid [bmin][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] with Lysozyme Investigated by Two-Dimensional Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *ACS Sustainable Chem Eng*. 2014; 2(6): 1420–8.
109. Navarra G, Troia F, Militello V, Leone M. Characterization of the nucleation process of lysozyme at physiological pH: primary but not sole process. *Biophysical chemistry*. 2013; 177-178: 24-33.
110. Noinville S, Revault M, Baron MH, Tiss A, Yapoudjian S, Ivanova M, et al. Conformational changes and orientation of *Humicola lanuginosa* lipase on a solid hydrophobic surface: an in situ interface Fourier transform infrared-attenuated total reflection study. *Biophysical journal*. 2002; 82(5): 2709-19.
111. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1767(9): 1073-101.
112. Mantele W. The analysis of protein conformation by infrared spectroscopy: an introduction of the editor to a scientific dispute. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2015; 138: 964-6.
113. Zscherp C, Aygun H, Engels JW, Mantele W. Effect of proline to alanine mutation on the thermal stability of the all-beta-sheet protein tendamistat. *Biochimica et biophysica acta*. 2003; 1651(1-2): 139-45.
114. Huntington JA, Stein PE. Structure and properties of ovalbumin. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2001; 756(1-2): 189-98.
115. Hu HY, Du HN. Alpha-to-beta structural transformation of ovalbumin: heat and pH effects. *Journal of Protein Chemistry*. 2000; 19(3): 177-83.
116. Tsutsui Y, Liu L, Gershenson A, Wintrodde PL. The conformational dynamics of a metastable serpin studied by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biochemistry*. 2006; 45(21): 6561-9.
117. Arii Y, Hirose M. Probing the serpin structural-transition mechanism in ovalbumin mutant R339T by proteolytic-cleavage kinetics of the reactive-centre loop. *The Biochemical journal*. 2002; 363(Pt 2): 403-9.
118. Yamasaki M, Arii Y, Mikami B, Hirose M. Loop-inserted and thermostabilized structure of P1-P1' cleaved ovalbumin mutant R339T. *Journal of molecular biology*. 2002; 315(2): 113-20.

119. Bhattacharya M, Mukhopadhyay S. Structural and dynamical insights into the molten-globule form of ovalbumin. *The journal of physical chemistry B*. 2012; 116(1): 520-31.
120. Sogami M, Era S, Koseki T, Nagai N. Structural characterization of the molten globule and native states of ovalbumin: A H-1 NMR study. *The Journal of Peptide Research*. 1997; 50(6): 465-74.
121. Tatsumi E, Hirose M. Highly ordered molten globule-like state of ovalbumin at acidic pH: Native-like fragmentation by protease and selective modification of Cys367 with dithiodipyridine. *Journal of Biochemistry*. 1997; 122(2): 300-8.
122. Bhattacharya M, Jain N, Dogra P, Samai S, Mukhopadhyay S. Nanoscopic Amyloid Pores Formed via Stepwise Protein Assembly. *The journal of physical chemistry letters*. 2013; 4(3): 480-5.
123. Sugimoto Y, Kamada Y, Tokunaga Y, Shinohara H, Matsumoto M, Kusakabe T, et al. Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2011; 89(6): 533-44.
124. Sagis LMC, Veerman C, van der Linden E. Mesoscopic properties of semiflexible amyloid fibrils. *Langmuir*. 2004; 20(3): 924-7.
125. Kalapothakis JM, Morris RJ, Szavits-Nossan J, Eden K, Covill S, Tabor S, et al. A kinetic study of ovalbumin fibril formation: the importance of fragmentation and end-joining. *Biophysical journal*. 2015; 108(9): 2300-11.
126. Meersman F, Atilgan C, Miles AJ, Bader R, Shang W, Matagne A, et al. Consistent picture of the reversible thermal unfolding of hen egg-white lysozyme from experiment and molecular dynamics. *Biophysical journal*. 2010; 99(7): 2255-63.
127. Sophianopoulos AJ, Sasse EA. Isoelectric Point of Proteins by Differential Conductimetry. *The Journal of biological chemistry*. 1965; 240: PC1864-6.
128. Vaney MC, Maignan S, Ries-Kautt M, Ducriux A. High-resolution structure (1.33 Å) of a HEW lysozyme tetragonal crystal grown in the APCF apparatus. Data and structural comparison with a crystal grown under microgravity from SpaceHab-01 mission. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 1996; 52(Pt 3): 505-17.
129. Trexler AJ, Nilsson MR. The formation of amyloid fibrils from proteins in the lysozyme family. *Current protein & peptide science*. 2007; 8(6): 537-57.
130. McAllister C, Karymov MA, Kawano Y, Lushnikov AY, Mikheikin A, Uversky VN, et al. Protein interactions and misfolding analyzed by AFM force spectroscopy. *Journal of molecular biology*. 2005; 354(5): 1028-42.



131. Hameed M, Ahmad B, Khan RH, Andrabi KI, Fazili KM. Tertiary butanol induced amyloidogenesis of hen egg white lysozyme (HEWL) is facilitated by aggregation-prone alkali-induced molten globule like conformational state. *Protein and peptide letters*. 2009; 16(1): 56-60.
132. Brudar S, Hribar-Lee B. The Role of Buffers in Wild-Type HEWL Amyloid Fibril Formation Mechanism. *Biomolecules*. 2019; 9(2): 65.
133. Kumar S, Ravi VK, Swaminathan R. Suppression of lysozyme aggregation at alkaline pH by tri-N-acetylchitotriose. *Biochimica et biophysica acta*. 2009; 1794(6): 913-20.
134. Sarkar N, Kumar M, Dubey VK. Rottlerin dissolves pre-formed protein amyloid: a study on hen egg white lysozyme. *Biochimica et biophysica acta*. 2011; 1810(9): 809-14.
135. Rahimi Araghi L, Dee DR. Cross-Species and Cross-Polymorph Seeding of Lysozyme Amyloid Reveals a Dominant Polymorph. *Frontiers in molecular biosciences*. 2020; 7: 206.
136. Lara C, Adamcik J, Jordens S, Mezzenga R. General self-assembly mechanism converting hydrolyzed globular proteins into giant multistranded amyloid ribbons. *Biomacromolecules*. 2011; 12(5): 1868-75.
137. Arnaudov LN, de Vries R. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophysical journal*. 2005; 88(1): 515-26.
138. Vernaglia BA, Huang J, Clark ED. Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme. *Biomacromolecules*. 2004; 5(4): 1362-70.
139. Yonezawa Y, Tanaka S, Kubota T, Wakabayashi K, Yutani K, Fujiwara S. 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. *Journal of molecular biology*. 2002; 323(2): 237-51.
140. Holley M, Eginton C, Schaefer D, Brown LR. Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 373(1): 164-8.
141. Cao A, Hu D, Lai L. Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2004; 13(2): 319-24.
142. Goda S, Takano K, Yamagata Y, Nagata R, Akutsu H, Maki S, et al. Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2000; 9(2): 369-75.
143. Nemova NN, Bondareva LA. [To the problem of proteolytic enzyme evolution]. *Biomeditsinskaia khimiia*. 2008; 54(1): 42-57.

144. Sharma A, Kumari M, Jagannadham MV. Benghalensin, a highly stable serine protease from the latex of medicinal plant *Ficus benghalensis*. J Agric Food Chem. 2009; 57(23): 11120-6.
145. Hervio LS, Coombs GS, Bergstrom RC, Trivedi K, Corey DR, Madison EL. Negative selectivity and the evolution of protease cascades: the specificity of plasmin for peptide and protein substrates. Chemistry & biology. 2000; 7(6): 443-53.
146. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic acids research. 2014; 42(Database issue): D503-9.
147. Lowe D. The cystein proteinases. Tetrahedron. 1976; 32(3): 291-302.
148. Baez-Santos YM, St John SE, Mesecar AD. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. Antiviral research. 2015; 115: 21-38.
149. Novinec M, Lenarcic B. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. Biomolecular concepts. 2013; 4(3): 287-308.
150. Amri EM, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2012; 8(2): 99-104.
151. Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MB, Drenth J. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. Journal of molecular biology. 1984; 179(2): 233-56.
152. Raskovic B, Babić N, Korać J, Polovic N. Evidence of  $\beta$ -sheet structure induced kinetic stability of papain upon thermal and sodium dodecyl sulfate denaturation. Journal of the Serbian Chemical Society. 2015; 80(5): 613-25
153. Sathish HA, Kumar PR, Prakash V. Effect of urea at lower concentration on the structure of papain--formation of a stable molten globule and its characterization. Indian journal of biochemistry & biophysics. 2002; 39(3): 155-62.
154. Villard C, Larbat R, Munakata R, Hehn A. Defence mechanisms of *Ficus*: pyramiding strategies to cope with pests and pathogens. Planta. 2019; 249(3): 617-33.
155. Konno K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. Phytochemistry. 2011; 72(13): 1510-30.
156. Chiang CL, Chang YM, Chang CT, Sung HY. Characterization of a chitosanase isolated from a commercial ficin preparation. J Agric Food Chem. 2005; 53(19): 7579-85.
157. Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, Polovic N. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. Journal of bioscience and bioengineering. 2014; 118(6): 622-7.

158. Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2004; 37(3): 370-8.
159. Azarkan M, Matagne A, Wattiez R, Bolle L, Vandenameele J, Baeyens-Volant D. Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry*. 2011; 72(14-15): 1718-31.
160. Devaraj KB, Kumar PR, Prakash V. Purification, Characterization, and Solvent-Induced Thermal Stabilization of Ficin from *Ficus carica*. *J Agr Food Chem*. 2008; 56(23): 11417-23.
161. Zare H, Moosavi-Movahedi AA, Salami M, Mirzaei M, Saboury AA, Sheibani N. Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*. 2013; 87: 16-22.
162. Sgarbieri VC, Gupte SM, Kramer DE, Whitaker JR. Ficus Enzymes. I. Separation of the Proteolytic Enzymes of *Ficus Carica* and *Ficus Glabrata* Latices. *The Journal of biological chemistry*. 1964; 239: 2170-7.
163. Solorzano Zambrano L, Usai G, Vangelisti A, Mascagni F, Giordani T, Bernardi R, et al. Cultivar-specific transcriptome prediction and annotation in *Ficus carica* L. *Genomics data*. 2017; 13: 64-6.
164. Baeyens-Volant D, Matagne A, El Mahyaoui R, Wattiez R, Azarkan M. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: Purification and characterization. *Phytochemistry*. 2015; 117: 154-67.
165. Haesaerts S, Buitrago JAR, Loris R, Baeyens-Volant D, Azarkan M. Crystallization and preliminary X-ray analysis of four cysteine proteases from *Ficus carica* latex. *Acta Crystallographica Section F*. 2015; 71: 459-65.
166. Kitajima S, Aoki W, Shibata D, Nakajima D, Sakurai N, Yazaki K, et al. Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (*Ficus carica*). *Planta*. 2018; 247(6): 1423-38.
167. Cui Y, Wang Z, Chen S, Vainstein A, Ma H. Proteome and transcriptome analyses reveal key molecular differences between quality parameters of commercial-ripe and tree-ripe fig (*Ficus carica* L.). *BMC plant biology*. 2019; 19(1): 146.
168. Katsaros GI, Tavantzis G, Taoukis PS. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010; 11(1): 47-51.

169. Feijoo-Siota L, Villa TG. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology*. 2011; 4(6): 1066-88.
170. Esti M, Benucci I, Lombardelli C, Liburdi K, Garzillo AMV. Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic-acidic buffer for wine application. *Food and Bioproducts Processing*. 2013; 91(C4): 595-8.
171. Katsaros GI, Katapodis P, Taoukis PS. High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food and Engineering*. 2009; 91(1): 42-8.
172. B. Devaraj K, Kumar P, Prakash V. Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry*. 2011; 46: 458-64.
173. Kortt AA, Hamilton S, Webb EC, Zerner B. Ficans (EC 3.4.22.3). Purification and characterization of the enzymatic components of the latex of *Ficus glabrata*. *Biochemistry*. 1974; 13(10): 2023-8.
174. Devaraj KB, Kumar PR, Prakash V. Characterization of acid-induced molten globule like state of ficin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009; 45(3): 248-54.
175. Edwin F, Jagannadham MV. Sequential unfolding of papain in molten globule state. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998; 252(3): 654-60.
176. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. 2015; 10(6): 845-58.
177. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72: 248-54.
178. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
179. Zhang Y, Fu Y, Zhou S, Kang L, Li C. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry. *Analytical biochemistry*. 2013; 437(1): 46-8.
180. Goldschmidt L, Teng PK, Riek R, Eisenberg D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(8): 3487-92.
181. Byler DM, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*. 1986; 25(3): 469-87.

182. Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM. Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *European journal of biochemistry*. 1990; 193(2): 409-20.
183. Qi XL, Holt C, McNulty D, Clarke DT, Brownlow S, Jones GR. Effect of temperature on the secondary structure of beta-lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: A test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal*. 1997; 324: 341-6.
184. Ami D, Natalello A, Taylor G, Tonon G, Maria Doglia S. Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochimica et biophysica acta*. 2006; 1764(4): 793-9.
185. Ismail AA, Mantsch HH, Wong PT. Aggregation of chymotrypsinogen: portrait by infrared spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta*. 1992; 1121(1-2): 183-8.
186. Dong AC, Meyer JD, Brown JL, Manning MC, Carpenter JF. Comparative Fourier transform infrared and circular dichroism spectroscopic analysis of alpha(1)-proteinase inhibitor and ovalbumin in aqueous solution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000; 383(1): 148-55.
187. Iram A, Naeem A. Existence of different structural intermediates and aggregates on the folding pathway of ovalbumin. *Journal of fluorescence*. 2012; 22(1): 47-57.
188. Vedantham G, Sparks HG, Sane SU, Tzannis S, Przybycien TM. A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H(2)O solutions. *Analytical biochemistry*. 2000; 285(1): 33-49.
189. Smith D, Galazka VB, Wellner N, Sumner IG. High pressure unfolding of ovalbumin. *International Journal of Food Science & Technology*. 2000; 35(4): 361-70.
190. Cai K, Zheng X, Liu J, Du F, Yan G, Zhuang D, et al. Mapping the amide-I vibrations of model dipeptides with secondary structure sensitivity and amino acid residue specificity, and its application to amyloid beta-peptide in aqueous solution. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2019; 219: 391-400.
191. Seo J, Hoffmann W, Warnke S, Huang X, Gewinner S, Schollkopf W, et al. An infrared spectroscopy approach to follow beta-sheet formation in peptide amyloid assemblies. *Nature chemistry*. 2017; 9(1): 39-44.
192. Yamasaki M, Takahashi N, Hirose M. Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(37): 35524-30.

193. Cai S, Singh BR. Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophysical chemistry*. 1999; 80(1): 7-20.
194. Cai S, Singh BR. A distinct utility of the amide III infrared band for secondary structure estimation of aqueous protein solutions using partial least squares methods. *Biochemistry*. 2004; 43(9): 2541-9.
195. Manning M, Colon W. Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry*. 2004; 43(35): 11248-54.
196. Raskovic BP, N. Collagenase activity in fig latex could contribute to its efficacy in ethnomedicinal preparations. *Journal of Herbal Medicine*. 2016; 6(2): 73-8.
197. Nishimura K, Higashiya K, Ueshima N, Abe T, Yasukawa K. Characterization of proteases activities in *Ficus carica* cultivars. *Journal of food science*. 2020; 85(3): 535-44.
198. Edwin F, Sharma YV, Jagannadham MV. Stabilization of molten globule state of papain by urea. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002; 290(5): 1441-6.
199. Mohan V, Das N, Das A, Mishra V, Sen P. Spectroscopic Insight on Ethanol-Induced Aggregation of Papain. *The journal of physical chemistry B*. 2019; 123(10): 2280-90.
200. Sengupta B, Chaudhuri A, Das N, Sen P. Single Molecular Level Probing of Structure and Dynamics of Papain Under Denaturation. *Protein and peptide letters*. 2017; 24(11): 1073-81.
201. Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(7): 3590-4.
202. Dobson CM, Karplus M. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Current opinion in structural biology*. 1999; 9(1): 92-101.
203. Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID, Dobson CM. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(8): 4224-8.
204. Pearce FG, Mackintosh SH, Gerrard JA. Formation of amyloid-like fibrils by ovalbumin and related proteins under conditions relevant to food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(2): 318-22.

205. Tani F, Shirai N, Onishi T, Venelle F, Yasumoto K, Doi E. Temperature control for kinetic refolding of heat-denatured ovalbumin. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1997; 6(7): 1491-502.
206. Jansens KJAB, K; Delcour, J.A; Scanlon, M.G. Amyloid-like aggregation of ovalbumin: Effect of disulfide reduction and other egg white proteins. *Food Hydrocolloid*. 2016; 61: 914-22.
207. Iram A, Naeem A. Conformational transitions provoked by organic solvents in chicken egg ovalbumin: mimicking the local environment. *The protein journal*. 2013; 32(1): 7-14.
208. Naeem A, Amani S. Deciphering structural intermediates and genotoxic fibrillar aggregates of albumins: a molecular mechanism underlying for degenerative diseases. *PloS one*. 2013; 8(1) :e54061.
209. Cerf E, Sarroukh R, Tamamizu-Kato S, Breydo L, Derclaye S, Dufrene YF, et al. Antiparallel beta-sheet: a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *The Biochemical journal*. 2009; 421(3): 415-23.
210. Itkin A, Dupres V, Dufrene YF, Bechinger B, Ruyschaert JM, Raussens V. Calcium ions promote formation of amyloid beta-peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PloS one*. 2011; 6(3): e18250.
211. Ballal D, Chapman WG. Hydrophobic and hydrophilic interactions in aqueous mixtures of alcohols at a hydrophobic surface. *The Journal of chemical physics*. 2013; 139(11): 114706.
212. Hasecke F, Miti T, Perez C, Barton J, Scholzel D, Gremer L, et al. Origin of metastable oligomers and their effects on amyloid fibril self-assembly. *Chemical science*. 2018; 9(27): 5937-48.
213. Barton J, Arias DS, Niyangoda C, Borjas G, Le N, Mohamed S, et al. Kinetic Transition in Amyloid Assembly as a Screening Assay for Oligomer-Selective Dyes. *Biomolecules*. 2019; 9(10): 539.
214. Yanamandra K, Gruden MA, Casaite V, Meskys R, Forsgren L, Morozova-Roche LA. alpha-synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PloS one*. 2011; 6(4): e18513.
215. Fandrich M, Dobson CM. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *The EMBO journal*. 2002; 21(21): 5682-90.
216. Zandomenighi G, Krebs MR, McCammon MG, Fandrich M. FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2004; 13(12): 3314-21.
217. Naeem A, Khan TA, Muzaffar M, Ahmad S, Saleemuddin M. A partially folded state of ovalbumin at low pH tends to aggregate. *Cell biochemistry and biophysics*. 2011; 59(1): 29-38.

218. Miti T, Mulaj M, Schmit JD, Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules*. 2015; 16(1): 326-35.
219. Buijs J, Norde W, Lichtenbelt JWT. Changes in the Secondary Structure of Adsorbed IgG and F(ab')<sub>2</sub> Studied by FTIR Spectroscopy. *Langmuir*. 1996; 12(6): 1605-13.
220. Lee TH, Lin SY. Additives affecting thermal stability of salmon calcitonin in aqueous solution and structural similarity in lyophilized solid form. *Process Biochemistry*. 2011; 46(11): 2163-9.
221. Raskovic B, Vatic S, Andelkovic B, Blagojevic V, Polovic N. Optimizing storage conditions to prevent cold denaturation of trypsin for sequencing and to prolong its shelf life. *The Biochemical Engineering Journal*. 2016; 105: 168-76.
222. Mossuto MF, Dhulesia A, Devlin G, Frare E, Kumita JR, de Laureto PP, et al. The non-core regions of human lysozyme amyloid fibrils influence cytotoxicity. *Journal of molecular biology*. 2010; 402(5): 783-96.
223. Zurdo J, Guijarro JI, Dobson CM. Preparation and characterization of purified amyloid fibrils. *Journal of the American Chemical Society*. 2001; 123(33): 8141-2.
224. Naeem A, Fatima S, Khan RH. Characterization of partially folded intermediates of papain in presence of cationic, anionic, and nonionic detergents at low pH. *Biopolymers*. 2006; 83(1): 1-10.
225. Chamani J, Heshmati M. Mechanism for stabilization of the molten globule state of papain by sodium n-alkyl sulfates: Spectroscopic and calorimetric approaches. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008; 322(1): 119-27.
226. Cordeiro Y, Kraineva J, Suarez MC, Tempesta AG, Kelly JW, Silva JL, et al. Fourier transform infrared spectroscopy provides a fingerprint for the tetramer and for the aggregates of transthyretin. *Biophysical journal*. 2006; 91(3): 957-67.
227. Martin SR, Esposito V, De Los Rios P, Pastore A, Temussi PA. Cold denaturation of yeast frataxin offers the clue to understand the effect of alcohols on protein stability. *Journal of the American Chemical Society*. 2008; 130(30): 9963-70.
228. Meng LP, Joshi R, Eckstein H. Protease-catalyzed synthesis of the tripeptide CCK26–28, a fragment of CCK-8. *Amino Acids*. 2007; 33(1): 91-6.
229. Quiroga E, Priolo N, Obregon D, Marchese J, Barberis S. Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits. *The Biochemical Engineering Journal*. 2008; 39(1): 115-20.



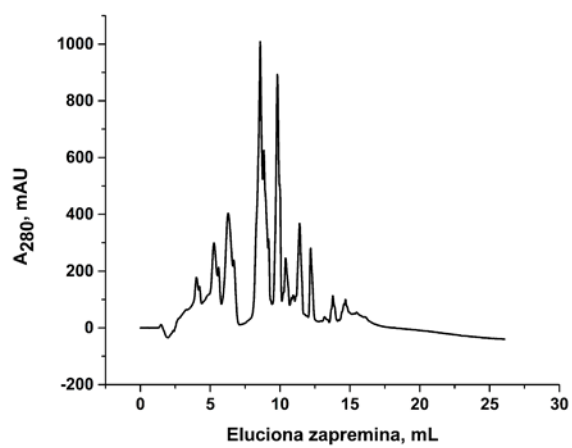
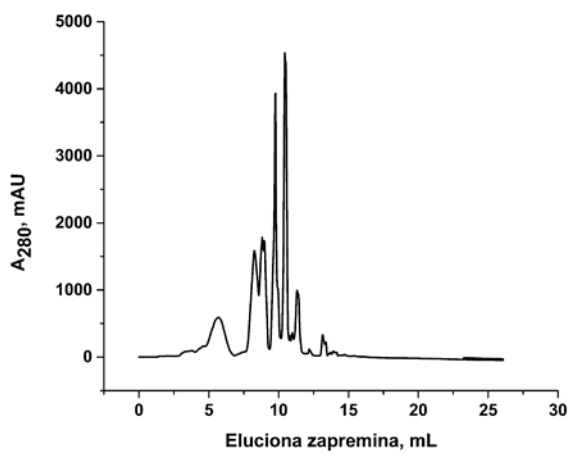
230. Sekizaki H, Toyota E, Fuchise T, Zhou S, Noguchi Y, Horita K. Application of several types of substrates to ficin-catalyzed peptide synthesis. *Amino Acids*. 2007; 34(1): 149.
231. Cabral M, Toure A, Garcon G, Diop C, Bouhsina S, Dewaele D, et al. Effects of environmental cadmium and lead exposure on adults neighboring a discharge: Evidences of adverse health effects. *Environmental pollution*. 2015; 206: 247-55.
232. Chen SBM, Y. B; Chen, L; Xian K. Adsorption of aqueous  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ions by nano-hydroxyapatite: Single- and multi-metal competitive adsorption study. *Geochemical Journal*. 2010; 44(3): 233-9.

## PRILOZI

Prilog 1. Karakteristike izoformi ficina iz UniProt baze podataka.

Sekvence ficina iz transkriptoma	Aminokiseline	pI	Mw (Da)
Ficin 1a (A0A2Z6DRL4)	217	6.89	23642.55
Ficin 1b (A0A2Z6DRT1)	217	8.42	23571.56
Ficin 1c (A0A2Z6DRL5)	216	8.64	23586.62
Ficin 2a (A0A2Z6DRL9)	216	5.39	23276.18
Ficin 2b (A0A2Z6DRP9)	216	5.39	23248.17
Ficin 2c (A0A2Z6DRM5)	216	5.39	23248.17
Ficin 3 (A0A2Z6DRN1)	217	9.50	23703.88
Ficin 4 (A0A2Z6DRL6)	215	8.88	23287.30
Ficin 5 (A0A2Z6DRM9)	217	8.85	23810.96
Ficin 6a (A0A2Z6DRW8)	217	7.70	24053.24
Ficin 6b (A0A2Z6DRN0)	217	7.70	24053.24
Sekvence poznate 3D strukture	Aminokiseline	pI	Mw (Da)
Ficin isoform A (A0A182DW06)	217	8.94	23532.64
Ficin isoform B (A0A182DW08)	217	7.69	24114.15
Ficin C (A0A182DW09)	217	8.10	24173.32
Ficin C (A0A182DW09)	217	4.87	23657.57

**Prilog 2. RP-HPLC hromatogram vodene frakcije lateksa smokve prikupljenog tokom A) juna i B) avgusta.**



### Prilog 3. Rezultati tripsinskog mapiranja prečišćene izoforme ficina.

1. Ficin1c MW: 23587

Da pI: 8.6

m/z peptida	Prepoznati MH <sup>+</sup>	Intenzitet	$\Delta$ (Da)	Početak	Kraj	Preskočena mesta sečenja	Sekvenca
679.18	679.3232	100	-0.143	67	72	0	<a href="#">(R)GGWMTK(A)</a>
750.08	750.3451	100	-0.265	96	102	0	<a href="#">(K)GECNVTK(A)</a>
750.08	750.3781	100	-0.298	113	118	0	<a href="#">(R)YESVPR(N)</a>
785.31	785.4152	100	-0.105	198	205	0	<a href="#">(R)NVAEPAGK(C)</a>
878.8	878.44	100	0.36	95	102	1	<a href="#">(R)KGEKNVTK(A)</a>
885.2	885.4716	100	-0.272	73	79	0	<a href="#">(K)AYDYIIK(N)</a>
1015.31	1015.5207	100	-0.211	1	8	0	<a href="#">(-)LPETVDWR(I)</a>
1061.43	1061.5586	100	-0.129	103	112	0	<a href="#">(K)ASQTVATIDR(Y)</a>
1105.66	1105.481	100	0.179	182	190	0	<a href="#">(R)NSWGNWGER(G)</a>
1178.3	1178.5333	100	-0.233	206	216	0	<a href="#">(K)CGIAMHSTYPV(-)</a>
1568.72	1568.8391	100	-0.119	127	142	0	<a href="#">(K)AVANQPVSVTIEAGGR(A)</a>
1628.75	1628.7663	100	-0.0163	80	94	0	<a href="#">(K)NGGITSQSNIYPYTAR(K)</a>
1696.59	1696.9341	100	-0.344	126	142	1	<a href="#">(K)KAVANQPVSVTIEAGGR(A)</a>
1757.16	1756.8613	100	0.299	80	95	1	<a href="#">(K)NGGITSQSNIYPYTARK(G)</a>

Prepoznati peptidi pokrivaju **48.6%** (105/216) sekvence proteina.

2. Ficin1a (**8% razlike u sekvenci između Ficin 1a i Ficin 1c**) MW:

23643 Da pI: 6.9

m/z peptida	Prepoznati MH <sup>+</sup>	Intenzitet	$\Delta$ (Da)	Početak	Kraj	Preskočena mesta sečenja	Sekvenca
885.2	885.4716	100	-0.272	73	79	0	<a href="#">(K)AYDYIIK(N)</a>
1015.31	1015.5207	100	-0.211	1	8	0	<a href="#">(-)LPETVDWR(I)</a>
1628.75	1628.7663	100	-0.0163	80	94	0	<a href="#">(K)NGGITSQSNIYPYTAR(K)</a>
1757.16	1756.8613	100	0.299	80	95	1	<a href="#">(K)NGGITSQSNIYPYTARK(G)</a>

Prepoznati peptidi pokrivaju **14.3%** (31/217) sekvence proteina.

3. Ficin3 (18% razlike u sekvenci između Ficin 1a i Ficin 1c) MW:  
23704 Da pI: 9.5

m/z peptida	Prepoznati MH <sup>+</sup>	Intenzitet	Δ (Da)	Početak	Kraj	Preskočena mesta sečenja	Sekvenca
885.2	885.4716	100	-0.272	73	79	0	<a href="#">(R)AYDYIIK(N)</a>
1015.31	1015.5207	100	-0.211	1	8	0	<a href="#">(-)LPETVDWR(S)</a>
1061.43	1061.5586	100	-0.129	103	112	0	<a href="#">(K)ASQTVATIDR(Y)</a>
1586.54	1586.7784	100	-0.238	67	79	1	<a href="#">(K)GGWMNRAYDYIIK(N)</a>

Prepoznati peptidi pokrivaju **14.3%** (31/217) sekvence proteina.

4. FicinC (12% razlike u sekvenci između Ficin C i Ficin 1c) MW:  
24174 Da pI: 8.1

m/z peptida	Prepoznati MH <sup>+</sup>	Intenzitet	Δ (Da)	Početak	Kraj	Preskočena mesta sečenja	Sekvenca
885.2	885.4716	100	-0.272	73	79	0	<a href="#">(K)AYDYIIK(N)</a>
1015.31	1015.5207	100	-0.211	1	8	0	<a href="#">(-)LPETVDWR(I)</a>
1297.54	1297.6279	100	-0.0879	207	218	0	<a href="#">(K)CGIAMQSTYPVK(K)</a>
1425.94	1425.7229	100	0.217	207	219	1	<a href="#">(K)CGIAMQSTYPVKK(T)</a>
1568.72	1568.8391	100	-0.119	127	142	0	<a href="#">(K)AVANQPVSVTIEAGGR(A)</a>
1696.59	1696.9341	100	-0.344	126	142	1	<a href="#">(K)KAVANQPVSVTIEAGGR(A)</a>

Prepoznati peptidi pokrivaju **20.3%** (45/222) sekvence proteina.

5. FicinD (30% razlike u sekvenci između Ficin D i Ficin 1c) MW: 23658 Da pI: 4.9

m/z peptida	Prepoznati MH <sup>+</sup>	Intenzitet	Δ (Da)	Početak	Kraj	Preskočena mesta sečenja	Sekvenca
885.2	885.4716	100	-0.272	73	79	0	<a href="#">(K)AYDYIIK(D)</a>
1015.31	1015.5207	100	-0.211	1	8	0	<a href="#">(-)LPETVDWR(S)</a>
1730.52	1730.798	100	-0.278	80	94	1	<a href="#">(K)DRGITSESDYPYTK(K)</a>

Prepoznati peptidi pokrivaju **13.6%** (30/220) sekvence proteina.

6. FicinB (11% of razlike u sekvenci između Ficin B i Ficin 1c) MW: 24157 Da pI: 7.7

m/z peptida	Prepoznati MH <sup>+</sup>	Intenzitet	Δ (Da)	Početak	Kraj	Preskočena mesta sečenja	Sekvenca
885.2	885.4716	100	-0.272	73	79	0	<a href="#">(K)AYDYIIK(N)</a>
1015.31	1015.5207	100	-0.211	1	8	0	<a href="#">(-)LPETVDWR(I)</a>
1297.54	1297.6279	100	-0.0879	207	218	0	<a href="#">(K)CGIAMQSTYPVK(K)</a>
1425.94	1425.7229	100	0.217	207	219	1	<a href="#">(K)CGIAMQSTYPVKK(T)</a>

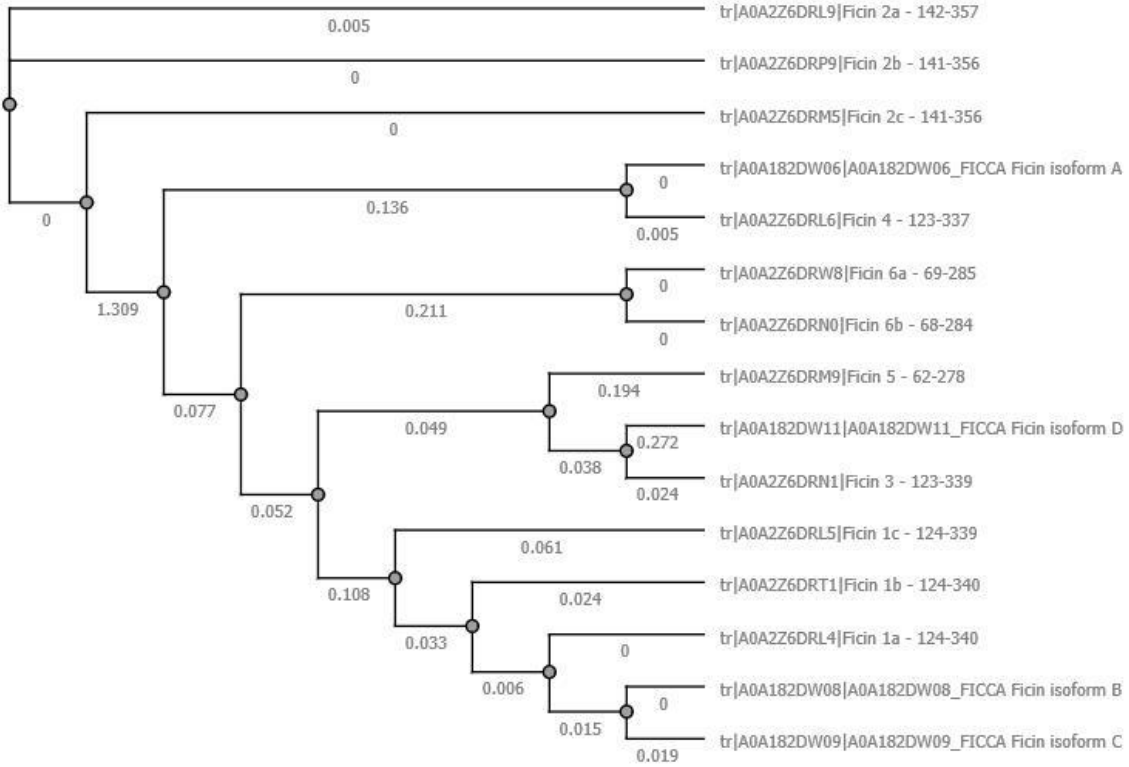
Prepoznati peptidi pokrivaju **12.6%** (28/222) sekvence proteina.

**Prilog 4. Pokrivenost sekvence, pouzdanost i identičnost ficina 1c sa templatima za građenje Phyre2 modela.**

<b>PDB kod templata</b>	<b>Naziv i funkcija proteina</b>	<b>Pokrivenost sekvence (%)</b>	<b>Pouzdanost (%)</b>	<b>Identičnost (%)</b>
<b>1PCI</b>	Prokarikain, cistein-proteaza iz <i>Carica papaya</i>	99	100	53
<b>5EGW</b>	Amb a 11, cistein-proteaza iz <i>Ambrosia artemisii folia</i> (2.70 Å)	99	100	48
<b>5EF4</b>	Amb a 11, cistein-proteaza iz <i>Ambrosia artemisii folia</i> (2.05 Å)	99	100	48
<b>6U7D</b>	Rekombinantni prekursor bromelaina, cistein-proteaza iz <i>Ananas comosus</i>	99	100	53
<b>1AEC</b>	Aktinidin-E-64 <sup>9</sup> kompleks, cistein-proteaza iz <i>Actinidia chinensis</i>	99	100	58
<b>4YYW</b>	Ficin D2, cistein-proteaza iz <i>Ficus carica</i>	99	100	70
<b>7PCK</b>	Prokatepsin K, lizozomalna cistein-proteaza iz <i>Homo sapiens</i>	99	100	41
<b>3TNX</b>	Termostabilna varijanta papaina, cistein-proteaza iz <i>Carica papaya</i> (2,60 Å)	99	100	50
<b>1S4V</b>	KDEL-vezana cistein-proteaza iz <i>Ricinus communis</i>	99	100	54
<b>2C0Y</b>	Cys25Ala mutant prokatepsina S, cistein-proteaze iz <i>Homo sapiens</i>	99	100	42
<b>1PPO</b>	Proteaza omega, cistein-proteaza iz <i>Carica papaya</i>	99	100	53
<b>4YYQ</b>	Ficin A, cistein-proteaza iz <i>Ficus carica</i>	99	100	73

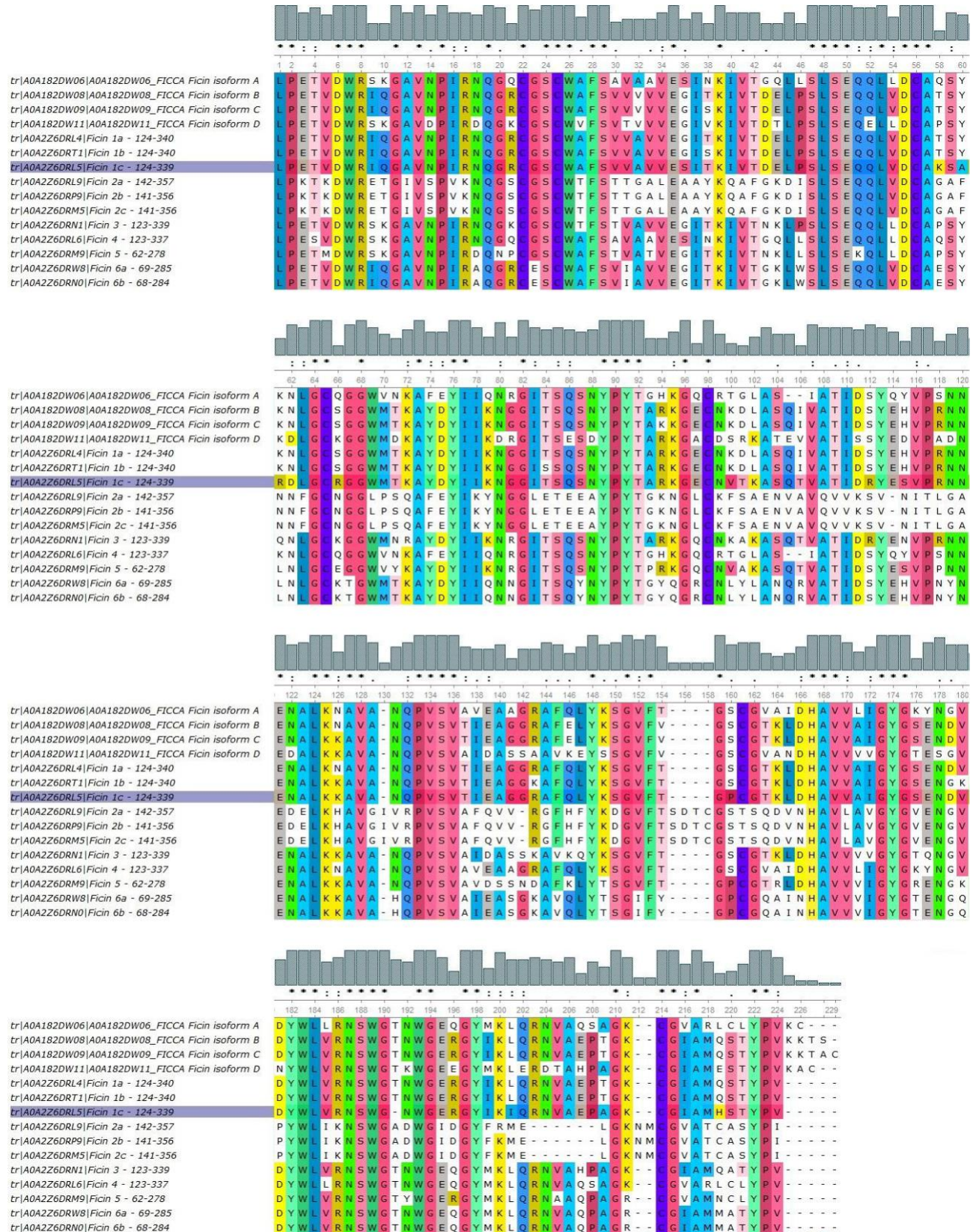
<sup>9</sup> N-[N-(L-3-transkarboksiiran-2-karbonil)-L-Leucil]-agmatin

**Prilog 5. Evolutivni odnos izoformi ficina utvrđen višestrukim poravnavanjem sekvenci korišćenjem alata MAFFT.**

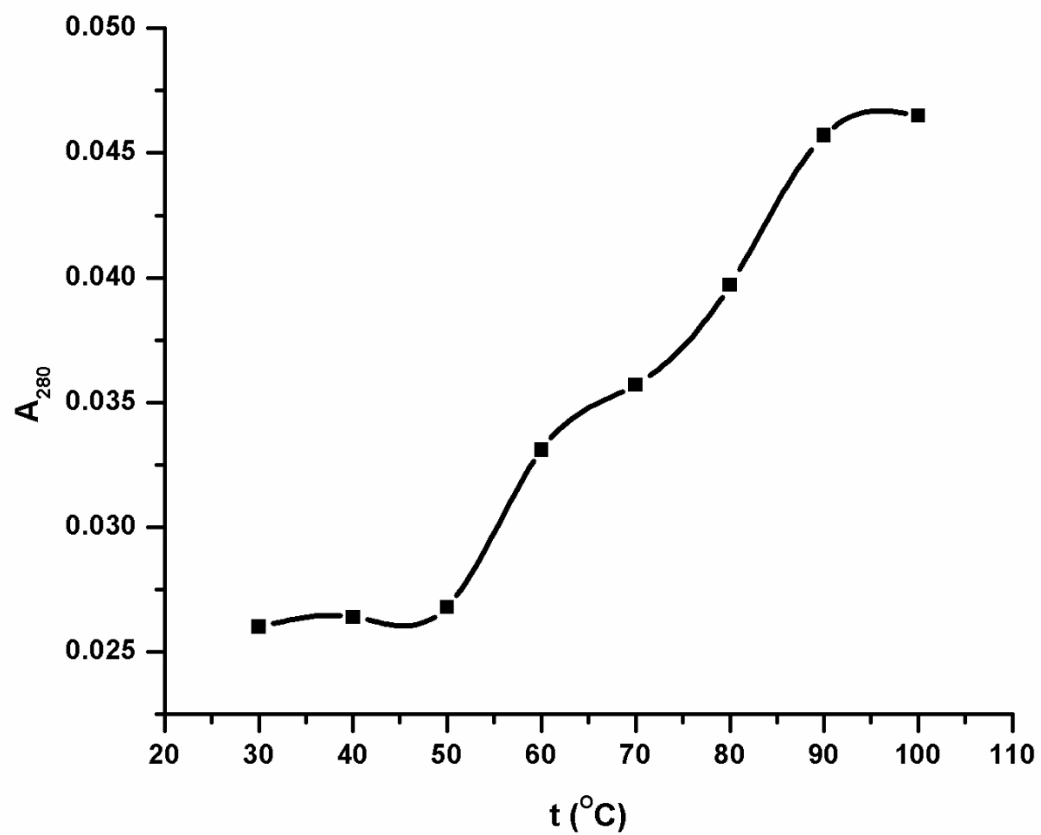




## Prilog 6. Poravnanje sekvenci zrelih izoformi ficina.

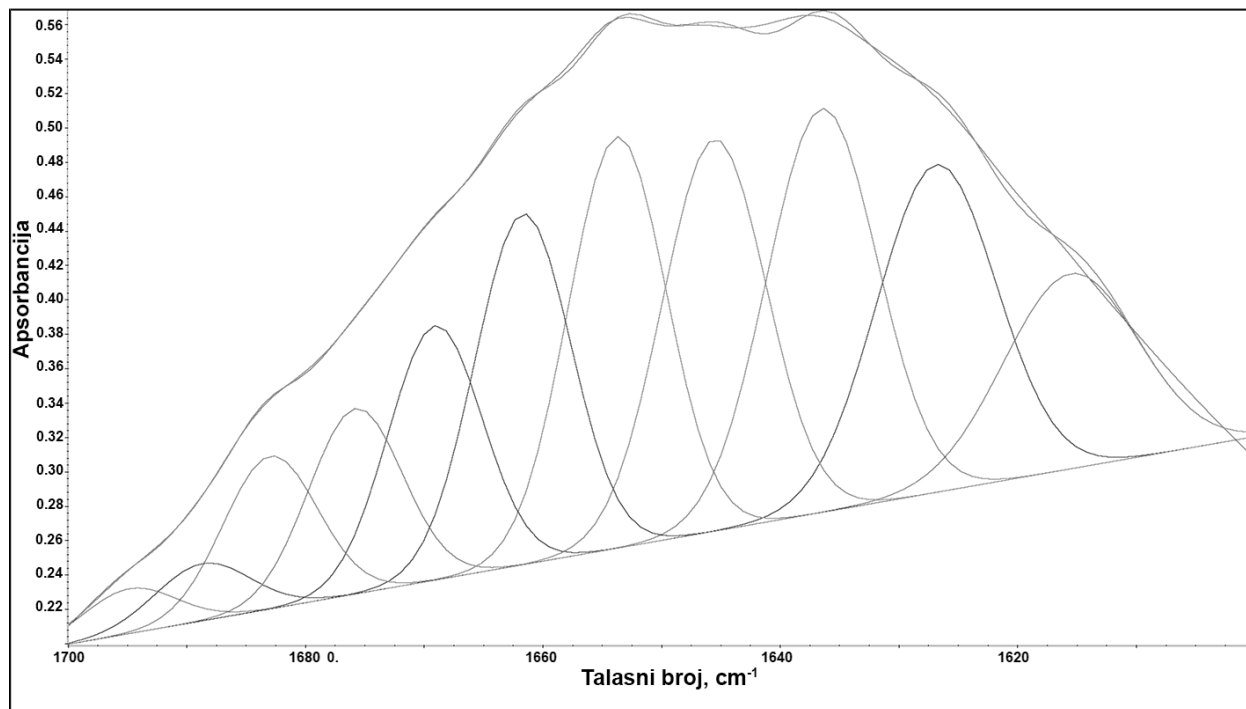


Prilog 7. Kriva denaturacije ovalbumina u kiseljoj sredini (pH 5) dobijena metodom UV spektroskopije.

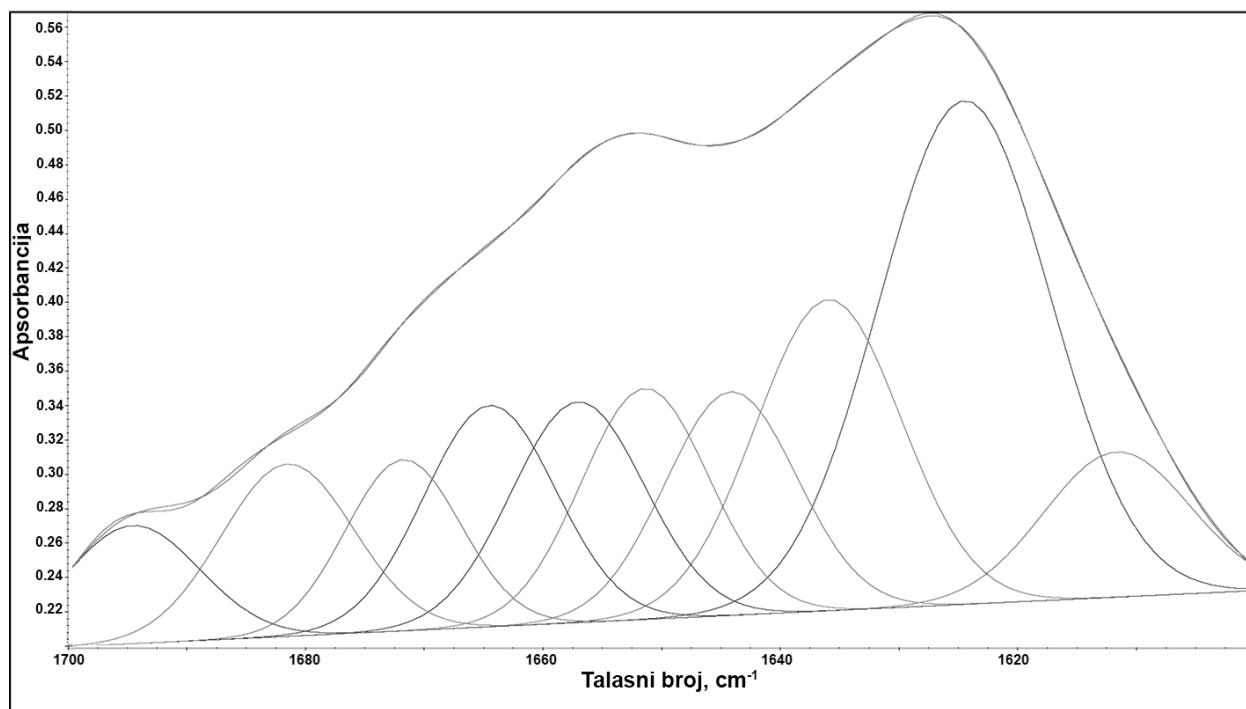


**Prilog 8. Dekonvolucija spektara ovalbumina: A) nativan ovalbumin na pH 7; B) amiloidni fibrili ovalbumina nakon 24 h na 90C i pH 2.**

**A**

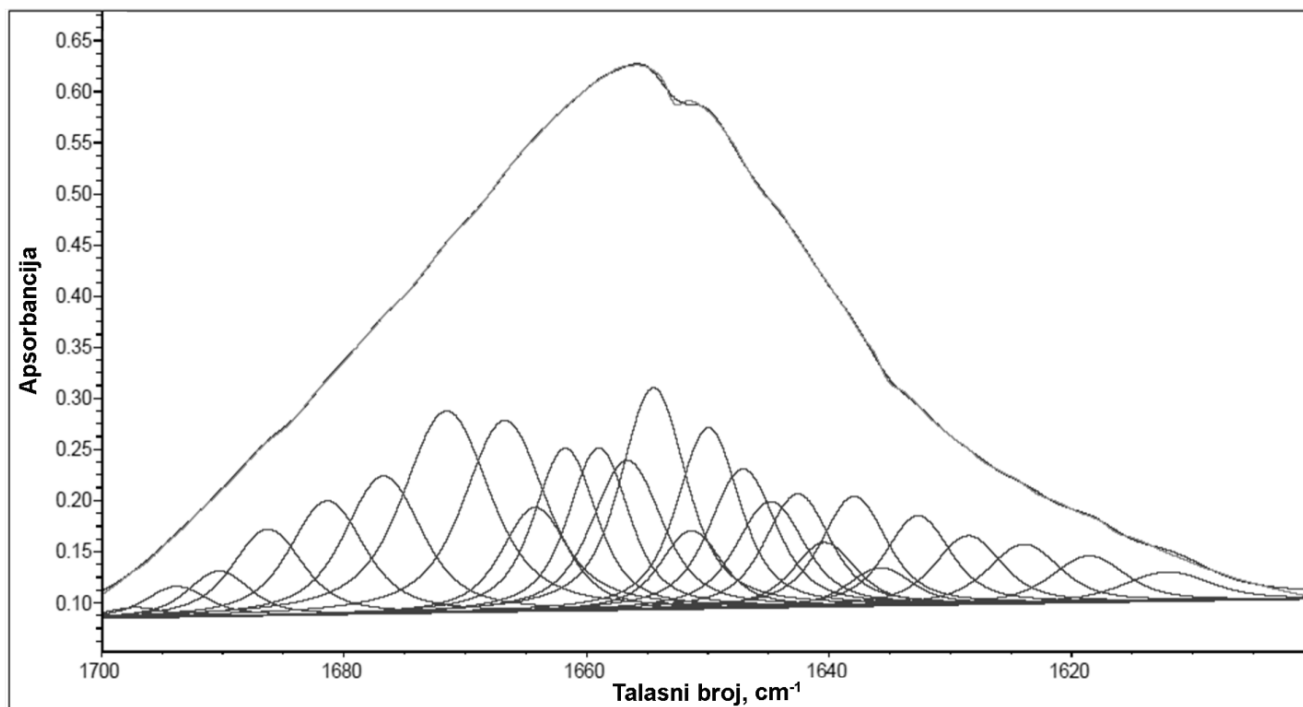


**B**

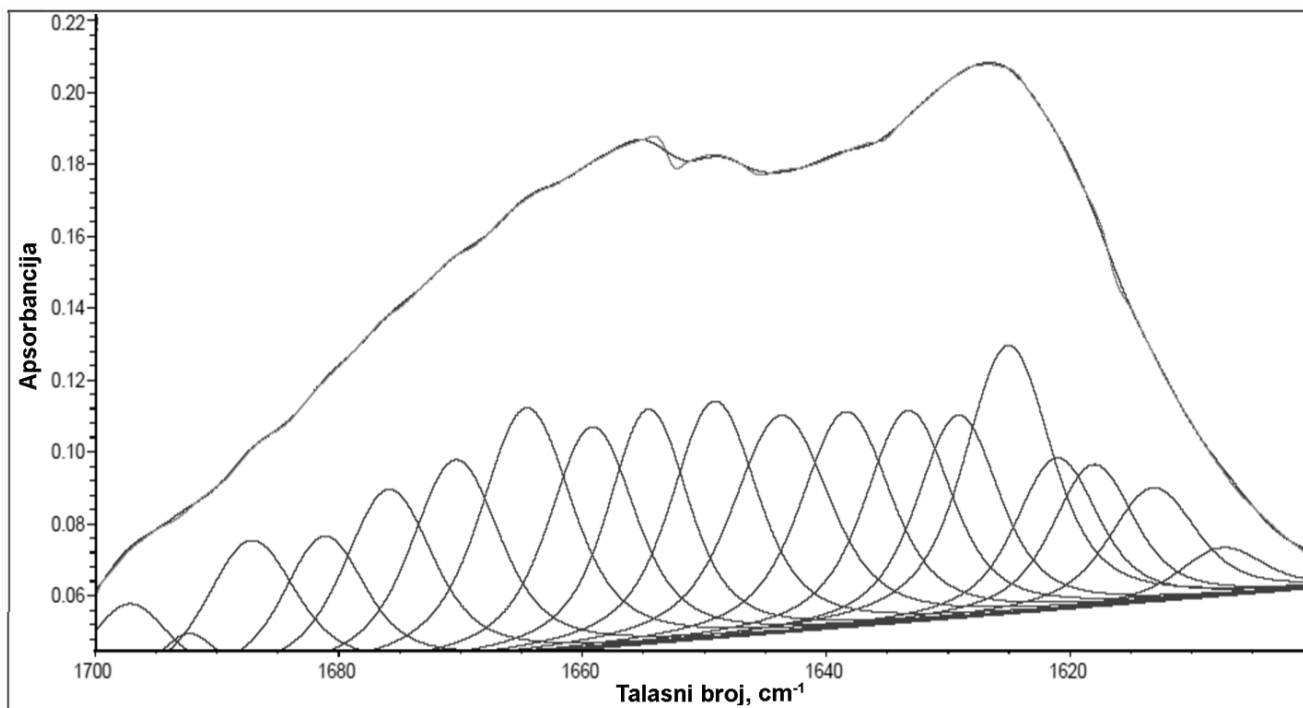


**Prilog 9. Dekonvolucija spektara lizozima: A) nativan lizozim; B) oligomeri lizozima nakon 96 h u 90% etanolu.**

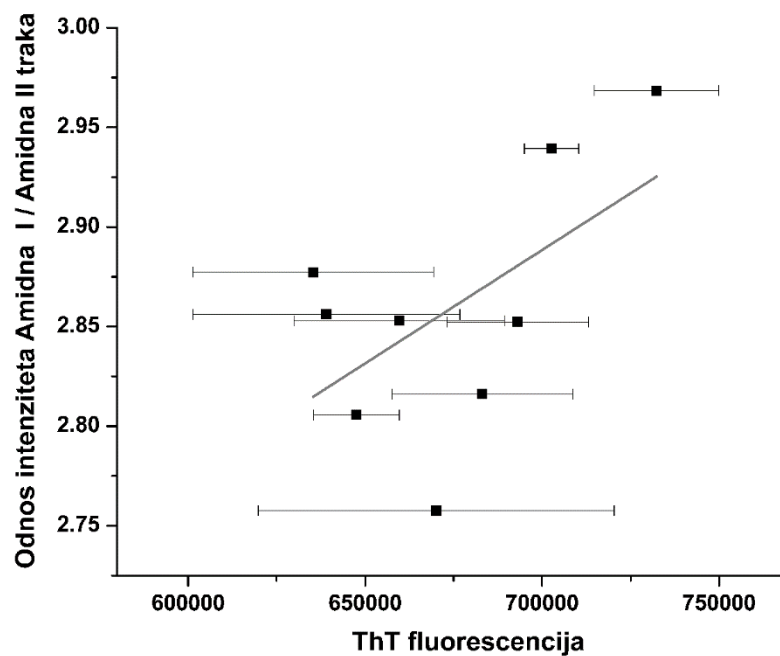
**A**



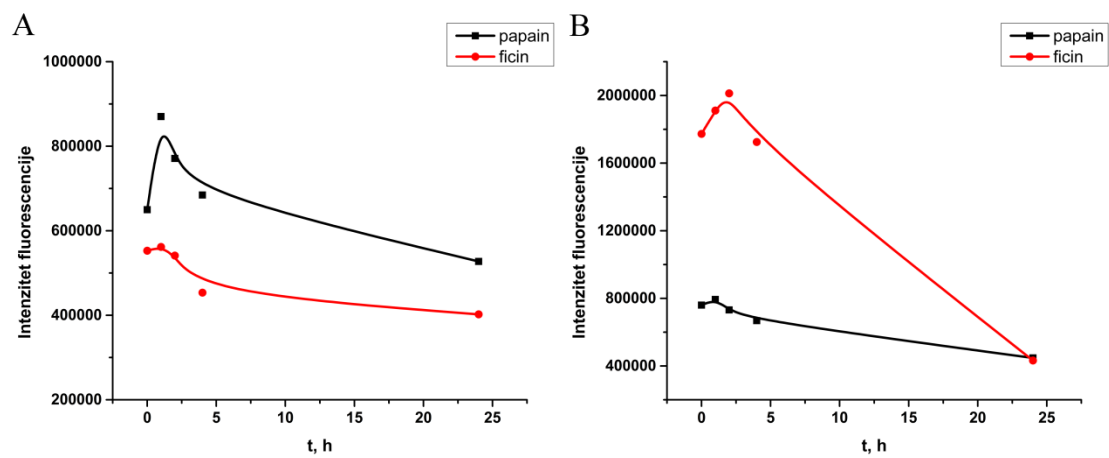
**B**



Prilog 10. Korelacija rezultata merenja odnosa Amidne I i Amidne II trake sa intenzitetom fluorescencije ThT za uzorke lizozima inkubiranih u 90% etanolu. Odnos intenziteta je dobijen sabiranjem intenziteta traka agregacione  $\beta$ -pločice ( $1620$  i  $1698\text{ cm}^{-1}$ ) i deljenjem sa intenzitetom maksimuma u Amidnom II region.



**Prilog 11. Praćenje formiranja amiloida papaina i smeše ficina merenjem intenziteta fluorescencije ThT tokom 24 h inkubiranja u rastvoru HCl pH 3: A) bez redukcionog sredstva, B) u prisustvu 355 mM  $\beta$ -merkaptoetanol.**



## Biografija

Jelica Milošević rođena je 15.10.1991. u Beogradu. Osnovnu školu „Vuk Karadžić“ u Sremčici i XIII beogradsku gimnaziju završila je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“ i kao učenica generacije. Hemijski fakultet - Univerziteta u Beogradu, studentski program Biohemija upisala je školske 2010/2011. godine, a diplomirala 6. avgusta 2014. godine, sa prosečnom ocenom 9,71. Master akademske studije na istom fakultetu, na studijskom programu Biohemija, upisala je školske 2014/2015. godine, a završila 29.9.2015. sa prosečnom ocenom 9,50. Tokom osnovnih i master akademskih studija bila je nosilac stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Mladi istraživači“, za koju se kandidovala osvajanjem drugog mesta na međunarodnoj biološkoj olimpijadi „Racing to save the environment“ 2010. godine. Po završetku osnovnih akademskih studija proglašena je najboljim studentom na studijskom programu Biohemija u generaciji koje je diplomirala školske 2013/2014. Dobitnica je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh tokom studija na Hemijskom fakultetu i diplome „Đorđe Stefanović“ za najboljeg studenta studijskog programa Biohemija školske 2013/2014. godine.

Školske 2015/2016. započela je doktorske akademske studije Biohemije na Katedri za biohemiju na Hemijskom fakultetu - Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Natalije Polović. Položila je sve planom i programom predviđene ispite na doktorskim studijama sa prosečnom ocenom 10,00. Tokom doktorskih studija uključena je na projekat „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ (172049) kao stipendista - doktorand Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (2016-2018.), a zatim kao istraživač-pripravnik (januar-decembar 2018.) na Hemijskom fakultetu – Univerziteta u Beogradu. Od 2015. godine bila je angažovana u izvođenju nastave na više predmeta na Katedri za biohemiju Hemijskog fakulteta. Od decembra 2018. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za biohemiju. Učestvovala je u izvođenju nastave na predmetima: Biohemija proteina i nukleinskih kiselina, Biohemija (studijski program Hemija), Biohemija (studijski programi Hemija životne sredine i Nastava hemije), Biofizika i biohemija makromolekula, Patobiohemija, Eksperimentalna biohemija, Hemija prirodnih proizvoda i Ogledi u nastavi biohemije. Član je nekoliko Komisija Hemijskog fakulteta, uključujući Komisiju za akreditaciju.

Tokom 2018. godine učestvovala je u tri škole kao dobitnica granta koji dodeljuje Federacija evropskih biohemijskih društava (FEBS) za učešće u školi protein-ligand interacija u mestu

Nove Hradi u Češkoj, granta Organizacije evropskih biofizičkih društava (EBSO) za učešće u školi biofizike Greta Pifat-Mrzljak u Splitu, kao i granta akcije Kooperacije u nauci i tehnologiji (COST) za učešće u školi biofizike u Palermu. Tokom studija završila je i nekoliko metodoloških radionica i obuka u Srbiji, kao i školu inovativnog preduzetništva u Naučno-tehnološkom parku u Beogradu.

Prvi je autor četiri i koautor još četiri rada objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja. Autor je 3 saopštenja, jednog na međunarodnoj konferenciji, a dva na nacionalnim konferencijama Biohemijskog društva Srbije.

Član je Biohemijskog društva Srbije, Srpskog hemijskog društva i Društva biofizičara Srbije.

Objavljeni radovi koji čine deo disertacije:

1. Jelica Milošević, Jovan Petrić, Branko Jovčić, Brankica Janković, Natalija Polović, Exploring the potential of infrared spectroscopy in qualitative and quantitative monitoring of ovalbumin amyloid fibrillation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 229 (2020): 117882. (IF2019 3,232, M21, 7/42 Spectroscopy). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117882>
2. Jelica Milošević, Brankica Janković, Radivoje Prodanović, Natalija Polović, Comparative stability of ficin and papain in acidic conditions and the presence of ethanol, *Amino Acids* 51 (2019): 829–838. (IF2019 3,063, M22, 153/297 Biochemistry & Molecular Biology). <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02724-3>
3. Jelica Milošević, Lidija Vrhovac, Filip Đurković, Brankica Janković, Saša Malkov, Jurij Lah, Natalija Polović, Isolation, identification, and stability of Ficin 1c isoform from fig latex, *New Journal of Chemistry* 44 (2020): 15716-15723. (IF2019 3,288, M22, 68/177 Chemistry, Multidisciplinary). <https://doi.org/10.1039/D0NJ02938F>
4. Jelica Milošević, Radivoje Prodanović, Natalija Polović, On the Protein Fibrillation Pathway: Oligomer Intermediates Detection Using ATR-FTIR Spectroscopy, *Molecules* 26 (2021): 970. (IF2019 3,267, M22, 37/126 Chemistry, Multidisciplinary, 70/171 Biochemistry & Molecular Biology). <https://doi.org/10.3390/molecules26040970>



Изјава о авторству и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Јелица Р. Милошевић**

Број индекса: **ДБ09/2015**

Број индекса: ДБ09/2015

Студијски програм: Докторских наука

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом:

**„Дивезитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина“**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијском листу у Београду.

Овај лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијском листу у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 14.6.2021.

Јелица Милошевић

У Београду, 14.6.2021.

Јелица Милошевић

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора: **Јелица Р. Милошевић**

Број индекса: **ДБ09/2015**

Студијски програм: **Доктор биохемијских наука**

Наслов рада:

**„Дивезитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина“**

Ментор проф. Др Наталија Половић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 14.6.2021.

Јелица Милошевић

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду** унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Дивезитет пептидних секвенци у амилоидном агрегирању протеина“  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање. Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

**Потпис аутора**

У Београду, 14.6.2021.

Јелена Милошевић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.