

**Uniwersytet Gdański**

**Wydział Chemii**

**Katedra Chemii Biomedycznej**

mgr Justyna Żygowska

**BADANIE WPŁYWU JONÓW  $\text{Cu}^{2+}$   
NA STRUKTURĘ, WŁAŚCIWOŚCI I OLIGOMERYZACJĘ  
CYSTATYNY C**

Rozprawa doktorska

Promotor

**dr hab. Aneta Szymańska, prof. UG**

Promotor pomocniczy

**dr Marta Orlikowska**

**Gdańsk 2022**



*Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi **dr hab. Anecie Szymańskiej, prof. UG** za opiekę naukową, cierpliwość, nieocenioną pomoc, liczne wskazówki i wiarę w moje możliwości. Dziękuję za wsparcie i ciepłe słowa, które były najlepszą motywacją do pracy.*

*Dziękuję mojemu promotorowi pomocniczemu **dr Marcie Orlikowskiej** za wszystkie lekcje krytalografii, których mi udzieliła, za wyrozumiałość, miłą współpracę oraz za to, że cierpliwie i z uśmiechem znosiła łowienie moich kryształów.*

*Dziękuję wszystkim **pracownikom i doktorantom z Katedry Chemii Biomedycznej** za ciepłą atmosferę w pracy, odpowiedzi na wszystkie moje pytania, cenne rady i masę uśmiechu.*

*Dziękuję moim katedralnym przyjaciołom **Magdalenie Bojko, Sandrze Skibiszewskiej i Marcie Piotrowskiej.** Byłyście dla mnie ogromnym wsparciem zarówno psychicznym jak i naukowym. Jestem Wam za to niewymownie wdzięczna.*

*Dziękuję mojej przyjaciółce **Magdalenie Miodyńskiej,** bez której prawdopodobnie nie udałoby mi się napisać niniejszej rozprawy. Dziękuję za wszystkie wieczorne rozmowy, wszystkie łzy i uśmiechy, które doprowadziły (mam nadzieję, że nas obie) do obrony rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję również **mojej rodzinie,** która ogromnie we mnie wierzy i nieustannie mi kibicuje. Dziękuję za wyrozumiałość i za to, że zawsze mogę liczyć na Wasze wsparcie.*

**PRACA NAUKOWA WSPÓŁFINANSOWANA ZE ŚRODKÓW**

Narodowego Centrum Nauki  
konkurs OPUS 11  
nr UMO-2016/21/B/NZ1/02823



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I

Uniwersytetu Gdańskiego  
konkurs na projekt Badań Młodych Naukowców

nr 538-8720-B818-18

nr 539-8720- B342-19

nr 539-T070-B481-20

nr 539-T070-B921-21



**Uniwersytet  
Gdański**

## Spis treści

<b>Wykaz stosowanych skrótów .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Wprowadzenie.....</b>	<b>10</b>
1. Choroby neurodegeneracyjne i agregacja białek.....	10
1.1 Demencja .....	11
1.2 Amyloidozy .....	12
1.3 Agregacja białek amyloidogennych.....	16
1.4 Laboratoryjne metody badania agregacji białek.....	21
2. Rola jonów metali w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych .....	24
2.1 Jony miedzi .....	25
2.2 Jony miedzi w chorobie Alzheimera .....	29
2.3 Jony miedzi w chorobie Parkinsona .....	32
2.4 Jony cynku .....	34
3. Ludzka cystatyna C .....	37
3.1 Funkcje biologiczne .....	37
3.2 Budowa cząsteczki .....	39
3.3 Dziedziczna angiopatia amyloidowa typu islandzkiego.....	41
3.4 Mechanizm oligomeryzacji .....	42
3.5 Oddziaływanie z jonami metali.....	44
<b>II. Cel pracy .....</b>	<b>47</b>
<b>III. Metody badań.....</b>	<b>50</b>
1. Analiza i otrzymywanie DNA .....	50
1.1 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym .....	50
1.2 Mutagenesa ukierunkowana .....	50
2. Nadprodukcja rekombinowanych białek w komórkach bakteryjnych.....	52
2.1 Nadprodukcja białek w bakteriach <i>Escherichia coli</i> .....	52
2.2 Oczyszczanie białek – chromatografia cieczowa .....	54
2.3 Elektroforeza białek.....	56
3. Analiza białek.....	56
3.1 Dichroizm kołowy .....	56
3.2 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego.....	58
3.3 Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego .....	59

---

3.4 Transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	60
3.5 Testy kolorymetryczne .....	61
4. Rentgenografia strukturalna .....	63
4.1 Krystalizacja metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli .....	63
4.2 Pomiar dyfrakcji i analiza danych dyfrakcyjnych .....	65
<b>IV. Procedury .....</b>	<b>68</b>
1. Otrzymanie wektorów ekspresyjnych.....	68
1.1 Elektroforeza w żelu agarozowym.....	68
1.2 Mutagenesa ukierunkowana .....	68
1.3 Transformacja do komórek bakteryjnych .....	70
1.4 Amplifikacja i izolacja DNA .....	71
2. Nadprodukcja rekombinowanych białek .....	71
2.1 Przygotowanie komórek kompetentnych .....	71
2.2 Transformacja do komórek kompetentnych.....	72
2.3 Nadprodukcja białek.....	72
2.4 Nadprodukcja białka znakowanego izotopowo .....	73
3. Oczyszczanie białek .....	74
3.1 Elektroforeza SDS-PAGE .....	74
3.2 Izolacja nadprodukowanych białek z komórek bakteryjnych .....	75
3.3 Oczyszczanie białek .....	75
3.4 Elektroforeza natywna w żelu agarozowym.....	76
4. Charakterystyka białek.....	77
4.1 Analiza chromatograficzna .....	77
4.2 Analiza LC-MS .....	77
4.3 Badania konformacyjne metodą dichroizmu kołowego .....	77
4.4 Dimeryzacja w obecności chlorowodoru guanidyny .....	78
4.5 Badania aktywności białek .....	78
5. Badanie oddziaływania cystatyny C z jonami Cu <sup>2+</sup> .....	79
5.1 Inkubacja białek z jonami miedzi.....	79
5.2 Badanie zmian konformacyjnych metodą dichroizmu kołowego .....	80
5.3 Analiza oddziaływania białko-metal metodą spektroskopii EPR.....	80
5.4 Analiza oddziaływania białko-metal metodą spektroskopii NMR.....	81
6. Badanie wpływu jonów Cu <sup>2+</sup> na proces oligomeryzacji cystatyny C.....	81

---

6.1 Fibrylizacja białek.....	81
6.2 Testy kolorymetryczne .....	83
6.3 Transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	83
7. Rentgenografia strukturalna .....	84
7.1 Krystalizacja białek.....	84
7.2 Pomiar dyfrakcyjne .....	85
7.3 Rozwiązywanie i udokładnianie struktur.....	87
<b>V. Prezentacja i omówienie wyników .....</b>	<b>88</b>
1. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych i nadprodukcja białek.....	88
2. Izolacja i oczyszczanie białek.....	91
3. Charakterystyka nadprodukowanych białek.....	95
3.1 Analiza chromatograficzna .....	95
3.2 Analiza widm masowych .....	96
3.3 Analiza widm dichroizmu kołowego.....	99
3.4 Dimeryzacja .....	103
3.5 Analiza aktywności biologicznej .....	104
4. Badanie oddziaływania białko-metal .....	105
4.1 Inkubacja białek z jonami $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Zn}^{2+}$ .....	105
4.2 Badanie zmian konformacyjnych metodą dichroizmu kołowego .....	109
4.3 Analiza EPR kompleksu hCC- $\text{Cu}^{2+}$ .....	116
4.4 Analiza NMR kompleksu hCC- $\text{Cu}^{2+}$ .....	117
5. Badanie wpływu jonów $\text{Cu}^{2+}$ na fibrylizację cystatyny C.....	118
5.1 Fibrylizacja w pH 4,0 .....	119
5.2 Fibrylizacja w pH 6,9 .....	137
6. Krystalizacja białek i analiza struktur krystalicznych.....	139
6.1 Krystalizacja .....	140
6.2 Analiza danych dyfrakcyjnych.....	146
6.3 Analiza map gęstości elektronowej hCC WT .....	149
6.4 Analiza struktur krystalicznych .....	150
<b>Podsumowanie .....</b>	<b>156</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>161</b>

**Wykaz stosowanych skrótów**

**A $\beta$**  – amyloid  $\beta$

**AD** – choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer Disease*)

**AFM** – mikroskopia sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*)

**Amp** – ampicylina

**AMPAR** – receptor kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego

**ANS** – kwas 8-anilinonaftaleno-1-sulfonowy

**APP** – białko prekursorowe amyloidu  $\beta$  (ang. *Amyloid Precursor Protein*)

**APS** – nadsiarczan amonu (ang. *Ammonium Persulfate*)

**AUN** – autonomiczny układ nerwowy

**BAPA** – chlorowodorek p-nitroanilidu N-benzoilo-L-argininy

**Bza** – chlorowodorek benzamidyny

**CD** – dichroizm kołowy (ang. *Circular Dichroism*)

**CUN** – centralny układ nerwowy

**DMSO** – dimetylosulfotlenek

**dNTP** – mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów

**DOPAL** – 3,4-dihydroksyfenyloacetaldehyd

**DTT** – ditiotreitól

***E. coli*** – *Escherichia coli*

**EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy

**EPR** – elektronowy rezonans paramagnetyczny  
(ang. *Electron Paramagnetic Resonance*)

***for.*** – oligonukleotyd komplementarny do nici matrycowej DNA (ang. *forward*)

**Gdn** – chlorowodorek guanidyny

**hCC** – ludzka cystatyna C (ang. *Human Cystatin C*)

**HCCAA** – dziedziczna angiopatia amyloidowa typu islandzkiego  
(ang. *Human Cystatin C Amyloid Angiopathy*)

**HNE** – 4-hydroksy-2-nonenal

**IEX** – chromatografia jonowymienna (ang. *Ion Exchange Chromatography*)

- IPTG** – izopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozyd
- LA** – stała pożywka mikrobiologiczna zawierająca agar, ekstrakt, drożdżowy, trypton oraz chlorek sodu
- LA/Amp** – podłoże mikrobiologiczne LA z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 0,1 mg/ml
- LB** – płynna pożywka mikrobiologiczna (ang. *Lysogeny Broth*) zawierająca ekstrakt drożdżowy, trypton oraz chlorek sodu
- LB/Amp** – pożywka mikrobiologiczna LB z dodatkiem ampicyliny w stężeniu 0,1 mg/ml
- MPD** – 2-metylo-2,4-pentanodiol
- MWCO** – najniższa masa cząsteczkowa białka, dla której 90 % cząsteczek jest zatrzymywanych przez błonę (ang. *Molecular Weight Cut Off*)
- NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy
- NMDAR** – receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego
- NMR** – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*)
- OD<sub>600</sub>** – gęstość optyczna (ang. *Optical Density*) przy długości fali 600 nm
- OmpA** – bakteryjne białko błonowe A (ang. *Outer Membrane Protein A*)
- OUN** – obwodowy układ nerwowy
- PBS** – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem
- PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)
- PD** – choroba Parkinsona (ang. *Parkinson Disease*)
- PDB** – baza danych o strukturach przestrzennych białek (ang. *Protein Data Bank*)
- PEG** – polimer zbudowany z poli(tlenku etylenu)
- pI** – punkt izoelektryczny
- RBPL** – receptor bramkowany potencjałem typu L
- rev.** – oligonukleotyd komplementarny do nici kodującej DNA (ang. *reverse*)
- RMSD** – średnie kwadratowe odchylenie od położenia atomów C $\alpha$  nałożonych białek
- ROS** – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*)
- SD** – sekwencja Shine-Dalgarno
- SDS** – sól sodowa siarczanu dodecyłu
- SDS-PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- SEC** – chromatografia sączenia molekularnego (ang. *Size-Exclusion Chromatography*)



- SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*)
- SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa
- TAE** – bufor do elektroforezy DNA złożony z 40mM Tris, 20mM kwasu octowego oraz 1mM EDTA
- TBE** – bufor do elektroforezy DNA złożony z 90mM Tris, 90mM kwasu borowego oraz 1mM EDTA
- TEM** – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*)
- TEMED** – N,N,N',N'-tetrametylenodiamina
- ThT** – tioflawina T
- TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor*)
- Tris** – 2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol
- TTR** – transtyretyna
- % v/v** – stężenie procentowe objętościowe
- % w/v** – stężenie procentowe wagowo objętościowe

## I. Wprowadzenie

### 1. Choroby neurodegeneracyjne i agregacja białek

Rozwój medycyny oraz wzrost poziomu higieny osobistej na przestrzeni wieków doprowadziły do znacznej poprawy komfortu i bezpieczeństwa życia. Masowa produkcja leków i pojawienie się szczepionek zaowocowały wydłużeniem średniej długości życia na całym świecie, w niektórych rejonach nawet dwu- lub trzykrotnie. Ze względu na dobre warunki bytowe oraz wysoki poziom opieki zdrowotnej zjawisko to jest najlepiej widoczne na obszarze Europy, gdzie, według danych statystycznych, średnia długość życia w roku 400 wynosiła zaledwie 25 lat, a w 1950 aż 66 lat [1] i nadal rosta. Przeprowadzono szczegółowe badania dotyczące długości życia na obszarze Francji w latach 1750-2000 [1] (dane zebrane w **Tabeli 1**), które dodatkowo potwierdziły wyżej opisaną tendencję.

Aktualny (14.07.2021) rekord Guinnessa w długości życia należy do Francuzki Jeanne Louise Calment, która zmarła w wieku 122 lat i 164 dni [2] i jest jedną z wielu osób, które przekroczyły barierę stu lat. Wydłużenie długości życia, choć na pozór jest zjawiskiem pozytywnym, to niesie za sobą szereg konsekwencji, a jedną z nich jest gwałtowne szerzenie się chorób wieku starczego, w tym między innymi demencji.

**Tabela 1** Dane statystyczne dotyczące średniej długości życia kobiet i mężczyzn na obszarze Francji w latach 1750-2000 [1].

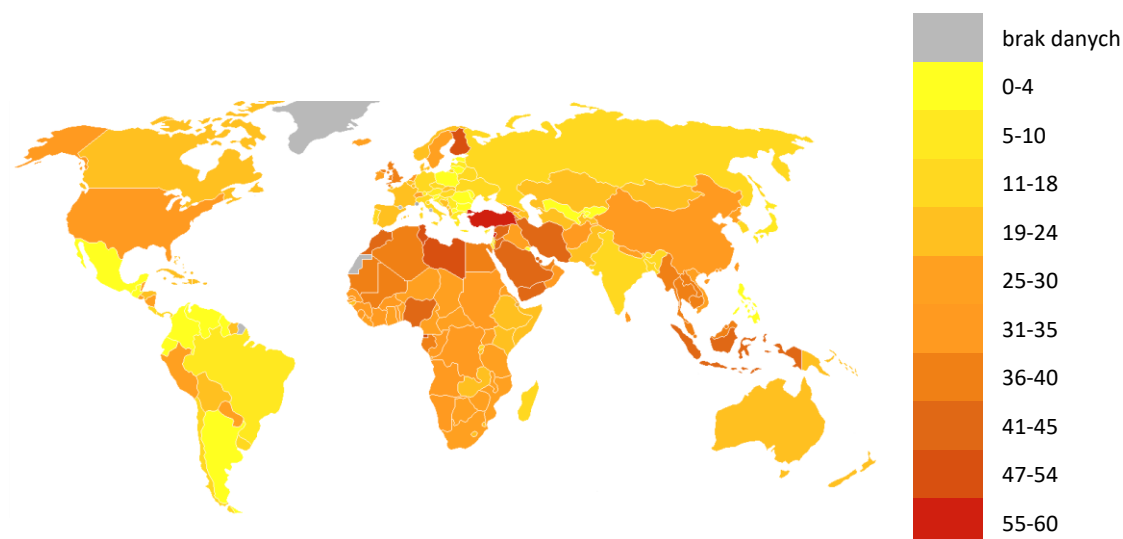
Rok	Mężczyźni	Kobiety
1750	27 lat	29 lat
1850	39 lat	41 lat
1900	46 lat	50 lat
1955	65 lat	71 lat
1970	68 lat	76 lat
1985	71 lat	79 lat
2000	75 lat	83 lat

## 1.1 Demencja

Demencja lub inaczej otępienie to, według Encyklopedii Popularnej PWN, postępujący spadek sprawności umysłowej wskutek choroby centralnego układu nerwowego (CUN) [3]. Wyróżnia się wiele rodzajów demencji, ale najpowszechniejszym z nich jest otępienie o typie alzheimerowskim. W tym przypadku uszkodzeniu ulega głównie płat skroniowy mózgu, a szczególnie hipokamp, który jest odpowiedzialny za pamięć [4,5]. Bez względu na rodzaj demencji, do jej pierwszych objawów najczęściej należą:

- pobudzenie,
- zaburzenia motoryczne,
- lęk i drażliwość,
- zaburzenia apetytu,
- w niektórych przypadkach także omamy i urojenia [6].

Otępienie ma zazwyczaj charakter postępujący, a jego skutki są nieodwracalne i prowadzą do śmierci chorego. Światową skalę zgonów wywołanych demencją w roku 2018 przedstawia **Rycina 1**. Problem demencji nie dotyczy tylko krajów z wysoko rozwiniętą służbą zdrowia, ale, jak wynika z niżej przedstawionej mapy, jest to już problem ogólnoświatowy.



**Rycina 1** Ilość zgonów (na 100 000 osób) wywołanych demencją w poszczególnych państwach świata. Na podstawie danych statystycznych zgromadzonych przez WHO w 2018 roku [7].

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) na demencję cierpi około 50 milionów ludzi na świecie i co roku przybywa kolejne 10 milionów chorych [8]. Problem stał się na tyle poważny, że WHO uznało tę przypadłość za priorytet w ochronie zdrowia publicznego i w maju 2017 roku Światowe Zgromadzenie Zdrowia zatwierdziło globalny plan działania w sprawie walki z demencją [9], który objął takie kwestie jak badania naukowe, diagnoza, leczenia i opieka nad chorymi, ale także zwiększanie świadomości społeczeństwa dotyczącej występowania, objawów i postępowania z osobami dotkniętymi tą przypadłością.

Leczenie demencji opiera się obecnie głównie na farmakoterapii prowadzącej do obniżenia szybkości postępowania uszkodzenia mózgu i pobudzaniu pacjentów do myślenia (trenowanie pamięci, częste rozmowy, terapie wspomnieniowe). Medycyna nie ma jeszcze do dyspozycji medykamentów hamujących pogłębianie chorobowej degeneracji mózgu, ani pobudzających układ nerwowy do regeneracji.

Demencja sama w sobie nie jest chorobą. Należy ją rozpatrywać jako konsekwencję uszkodzenia tkanki nerwowej mózgu. Do tego rodzaju uszkodzeń dochodzi w wyniku urazu, krwotoku lub na skutek rozwoju chorób neurodegeneracyjnych np. niektórych amyloidoz, prowadzących do obumierania neuronów.

## 1.2 Amyloidozy

Amyloidozy to grupa schorzeń związana z zewnątrz- i/lub wewnątrz-komórkowym odkładaniem się zagregowanych, nieaktywnych biologicznie białek. Złogi białkowe gromadzą się w narządach wewnętrznych, takich jak serce, wątroba, nerki czy mózg, prowadząc do poważnego zaburzenia ich prawidłowej pracy. Agregaty te mają nieco inną budowę i skład w zależności od rodzaju amyloidozy z jaką są związane. Przykładami najczęściej występujących złogów amyloidowych są tzw. płytki starcze (w chorobie Alzheimera) i ciała Lewy'ego (w chorobie Parkinsona). Ze względu na przyczyny występowania, wyróżniamy pięć głównych rodzajów amyloidoz [10]:

- **pierwotne** – występują bez wyraźnej przyczyny; związane są z gromadzeniem białka AL (łańcuchy lekkie immunoglobulin); są wynikiem nieprawidłowej degradacji przeciwciał po zwalczeniu zakażenia w organizmie;

- **wtórne** – są to powikłania po przebiegu przewlekłych procesów zapalnych takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów; związane są z gromadzeniem amyloidu A, którego prekursorem jest surowiczy amyloid A, jedno z białek ostrej fazy;
- **transtyretynowe** – inaczej amyloidozy starcze; związane są z gromadzeniem amyloidu, którego prekursorem jest transtyretyna (TTR); wyróżnia się również postać dziedziczną, którą powoduje mutacja w genie TTR,
- **dziedziczne** – mają podłoże genetyczne; są wynikiem mutacji w genie białka amyloidogennego lub jego prekursora;
- **rodzinne** – również o podłożu genetycznym, ale związane z mutacją w genie innym niż gen kodujący prekursorowe bądź macierzyste białko amyloidowe.

Do tej pory poznano co najmniej 35 białek amyloidogennych [11]. Każde z nich posiada w organizmie swój prekursor lub niezmutowany odpowiednik, który pełni szereg ważnych z biologicznego punktu widzenia funkcji. Przykłady białek amyloidogennych wraz z ich prekursorami oraz miejscami tworzenia złogów przedstawione zostały w **Tabeli 2**. Amyloidozy, ze względu na dużą różnorodność składu złogów białkowych, zróżnicowany obraz kliniczny w zależności od typu amyloidozy oraz bardzo ograniczoną wiedzę o ich patogenezie, stanowią poważny medyczny problem, który od wielu lat pozostaje nierozwiązany.

Spora część białek o właściwościach amyloidogennych zaliczana jest również do grupy białek odpowiedzialnych za choroby neurodegeneracyjne [12]. Tkanka nerwowa, jako najbardziej wrażliwa i najmniej skłonna do regeneracji tkanka ludzkiego organizmu, jest najczulszym i najbardziej dla nas niebezpiecznym punktem ataku. Uszkodzenie mózgu na skutek amyloidoz prowadzi do głębokiej demencji, problemów z koordynacją i poruszaniem się, a w końcu do śmierci chorego. Przykładem chorób neurodegeneracyjnych, będących jednocześnie amyloidozami, są choroba Alzheimera (czynnik patogenny - amyloid  $\beta$ ), choroba Parkinsona (czynnik patogenny -  $\alpha$ -synukleina) oraz dziedziczna angiopatia amyloidowa cystatyny C (czynnik patogenny - cystatyna C). Wiele neurodegeneracji charakteryzuje się odkładaniem zagregowanych białek nie tylko zewnątrz-, ale również wewnątrzkomórkowo. Ze względu na mocno upakowaną strukturę i duże rozmiary, złogi amyloidowe są nierozpuszczalne i odporne na działanie

enzymów proteolitycznych [13]. Obrazy mikroskopowe takich złogów występujących w wybranych chorobach neurodegeneracyjnych przedstawione zostały na **Rycinie 2**.

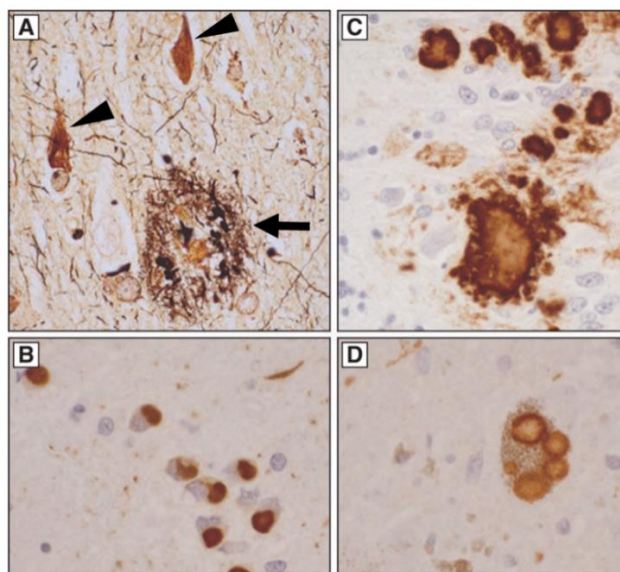
**Tabela 2** Ludzkie białka amyloidogenne oraz ich prekursorzy [11].

Białko amyloidogenne	Białko prekursorowe	Rodzaj amyloidozy	Zajęte narządy
AA	surowiczy amyloid A	nabyta	wszystkie bez CUN*
Ab	białko prekursorowe A $\beta$ (typ dziki)	nabyta	CUN*
	białko prekursorowe A $\beta$ (wariant)	dziedziczna	CUN*
ACys	cystatyna C (wariant)	dziedziczna	CUN*
AGel	gelsolina (wariant)	dziedziczna	OUN**
ALac	laktoferyna	nabyta	rogówka
ALys	lizozym (wariant)	dziedziczna	nerki
AMed	laktadheryna	nabyta	aorta
ASPC	płuczny surfaktant	nabyta	płuca
APrP	białko prionowe (typ dziki)	nabyta	CUN*
	białko prionowe (wariant)	dziedziczna	CUN*
ASem1	semenogelina I	nabyta	pęcherzyki nasienne
A $\alpha$ Syn	$\alpha$ -synukleina	nabyta	CUN*
ATau	białko tau	nabyta	CUN*
ATTR	transtyretyna (typ dziki)	nabyta	serce, więzadła, ścięgna
	transtyretyna (wariant)	dziedziczna	OUN**, AUN***, serce, oczy

\* centralny układ nerwowy

\*\* obwodowy układ nerwowy

\*\*\* autonomiczny układ nerwowy



**Rycina 2** Obraz mikroskopowy złogów amyloidowych w wybranych chorobach neurodegeneracyjnych [14].

*A – choroba Alzheimera, B – choroba Picka, C – choroba prionowa, D – choroba Parkinsona (groty strzał wskazują wewnątrzkomórkowe sploty neurofibrylarne, a strzałka płytkę starczą)*

Upakowane w złogi włókna długo były uważane za główny czynnik wywołujący śmierć komórek nerwowych. Jednak w ostatnich latach zaczęto zwracać większą uwagę również na neurotoksyczność mniejszych oligomerów białek amyloidogennych [15], które mogą zaburzać działanie kanałów jonowych, zwiększać przepuszczalność błon komórkowych i/lub zakłócać szlaki sygnałowe w neuronach [12]. Dodatkowo, organizm sam próbując radzić sobie z usunięciem patologicznego białka wywołuje apoptozę „zainfekowanej” komórki. Taki mechanizm w założeniu ma chronić przed wywołaniem stanu zapalnego, ale w konsekwencji prowadzi do obumierania komórek nerwowych [16].

Ze względu na niewielki stopień regeneracji tkanki nerwowej oraz poziom skomplikowania procesów zachodzących w ludzkim mózgu, choroby neurodegeneracyjne nadal stanowią jedną z największych medycznych zagadek. Dotychczas zaproponowano kilka sposobów leczenia mających na celu ograniczenie rozwoju tego rodzaju chorób lub ich całkowite wyeliminowanie. Opierały się one na terapiach genowych, zastosowaniu związków chemicznych blokujących produkcję amyloidogennego białka np. antysensownych oligonukleotydów uniemożliwiających translację czy stosowanie przeciwciał [17], jednak żadna z tych metod nie odniosła jeszcze znaczącego sukcesu.

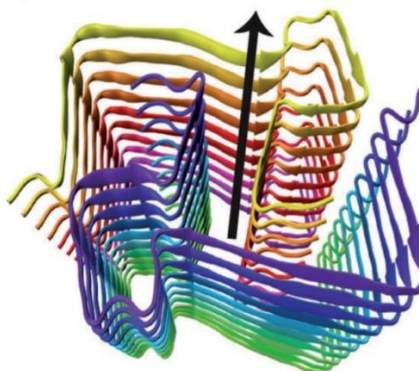
### 1.3 Agregacja białek amyloidogennych

W procesie tworzenia złogów amyloidowych kluczową rolę pełni struktura oraz stabilność białka [18]. Białko stabilne, o prawidłowej z punktu widzenia biochemii konformacji, które wykazuje aktywność biologiczną, stanowi cenny nabytek dla organizmu. W komórkach proces fałdowania białek jest w pełni kontrolowany. Odpowiadają za to tzw. białka opiekuńcze lub inaczej chaperony, które poprzez oddziaływanie z fałdowanym białkiem chronią je przed przyjmowaniem nieprawidłowej struktury przestrzennej [19]. Posiadają one również zdolność do wyłapywania źle sfałdowanych makromolekuł i pomagania w ich ponownym, najbardziej korzystnym energetycznie, zwinięciu. Obecność chaperonów stanowi jeden ze sposobów ochrony komórkowej przed oligomeryzacją białek [18]. Częsteczki, którym udaje się uniknąć działania chaperonów i przez to przyjmują niekorzystną konformację lub zostają uszkodzone (np. utlenione) są degradowane przez proteasom, duży kompleks enzymatyczny odpowiedzialny za proteolizę [20,21] stanowiący drugi sposób ochrony komórkowej. W stanach patologicznych system kontroli i degradacji białek jest zaburzony [12,16] i nie posiada wystarczającej wydajności, aby pozbyć się z komórki wszystkich nieaktywnych biologicznie cząsteczek. Amyloidogenne formy białka, którym udaje się uniknąć pocięcia, ulegają akumulacji w przestrzeni wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowej [22]. Formy te zazwyczaj charakteryzują się niską stabilnością monomeru, co wynika z przyjęcia wysokoenergetycznej konformacji lub wystąpienia czynnika destabilizującego strukturę np. mutacji, obecności jonów metali, zmiany pH czy stężenia białka [23].

Chorobotwórcze złogi białkowe zbudowane są z długich, nierozgałęzionych, wysoko uporządkowanych oligomerów zwanych fibrylami. Podstawowym budulcem fibryli amyloidowych są struktury  $\beta$ -kartkowe utworzone z łańcuchów zoligomeryzowanego białka. Arkusze  $\beta$ -kartek w fibrylach amyloidowych ułożone są jeden na drugim [24] i w ten sposób tworzą tzw.  $\beta$ -krzyżowy rdzeń charakterystyczny dla wszystkich fibryli białkowych [25]. W rdzeniu tym arkusze  $\beta$ -kartek biegną równoległe do osi fibryli, w przeciwieństwie do pojedynczych  $\beta$ -nici biegnących prostopadle. Odległości między poszczególnymi  $\beta$ -niciami szacuje się na 4,7-4,8 Å, a między poszczególnymi  $\beta$ -kartkami na 10-12 Å [26]. Struktura przykładowej

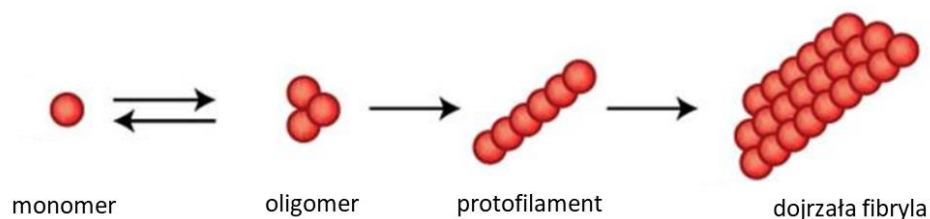


fibryli białkowej (na podstawie struktury włókna amyloidu  $\beta$ ) została przedstawiona na **Rycinie 3**.



**Rycina 3** Struktura  $\beta$ -krzyżowego rdzenia fibryli zbudowanej z amyloidu  $\beta$  [27].  
Strzałka wskazuje oś fibryli.

$\beta$ -nici wchodzące w skład fibryli mogą być ułożone względem siebie równolegle lub antyrównolegle. Struktura włókien utrzymywana jest głównie dzięki takim siłom jak wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne [28], oddziaływania van der Waalsa oraz oddziaływania hydrofobowe występujące między ciasno upakowanymi łańcuchami bocznymi aminokwasów wchodzących w skład białka [29]. Tworzą one układ, który można przyrównać do ułożonych naprzemiennie zębów zamka błyskawicznego [24]. Proces tworzenia fibryli amyloidowych różni się w zależności od białka, jednak ogólny mechanizm, przedstawiony na **Rycinie 4**, zawsze pozostaje taki sam.



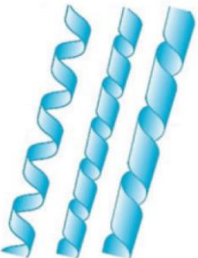



**Rycina 4** Ogólny mechanizm patologicznej agregacji białek amyloidogennych [30].

Mechanizm agregacji białek amyloidogennych rozpoczyna się od formowania różnego rozmiaru oligomerów o strukturze  $\beta$ -karkowej. Oligomery te, oddziałując ze sobą, tworzą długie, proste włókna – protofilamenty, które, na drodze dalszej agregacji, tworzą protofibryle (nieodjrzałe fibryle) i ostatecznie dojrzałe włókna. Fibryle

amyloidowe najczęściej składają się z 2-6 protofilamentów. W zależności od sposobu ich połączenia możemy obserwować różną morfologię dojrzałych włókien, co przedstawione zostało w **Tabeli 3**. Jest to zjawisko tzw. polimorfizmu strukturalnego fibryli amyloidowych [26]. Protofilamenty mogą łączyć się ze sobą boczenie tworząc tzw. kryształy [31] lub skręcać razem formując skręcone [32] lub helikalne wstążki [33] bądź też nanorurki [34].

**Tabela 3** Polimorfizm fibryli amyloidowych [26].

	Kryształ	Skręcona wstążka	Helikalna wstążka	Nanorurka
Morfologia fibryli				

Proces fibrylizacji różni się dla poszczególnych białek amyloidogennych. Różnice w mechanizmie tego procesu pojawiają się na jego początkowych etapach, a dokładnie w sposobie łączenia monomerów białka i tworzeniu protofilamentów. Obecnie wyróżnia się cztery główne mechanizmy fibrylizacji [29]:

#### **A. Asocjacja monomerów**

Jest to rzadki mechanizm. Dotyczy białek, które posiadają zdolność do samoasocjacji. Nie wymaga on zmian konformacyjnych w strukturze łańcucha. Częsteczki asocjują w sposób odwracalny tworząc mniejsze lub większe oligomery, które następnie z powrotem rozpadają się na monomery. W niektórych przypadkach duży rozmiar powstałego oligomeru powoduje, że proces przestaje być odwracalny, co prowadzi do utworzenia agregatu białkowego.

#### **B. Zmiany konformacyjne w białku**

Mechanizm ten dotyczy białek, które oligomeryzują dopiero po wystąpieniu określonej zmiany konformacyjnej np. po częściowym rozwinięciu struktury, natomiast w postaci natywnej nie wykazują skłonności do agregacji. Zmiany strukturalne

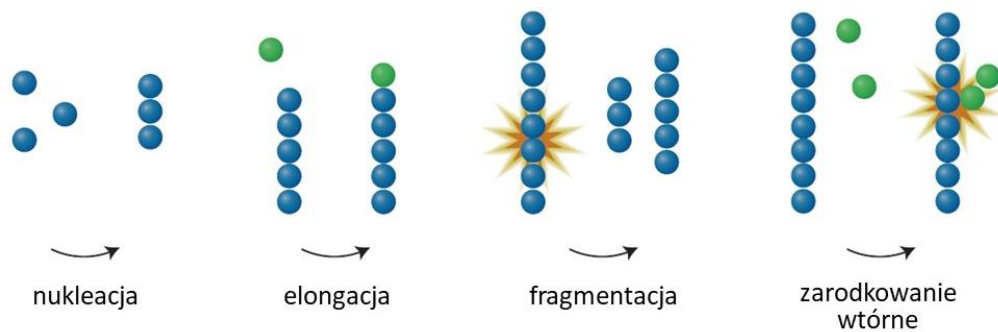
prowadzące do utworzenia fibryli mogą być wywołane, w tym przypadku, takimi czynnikami jak podwyższenie temperatury lub częściowa denaturacja białka.

### C. Zarodkowanie (nukleacja)

Mechanizm ten zakłada utworzenie tzw. jądra/zarodka agregacji, czyli oligomeru o rozmiarach wystarczających do inicjacji procesu tworzenia fibryli białkowych. Mamy tutaj do czynienia z tzw. fazą opóźnienia. W całym procesie fibrylizacji nukleacja jest etapem zachodzącym najwolniej. Wymaga pokonania pewnej bariery energetycznej, co czyni ją termodynamicznie niekorzystną [35], dlatego w próbkach białek fibrylizujących przez zarodkowanie fibryle można znaleźć najczęściej dopiero po kilkunastu, a nawet kilkudziesięciu dniach inkubacji [29]. Obecnie wyróżnia się trzy drogi nukleacji:

- **zarodkowanie homogeniczne** – polega na spontanicznej zmianie konformacji białka i spontanicznemu połączeniu cząsteczek [36]; jest rzadkie i powolne; dotyczy głównie tworzenia amyloidów w chorobach dziedzicznych, w których proces ten jest wspomagany przez mutację w genie białka wzmagającą jego podatność na spontaniczne samoorganizowanie [35];
- **zaszczepianie** – mechanizm szybszy i bardziej powszechny; polega na dostarczeniu do organizmu wstępnie uformowanego jądra agregacji; dotyczy np. prionów, które, ponieważ posiadają zmienioną już konformację, umożliwiają natychmiastowe przejście do etapu wzrostu i wydłużania fibryli białkowych [25]; szeroko prowadzone badania na myszach wykazały, że wszczęcie zdrowemu organizmowi oligomerycznych zarodków niektórych białek, np. amyloidu  $\beta$  czy  $\alpha$  synukleiny, również prowadzi do rozwoju zmian chorobowych – neurodegeneracji [37], co potwierdza prawidłowość tego mechanizmu;
- **zarodkowanie heterogeniczne** – tutaj do rozpoczęcia procesu nukleacji wykorzystywana jest zewnętrzna powierzchnia (katalizator) stanowiąca rusztowanie dla nowo powstającego jądra, co obniża barierę energetyczną zarodkowania [36,38]; takimi katalizatorami mogą być np. wirusy [39], nanocząstki [40], błony lipidowe [41], a także powierzchnie formujących się dopiero włókien białkowych (tzw. zarodkowanie wtórne) [42].

Dojrzałe fibryle, poza katalizowaniem zarodkowania wtórnego, mogą także ulegać fragmentacji i w ten sposób dostarczać jądra agregacji dla nowych fibryli [30] (**Rycina 5**). W dalszych etapach do zarodków przyłączają się kolejne monomery białka formując w ten sposób większe oligomery o strukturze  $\beta$ -karkowej, które dalej przekształcają się w dojrzałe fibryle.



**Rycina 5** Schematyczne przedstawienie mechanizmu nukleacji poprzez zarodkowanie homogeniczne, fragmentację włókna oraz zarodkowanie wtórne [43].

#### D. Trójwymiarowa wymiana domen

Mechanizm ten dotyczy białek, które poprzez wymianę między sobą konkretnych fragmentów cząsteczki tworzą długie oligomeryczne łańcuchy, co przedstawione zostało na **Rycinie 6**. Wymianie mogą ulegać pojedyncze motywy strukturalne jak np.  $\alpha$ -helisa lub całe domeny białkowe [44]. Powszechnie uważa się, że pierwszym etapem tworzenia fibryli według tego mechanizmu jest dimeryzacja. Powstające dimery nigdy nie są całkowicie symetryczne. Jeśli dotyczą białek wymieniających ten sam fragment cząsteczki, to niesymetryczność najczęściej objawia się w regionie zawiasowym, czyli w miejscu połączenia podjednostek dimeru [45]. Jednym z białek, które fibrylizuje za pomocą trójwymiarowej wymiany domen jest cystatyna C (więcej na ten temat w rozdziale I.3.4).



**Rycina 6** Schemat tworzenia oligomeru według mechanizmu trójwymiarowej wymiany domen [46].

#### 1.4 Laboratoryjne metody badania agregacji białek

Umiejętność otrzymywania i rozpoznawania fibryli białkowych w warunkach *in vitro* pozwala na lepsze poznanie i zrozumienie ich chorobotwórczości. Monitorowanie procesu oligomeryzacji i obrazowanie powstających włókien dostarcza szeregu informacji o ich morfologii i mechanizmie tworzenia. Istnieje wiele sposobów na badanie fibrylizacji, a należą do nich między innymi [47]:

##### A. Badanie pochłaniania światła

Pierwszą oznaką wskazującą na obecność agregatów białkowych jest wzrost zmętnienia badanej próbki. Powstałe oligomery poprzez zdolność do pochłaniania i rozpraszania światła powodują, że roztwór nabiera właściwości optycznych i często opalizuje, co można zaobserwować gołym okiem. Wielkość zmętnienia (gęstość optyczną) bada się spektrofotometrycznie poprzez zarejestrowanie widma dla długości fali  $\lambda_{\max}$ , przy której występuje maksymalna absorpcja promieniowania.  $\lambda_{\max}$  ściśle zależy od wielkości cząstek obecnych w badanej próbce.

##### B. Analiza rozpraszania światła

Teoria Rayleigha dotycząca rozpraszania światła przez agregaty białkowe mówi o tym, że cząstki o średnicy mniejszej niż długość fali padającego światła są w stanie to światło rozproszyć [48]. Zjawisko to monitoruje się za pomocą spektrofluorymetru ustawiając identyczną długość fali wzbudzenia i emisji, zazwyczaj około 350 nm.

##### C. Pomiary fluorescencji wewnętrznej

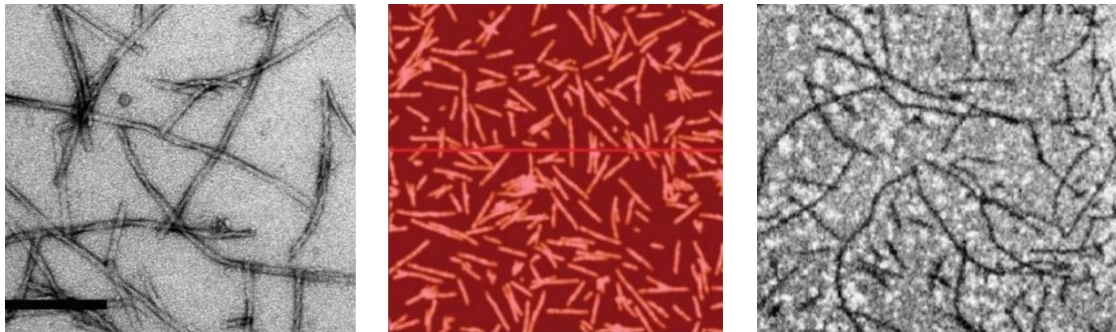
Białka w swojej budowie posiadają wewnętrzne chromofory takiej jak reszty tyrozyny czy tryptofanu. Są one bardzo wrażliwe na zmiany polarności i struktury białka, dlatego można je wykorzystać do badania dynamiki zmian konformacyjnych, w tym także agregacji. Zmiany w intensywności fluorescencji i położeniu maksimum emisji, badane za pomocą spektrofluorymetru, dostarczają informacji umożliwiających monitorowanie procesu tworzenia fibryli. Jedną z teorii dotyczących wewnętrznej fluorescencji agregatów białkowych mówi o tym, że odpowiadają za nią nie tylko aminokwasy aromatyczne, ale także delokalizacja elektronów powstająca w procesie fibrylizacji [49]. Dzieje się tak na skutek tworzenia struktur  $\beta$ -karkowych i obecności licznych wiązań wodorowych. Teoria ta poparta została faktem wykrycia wewnętrznej fluorescencji we fragmencie amyloidu  $\beta$  pozbawionego reszt aromatycznych [49].

#### D. Analiza za pomocą dichroizmu kołowego

Dichroizm kołowy (CD) to jedna z najważniejszych metod wykorzystywanych podczas pracy z białkami. Umożliwia określenie struktury II- i III-rzędowej badanego białka, ale także pozwala na śledzenie kinetyki zmian konformacyjnych zachodzących podczas procesu fibrylizacji. Tworzeniu arkuszy  $\beta$ -karkowych towarzyszy pojawienie się na widmach CD charakterystycznego minimum w zakresie 215-218 nm.

#### E. Bezpośrednie obrazowanie morfologii fibryli

Istnieje szereg metod mikroskopowych wykorzystywanych do bezpośredniego obrazowania morfologii agregatów białkowych. Najczęściej wykorzystywanymi są transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), mikroskopia sił atomowych (AFM) oraz skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM). Każda z tych metod dostarcza jakościowych informacji na temat badanej próbki. Otrzymanie obrazów o wystarczająco dobrej rozdzielczości pozwala także na określenie długości, szerokości oraz charakterystyki powierzchniowej agregatów białkowych. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe fibryli białkowych przedstawione zostały na **Rycinie 7**.



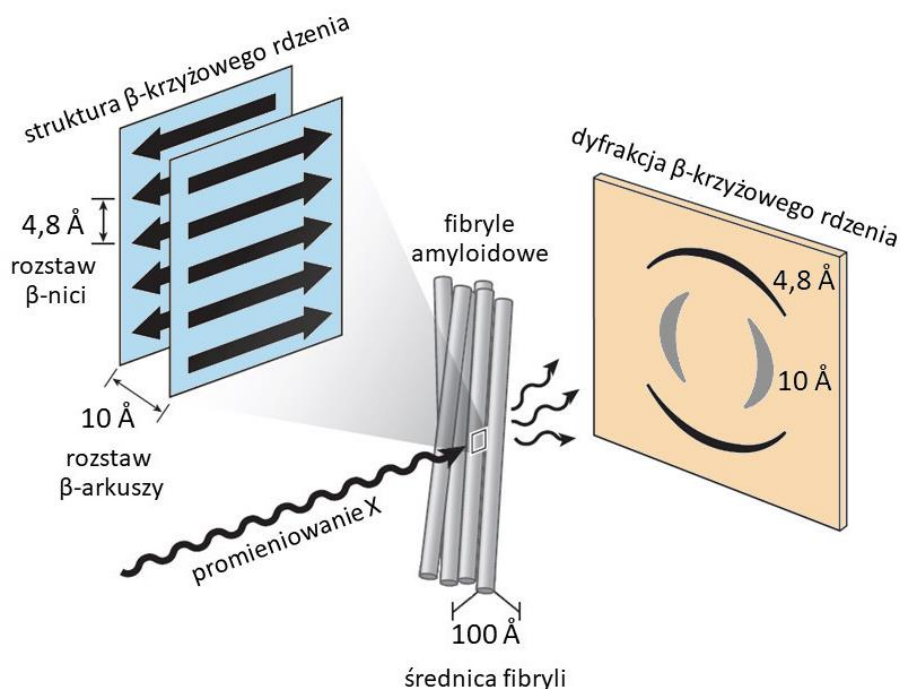
**Rycina 7** Obrazy mikroskopowe fibryli amyloidowych.

Z lewej obraz wykonany za pomocą TEM [50], w środku - AFM [51], a z prawej SEM [50].

#### F. Badanie dyfrakcji fibryli amyloidowych

Kolejną metodą potwierdzającą obecność fibryli w próbce są badania wykorzystujące promieniowanie rentgenowskie. Struktura  $\beta$ -krzyżowego rdzenia charakteryzuje się specyficznym obrazem dyfrakcyjnym, w którym wyróżniamy silne refleksy południkowe przy około 4,7-4,8 Å oraz równoleżnikowe w okolicach 10-12 Å [52]. Wartości te odpowiadają odległościom między oddziałującymi ze sobą za

pomocą wiązań wodorowych  $\beta$ -nićmi oraz odległościom między całymi  $\beta$ -arkuszami w strukturze fibryli, co przedstawione zostało na **Rycinie 8**.



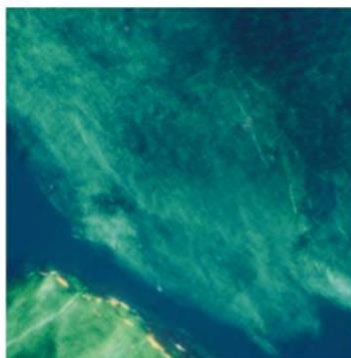
**Rycina 8** Badanie fibryli amyloidowych za pomocą promieniowania rentgenowskiego [24].

### G. Analiza z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych

Jedną z najpopularniejszych metod używanych w badaniach procesu fibrylizacji zakłada wykorzystanie barwnika fluorescencyjnego do obserwowania zmian strukturalnych zachodzących w białku. Najczęściej używanymi barwnikami są:

- **ANS** – kwas 8-anilino-naftaleno-1-sulfonowy – oddziałuje z częściami hydrofobowymi białka, co powoduje wzrost jego fluorescencji; na podstawie zmian w intensywności fluorescencji można monitorować zmiany konformacyjne zachodzące w badanych cząsteczkach;
- **tioflawina T** – oddziałuje ze strukturami bogatymi w  $\beta$ -karty, co powoduje znaczne nasilenie jej fluorescencji [53]; monitorowanie intensywności fluorescencji dla  $\lambda$  wzbudzenia około 450 nm i  $\lambda$  emisji 482 nm pozwala na określenie czy w roztworze rozwinęły się agregaty fibrylarne;
- **czerwień Kongo** – wybarwienie czerwienią Kongo próbki zawierającej fibryle powoduje pojawienie się charakterystycznej zielonej dwójtomności w świetle

spolaryzowanym [54] przedstawionej na **Rycinie 9**; opracowano również test łączony tioflawina T – czerwień Kongo, który według autorów, daje bardziej wiarygodne wyniki [55].



**Rycina 9** Obraz próbki zawierającej fibryle amyloidowe wybarwione czerwienią Kongo w świetle spolaryzowanym [54].

## 2. Rola jonów metali w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych

Etiologia chorób neurodegeneracyjnych nie jest do końca poznana. Na ich występowanie i przebieg wpływa wiele czynników, począwszy od uwarunkowań genetycznych, przez starzenie się, aż po możliwy wpływ środowiska zewnętrznego np. zanieczyszczeń powietrza [56,57] lub sposobu odżywiania. Najczęściej występującymi i zarazem najlepiej poznanymi chorobami neurodegeneracyjnymi są choroba Alzheimera i Parkinsona. Badania wykazały, że w złogach  $\beta$ -amyloidu w chorobie Alzheimera występują wysokie stężenia jonów niektórych metali np. miedzi czy cynku [58,59,60]. Odkrycie to sprawiło, że zaczęto zastanawiać się nad ich rolą w całym procesie patologicznej agregacji białek. Jony metali oddziałując z domenami wiążącymi białek amyloidogennych, mogą wpływać na proces formowania złogów w mózgu. Ponadto, obecność wysokich stężeń tych jonów zwiększa poziom stresu oksydacyjnego, co jest dodatkowym czynnikiem proapoptycznym w komórkach nerwowych [61].

Zarówno jony miedzi jak i cynku są niezbędne do właściwego funkcjonowania organizmu. Zaproponowano, że zaburzenie ich homeostazy może być jednym z czynników wpływających na postęp neurodegeneracji [62]. Ze względu na złożoność i ogrom nieprawidłowych procesów zachodzących w mózгах osób cierpiących



na amyloidozy neurodegeneracyjne, rola jonów wyżej wymienionych metali nie ogranicza się jedynie do oddziaływania z samym białkiem podczas oligomeryzacji. W dalszej części tego rozdziału omówione zostaną wybrane aspekty wpływu jonów miedzi i cynku na rozwój chorób neurodegeneracyjnych.

## 2.1 Jony miedzi

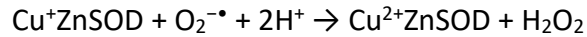
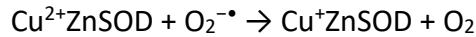
Miedź to nie tylko metal ciężki, ale także mikroelement niezbędny do właściwego funkcjonowania organizmów żywych, w tym także mózgu [63]. W warunkach fizjologicznych występuje na dwóch stopniach utlenienia,  $\text{Cu}^+$  (niestabilny) oraz  $\text{Cu}^{2+}$  (stabilny), które z łatwością przechodzą w siebie nawzajem. Jony miedzi posiadają właściwości oksydoredukcyjne, mogą być zarówno donorami jak i akceptorami elektronu, co warunkuje ich szerokie funkcje biologiczne [64]. Miedź jest niezbędną częścią centrów aktywnych wielu enzymów, które biorą udział w podstawowych reakcjach biochemicznych, takich jak np. oddychanie komórkowe. Metal ten wchodzi w skład co najmniej 30 ważnych dla organizmu białek, z których wyróżnić można [65]:

- dysmutazę ponadtlenkową – posiada silne właściwości antyoksydacyjne;
- oksydazę cytochromu c – bierze udział w procesie oddychania komórkowego;
- $\beta$ -hydroksylazę dopaminy – uczestniczy w wytwarzaniu neuroprzekaźników;
- oksydazę lizylową – bierze udział w produkcji kolagenu.

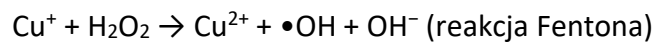
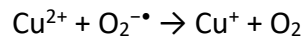
Dodatkowo udowodniono ważną rolę jonów miedzi w metabolizmie węglowodanów i tłuszczu [66], procesach spermatogenezy i podziałów komórkowych [67], syntezie czerwonych krwinek oraz metabolizmie żelaza [63]. Niemożność utrzymania homeostazy miedzi w organizmie prowadzi do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Menkesa wywołana mutacją w genie białka ATP7A transportującego jony miedzi, czy choroba Wilsona wywołana mutacją w genie białka ATP7B, również zaliczanego do transporterów  $\text{Cu}^{2+}$  [68]. Obie przypadłości prowadzą do uszkodzenia układu nerwowego.

Jony miedzi, jako kofaktory SOD (dysmutazy ponadtlenkowej) katalizującej dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego, pośrednio posiadają właściwości przeciwutleniające. Jednak ich nadmiar w komórkach powoduje efekt odwrotny

tj. podnosi poziom stresu oksydacyjnego ze względu na wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) [69]:



Swobodnemu przechodzeniu jonów miedzi z jednego na drugi stopień utlenienia ( $\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$ ) w reakcjach Harbera-Weissa, towarzyszy powstanie rodnika hydroksylowego wyniszczającego komórki nerwowe [69]:



Miedź jest substratem do reakcji Fentona, co powoduje, że jej nadmiar staje się silnie cytotoksyczny. Reakcja ta zachodzi w organizmie obciążonym neurodegeneracją szybko i wydajnie ze względu na powszechnie dostępne substraty. W mózgu osoby chorej stężenie jonów miedzi znacznie przewyższa prawidłowe stężenie fizjologiczne [59,70], co uniemożliwia SOD oraz innym przeciwutleniaczom wystarczająco szybką dezaktywację wolnych rodników. Zbyt wysoki poziom stresu oksydacyjnego powoduje nieodwracalne zniszczenia na poziomie komórkowym [71].

Powstający w reakcji Fentona bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy reaguje między innymi z mitochondrialnym DNA [69] powodując pęknięcie łańcucha kwasu nukleinowego i/lub modyfikacje zasad budujących nici. Komórki nieobjęte neurodegeneracją (nienarażone na nadmierną produkcję  $\bullet\text{OH}$ ) potrafią radzić sobie z takimi uszkodzeniami dzięki licznym enzymom odpowiadającym za naprawę łańcucha DNA (polimerazy, nukleazy) [72]. Oprócz kwasów nukleinowych, rodniki hydroksylowe reagują również z szeroką gamą białek biologicznie czynnych. Utlenianiu białka zazwyczaj towarzyszy zmiana jego struktury II- i III-rzędowej, co skutkuje utratą aktywności biologicznej. Dodatkowo, utlenianie łańcuchów bocznych aminokwasów może prowadzić do sieciowania cząsteczek białka czyli indukować jego agregację [22], a efekt ten dodatkowo wzmacniany jest przez obecność jonów miedzi [73]. Na skutek działania wolnych rodników modyfikacjom ulegają także lipidy, długie kwasy tłuszczowe czy cholesterol. Jedną z hipotez mówi, że HNE (4-hydroksy-2-nonenal), powstający w procesie utlenienia wielonienasyconych lipidów, dodatkowo przyspiesza

amyloidogenezę. HNE kowalencyjnie łączy się z resztami histydyn w łańcuchu amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ), co znacznie zwiększa jego tendencję do agregacji oraz powinowactwo do błon lipidowych, które na skutek oddziaływania z  $A\beta$  ulegają uszkodzeniu [74].

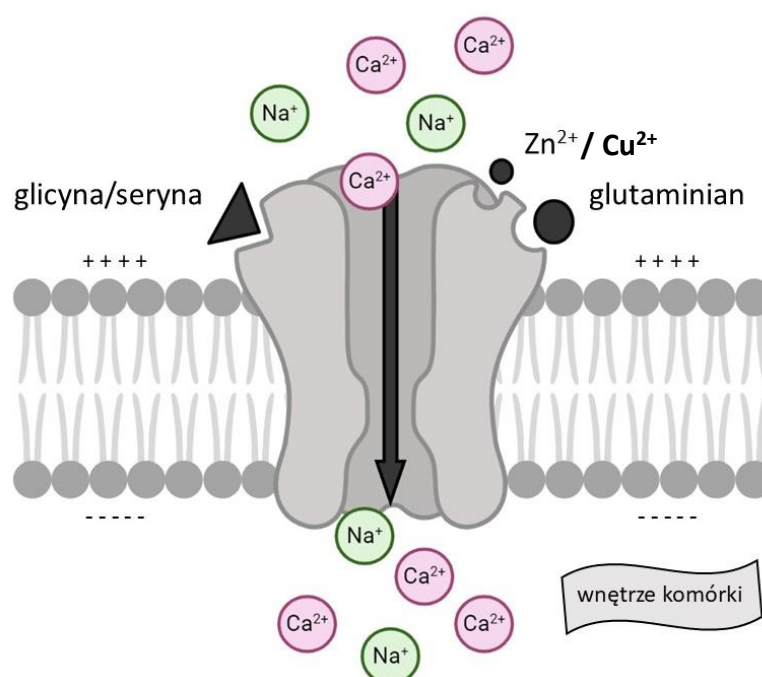
Badania *in vitro* wskazują, że jony miedzi silnie wiążą się z amyloidem  $\beta$  [75,76,60]. Udowodniono, że w ich obecności generowanie wolnych rodników następuje głównie na drodze reakcji redoks aktywnego kompleksu metal-białko, a nie wolnego jonu [77]:



W kolejnym etapie utlenione jony miedzi zostają zredukowane ( $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ ) z wytworzeniem  $H_2O_2$  czyli substratu do produkcji ROS [70].

Jony miedzi pogłębiają choroby neurodegeneracyjne nie tylko przez generowanie stresu oksydacyjnego, ale pośrednio także poprzez modulację działania jonotropowego receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDAR) [78] umiejscowionego na błonie postsynaptycznej neuronów. Wolne jony miedzi są silnymi inhibitorami NMDAR, uwalnianymi do szczeliny synaptycznej po przekazaniu sygnału nerwowego [79]. W chorobach neurodegeneracyjnych następuje upośledzenie przekazywania sygnałów nerwowych w objętym chorobą obszarze mózgu. Głównym neuroprzekaźnikiem ośrodkowego układu nerwowego jest kwas glutaminowy, który znajduje się w blisko połowie neuronów mózgowych. Pełni on szereg ważnych funkcji w procesie uczenia się i zapamiętywania, ale jego nadmiar, który występuje również w przypadku choroby Alzheimera i Parkinsona, okazuje się ekscytotoksyczny [80,81]. Toksyczność kwasu glutaminowego wynika ze zbyt silnej aktywacji receptorów glutaminianowych, takich jak właśnie NMDAR, znajdujących się w błonie postsynaptycznej. Pobudzenie NMDAR (przyłączenie glutaminianu i glicyny lub D-seryny) powoduje otwarcie nieselektywnego kanału jonowego, przez który jony wapnia i sodu przedostają się do cytozolu komórkowego (**Rycina 10**). W przypadku prawidłowego działania receptora, w tym momencie następuje depolaryzacja błony postsynaptycznej czyli przekazanie sygnału elektrycznego do kolejnej komórki nerwowej. Jednak w przypadku nadmiernego pobudzenia NMDAR następuje niekontrolowany napływ jonów sodu i wapnia do komórki, które, kumulując się w komórce, zaburzają jej prawidłową pracę i prowadzą do obumierania neuronu [82].

Badania wykazały, że w mózgu objętym neurodegeneracją stężenie wolnych jonów miedzi odpowiadających za blokowanie NMDAR jest niskie, co prowadzi do wzmożonego pobudzenia tych receptorów i opisanych powyżej konsekwencji [78,83,84]. Aktywacja receptora NMDAR dodatkowo stymuluje produkcję A $\beta$  oraz uwalnianie jonów miedzi z ATP7A, ATPazy transportującej Cu<sup>+</sup>. Amyloid  $\beta$  oligomeryzując w przestrzeni międzysynaptycznej wiąże wolne jony miedzi uniemożliwiając im inhibicję NMDAR, co prowadzi do powstania błędnego koła, w skutek którego następuje śmierć komórki [85,86].



**Rycina 10** Schemat działania jonotropowego receptora NMDAR. Otwarcie kanału następuje po przyłączeniu glicyny lub D-seryny oraz glutaminianu lub NMDA.

Jony Zn<sup>2+</sup> oraz Cu<sup>2+</sup> inhibują działanie receptora.

Rysunek wykonany za pomocą strony BioRender.com.

Jony miedzi obecne są w całym obszarze mózgu, m.in. w hipokampie, jądrach podstawnych czy mózdzku [87]. Nie tylko biorą udział w generowaniu wolnych rodników, ale także oddziałują z białkami tworzącymi złoży, prawdopodobnie przyspieszając ich kształtowanie. We wczesnych stadiach choroby Alzheimera (AD) stężenie jonów miedzi we krwi pozostaje niezmienione i dopiero wraz z rozwojem choroby ulega podwyższeniu. Z tego względu, naukowcy bardziej skłaniają się ku

hipotezie, że zaburzenie homeostazy Cu nie jest bezpośrednim czynnikiem wywołującym uszkodzenie mózgu, a jedynie jego następstwem, które w dalszych etapach przyspiesza postęp choroby.

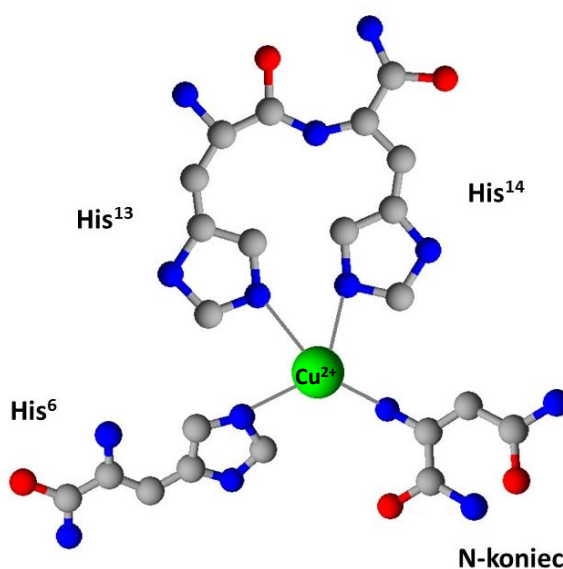
## 2.2 Jony miedzi w chorobie Alzheimera

Choroba Alzheimera jest najczęściej występującą przyczyną demencji. Obejmuje od 60 do 80 % jej przypadków i pojawia się najczęściej powyżej 65 roku życia [88,89]. Rozwija się bardzo powoli i przez lata może nie dawać żadnych objawów. Pierwszymi sygnałami, które mogą wskazywać na wystąpienie tej przypadłości, są trudności w zapamiętywaniu ostatnich wydarzeń bądź rozmów i apatia. Z czasem pojawiają się również zmiany w zachowaniu chorego, dezorientacja, zaniki pamięci oraz trudności w mówieniu i poruszaniu się [88]. Niektórym przypadkom AD towarzyszą także silne objawy neuropsychiatryczne takie jak depresja, zaburzenia snu oraz nasilająca się agresja [90]. Choć chorobę Alzheimera łączy się bezpośrednio ze starzeniem organizmu oraz uwarunkowaniami genetycznymi, to badania epidemiologiczne wykazały, że czynnikami ryzyka znacznie zwiększającymi prawdopodobieństwo zachorowania są między innymi poważne urazy głowy, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2, nieprawidłowa masa ciała (zarówno niedowaga jak i otyłość), palenie czy permanentny stres [91].

Uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego w AD następuje na skutek odkładania się międzykomórkowo agregatów  $\beta$ -amyloidu powstającego w wyniku nieprawidłowego cięcia białka prekursorowego amyloidu (APP) oraz wewnątrzkomórkowo – hiperfosforylowanego białka tau [89]. Badania wykazały, że jony miedzi mają zdolność do wiązania się ze wszystkimi trzema wymienionymi powyżej, istotnymi w chorobie Alzheimera białkami. Domena wiążąca jony miedzi w APP znajduje się na C-końcu białka, a w jej skład wchodzi cztery reszty aminokwasowe: His<sup>147</sup>, His<sup>151</sup>, Tyr<sup>168</sup> oraz Met<sup>170</sup> [92]. APP ma zdolność do katalizowania redukcji Cu<sup>2+</sup> do Cu<sup>+</sup> [93]. Ponadto uważa się, że białko prekursorowe amyloidu bierze udział w regulacji homeostazy jonów miedzi. Według badań, zarówno nadmiar jak i niedobór miedzi wpływa na poziom ekspresji APP w organizmie [94,95]. Jedną z hipotez mówi, że oddziaływanie Cu z APP powoduje dimeryzację białka i jego lokalizację w tratwach

lipidowych w błonie komórkowej, gdzie prawdopodobnie zachodzi generowanie A $\beta$  [96].

Amyloid  $\beta$  zarówno w postaci monomeru, jak i dużego oligomeru ma zdolność do wiązania  $\text{Cu}^{2+}$ . Dodatkowo, posiada wystarczająco wysokie powinowactwo do jonów miedzi, aby proces ten mógł zachodzić na poziomie zewnątrzkomórkowych stężeń fizjologicznych i, w związku z tym, wiele badań potwierdza udział Cu w procesie tworzenia złogów [97,98,99,100]. Główna domena wiążąca jony metalu w amyloidzie  $\beta$  znajduje się na N-końcu białka i obejmuje obszar od 1 do 16 reszty aminokwasowej [101]. Wiązanie metalu zachodzi bardzo dynamicznie, dlatego nie wyklucza się możliwości oddziaływania z nim również innych fragmentów sekwencji. Dokładne miejsce koordynacji jonów miedzi na N-końcu ściśle zależy od pH. W zakresie pH 6-7 za wiązanie jonów odpowiadają reszty Asp<sup>1</sup>, His<sup>6</sup> oraz His<sup>13</sup>/His<sup>14</sup>. Natomiast w pH 7-8 są to reszty His<sup>6</sup>, His<sup>13</sup>, His<sup>14</sup> [102] oraz wolna grupa aminowa (**Rycina 11**) [103]. Krytyczną resztą w łańcuchu amyloidu  $\beta$  odpowiadającą za oddziaływanie z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  jest His<sup>13</sup>. Wykazano, że szczury typu dzikiego nie zapadają na AD, ponieważ szczurzy amyloid  $\beta$  nie posiada w pozycji 13 reszty histydyny, która jest niezbędna do indukowanej przez miedź agregacji białka [99]. Mechanizm takiej oligomeryzacji może być związany ze zmianą ładunku na N-końcu łańcucha. Oddziaływanie z jonem metalu powoduje redukcję ładunku z obojętnego na silnie ujemny, co wpływa także na rozpuszczalność amyloidu  $\beta$  [103].



**Rycina 11** Model koordynacji jonu  $\text{Cu}^{2+}$  (zielona kula) przez amyloid  $\beta$  w fizjologicznym pH.  
Rysunek wykonany za pomocą programu ChemSketch.

Wiele badań laboratoryjnych wskazuje, że oddziaływanie Cu-A $\beta$  prowadzi do bardzo zróżnicowanych produktów oligomeryzacji, od nieuporządkowanych oligomerów po wysoko uporządkowane fibryle białkowe [104]. Na przebieg procesu agregacji wpływają takie czynniki jak pH, stężenie białka, stężenie metalu, temperatura, rodzaj buforu czy intensywność mieszania próbki [97]. Niektóre doniesienia mówią, że w przypadku amyloidu  $\beta$ , stechiometryczne stężenia jonów miedzi zapobiegają tworzeniu jego uporządkowanych struktur  $\beta$ -karkowych [105]. Jednak zdecydowana większość badaczy twierdzi, że jony Cu<sup>2+</sup> w obecności nawet niewielkiego stężenia A $\beta$ , indukują szybką fibrylizację białka [97].

W literaturze znaleźć można również informacje na temat pobudzania przez jony miedzi agregacji białka tau. W organizmie ludzkim produkowanych jest 6 izoform tego białka, zbudowanych, w zależności od izoformy, z 352-441 reszt aminokwasowych. Białka te posiadają 3 lub 4 domeny wiążące z mikrotubulami, przez co uczestniczą w budowie cytoszkieletu [106]. W chorobie Alzheimera agregacja amyloidu  $\beta$  jest ściśle związana z tworzeniem wewnątrzkomórkowo złogów (splątków) neurofibrylarnych zbudowanych z hiperfosforylowanego białka tau. Nie jest do końca jasne czy agregacja jednego białka jest niezależna od agregacji drugiego, ale według badań przeprowadzonych na modelu mysim, oligomery amyloidu  $\beta$  stymulują hiperfosforylację tau promując tworzenie neurofibryli [107]. Wielu naukowców skłania się ku hipotezie, że dopiero jednoczesne oddziaływanie na organizm obu tych białek prowadzi do zmian patologicznych w komórkach nerwowych.

Poszczególne izoformy białka tau różnią się ilością pseudopowtórzeń sekwencji aminokwasowych na C-końcu. Sekwencje te wykazują powyżej 60 % homologii, co przedstawione zostało na **Rycinie 12**. Wraz ze wzrostem liczby powtórzeń, wzrasta także powinowactwo do mikrotubul oraz tendencja do agregacji [85].

<b>R1</b> 244-274	-QTAPVMPD LKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
<b>R2</b> 275-305	-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPPGGGS
<b>R3</b> 306-336	-VQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPPGGGQ
<b>R4</b> 337-368	VEVKSEKLD FFKDRVQSKIGSLDNIHVPGGGN

**Rycina 12** Sekwencje pseudopowtórzeń (R1-R4) obecnych w domenie wiążącej z mikrotubulami w białku tau z zaznaczonymi resztami histydyny [108].

Badania *in vitro* sugerują, że miedź wiąże się do drugiego (R2) i trzeciego (R3) regionu powtórzeń powodując tworzenie struktury  $\alpha$ -helikalnej promującej formowanie włókien neurofibrylarnych [85]. Jedną z teorii mówi również, że białko tau, podobnie jak A $\beta$ , jest zdolne do redukcji jonów miedzi indukując przy tym wytwarzanie nadtlenu wodoru [109]. Region R3 ze względu na obecność w sekwencji dwóch reszt histydyny obok siebie, jest w stanie silnie wiązać jony miedzi na obu stopniach utlenienia, co sprzyja zachodzeniu reakcji redoks ( $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ ) [108] i generowaniu ROS.

### 2.3 Jony miedzi w chorobie Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD) występuje głównie u osób powyżej 55 roku życia, rozwija się powoli i prowadzi do trwałego, nieodwracalnego uszkodzenia istoty czarnej w mózgu [110], odpowiedzialnej między innymi za koordynację ruchów mimowolnych. PD uważana jest za drugie najczęstsze zaburzenie zwyrodnieniowe mózgu. Mechanizm powstawania i rozwoju choroby Parkinsona, tak samo jak w przypadku AD, nie jest do końca poznany. Badania statystyczne wykazały, że częstość zachorowań ściśle zależy od płci (mężczyźni chorują dwa razy częściej od kobiet), grupy etnicznej czy położenia geograficznego, jednak fakt ten nie został jeszcze wyjaśniony [111].

Charakterystycznymi objawami PD są zaburzenia ruchowe (spowolnienie, niezgrabność), powłóczenie nogami, drżenie mięśni, pochylona postawa oraz spowolnienie procesów myślowych. Pierwsze objawy parkinsonizmu są często mylone z objawami starzenia, dlatego wielu pacjentów rozpoczyna leczenie w momencie, kiedy choroba jest już mocno rozwinięta. Upośledzenie ruchowe oraz myślowe zwiększa prawdopodobieństwo zgonu na skutek przypadku, a nie samej choroby, np. w wyniku upadku, zapalenia płuc czy niedożywienia [112].

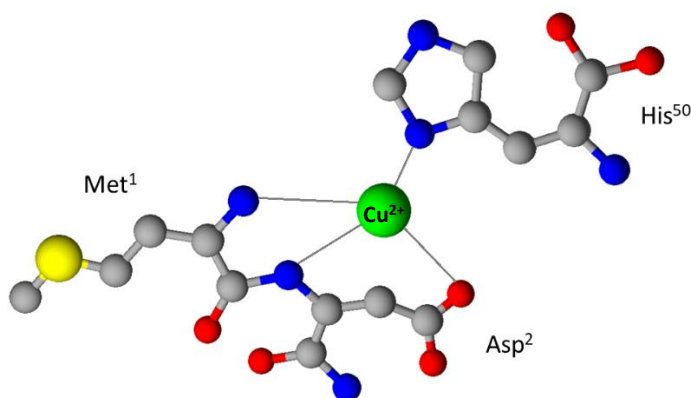
W mózgach osób cierpiących na chorobę Parkinsona odkryto nierozpuszczalne złogi białkowe zwane ciałami Lewy'ego. Są to duże agregaty białkowe, których głównym składnikiem jest  $\alpha$ -synukleina obficie występująca we fragmentach presynaptycznych neuronów, gdzie prawdopodobnie bierze udział w uwalnianiu neuroprzekaźników z pęcherzyków presynaptycznych [113]. W postaci natywnej  $\alpha$ -synukleina posiada strukturę wysoce nieuporządkowaną ze względu na niską hydrofobowość i wysoki ładunek. Początkiem procesu agregacji prawdopodobnie jest częściowe zwinięcie łańcucha (ustrukturyzowanie). Dopiero w kolejnych etapach następuje przekształcenie



struktury białka w dobrze zdefiniowaną strukturę trzeciorzędową bogatą w  $\beta$ -karkki [114]. Wiele dowodów wskazuje na to, że tak jak w przypadku AD, to nierozpuszczalne oligomery i protofibryle, a nie same włókna amyloidowe, odpowiadają za toksyczność  $\alpha$ -synukleiny [115]. Potrafią one przenikać przez błony komórkowe, wiązać się z nimi oraz tworzyć w nich kanały podobne do porów [116]. Badania wykazały, że agregację  $\alpha$ -synukleiny *in vitro* promują takie czynniki jak wysokie stężenie białka, niskie pH, podwyższona temperatura, obecność jonów metali oraz oddziaływanie z innymi białkami [116].

Patogenność oligomerów  $\alpha$ -synukleiny opiera się na niszczeniu neuronów dopaminergicznych istoty czarnej [110]. Dopamina jest jednym z głównych neuroprzekaźników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mózgu. Obniżenie jej produkcji skutkuje osłabieniem sygnałów nerwowych, czego konsekwencją są przedstawione wcześniej objawy parkinsonizmu. Dlatego też, we wczesnych stadiach choroby, podaje się pacjentom prekursorzy dopaminy np. lewodopę, aby pobudzić inne komórki nerwowe do jej produkcji.

$\alpha$ -Synukleina wykazuje wysokie powinowactwo do jonów miedzi, znacznie wyższe od ich synaptycznego stężenia. Substancja czarna, atakowana w PD, jest częścią zwojów podstawnych mózgu, w których występuje największe w ośrodkowym układzie nerwowym stężenie jonów miedzi, dlatego ich rola w rozwoju parkinsonizmu może być dość istotna. Domena wiążąca  $\text{Cu}^{2+}$  znajduje się na N-końcu łańcucha białka. Za proces koordynacji odpowiadają: N-końcowa grupa aminowa  $\text{Met}^1$ , pochodzące od  $\text{Asp}^2$  grupa amidowa i karboksylowa oraz pierścień imidazolowy  $\text{His}^{50}$  (**Rycina 13**) [117].



**Rycina 13** Domena wiążąca jon  $\text{Cu}^{2+}$  (zielona kula) w  $\alpha$ -synukleinie.  
Rysunek wykonany za pomocą programu ChemSketch.

Wiele badań wskazuje na związek agregacji  $\alpha$ -synukleiny z jonami metali. Udowodniono, że dodatek DOPAL (3,4-dihydroksyfenyloacetaldehydu), jednego z głównych metabolitów dopaminy, do roztworu  $\alpha$ -synukleiny powoduje jej silną oligomeryzację, a obecność dwuwartościowych jonów metali znacznie wzmacnia ten proces. Spośród badanych metali tj.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  oraz  $\text{Cu}^{2+}$ , to miedź wykazywała najsilniejszy efekt [118]. Mechanizm oligomeryzacji z wykorzystaniem DOPAL nie wymaga wysokich stężeń reagentów, co skłania ku hipotezie, że mógłby zachodzić w warunkach *in vivo*.

Niektóre źródła literaturowe mówią także o zdolności miedzi do bezpośredniej indukcji i/lub przyspieszenia oligomeryzacji  $\alpha$ -synukleiny [119]. Oddziaływanie metal-białko wywołuje zmiany konformacyjne, które promują tworzenie konkretnego rodzaju oligomerów. Badania *in vitro* wykazały, że w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  cząsteczki  $\alpha$ -synukleiny chętniej tworzą pierścieniowe protofibryle niż włókienka, co może tłumaczyć zwiększenie toksyczności agregatów w obecności tego metalu. Pierścieniowe protofibryle wykazują bardzo wysokie powinowactwo do błon komórkowych. Łącząc się z membraną generują powstanie porów, prowadząc w ten sposób do śmierci komórek nerwowych [120]. Nie istnieją co prawda silne dowody na potwierdzenie toksyczności zarówno pierścieniowych protofibryli, jak i dojrzałych fibryli, jednak nie ma wątpliwości co do powiązania agregacji  $\alpha$ -synukleiny z degeneracją neuronów dopaminergicznych.

## 2.4 Jony cynku

Cynk, obok miedzi, jest jednym z najważniejszych mikroelementów niezbędnych do właściwego funkcjonowania organizmów ludzkich. Wchodzi w skład szeregu metaloprotein, z których znaczna część posiada w sekwencji tzw. motyw palca cynkowego. Klasycznie składa się on z dwóch reszt cysteiny i dwóch reszt histydyny (typ C2-H2) koordynujących jon cynku, jednak łącznie wyróżnić można co najmniej 30 różnych struktur palca cynkowego (różnych układów reszt Cys i His) [121]. Białka zawierające jony  $\text{Zn}^{2+}$  są bezpośrednio związane z układami neurologicznym, immunologicznym i rozrodczym [122]. Dodatkowo biorą udział między innymi w procesach organogenezy, spermatogenezy, odczuwania smaków czy wydzielania enzymów żołądkowych. Cynk zaangażowany jest także w syntezę i degradację białek

oraz kwasów nukleinowych. Wchodzi w skład ponad 3000 różnych metaloprotein [123]. Przykładami enzymów cynkozależnych są [124]:

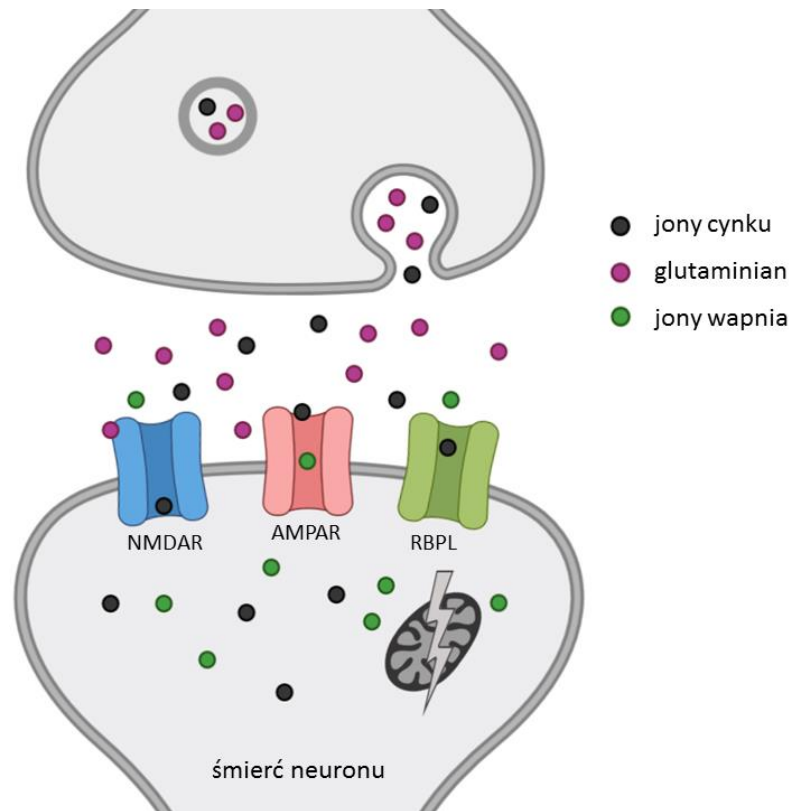
- dehydrogenaza alkoholowa – bierze udział w detoksykacji alkoholu,
- anhydraza węglanowa – katalizuje reakcję  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ,
- karboksypeptydaza – uczestniczy w hydrolizie łańcuchów peptydowych.

Ze względu na swoje szerokie zastosowania, cynk znajduje się we wszystkich tkankach i wydzielinach ciała, a jego najbardziej stabilny, a tym samym najpowszechniejszy, stopień utlenienia to  $\text{Zn}^{2+}$ . Związki zawierające  $\text{Zn}^{2+}$  występują rzadko i muszą być stabilizowane przez duże ligandy. Cynk, razem z jonami miedzi, wchodzi w skład SOD, co wskazuje na jego istotną funkcję cytoochronną. Udowodniono, że niedobór tego metalu skutkuje zwiększoną produkcją wolnych rodników i, w konsekwencji, uszkodzeniem komórek [125].

Wiele źródeł literaturowych wskazuje na udział cynku w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Udowodniono, że metal ten wiąże się z białkami amyloidogennymi, takimi jak APP, amyloid  $\beta$  czy  $\alpha$ -synukleina, jednak oddziaływanie to jest znacznie słabsze niż w przypadku miedzi [126]. Pomimo tego, niektórzy naukowcy skłaniają się ku hipotezie, że jony  $\text{Zn}^{2+}$  indukują szybką agregację  $\text{A}\beta$  [127]. Faktem skłaniającym do potwierdzenia tej hipotezy jest wykrycie wysokiego stężenia tego metalu w złogach amyloidowych.

Ze względu na obecność jonów cynku jako neuroprzekaźników w szczelinach synaptycznych, są one w tym kontekście ściślej łączone z objawami demencji starczej. Chelatowane jony  $\text{Zn}^{2+}$  znajdują się w pęcherzykach presynaptycznych neuronów glutaminergicznych i wraz z glutaminianem uwalniane są do szczeliny synaptycznej podczas wzbudzenia neuronu. W stanach niedokrwienia mózgu, na niedobór tlenu oraz glukozy neurony reagują nagłym, niekontrolowanym wyrzutem glutaminianu i jonów cynku do szczeliny synaptycznej. Tam oddziałują one z receptorami na błonie postsynaptycznej, takimi jak AMPAR (receptor kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego), RBPL (receptory bramkowane potencjałem typu L) oraz wcześniej już wspomniany NMDAR, powodując otwarcie kanałów jonowych dla wapnia, co przedstawione zostało na **Rycinie 14** [128]. Niespecyficzność wyżej wymienionych kanałów powoduje przedostanie się do wnętrza komórki także jonów cynku, które

w nadmiarze stają się neurotoksyczne.  $Zn^{2+}$  ma zdolność do inhibowania pracy szeregu enzymów, hamowania procesu oddychania komórkowego, co pozbawia komórkę energii oraz uczestniczy w produkcji wolnych rodników [128]. Negatywne skutki działania cynku, w połączeniu z nadmiarem jonów wapnia w neuronach, powodują ich obumieranie, dlatego u osób po udarach niedokrwiennych mózgu, w ciągu trzech miesięcy, często rozwijają się objawy demencji.



**Rycina 14** Nieprawidłowe działanie synapsy indukujące śmierć komórki nerwowej w stanie niedokrwienia mózgu.

Rysunek wykonany za pomocą strony [BioRender.com](https://www.biorender.com).

### 3. Ludzka cystatyna C

Cystatyny to rodzina białek charakteryzujących się podobną budową cząsteczki. Występują one zarówno w organizmach ludzkich, jak i zwierzęcych, a ich główną funkcją jest inhibicja proteaz cysteinowych. Ze względu na pewne rozbieżności w strukturze i występowaniu cystatyny dzielimy na [129,130]:

- **Cystatyny Typu 1** – wewnątrzkomórkowe; przedstawiciele: cystatyna A i B, inaczej zwane stefinami; jednołańcuchowe białka zbudowane z około 100 reszt aminokwasowych; nie posiadają mostków disulfidowych ani reszt cukrowych; występują głównie w cytozolu komórkowym;
- **Cystatyny Typu 2** – zewnątrzkomórkowe; przedstawiciele: cystatyny C, D, E, F, G, S i SN; jednołańcuchowe białka zbudowane z około 115 reszt aminokwasowych; posiadają dwa mostki disulfidowe, ale nie posiadają reszt cukrowych; występują głównie w płynach ustrojowych;
- **Cystatyny Typu 3** – wewnątrznaczyniowe; tzw. L- i H-kininogeny; są to wielodomenowe białka zbudowane z trzech typowych dla cystatyn sekwencji aminokwasowych; różnią się od siebie rodzajem aktywności biologicznej; zawierają zarówno mostki disulfidowe jak i reszty cukrowe; występują w osoczu.

Jednym z przedstawicieli grupy cystatyn Typu 2 jest cystatyna C, która stanowi główny przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej.

#### 3.1 Funkcje biologiczne

Ludzka cystatyna C lub inaczej hCC (z ang. *Human Cystatin C*) produkowana jest przez wszystkie komórki jądrzaste ludzkiego organizmu i, w postaci monomerycznej, wydzielana jest do płynów ustrojowych [131]. Największe stężenie hCC występuje w spermie (ok. 51,0 mg/l) oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym (ok. 5,8 mg/l), ale możemy ją znaleźć również w moczu, ślinie, łzach, osoczu oraz mleku [131]. Cystatyna C wykazuje silną aktywność inhibicyjną wobec proteaz cysteinowych. W sposób odwracalny hamuje enzymy należące do klasy C1 proteaz cysteinowych takie jak papaina, katepsyny B, H, K, L i S oraz do klasy C13 czyli leguminaz [132]. Dzięki temu hCC kontroluje i reguluje proteolizę pozakomórkową.

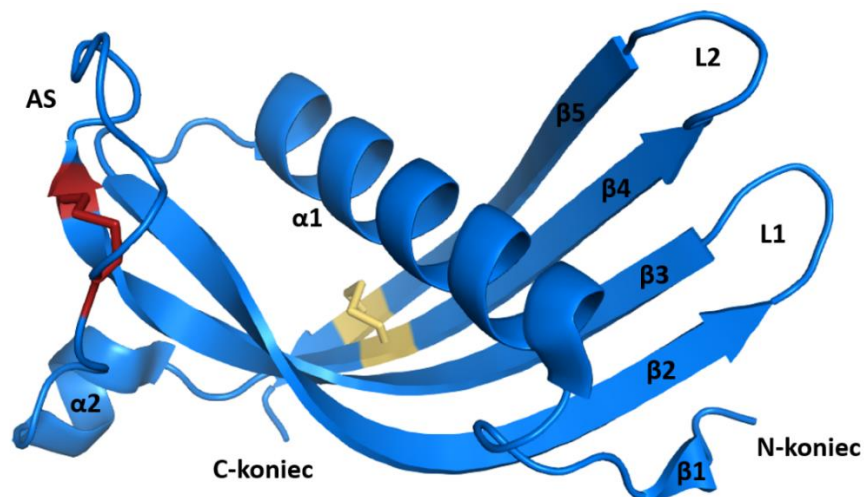
Zmiana w osoczym stężeniu cystatyny C jest czynnikiem wskazującym na rozwój niekorzystnych zmian w organizmie. W niektórych stanach chorobowych, jak np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów [133] czy rozedmie płuc [134], zaobserwowano podwyższoną aktywność proteaz cysteinowych i/lub stężenia cystatyny C. Zaburzenie równowagi enzym-inhibitor prowadzi do powstawania i pogłębiania patologicznych zmian, co sugeruje bardzo istotną rolę hCC w ochronie i prawidłowym funkcjonowaniu komórek. Niektóre z badań naukowych wskazują na zdolność cystatyny C do aktywacji układu odpornościowego poprzez stymulację syntezy czynnika TNF- $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) i interleukiny 10 oraz pobudzania makrofagów [135,136]. Udowodniono również, że białko to posiada właściwości neuroochronne [137]. Produkowane jest w neuronach w odpowiedzi na obecność złogów amyloidowych w mózgu i, poprzez oddziaływanie z fragmentem amyloidu  $\beta$  niezbędnym do fibrylizacji (reszty 17-28), zdolne jest do hamowania jego agregacji [138,139].

Oprócz organizmów ludzkich, proteazy cysteinowe niezbędne są również do prawidłowego funkcjonowania bakterii, pasożytów, wirusów oraz grzybów [140]. Z tego względu cystatyna C, będąc inhibitorem proteaz cysteinowych, jest szeroko rozpatrywana jako cząsteczka o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciw pasożytniczych, przeciwgrzybiczych i przeciw wirusowych. W oparciu o fragment sekwencji hCC zaprojektowano, zsyntezowano i przebadano peptydomimetyk Cystapep 1, który, jak się okazało, charakteryzuje się silnymi właściwościami przeciwbakteryjnymi oraz wysokim profilem bezpieczeństwa [141].

Z uwagi na niewielki rozmiar i ładunek dodatni w fizjologicznym pH, cystatyna C posiada możliwość swobodnego przechodzenia przez kłębuszki nerkowe. Stężenie hCC w organizmie jest stałe i niezależne od płci, wieku oraz masy ciała, a samo białko wykazuje dużą stabilność w warunkach laboratoryjnych. Dzięki temu cystatyna C, choć jej ilość w moczu jest niewielka (ok. 0,095 mg/l) [131], stanowi doskonały endogenny biomarker. Zmiany w stężeniu hCC w moczu mogą wskazywać na uszkodzenie nerek lub działanie nefrotoksyczne przyjmowanych leków. Wyznaczenie wskaźnika filtracji kłębuszkowej GFR (z ang. *Glomerular Filtration Rate*) oznaczającego ilość osocza przefiltrowanego w jednostce czasu przez kłębuszki nerkowe, pozwala na ocenę stopnia wydolności nerek [142].

### 3.2 Budowa cząsteczki

Biologicznie aktywna forma cystatyny C to pojedynczy łańcuch polipeptydowy zbudowany ze 120 reszt aminokwasowych (**Rycina 15**) o łącznej masie 13,4 kDa. W przeciwieństwie do innych przedstawicieli cystatyn Typu 2, hCC ma charakter zasadowy. W warunkach fizjologicznych wykazuje dodatni ładunek elektryczny, a jej pI wynosi 9,3. Cząsteczka cystatyny C zbudowana jest z  $\alpha$ -helisy ( $\alpha 1$ ) otoczonej przez  $\beta$ -kartkę złożoną z czterech antyrównoległych  $\beta$ -nici. Nici  $\beta 2$  i  $\beta 3$  połączone są tak zwaną pętlą L1, a  $\beta 4$  i  $\beta 5$  pętlą L2. Po przeciwnej stronie cząsteczki (patrzac od pętli L1 i L2) znajduje się słabo ustrukturyzowany i labilny fragment łańcucha nazwany regionem AS (ang. *Appending Structure*). hCC posiada dwa mostki disulfidowe zlokalizowane w pozycjach Cys<sup>73</sup>-Cys<sup>83</sup> oraz Cys<sup>97</sup>-Cys<sup>117</sup>.



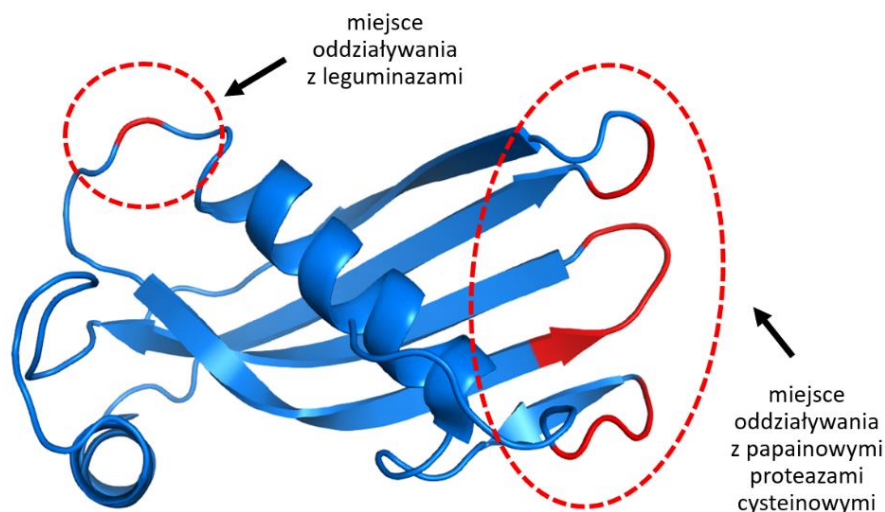
**Rycina 15** Struktura krystaliczna mutantu V57N cystatyny C (kod PDB: 3NX0) z zaznaczonymi resztami cysteiny tworzącymi mostki disulfidowe (czerwone: Cys<sup>73</sup>-Cys<sup>83</sup> oraz żółte: Cys<sup>97</sup>-Cys<sup>117</sup>).

Struktura krystaliczna fizjologicznie aktywnej czyli monomerycznej formy cystatyny C typu dzikiego (WT z ang. *Wild Type*) nie została wyznaczona bezpośrednio. W warunkach krystalizacji białko dimeryzuje [143], dlatego do rozwiązania monomerycznej struktury hCC wykorzystano jej mutanty punktowe [144,145]. Struktury te nie zawierają N-końcowego fragmentu łańcucha (około 11 reszt aminokwasowych), ponieważ w warunkach krystalizacji łatwo odszczępia się on od reszty białka lub jest zbyt labilny, aby można było uzyskać dla niego dane dyfrakcyjne. Tą samą metodą

(wykorzystując mutant punktowy) udało się również otrzymać strukturę NMR, która obrazuje pełną sekwencję hCC [146] i różni się od struktur krystalicznych głównie ułożeniem łańcucha białka w miejscach słabo ustrukturyzowanych takich jak pętla AS.

W organizmie ludzkim obserwowana jest również dimeryczna postać cystatyny C. Proces dimeryzacji zachodzi na skutek wymiany domen [143], co szerzej opisane zostało w rozdziale I.3.4. Dimer hCC nie posiada zdolności inhibicyjnej wobec proteaz cysteinowych ze względu na zmianę konformacji miejsc oddziaływania białko-enzym [147]. Uważa się, że dimeryzacja jest jedną z dróg ochrony komórkowej, między innymi w warunkach występowania nadmiaru reaktywnych form tlenu czyli podwyższonego stresu oksydacyjnego [148].

W cząsteczce cystatyny C znajdują się dwa miejsca oddziaływania z enzymami, które przedstawione zostały na **Rycinie 16**. Obszarem oddziałującym z papainowymi proteazami cysteinowymi są następujące fragmenty łańcucha: fragment N-końcowy złożony z reszt  $R^8LVG^{11}$ , fragment  $Q^{55}IVAG^{59}$  znajdujący się w pętli L1 oraz fragment  $P^{105}W^{106}$  znajdujący się w pętli L2 [149]. Natomiast obszar inhibujący aktywność leguminaz znajduje się po przeciwnej stronie cząsteczki. Tutaj istotną rolę w oddziaływaniu białko-enzym prawdopodobnie pełni reszta  $Asn^{39}$  [150].



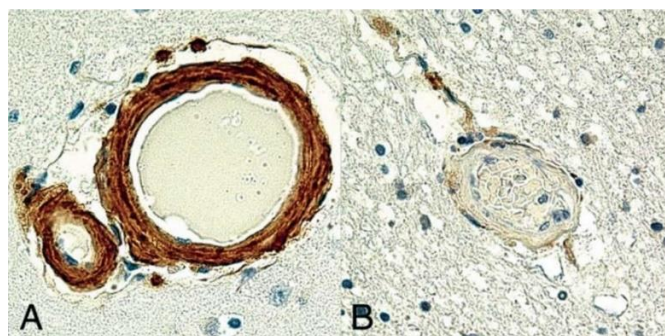
**Rycina 16** Struktura NMR mutantu V57G cystatyny C (kod PDB: 6RPV) z zaznaczonymi na czerwono resztami aminokwasowymi biorącymi udział w blokowaniu aktywności proteaz cysteinowych klas C1 i C13.



### 3.3 Dziedziczna angiopatia amyloidowa typu islandzkiego

Opisane do tej pory funkcje i właściwości cystatyny C wskazują na jej pozytywny wpływ na zdrowie i funkcjonowanie organizmu. Z drugiej jednak strony hCC zaliczana jest do grupy białek amyloidogennych i chorobotwórczych. Wywołuje rzadką, lecz bardzo poważną chorobę neurodegeneracyjną, zwaną dziedziczną angiopatią amyloidową typu islandzkiego, w skrócie HCCAA (od ang. *Human Cystatin C Amyloid Angiopathy*). Występuje ona głównie u osób mieszkających na Islandii. Na skutek punktowej mutacji w genie cystatyny C, następuje zamiana reszty leucyny w pozycji 68 łańcucha na resztę glutaminy [151]. Tak niewielka zmiana znacznie destabilizuje formę monomeryczną białka i prowadzi do produkcji silnie amyloidogennego mutantu (L68Q). L68Q fibrylizuje, tworząc złogi odkładające się w naczyniach krwionośnych mózgu (**Rycina 17**). Osłabione naczynia pękają, wywołując krwotoki uszkodzające komórki nerwowe. HCCAA jest schorzeniem dziedzicznym autosomalnie dominującym, prowadzącym do udarów, demencji i śmierci młodych dorosłych (w wieku około 30 lat).

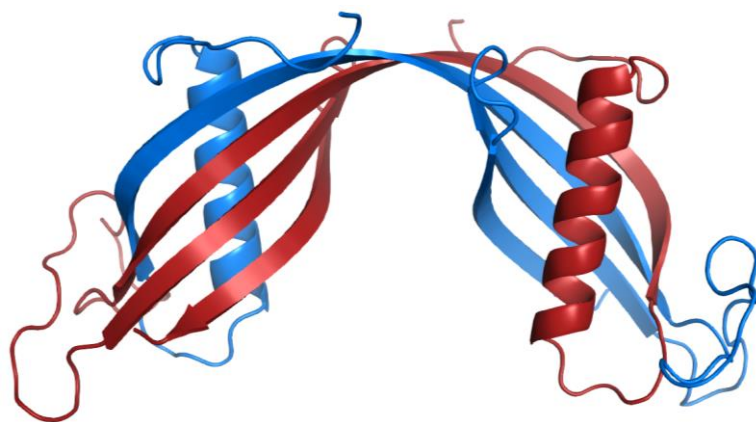
Dziedziczna angiopatia amyloidowa, tak jak wiele innych chorób neurodegeneracyjnych, nadal pozostaje nieuleczalna. Mechanizm fibrylizacji cystatyny C oraz czynniki wpływające na ten proces, czyli na chorobotwórczość białka, nadal nie zostały do końca poznane. Istnieje kilka teorii mówiących o możliwej drodze oligomeryzacji hCC i wpływie na ten proces jonów metali, co omówione zostanie w kolejnych podrozdziałach.



**Rycina 17** Tętniczki mózgu immunobarwione przeciwciałami poliklonalnymi cystatyny C [152]. Intensywne zabarwienie ścian tętniczek na kolor brązowy oznacza obecność cystatyny C w wysokim stężeniu. Powiększenie:  $\times 40$ .  
A – pacjent zmarły na HCCAA, B – próbka kontrolna

### 3.4 Mechanizm oligomeryzacji

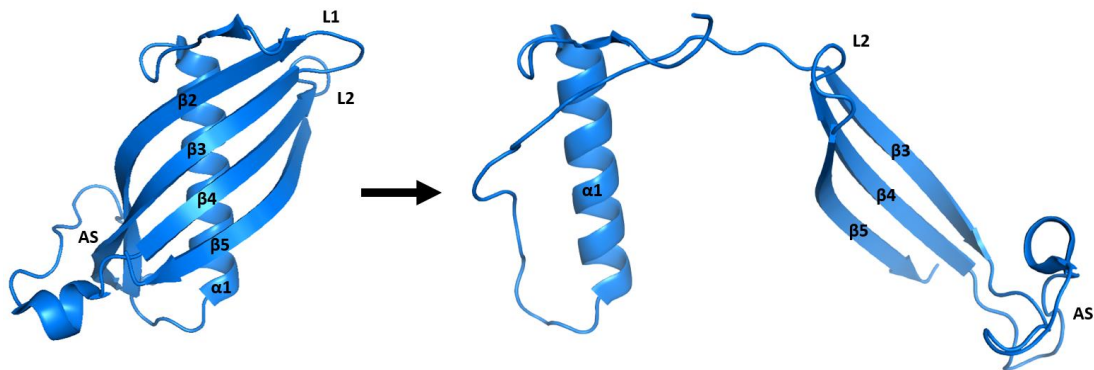
Patologiczna forma cystatyny C, nieaktywna bądź chorobotwórcza, związana jest z oligomeryzacją monomerycznej cząsteczki białka i tworzeniem agregatów o charakterze fibrylarnym. Początkiem procesu fibrylizacji hCC jest prawdopodobnie jej dimeryzacja. Podczas prób krystalizacji wykazano, że cystatyna C dimeryzuje według mechanizmu trójwymiarowej wymiany domen (ang. *3D Domain Swapping*) [143], co doskonale obrazuje struktura krystaliczna hCC typu dzikiego, przedstawiona na **Rycinie 18**.



**Rycina 18** Struktura krystaliczna dimeru cystatyny C typu dzikiego (kod PDB: 1G96). Kolory przedstawiają fragmenty monomerycznych cząsteczek białka, od których pochodzą poszczególne fragmenty dimeru.

Proces dimeryzacji rozpoczyna się od rozplecenia struktury białka poprzez „zerwanie” powierzchni styku nici  $\beta 2$  i  $\beta 3$  (**Rycina 19**). Dzieje się tak prawdopodobnie na skutek naprężeń sterycznych występujących w pętli L1. Badania przeprowadzone w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego wykazały, że reszta waliny w pozycji 57 (w pętli L1) jest resztą krytyczną w procesie dimeryzacji cystatyny C [153]. Wprowadzenie mutacji punktowej w postaci asparaginy w pozycji 57 ustabilizowało pętlę L1 na tyle, że białko nie ulegało dimeryzacji ani w roztworze [153], ani w procesie krystalizacji, co doprowadziło do otrzymania struktury krystalicznej monomeru białka [144]. hCC typu dzikiego, dążąc do zniwelowania naprężeń sterycznych, odsuwa od siebie nici  $\beta 2$  i  $\beta 3$ . Prowadzi to do utworzenia stabilnego dimeru. Janowski i współpracownicy sugerują tworzenie długiej, międzycząsteczkowej dwuniciowej

$\beta$ -kartki rozciągniętej od reszty Tyr<sup>42</sup> do reszty Thr<sup>74</sup>, która dodatkowo stabilizuje formę dimeryczną białka [143].



**Rycina 19** Częściowe rozplecenie struktury monomeru cystatyny C prowadzące do utworzenia dimeru.

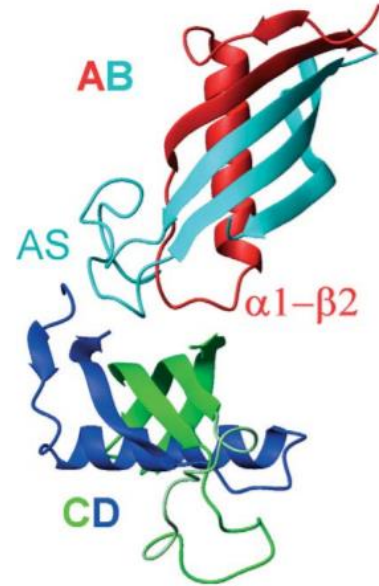
Pojedyncza podjednostka dimeru zbudowana jest z  $\alpha$ -helisy  $\alpha 1$  i fragmentów nici  $\beta 1$  i  $\beta 2$  pochodzącej od cząsteczki I oraz regionu AS, pętli L2 oraz nici  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  i  $\beta 5$  pochodzących od cząsteczki II. Podjednostki połączone są ze sobą stabilizowanymi za pomocą wiązań wodorowych fragmentami będącymi wcześniej pętlami L1 obu cząsteczek. Czynnikiem sprzyjającymi dimeryzacji są, między innymi, wysokie stężenie białka, niskie pH oraz wysoka temperatura [147].

Z uwagi na amyloidogenne właściwości cystatyny C proces jej dimeryzacji zaczęto rozpatrywać jako początek procesu oligomeryzacji, czyli początek procesów chorobotwórczych [154]. Jak już wspomniano wcześniej mechanizm fibrylizacji cystatyny C nie został jeszcze do końca poznany. Do tej pory przedstawiono na ten temat dwie teorie. Pierwszą z nich jest oligomeryzacja przez propagacyjną wymianę domen. Podczas dimeryzacji jedna cząsteczka białka wymienia domeny z jedną inną cząsteczką hCC, natomiast według wyżej wymienionej hipotezy oligomeryzacji, jedna cząsteczka hCC wymienia domeny z dwoma różnymi cząsteczkami tworząc w ten sposób „łańcuszek” zoligomeryzowanego białka, który następnie formuje fibryle. Wahlbom i współpracownicy nadprodukowali metodami inżynierii genetycznej wariant cystatyny C stabilizowany przeciw wymianie domen poprzez dodatkowy mostek disulfidowy uniemożliwiający „zerwanie” powierzchni styku nici  $\beta 2$  i  $\beta 3$ . Wariant ten nie

wykazywał żadnych tendencji do oligomeryzacji w przeciwieństwie do badanych równocześnie białka typu dzikiego oraz wariantu L68Q [155].

Drugą teorią dotyczącą oligomeryzacji cystatyny C jest oligomeryzacja poprzez asocjację dimerów. Janowski i współpracownicy, podczas próby krystalizacji hCC z obciętym N-końcem (głównie taka forma białka tworzy złogi amyloidowe), odkryli w kryształach formy oktamerycznej białka [156].

W procesie tworzenia oktamerycznych wymiana domen również ma istotne znaczenie, ponieważ jego pierwszym etapem jest dimeryzacja. Dimery oddziałują ze sobą poprzez pętle AS i  $\alpha 1$ - $\beta 2$  jednego dimeru oraz powierzchnię  $\beta$ -kartyki drugiego (**Rycina 20**) tworząc tetrametry zbudowane z łącznie ośmiu monomerów białka. Oddziałują one ze sobą głównie za pomocą oddziaływań hydrofobowych reszt alaniny, waliny oraz izoleucyny. Uważa się, że takie upakowanie białka może mieć miejsce nie tylko w kryształach, ale również może być podstawą do tworzenia rdzenia agregatów fibrylarnych.



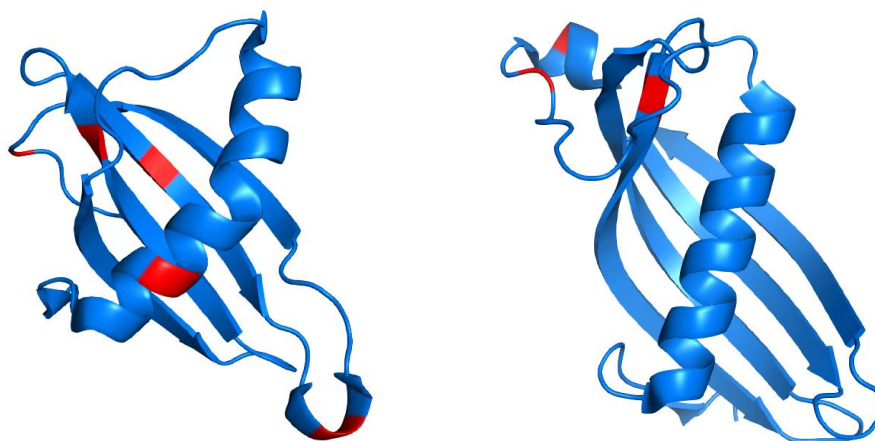
**Rycina 20** Ułożenie względem siebie dwóch dimerów cystatyny C typu dzikiego w oktamerycznej [156].

Niezależnie od sposobu łączenia cząsteczek cystatyny C w oligomerach, ich tworzenie prowadzi do powstawania wysoko uporządkowanych struktur  $\beta$ -karkowych. Badania fibrylizacji stefiny B, białka będącego analogiem hCC również należącego do grupy cystatyn, sugerują, że układ  $\beta$ -karków w jej fibrylach najprawdopodobniej jest równoległy, a nie, jak wcześniej uważano, antyrównoległy [157]. Dlatego też Davis i współpracownicy zaproponowali model oligomeryzacji cystatyny C oparty o trójwymiarową wymianę domen, który uwzględnia obecność w strukturze dwóch mostków disulfidowych i sugeruje, że utworzenie fibryli z równoległymi  $\beta$ -nicami, w przypadku tego białka, również jest prawdopodobne [157].

### 3.5 Oddziaływanie z jonami metali

Badania dotyczące oddziaływania cystatyny C z jonami metali nie zostały do tej pory przeprowadzone. Jedyne eksperymenty dotyczące zdolności kompleksotwórczej

dla białek z grupy cystatyn wykonano dla cystatyny B (stefiny B). Stefina B pod względem budowy nie różni się znacznie od hCC. Jest nieco mniejsza i nie posiada mostków disulfidowych, ale posiada charakterystyczną dla cystatyn strukturę cząsteczki. Porównanie budowy i sekwencji wyżej wymienionych białek przedstawione zostało na **Rycinie 21**.



Cystatyna C	1	SSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVRRALDFAVGEYNKASNDMYH	43
Stefina B	1	-----MMCGAPSATQPATAETQHIADQVRSQLEEKENKKF-	35
Cystatyna C	44	SRALQVVRARKQIVAGVNYFLDVELGRTTCTKTQPNLDNCPFH	86
Stefina B	36	-PVFKAVSFKSQVVAGTNYFIKVHVGD-----E	62
Cystatyna C	87	DQPHLKRKAFCSFQIYAVPWQG-TMTLSKSTCQDA-----	120
Stefina B	63	DFVHLR-----VFQ--SLPHENKPLTLSNYQTNKAKHDELTYF	98

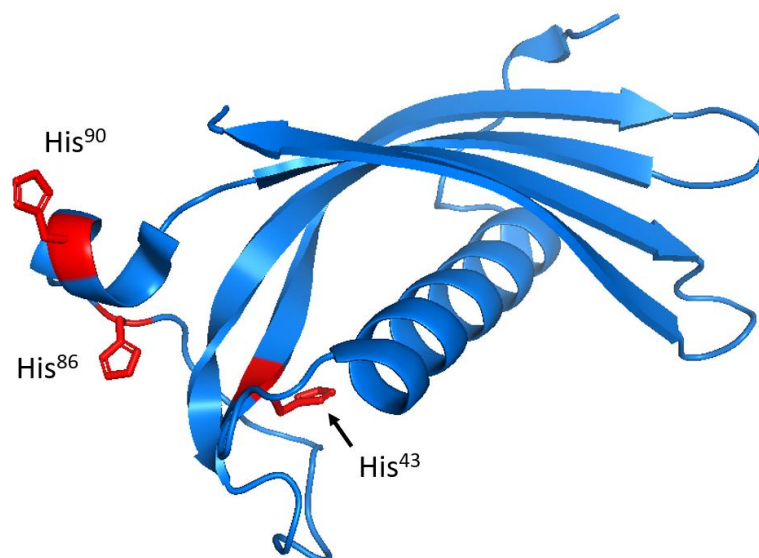
Identyczność sekwencji: 18,6 % (zielone). Podobieństwo sekwencji: 30,2 % (szare).

**Rycina 21** U góry struktury krystaliczne monomeru stefiny B z lewej (kod PDB: 4N6V) oraz cystatyny C z prawej (kod PDB: 3NX0). Na czerwono zaznaczono reszty histydyny obecne w łańcuchach obu białek. Na dole porównanie sekwencji cystatyny C i stefiny B. Obliczenia wykonane w programie internetowym EMBOSS Needle.

Przeprowadzone badania wykazały, że stefina B charakteryzuje się wysokim powinowactwem do jonów miedzi (II). W oddziaływanie to zaangażowane są trzy z pięciu obecnych w łańcuchu stefiny B reszt histydyny [158,159]. Udowodniono również, że dodatek  $\text{Cu}^{2+}$  powoduje destabilizację formy monomerycznej stefiny B, ale jednocześnie spowalnia proces fibrylogenezy [158].

Cystatyna C posiada w swojej strukturze trzy reszty histydyny w pozycjach: His<sup>43</sup>, His<sup>86</sup> oraz His<sup>90</sup>, które przedstawione zostały na **Rycinie 22**. Reszta His<sup>43</sup> jest schowana

w głębi struktury białka, co znacznie utrudnia interakcje ze środowiskiem. Jednak dwie pozostałe reszty His<sup>86</sup> oraz His<sup>90</sup> znajdują się w niewielkiej odległości od siebie, w labilnym i słabo ustrukturyzowanym regionie AS. Takie położenie może czynić je dobrym miejscem wiążącym dla jonów metali np. miedzi (II).



**Rycina 22** Położenie trzech reszt histydyny obecnych w łańcuchu ludzkiej cystatyny C (kod PDB: 3NX0).

Do tej pory przeprowadzone zostały badania na peptydzie będącym fragmentem pętli AS tj. od 85 do 94 reszty aminokwasowej w białku. Fragment ten zawierał obie interesujące reszty histydyny: His<sup>86</sup> i His<sup>90</sup>. Eksperymenty wykazały, że w pH fizjologicznym jony miedzi chętnie tworzą kompleksy z badanym peptydem, a w wiązaniu tym bierze udział co najmniej jedna z obecnych w sekwencji reszt His [160]. Wyniki te stanowią obiecujący wstęp do badań oddziaływania hCC-Cu<sup>2+</sup> na całym białku oraz jego wariantach.

## II. Cel pracy

Choroby neurodegeneracyjne związane z agregacją białek amyloidogennych w mózgu, ze względu na powszechne występowanie, stanowią ogromny problem medyczny, ekonomiczny i społeczny. Osoby cierpiące na tego rodzaju przypadłości wymagają stałej opieki oraz wysokich nakładów finansowych wynikających z potrzeby zakupu leków i akcesoriów ułatwiających im codzienne funkcjonowanie. Badania nad białkami amyloidogennym od lat przeprowadzane są na całym świecie, jednak pomimo tak wielu starań, wysoki stopień złożoności procesów zachodzących w ludzkim mózgu oraz wysoka wrażliwość tkanki nerwowej do tej pory nie pozwoliły na wynalezienie leków hamujących procesy patologiczne. Powszechnie uważa się, że amyloidozy neurodegeneracyjne wywołane są bezpośrednio przez agregację białek i odkładanie ich złogów w tkance mózgu. *Jednak czy jest to główna przyczyna procesów chorobotwórczych? Jak środowisko wpływa na agregację białek? Jakie czynniki ją przyspieszają, a jakie są w stanie zahamować?* Na te pytania nadal nie udzielono jednoznacznych odpowiedzi. Jednym z czynników, szeroko rozpatrywanym jako biorący udział w procesach oligomeryzacji białek, są jony metali np. miedzi (II), które występują w tkance mózgu.

Białkiem stanowiącym temat mojej rozprawy doktorskiej jest cystatyna C, która również należy do grupy białek amyloidogennych. Jej chorobotwórczość wywołana jest punktową mutacją w genie, czego konsekwencją jest śmiertelna choroba zwana dziedziczną angiopatią amyloidową typu islandzkiego [151]. Sam proces oligomeryzacji hCC był i nadal jest powszechnie analizowany, jednak w literaturze nie można znaleźć informacji na temat wpływu jonów metali na proces jej agregacji. Celem mojej rozprawy doktorskiej było zbadanie oddziaływania cystatyny C z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  oraz sprawdzenie ich wpływu na proces oligomeryzacji ww. białka. W sekwencji hCC znajdują się dwie dostępne dla środowiska zewnętrznego reszty chętnie oddziałującej z jonami miedzi histydyny: His<sup>86</sup> oraz His<sup>90</sup>. Obie zlokalizowane są w labilnym, słabo ustrukturyzowanym fragmencie łańcucha, co czyni je potencjalnym miejscem wiążącym dla jonów  $\text{Cu}^{2+}$ . Moja praca miała za zadanie potwierdzić i scharakteryzować oddziaływanie hCC- $\text{Cu}^{2+}$ . Otrzymanie metodami inżynierii genetycznej mutantów cystatyny C z zamienionymi resztami histydyn w pozycjach 86 oraz 90 na obojętne wobec jonów reszty alanin,

pozwołyby na sprawdzenie, czy któraś z tych reszt (a może obie) jest odpowiedzialna za wiązanie jonów miedzi (II). Analizy chromatograficzne wariantów hCC inkubowanych z  $\text{Cu}^{2+}$  zilustrowałyby wpływ wprowadzonej mutacji na zdolność do wiązania jonów i, biorąc pod uwagę skłonności białka do oligomeryzacji, na stabilność monomeru. Potwierdzeniem wniosków wysnutych na podstawie badań chromatograficznych miały być analizy NMR, które ostatecznie wskazałyby potencjalne miejsce wiążące jony miedzi w sekwencji białka.

Poza badaniem samego oddziaływania hCC- $\text{Cu}^{2+}$  postanowiłam także sprawdzić wpływ jonów miedzi (II) na proces oligomeryzacji cystatyny C. W tym celu miałam wykorzystać szereg metod mikroskopowych, chromatograficznych, spektrometrycznych oraz spektrofluorometrycznych, które pozwoliłyby mi określić charakter powstających w trakcie trwania eksperymentów agregatów białkowych oraz określić czy obecność jonów miedzi wpływa na zmiany w procesie oligomeryzacji cystatyny C.

Dodatkowym projektem realizowanym w ramach mojej pracy doktorskiej była krystalizacja i rozwiązywanie struktur krystalicznych nadprodukowanych przeze mnie wariantów hCC, zarówno bez jak i w obecności jonów miedzi. Badanie te miały na celu wykazanie różnic (lub ich braku) w strukturze trzeciorzędowej między mutantami cystatyny C a jej typem dzikim. Ponadto krystalizacja w obecności jonów miedzi w założeniu mogłaby wskazać potencjalne miejsce wiążące i potwierdzić powinowactwo jonów miedzi do reszt histydyn obecnych w pętli AS cystatyny C.

Podsumowując, szczegółowe cele, które realizowałam w ramach mojej pracy doktorskiej przedstawiają się następująco:

- A. Wprowadzenie mutacji punktowych do plazmidów bakteryjnych oraz nadprodukcja w komórkach bakteryjnych *Escherichia coli* czterech wariantów cystatyny C:
  - **hCC WT** – cystatyny C typu dzikiego (ang. *Wild Type*),
  - **hCC H86A** – wariantu cystatyny C z zamienioną resztą His<sup>86</sup> na resztę alaniny,
  - **hCC H90A** – wariantu cystatyny C z zamienioną resztą His<sup>90</sup> na resztę alaniny,
  - **hCC H86\_90A** – wariantu cystatyny C z zamienionymi resztami His<sup>86</sup> i His<sup>90</sup> na reszty alaniny;



- B. Oczyszczenie nadprodukowanych białek metodami chromatograficznymi oraz scharakteryzowanie ich za pomocą spektrometrii mas, dichroizmu kołowego, testów enzymatycznych oraz analiz chromatograficznych;
- C. Sprawdzenie wpływu jonów  $\text{Cu}^{2+}$  na stabilność monomerycznej cystatyny C oraz jej wariantów za pomocą inkubacji wyżej wymienionych białek z jonami miedzi (II) w warunkach zbliżonych do fizjologicznych;
- D. Przenalizowanie wyników badań NMR w celu znalezienia potencjalnych miejsc wiążących dla jonów miedzi (II) w sekwencji cystatyny C;
- E. Zbadanie wpływu jonów  $\text{Cu}^{2+}$  na proces oligomeryzacji cystatyny C poprzez poddanie próbek analizom chromatograficznym, spektrofluorometrycznym, spektrometrycznym i mikroskopowym;
- F. Wykryształowanie metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli trzech wariantów hCC (H86A, H90A oraz H86\_90A), poddanie kryształów badaniom dyfrakcyjnym oraz rozwiązywanie ich struktur krystalicznych;
- G. Próba wykryształowania cystatyny C typu dzikiego oraz badanych mutantów w obecności jonów miedzi (II), poddanie kryształów badaniom dyfrakcyjnym, rozwiązywanie ich struktur krystalicznych oraz wyznaczenie miejsca wiążącego dla  $\text{Cu}^{2+}$ .

### III. Metody badań

#### 1. Analiza i otrzymywanie DNA

##### 1.1 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Elektroforeza to technika umożliwiająca rozdział cząstek DNA na podstawie różnic w szybkości ich poruszania się w porowatym żelu w polu elektrycznym. Kwasy nukleinowe w pH zbliżonym do obojętnego obdarzone są ładunkiem ujemnym, co związane jest z obecnością grup fosforanowych w ich strukturze. Rozdział cząstek w żelu następuje zatem na podstawie ich masy i w kierunku elektrody dodatniej czyli anody. Mniejsze fragmenty kwasów nukleinowych poruszają się szybciej ze względu na możliwość swobodniejszego, w porównaniu do fragmentów większych, przechodzenia przez pory. Fazą stałą w tym rodzaju elektroforezy jest żel agarozowy, w skład którego wchodzi bufor elektrodowy oraz substancja sieciująca, agarozą, w stężeniu 0,5-2 % w zależności od potrzeb. Agarozą jest liniowym polisacharydem złożonym z agarobiozy, disacharydu zbudowanego z  $\beta$ -D-galaktopiranozy i 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galaktopiranozy. Pozwala ona na otrzymanie porów, których faktyczny rozmiar zależy od użytego stężenia substancji sieciującej. Pozwala to zatem na manipulowanie rozdzielczością fazy stałej. Im wyższe stężenie agarozy tym drobniejsze pory, a zatem lepszy rozdział mniejszych cząstek kwasów nukleinowych.

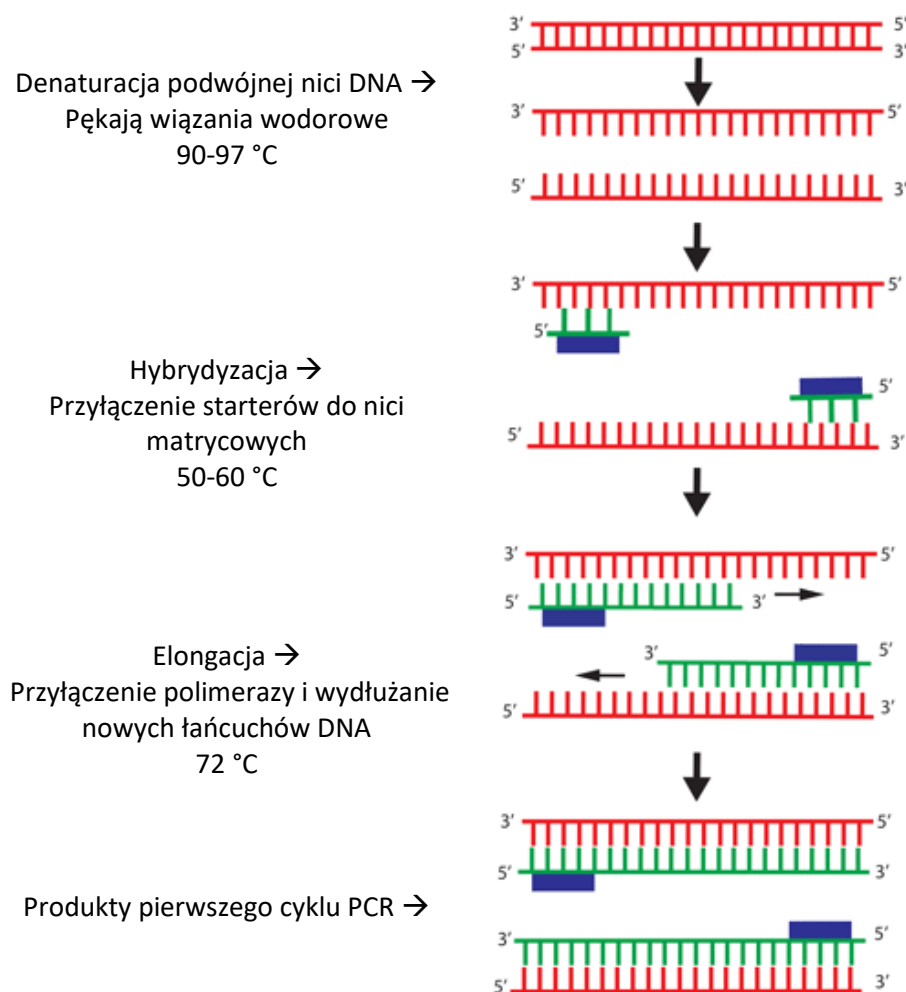
Jako bufony elektrodowe najczęściej wykorzystuje się bufony TAE oraz TBE [161]. Pierwszy z nich w swoim składzie zawiera EDTA, Tris oraz kwas octowy, a drugi EDTA, Tris oraz kwas borowy. Wybór buforu ściśle zależy od potrzeb wykonywanej analizy. Bufor TBE lepiej nadaje się do rozdzielania niewielkich fragmentów DNA, ale zawiera kwas borowy, który stanowi silny inhibitor enzymów. Jeśli istnieje zatem potrzeba dalszej pracy z rozdzielanymi cząstkami, to lepszym wyborem może okazać się bufor TAE.

##### 1.2 Mutageneza ukierunkowana

Mutageneza ukierunkowana, to szczególnie ważne narzędzie w inżynierii genetycznej i badaniu białek. Opiera się ona na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) i umożliwia wprowadzenie punktowej zmiany w precyzyjnie zdefiniowanym miejscu w nici DNA [162]. Wdrożenie takich modyfikacji

skutkuje otrzymaniem białek z zamienionymi wybranymi resztami aminokwasowymi, co pozwala na analizowanie wpływu tych zmian na stabilność, strukturę czy aktywność biologiczną cząsteczek.

Do przeprowadzenia mutagenazy ukierunkowanej niezbędna jest matryca, na podstawie której wprowadza się modyfikacje. Taką matrycą najczęściej stanowią zmetylowane przez komórki bakteryjne, koliste cząsteczki bakteryjnego DNA tzw. plazmidy z wklonowanym wcześniej genem badanego białka. Pierwszym etapem mutagenazy ukierunkowanej jest zaprojektowanie starterów, którymi nazywamy oligonukleotydy komplementarne do nici DNA z wprowadzoną już mutacją/mutacjami punktowymi. W kolejnym etapie rozpoczyna się reakcja PCR, która schematycznie przedstawiona została na **Rycinie 23**.



**Rycina 23** Schemat łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) [163].

PCR składa się z trzech głównych etapów: denaturacji, hybrydyzacji i elongacji. Etap denaturacji polega na rozpleceniu podwójnej nici matrycowego DNA poprzez działanie wysoką temperaturą, zazwyczaj około 90-97 °C, która powoduje pękanie wiązań wodorowych między sparowanymi zasadami azotowymi [164]. Następnie do pojedynczych nici DNA przyłączają się startery (etap hybrydyzacji), które w przypadku prowadzenia mutagenyzy nie są całkowicie komplementarne do matrycy (zawierają określone mutacje). Ten etap prowadzony jest w temperaturze niższej, około 50-60 °C, zależnej od właściwości stosowanych starterów. Ostatnim etapem jest elongacja. W temperaturze 72 °C polimeraza tworzy kompleks z matrycowym DNA i przyłączonym do niego starterem dzięki czemu może rozpocząć syntezę nowej nici. Aby uzyskać wysoką wydajność reakcji prowadzi się ją w 25-30 powtarzających się cyklach [164].

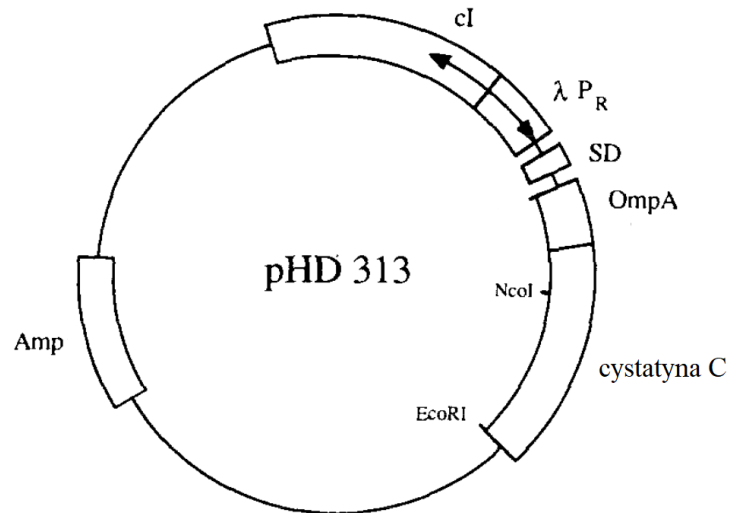
Po poprawnym przeprowadzeniu reakcji PCR należy usunąć matrycowe DNA z mieszaniny reakcyjnej. Wykonuje się to poprzez dodanie *DpnI* – enzymu restrykcyjnego trawiącego tylko zmetylowane cząsteczki DNA [165]. Matryca zostaje zdegradowana, a w roztworze pozostają nici kwasu nukleinowego posiadające pożądaną mutację. Na koniec niestrawione DNA zostaje wprowadzone do komórek bakteryjnych, gdzie można poddać je amplifikacji otrzymując nowe wektory ekspresyjne.

## **2. Nadprodukcja rekombinowanych białek w komórkach bakteryjnych**

### **2.1 Nadprodukcja białek w bakteriach *Escherichia coli***

System ekspresji genów w komórkach bakteryjnych *Escherichia coli* jest obecnie najczęściej wykorzystywanym i najlepiej poznany systemem do nadprodukcji białek. Wynika to z faktu, że bakterie te są łatwe i tanie w hodowli laboratoryjnej, a ich optymalna temperatura wzrostu wynosi 37 °C. Początkiem procesu nadprodukcji białka jest przygotowanie wektora ekspresyjnego, który zawiera zakodowaną, pożądaną sekwencję aminokwasową. Wektorami ekspresyjnymi nazywamy plazmidy bakteryjne, które po wprowadzeniu do komórki bakteryjnej nie zaburzają jej funkcji życiowych i są zdolne do autonomicznej replikacji. Jednym z częściej wykorzystywanych w inżynierii genetycznej wektorów ekspresyjnych jest pBR322 skonstruowany w roku 1977 [166]. Doczekał się on do tej pory wielu modyfikacji (np. pBR327 [167] czy pBR328 [168]) i stał się podstawą szeregu innych wektorów ekspresyjnych np. wektorów serii pET czy

wektora pHD313 przedstawionego na **Rycinie 24**, który wykorzystałam w mojej pracy doktorskiej.



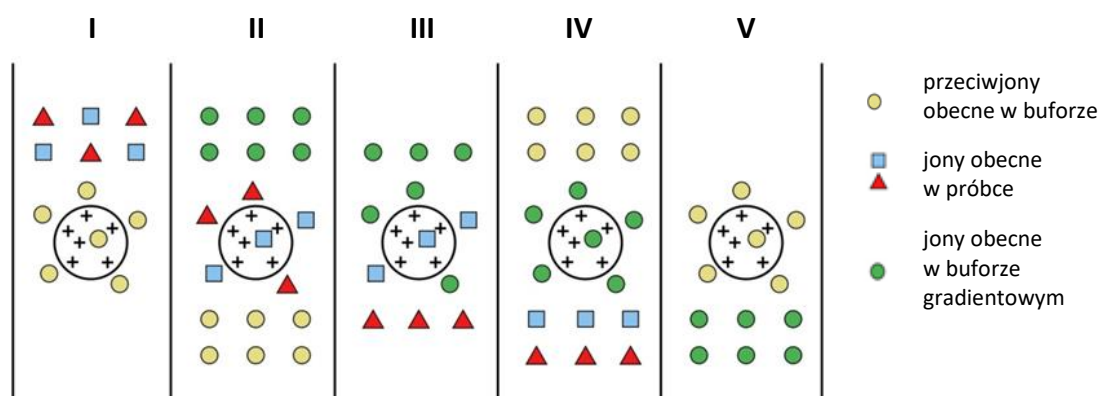
**Rycina 24** Mapa wektora ekspresyjnego pHD313 [169].

pHD313 skonstruowany został w roku 1988 z wektora pHD234 oraz wektora pUC18 z wklonowanym genem cystatyny C [169]. W swojej sekwencji posiada marker selekcyjny, gen *bla*, warunkujący oporność na ampicylinę (Amp). pHD313 zawiera również sekwencję Shine-Dalgarno (SD) jako miejsce wiązania rybosomu oraz zakodowany peptyd sygnałowy OmpA przyłączony do genu hCC. OmpA (ang. *Outer Membrane Protein A*) to bakteryjne białko błonowe, którego fragment wykorzystano jako peptyd sygnałowy kierujący cystatynę C do przestrzeni peryplazmatycznej, co znacznie zwiększyło wydajność nadprodukcji [170]. Za rozpoczęcie syntezy białka w komórkach bakteryjnych odpowiedzialne są promotory czyli sekwencje DNA rozpoznawane przez polimerazę RNA, które najczęściej wymagają użycia czynnika indukującego ekspresję. Wyróżniamy dwie metody indukcji ekspresji: fizyczne (np. poprzez zmianę temperatury hodowli) i chemiczne (np. przez dodatek IPTG). W wektorze pHD313 znajduje się promotor bakteriofagowy  $\lambda P_R$  oraz temperaturozależny represor  $\lambda cI857$  [169]. Podniesienie temperatury hodowli z 30-32 °C do 42 °C inaktywuje represor, co prowadzi do wzmożonej produkcji białka. Taki rodzaj indukcji stosuje się dla białek wydzielanych przez bakterie do podłoża lub, jak w przypadku hCC, do przestrzeni peryplazmatycznej, ponieważ w obu tych przypadkach ciągła synteza

białka nie wpływa na funkcje życiowe komórek (pod warunkiem, że białko nie zaczyna agregować).

## 2.2 Oczyszczanie białek – chromatografia cieczowa

Najpopularniejszą metodą oczyszczania białek w warunkach laboratoryjnych jest preparatywna chromatografia cieczowa. W swojej pracy doktorskiej wykorzystałam dwa rodzaje chromatografii: chromatografię jonowymienną (IEX, ang. *Ion Exchange Chromatography*) oraz chromatografię sączenia molekularnego (SEC, ang. *Size-Exclusion Chromatography*). W pierwszej z wymienionych metod rozdział na kolumnie zachodzi na podstawie powinowactwa chemicznego rozdzielanych substancji do obdarzonego ładunkiem złoża – wymiennicza jonowego (jonitu). Metoda ta wykorzystywana jest zatem do rozdziału jonów o różnych ładunkach. W IEX złoże stanowią obojętne polimery np. celuloza czy polistyren, które modyfikowane są grupami funkcyjnymi nadającymi im odpowiedni ładunek. Złoże naładowane ujemnie jest wymienniczem kationów (kationitem), natomiast naładowane dodatnio anionów (anionitem). Ogólna zasada rozdziału na anionicie przedstawiona została na **Rycinie 25**.



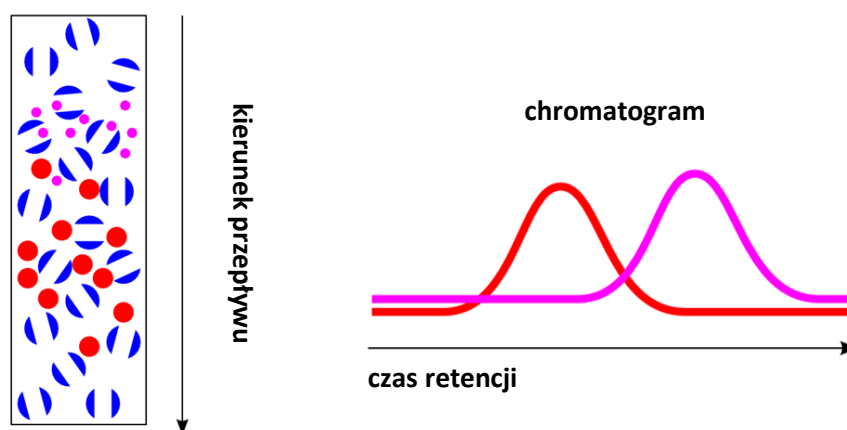
**Rycina 25** Schemat rozdziału ujemnie naładowanego białka na anionicie [171].

*I* – kolumna zrównowagowana za pomocą buforu A; *II* – adsorpcja jonów na złoże kolumny; *III* – początek gradientu – wymycie z kolumny jonów o małym powinowactwie do złoża za pomocą buforu B (buforu elucyjnego o dużej sile jonowej); *IV* – wymycie z kolumny wszystkich jonów za pomocą buforu B; *V* – równowagowanie kolumny buforem A

Wielkość i charakter ładunku oczyszczanego białka ściśle zależy od jego  $pI$  (punktu izoelektrycznego), a zatem także od pH buforu, w którym prowadzony jest

rozdział chromatograficzny. W pH równym pI ładunek cząsteczki białka jest równy zeru dlatego rozdzielanie nie nastąpi. W pH wyższym niż pI białko posiada ładunek ujemny i wiązane jest przez aniony. W pH niższym od pI białko obdarzone jest ładunkiem dodatnim i wiązane jest przez kationy. Wybór odpowiedniego złoża zależy zatem od preferowanych warunków rozdzielania czyli od stabilności białka w danym pH.

Drugim rodzajem wykorzystanej przez mnie chromatografii jest chromatografia sączenia molekularnego. Użyłam jej zarówno do rozdzielania preparatywnych jak i analiz analitycznych, między innymi do określania czystości próbki. Rozdział cząsteczek na kolumnie SEC odbywa się na podstawie różnicy w ich kształcie i wielkości. Złoże do tego rodzaju chromatografii zbudowane są z sieciowanych polimerów takich jak np. agarosa czy dekstran. W zależności od dokładnego składu złoża otrzymuje się różne wielkości porów, które umożliwiają rozdzielanie cząsteczek. Substancje o masie mniejszej (o mniejszym promieniu hydrodynamicznym) głębiej penetrują pory obecne w złożu, co opóźnia ich przejście przez kolumnę, zatem na chromatogramie najpierw pojawią się piki od cząsteczek większych lub (rzadziej) od tych o „bardziej skomplikowanym kształcie”. Schemat rozdzielania SEC przedstawiony został na **Rycinie 26**. Chromatografia sączenia molekularnego pozwala również na przybliżone określenie masy analizowanego białka. Niezbędne jest jednak wykonanie wcześniej krzywej kalibracyjnej na podstawie białek o zdefiniowanej masie cząsteczkowej.



**Rycina 26** Schemat rozdzielania substancji metodą chromatografii sączenia molekularnego [172].

## 2.3 Elektroforeza białek

Elektroforeza białek, podobnie jak elektroforeza DNA, polega na rozdziale cząsteczek w porowatym żelu w polu elektrycznym. Analizę prowadzić można w warunkach denaturujących, dzięki czemu białka rozdzielane są na podstawie ich masy, lub niedenaturujących, gdzie dużą rolę odgrywa także kształt i ładunek cząsteczki. W swojej pracy doktorskiej skorzystałam z obu rozwiązań używając elektroforezy SDS-PAGE oraz elektroforezy natywnej w żelu agarozowym. Umożliwiły mi one kontrolowanie czystości badanych próbek oraz analizę ich składu.

SDS-PAGE to skrót od elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu) jako czynnika maskującego ładunek (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Żel poliakrylamidowy otrzymuje się w wyniku polimeryzacji akrylamidu i bisakrylamidu katalizowanej APS (nadsiarczanem amonu) i TEMED (N,N,N',N'-tetrametylenodiaminą). Manipulacja zawartością procentową akrylamidu i bisakrylamidu pozwala na otrzymanie różnej wielkości porów, dostosowanej do wielkości rozdzielanych białek. Denaturacja białek (poprzez podgrzanie do 95°C i dodanie środka redukującego mostki disulfidowe) oraz obecność SDS w żelu pozwala na wyeliminowanie wpływu ładunku i struktury białka na szybkość poruszania w żelu, dzięki czemu rozdział odbywa się tylko na podstawie masy cząsteczkowej. Bufor rozwijający w metodzie SDS-PAGE składa się z Tris, glicyny oraz SDS.

Drugim rodzajem wykorzystanej przeze mnie elektroforezy była elektroforeza natywna w żelu agarozowym. Analizy przeprowadzałam zgodnie z procedurą opisaną przez Jeppsona i współpracowników [173]. W przypadku tej metody w skład żelu wchodzi bufor barbituranowy (bufor rozwijający) oraz agarozę. Białka nie są poddawane działaniu czynnika denaturującego, dlatego rozdział następuje głównie na podstawie ładunku, ale także masy i kształtu cząsteczki. Ten rodzaj elektroforezy umożliwił mi rozdział monomerycznej i dimerycznej formy cystatyny C.

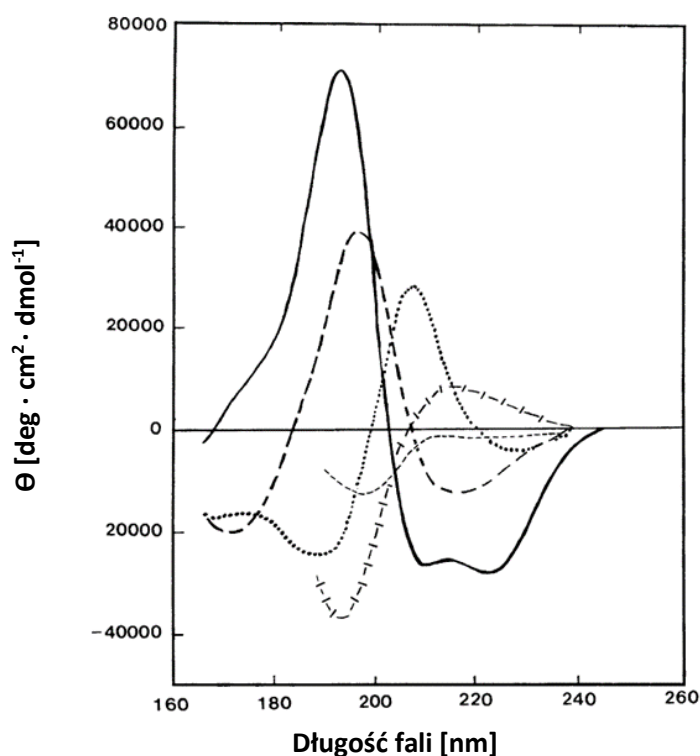
## 3. Analiza białek

### 3.1 Dichroizm kołowy

Dichroizm kołowy (CD, ang. *Circular Dichroism*) jest jedną z ważniejszych metod badania białek. Służy do analizy struktur przestrzennych cząsteczek w roztworze



i badania zmian konformacyjnych zachodzących pod wpływem czynników zewnętrznych np. temperatury. Wykorzystuje obecność aktywności optycznej cząsteczek, która prowadzi do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego przepuszczanego przez próbkę i pojawiania się polaryzacji eliptycznej. Zjawiskiem dichroizmu kołowego nazywamy różnicę w absorpcji światła lewo- i prawoskrętnego spolaryzowanego kołowo. Widma CD pokazują zależność między eliptycznością molową (miarą zjawiska różnicy absorpcji), a długością fali światła. Białka w zakresie 160-240 nm (w paśmie absorpcji wiązania peptydowego) dają silny sygnał, którego kształt jest ściśle zależny od struktury drugorzędowej (**Rycina 27**) [174]. Znaczne różnice w wyglądzie widm CD dla poszczególnych struktur ( $\alpha$ -helisy, helisy  $3_{10}$ ,  $\beta$ -kartki,  $\beta$ -skrętu i struktury nieuporządkowanej) dają możliwość oszacowania ich udziału procentowego w całkowitej strukturze cząsteczki.



**Rycina 27** Widma CD dla różnych struktur drugorzędowych [174].  
 $\alpha$ -helisa (—),  $\beta$ -kartka (---),  $\beta$ -skręt (·-·-·-·),  
 helisa  $3_{10}$  (-|-|-|-|-|-|-), struktura nieuporządkowana (-----)

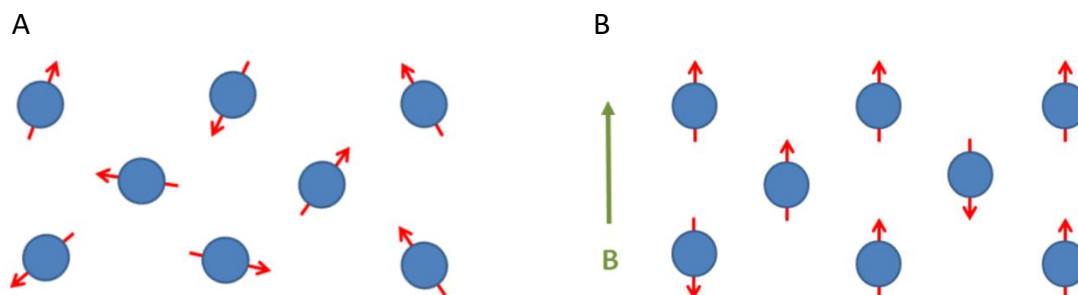
Analizę CD wykonuje się również w zakresie bliskiego nadfioletu czyli 260-320 nm. Przy tych długościach fali absorbują reszty aminokwasów aromatycznych, co pozwala uzyskać informację na temat struktur trzecio- i czwartorzędowych. Tego typu

analiza nazwana została „odciskiem palca”, ponieważ kształt widma CD jest unikatowy dla każdego białka. Charakterystyczne dla aminokwasów aromatycznych pasma absorpcji wyglądają następująco [174]:

- tryptofan – między 290 a 305 nm
- tyrozyna – między 275 a 282 nm
- fenyloalanina – między 255 a 270 nm

### 3.2 Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

NMR czyli spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) jest techniką badającą pola magnetyczne wokół jąder atomowych. Cząstki elementarne, w tym także protony, posiadają spin, dzięki któremu generowane jest wokół nich niewielkie pole magnetyczne. Cząstka zachowuje się jak dipol, którego orientacja w przestrzeni jest dowolna, gdy nie wpływa na niego żaden dodatkowy czynnik. W spektroskopii NMR próbkę umieszcza się w zewnętrznym polu magnetycznym, które wymusza ułożenie dipoli wzdłuż linii pola czyli porządkuje układ. Zjawisko to obrazowo przedstawione zostało na **Rycinie 28**.



**Rycina 28** Orientacja w przestrzeni spinów jądrowych [175].

A – kiedy nie oddziałuje na nie żaden czynnik zewnętrzny

B – w zewnętrznym polu magnetycznym B

Dostarczenie do układu energii w postaci promieniowania elektromagnetycznego z zakresu radiowego (60 – 900 MHz) powoduje wytrącenie spinu jądrowego z położenia początkowego i obrócenie go o pewien kąt, który zależy od ilości dostarczonej energii i natężenia pola magnetycznego. Spin, nawiązując do praw mechaniki kwantowej, które mówią, że energia jest skwantowana, może przyjąć tylko pewne określone wartości. Dla cząstek elementarnych spinowa liczba kwantowa ma

wartość  $\frac{1}{2}$ , a co za tym idzie, magnetyczna spinowa liczba kwantowa może przyjmować tylko wartości  $-\frac{1}{2}$  oraz  $+\frac{1}{2}$ . Przejścia energetyczne podczas absorpcji promieniowania elektromagnetycznego są zatem możliwe tylko między tymi dwoma wartościami. Jądra atomowe o parzystej liczbie zarówno protonów jak i neutronów posiadają liczbę spinową równą 0, co nie pozwala na żadne przejścia energetyczne [176]. Jądra posiadające parzystą liczbę nukleonów jednego rodzaju a nieparzystą drugiego są najistotniejsze z punktu widzenia techniki NMR. Kiedy spinowa liczba kwantowa przybiera wartość  $\frac{1}{2}$ , to jądro w polu magnetycznym zachowuje się analogicznie jak proton. Dzieje się tak dla takich izotopów jak  $^{13}\text{C}$  czy  $^{15}\text{N}$ , które stosowane są do znakowania badanych techniką NMR białek.

Na sygnał rezonansowy, który daje dane jądro atomowe, wpływa nie tylko rodzaj jądra (ilość nukleonów), ale także jego otoczenie chemiczne [176]. W cząsteczce powstają lokalne pola magnetyczne o różnych natężeniach, zależne od atomów i wiązań znajdujących się w sąsiedztwie. Otoczenie chemiczne bezpośrednio wpływa na częstość absorbowanego przez jądro atomowe promieniowania elektromagnetycznego, a zatem zastosowanie techniki NMR pozwala na ustalenie struktury analizowanego związku chemicznego lub badanie zmian zachodzących pod wpływem danego czynnika (np. podczas oddziaływania z jonem/ami metalu).

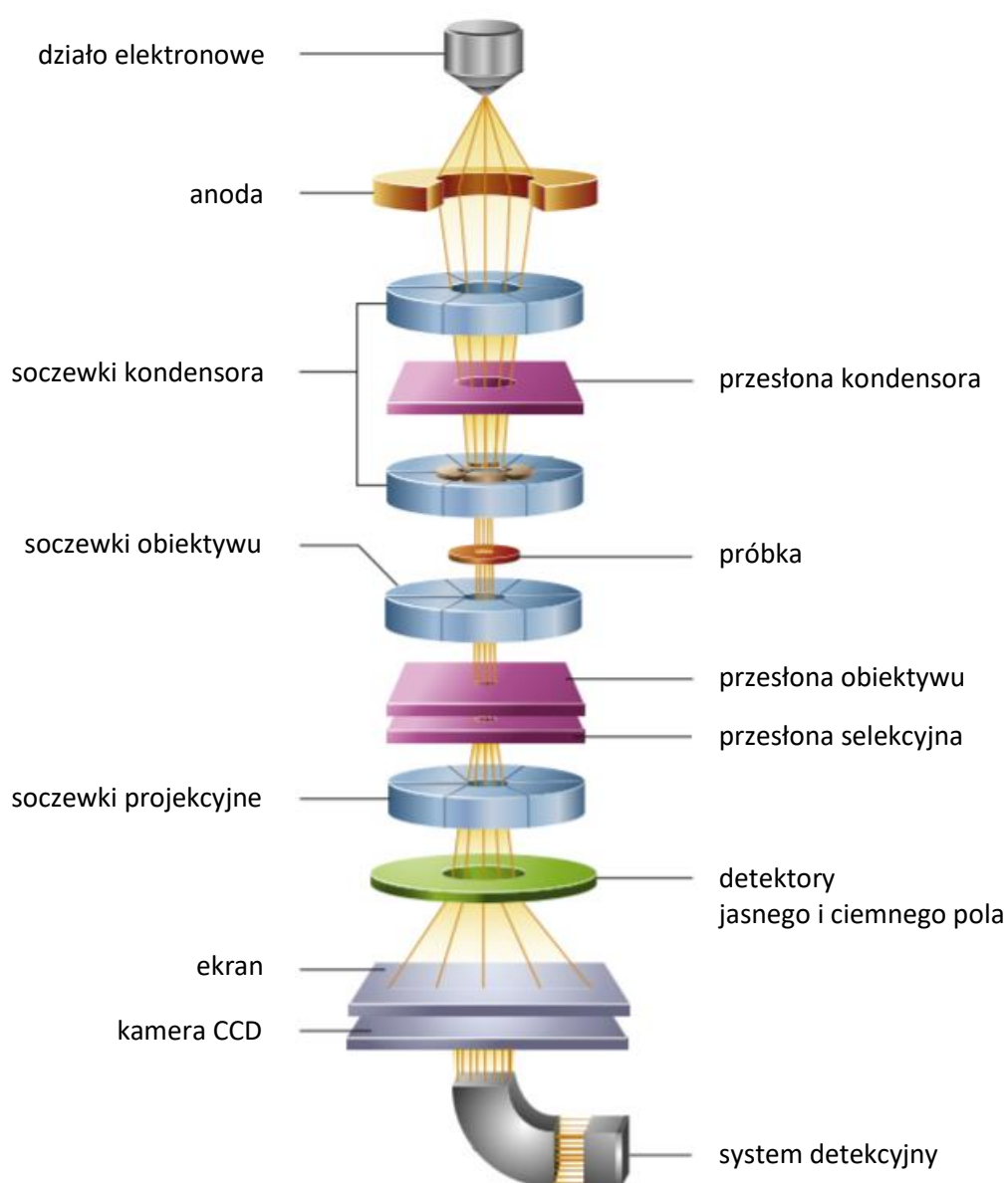
### 3.3 Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego

Spektroskopia EPR czyli spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. *Electron Paramagnetic Resonance*) w swojej zasadzie działania nie różni się znacząco od spektroskopii NMR. Główną różnicą między tymi dwoma technikami jest to, że EPR zakłada wzbudzanie spinów elektronów, a nie jąder atomowych [177]. Każdy elektron posiada spinową liczbę kwantową o wartości  $\frac{1}{2}$  oraz magnetyczne spinowe liczby kwantowe o wartościach  $-\frac{1}{2}$  lub  $+\frac{1}{2}$ . Z tego względu EPR służy do badania indywidualów, w których pola magnetyczne poszczególnych elektronów nie równoważą się wzajemnie (posiadających niesparowane elektrony) czyli paramagnetyków. Po umieszczeniu w polu magnetycznym niesparowany elektron może poruszać się między dwoma stanami energetycznymi poprzez absorpcję lub emisję kwantu energii, jednak to właśnie absorpcja jest monitorowana i przekształcana w końcowy wykres. Widmo EPR przedstawia intensywność sygnału w zależności od indukcji pola magnetycznego. Ten

rodzaj spektroskopii do wzbudzenia elektronów wykorzystuje promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu 1 – 1000 GHz i stosuje się go głównie do badania wolnych rodników oraz kompleksów z jonami metali [177].

### 3.4 Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, ang. *Transmission Electron Microscopy*) to technika mikroskopowa wykorzystująca wiązkę elektronów do obrazowania badanej próbki. Mikroskop TEM pozwala na uzyskanie obrazu cząstek o wielkościach nawet kilku nanometrów. Schematyczna budowa transmisyjnego mikroskopu elektronowego przedstawiona została na **Rycinie 29**.



**Rycina 29** Schemat budowy transmisyjnego mikroskopu elektronowego [178].

Podstawową częścią mikroskopu TEM jest układ wytwarzający wiązkę elektronów. Składa się on ze znajdującej się wewnątrz działa elektronowego katody emitującej elektrony oraz anody umiejscowionej poniżej. Między elektrody doprowadzane jest wysokiego napięcie przyspieszające elektrony. Wymaga to jednak utrzymania w mikroskopie próżni pozwalającej na uzyskanie większych prędkości i zapobiegającej rozpraszaniu elektronów. W mikroskopach TEM w zależności od typu urządzenia stosuje się napięcia przyspieszające od 100 do nawet 3000 kV (w przypadku mikroskopów wysokonapięciowych) [179]. Zastosowanie wyższego napięcia poprawia rozdzielczość mikroskopu i pozwala na uzyskanie lepszego obrazu próbki. W dalszej części urządzenia wiązka elektronów jest formowana i skupiana przez soczewki elektromagnetyczne oraz przesłony odcinające rozproszone elektrony. Tak uformowana wiązka pada na próbkę, a powstający obraz mikroskopowy za pomocą projektora wyświetlany jest na ekranie w dole kolumny.

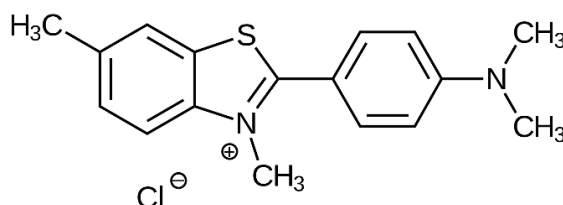
W mojej pracy doktorskiej transmisyjną mikroskopię elektronową wykorzystałam do obrazowania agregatów i fibryli białkowych. Zdjęcia TEM pozwalają określić jakiego rodzaju oligomery zawiera dana próbka. Co więcej, jakość zdjęć często umożliwia także obliczenie rozmiaru agregatów/fibryli i dokładną analizę ich morfologii.

### 3.5 Testy kolorymetryczne

Jedną z metod pozwalającą na badanie procesu fibrylizacji białek jest spektrofluorymetria wykorzystująca barwniki fluorescencyjne. W moich badaniach skorzystałam z takich barwników jak tioflawina T (ThT) oraz kwas 8-anilino-naftaleno-1-sulfonowy (ANS).

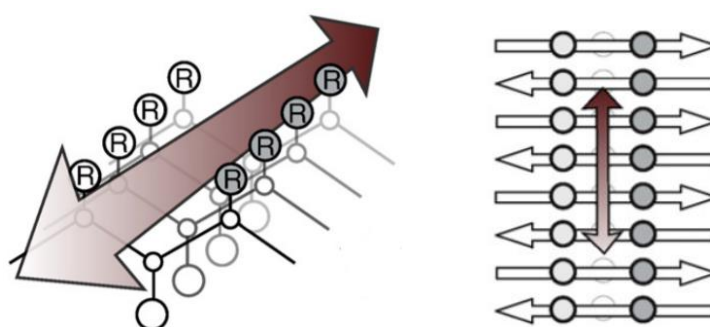
Tioflawina T jest substancją toksyczną, ale znalazła szerokie zastosowanie w badaniach nad chorobami amyloidogennymi. Służy do wykrywania wysoko uporządkowanych struktur  $\beta$ -karkowych obecnych w fibrylach białkowych. ThT zbudowana jest z pierścienia benzotiazolowego i benzyloaminy połączonych ze sobą wiązaniem węgiel-węgiel (**Rycina 30**). W roztworze cząsteczka ta zachowuje się jak „wirnik molekularny”, gdyż na osi wspólnego wiązania C-C następuje swobodna rotacja obu pierścieni. Konsekwencją tego zjawiska jest szybkie wygaszanie stanu wzbudzonego, co skutkuje niską emisją fluorescencji [180]. Udowodniono, że zablokowanie obrotu pierścieni daje możliwość utrzymania przez cząsteczkę

tioflawiny T stanu wzbudzonego. Zjawisko to wykorzystuje się do wykrywania fibryli białkowych w roztworze. Oddziaływanie ThT-fibryla powoduje zablokowanie rotacji wiązania C-C, co obserwujemy w postaci znacznego wzrostu intensywności fluorescencji badanej próbki [180].



**Rycina 30** Budowa tioflawiny T.

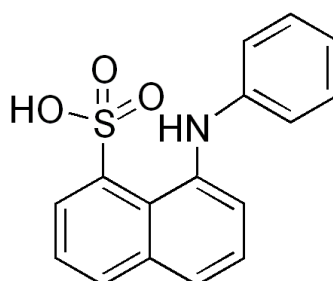
Szerokość kanałów znajdujących się wewnątrz struktury  $\beta$ -karkowej fibryli białkowych ocenia się na około 6,5–6,95 Å, nie uwzględniając łańcuchów bocznych aminokwasów [181]. Wymiary cząsteczki tioflawiny T szacuje się na około 6,1 Å długości i 4,3 Å grubości. Fakt ten sugeruje, że ThT najprawdopodobniej układa się dłuższą osią wzdłuż kanału (**Rycina 31**), a oddziaływanie z blisko położonymi łańcuchami bocznymi aminokwasów utrzymuje cząsteczkę w konformacji płaskiej, która w stanie wzbudzonym charakteryzuje się najwyższą spośród wszystkich konformacji wydajnością fluorescencji [181].



**Rycina 31** Ułożenie tioflawiny T (zobrazowanej jako strzałka) wewnątrz fibryli białkowej [180].

Drugim wykorzystanym przeze mnie barwnikiem fluorescencyjnym był ANS, którego budowa przedstawiona została na **Rycinie 32**. Emisja fluorescencji przez cząsteczki kwasu silnie zależy od polarności rozpuszczalnika, w którym się znajdują.

W środowisku wodnym fluorescencja jest prawie niezauważalna, jednak wraz ze wzrostem hydrofobowości rozpuszczalnika jej intensywność znacznie rośnie. ANS jest powszechnie stosowany do monitorowania zmian konformacyjnych zachodzących w cząsteczkach białek oraz obserwowania procesów oligomeryzacji. Barwnik oddziałuje z wewnętrznymi, hydrofobowymi fragmentami białek, co prowadzi do usztywnienia jego struktury i znacznego wzrostu emisji fluorescencji zależnego od konformacji białka. ANS może być również stosowany jako tak zwana sonda niefluorescencyjna dzięki możliwości oddziaływania z resztami aminokwasów naładowanych dodatnio. Takie interakcje zachodzą zazwyczaj na powierzchni białka i mogą zostać wykorzystane do poszukiwania miejsc wiążących dla innych ligandów [182].



*Rycina 32 Budowa kwasu 8-anilinonaftaleno-1-sulfonowego.*

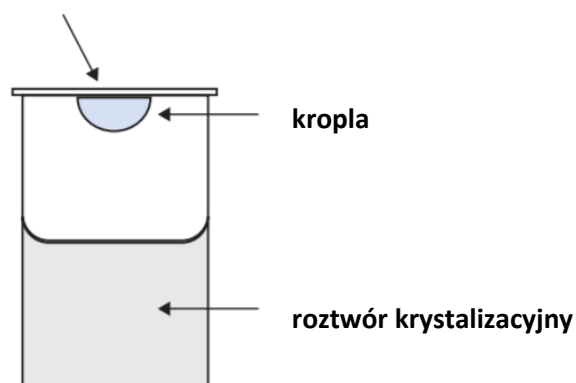
## 4. Rentgenografia strukturalna

### 4.1 Krystalizacja metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli

Spośród kilku dostępnych metod krystalizacji białek (np. krystalizacja z roztworu, krystalizacja pod warstwą parafiny czy dializa [183]) wybrałam metodę krystalizacji poprzez dyfuzję par w układzie wiszącej kropli. Ważnymi cechami tego typu krystalizacji jest jej prostota i możliwość wykorzystania stosunkowo niedużych ilości krystalizowanej substancji. Cały proces zachodzi w niewielkiej objętości (1-3  $\mu$ l), co pozwala na wypróbowanie dużej ilości różnych warunków krystalizacyjnych przy zużyciu małej ilości białka. Krystalizację najczęściej przeprowadza się na specjalnie do tego przeznaczonych szkiełkach i płytkach 24-dołkowych. Studzienki/rezerwuary na płytkach wypełnione zostają roztworami do krystalizacji o różnym składzie, a na szkiełku tworzy się niewielką kroplę poprzez zmieszanie roztworu białka z roztworem krystalizacyjnym (w proporcji dobranej do eksperymentu). Następnie szkiełko odwraca się kroplą do dołu i zakrywa

otwór rezerwuaru, którego brzegi pokryte zostały wcześniej smarem silikonowym zapewniającym szczelność układu. Kropla wisi na szkiełku i nie styka się z płynną zawartością rezerwuaru, co obrazowo przedstawione zostało na **Rycinie 33**.

szkiełko nakrywkowe



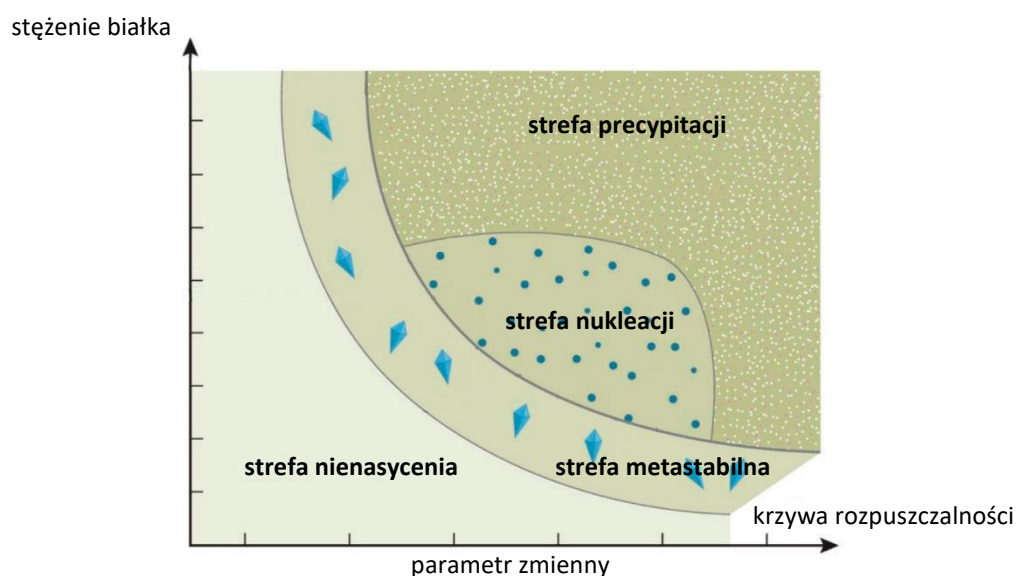
**Rycina 33** Schemat krystalizacji metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli [183].

Między kroplą a roztworem zachodzi wymiana lotnych składników, aż do momentu ustalenia stanu równowagi. Wiąże się to z odparowywaniem rozpuszczalnika z kropli, co jest równoznaczne z zatężaniem białka. Proces ten zachodzi powoli i często jest dodatkowo spowalniany poprzez przechowywanie płytek w obniżonej temperaturze. W odpowiednio dobranych warunkach, podczas zatężania, w kropli pojawiają się zarodki krystalizacyjne, z których, na skutek dalszego przyłączania cząsteczek białka, powstają dobrze uformowane monokryształy. Zależność procesu krystalizacji od warunków eksperymentu doskonale obrazuje diagram fazowy przedstawiony na **Rycinie 34**.

Roztwory stosowane do krystalizacji zawierają szereg składników ułatwiających powstawanie kryształów. Aby doprowadzić do krystalizacji należy osłabić oddziaływanie białka z cząsteczkami rozpuszczalnika. W tym celu wykorzystuje się związki zwane czynnikami strącającymi. Najczęściej używane są organiczne polimery takie jak poli(tlenki etylenu) - PEGi, których długość łańcuchów waha się między 200 a 15000 Da [184]. Innymi, często stosowanymi czynnikami strącającymi są sole [184], które w wysokim stężeniu prowadzą do wysalania białka poprzez obniżanie jego rozpuszczalności. Kolejnymi składowymi roztworów krystalizacyjnych są bufony odpowiedzialne za utrzymywanie właściwego pH oraz substancje dodatkowe takie jak



detergenty stabilizujące strukturę białek czy sole metali ciężkich [184]. Dwuwartościowe kationy metali oddziałują z cząsteczkami białek powodując powstawanie międzycząsteczkowych oddziaływań, które inicjują agregację i tworzenie kryształów. Poza jonami metali innymi wykorzystywanymi środkami sieciującymi są np. poliaminy czy polipeptydy [184].



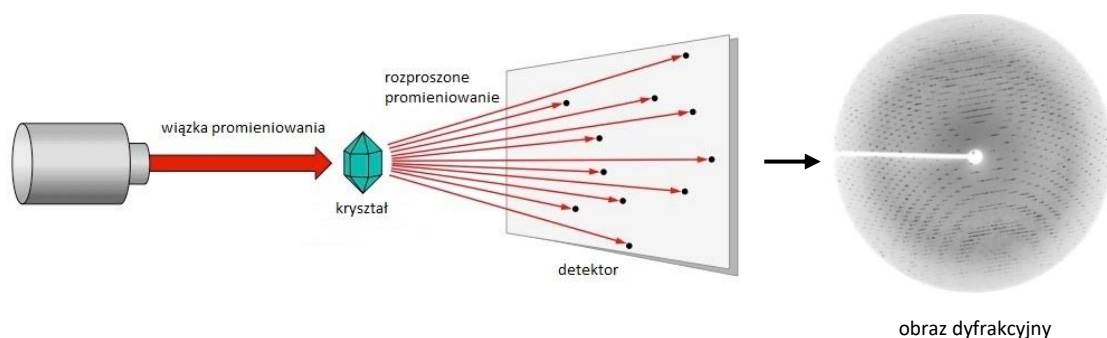
**Rycina 34** Diagram fazowy przedstawiający zależność procesu krystalizacji od stężenia białka i warunków eksperymentalnych [185]. Jako parametr zmienny możemy przyjąć na przykład temperaturę bądź stężenie czynnika strącającego.

#### 4.2 Pomiary dyfrakcji i analiza danych dyfrakcyjnych

Według podstawowej zasady w optyce, najmniejszy obiekt jaki możemy zobaczyć ma wymiary podobne do długości fali, za pomocą której go obserwujemy. Dlatego, do „obejrzenia” białka z rozdzielczością atomową wykorzystujemy promieniowanie rentgenowskie. Promieniowanie to ulega rozproszeniu na elektronach (dyfrakcji), co daje możliwość wyznaczenia uśrednionego rozkładu elektronów w cząsteczce czyli tzw. mapy gęstości elektronowej.

Pomiary dyfrakcji promieniowania na kryształach obecnie wykonuje się przy pomocy synchrotronowego źródła promieniowania rentgenowskiego. Tak silne źródło promieniowania umożliwia wykonanie wielu analiz w bardzo krótkim czasie, a zastosowanie dodatkowego chłodzenia w postaci strumienia ciekłego azotu chroni kryształ przed uszkodzeniami radiacyjnymi. Pomiary dyfrakcji polegają na rejestracji

szeregu obrazów dyfrakcyjnych podczas obracania kryształu, co przedstawione zostało na **Rycinie 35**.



**Rycina 35** Schemat pomiaru dyfrakcji promieniowania na kryształach [186] oraz przykładowy obraz dyfrakcyjny otrzymany dla kryształu białka [187].

Dane zebrane podczas pomiarów dyfrakcyjnych należy poddać obróbce komputerowej, aby uzyskać informacje dotyczące struktury cząsteczki. Pierwszym krokiem jest tzw. indeksowanie czyli proces analizy refleksów znajdujących się na poszczególnych obrazach dyfrakcyjnych. Polega on na znajdowaniu „przydatnych” refleksów i przypisywaniu im indeksów  $hkl$  oraz odrzucaniu refleksów o zbyt niskiej intensywności. Kolejnym krokiem jest integracja, wyznaczenie intensywności poszczególnych refleksów oraz skalowanie. Refleksy należące do takiej samej rodziny płaszczyzn, ale zarejestrowane na kilku obrazach dyfrakcyjnych zostają zsumowane w jedną intensywność. Otrzymuje się zbiór indeksów  $hkl$  dla poszczególnych refleksów, ich intensywność oraz wartość oszacowanego błędu pomiarowego. Posiadając takie dane można przejść do rozwiązywania problemu fazowego i generowania mapy gęstości elektronowej. Z pomiarów dyfrakcyjnych posiadamy dane dotyczące długości fali, którą sami zadajemy oraz jej amplitudy, którą wyznaczamy z intensywności refleksów. Nie możemy jednak zmierzyć doświadczalnie fazy fali, a informacja ta jest niezbędna do wyznaczenia położenia elektronów. Istnieją trzy główne metody rozwiązywania problemu fazowego [188]. Pierwszym z nich jest podstawienie izomorficzne, drugim dostrojona dyfrakcja anomalna, a trzecim tzw. metoda podstawienia cząsteczkowego. Rozwiązywanie nieznannej struktury krystalicznej opiera się tutaj na znanym modelu białka, którego sekwencja jest co najmniej w 25% identyczna z sekwencją białka krystalizowanego.

Struktury białek po rozwiązaniu problemu fazowego poddaje się udokładnianiu aż do momentu uzyskania zadowalających wartości wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{free}$ . Parametr  $R$  jest miarą niezgodności między udokładnianym modelem, a danymi eksperymentalnymi i w prawidłowo rozwiązanej strukturze powinien mieć wartość poniżej 20 % [189]. Wskaźnik  $R_{free}$  natomiast monitoruje postęp udokładniania struktury i finalnie jego wartość nie powinna odbiegać od wartości  $R$  o więcej niż 5 %.  $R_{free}$  zakłada wykorzystanie 95 % danych eksperymentalnych w procesie udokładniania, a następnie sprawdzanie jak dobrze zadany model przewiduje pozostałe 5 % danych. Monitorowanie obu tych wskaźników jednocześnie ogranicza generowanie błędów wynikających z nieprawidłowego wpasowania struktury w mapy gęstości elektronowej.

## IV. Procedury

### 1. Otrzymanie wektorów ekspresyjnych

#### 1.1 Elektroforeza w żelu agarozowym

Analizowane próbki DNA mieszałam z 6x stężonym buforem obciążającym (skład buforu obciążającego: 0,25 % błękit bromofenolowy, 0,25 % cyjanol ksyleny FF, 60 mM EDTA o pH 7,6 i 30 % glicerol w wodzie) w proporcji 1:4:1, odpowiednio - bufor obciążający : woda : próbka. Elektroforezę prowadziłam w 1 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny do stężenia końcowego równego 1 µg/ml. Do rozdzielenia wykorzystywałam 10x stężony bufor TBE firmy Sigma Aldrich, który przed użyciem rozcieńczałam wodą do 1x. Elektroforezę prowadziłam w temperaturze pokojowej przy napięciu 100 V do momentu osiągnięcia przez barwnik buforowy około 2/3 wysokości żelu. Jako odnośnika masowego używałam markera masowego 1 kb DNA Ladder firmy Fermentas. Wizualizacji prążków DNA dokonywałam za pomocą oświetlania żelu światłem ultrafioletowym wzbudzającym żółto-pomarańczową fluorescencję bromku etydyny interkalującego z podwójną nicią kwasu nukleinowego.

#### 1.2 Mutagenesa ukierunkowana

Zaplanowałam i przeprowadziłam trzy punktowe ukierunkowane mutagenesy. W pierwszej kolejności zaprojektowałam startery do reakcji PCR. W celu uzyskania odpowiednich parametrów takich jak temperatura mięknięcia czy zawartość par GC, do analizy oligonukleotydów wykorzystywałam programy internetowe Oligo Calc\* oraz OligoAnalyzer™ Tool\*\*. Sekwencje wybranych starterów przedstawiłam w **Tabeli 4**, a ich parametry w **Tabeli 5**. Skrót *for.* (ang. *forward*) oznacza oligonukleotyd komplementarny do nici matrycowej, natomiast *rev.* (ang. *reverse*) do nici kodującej.

\* Dostępny na stronie <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

\*\* Dostępny na stronie <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>

**Tabela 4** Sekwencje starterów do reakcji PCR z wprowadzonymi mutacjami.

Białko	Sekwencja oligonukleotydu
H86A	<i>for.</i> 5'- G GAC AAC TGC CCC TTC GCT GAC CAG CCA CAT CTG -3'
	<i>rev.</i> 5'- CAG ATG TGG CTG GTC AGC GAA GGG GCA GTT GTC C -3'
H90A	<i>for.</i> 5'- C CAT GAC CAG CCA GCT CTG AAA AGG AAA GCA TTC TG -3'
	<i>rev.</i> 5'- CAG AAT GCT TTC CTT TTC AGA GCT GGC TGG TCA TGG -3'
H86_90A	<i>for.</i> 5'- GGA CAA CTG CCC CTT CGC TGA CCA GCC AGC TCT GAA AAG GAA AGC -3'
	<i>rev.</i> 5'- GCT TTC CTT TTC AGA GCT GGC TGG TCA GCG AAG GGG CAG TTG TCC -3'

**Tabela 5** Parametry poszczególnych starterów do reakcji PCR.

Parametr	H86A	H90A	H86_90A
Masa molowa <i>for.</i>	10308,7 Da	11047,2 Da	13794,0 Da
Masa molowa <i>rev.</i>	10579,9 Da	11073,2 Da	13891,0 Da
Długość startera	34 nukleotydy	36 nukleotydów	45 nukleotydów
Zawartość % GD	61,8 %	50,0 %	57,8 %
Temperatura mięknięcia	80,3°C z Mg <sup>2+</sup>	76,6°C z Mg <sup>2+</sup>	84,5°C z Mg <sup>2+</sup>

Do wprowadzenia mutacji zastosowałam reakcję PCR. Wykorzystałam w niej termostabilną polimerazę *Pfu* firmy Thermo Scientific, która posłużyła do przygotowania wektorów ekspresyjnych wszystkich trzech mutantów cystatyny C. Matrycę stanowił zmetylowany plazmid pHD313 zawierający gen hCC typu dzikiego, który otrzymałam od dr hab. Anety Szymańskiej, prof. UG. Reakcję PCR prowadziłam w objętości 25 µl i użyłam do niej odczynników w ilości zgodnej z zaleceniami producenta polimerazy. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiłam w **Tabeli 6**, a warunki reakcji w **Tabeli 7**. Przebieg reakcji przeanalizowałam za pomocą elektroforezy w 1 % żelu agarozowym według procedury opisanej w punkcie IV.1.1.

**Tabela 6** Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Dodana ilość
bufor <i>Pfu</i>	10x	1x	2,5 µl
polimeraza <i>Pfu</i> *	-	-	1 µl
dNTP	8 mM	0,8 mM	2,5 µl
starter <i>for.</i>	10 µM	0,4 µM	1 µl
starter <i>rev.</i>	10 µM	0,4 µM	1 µl
DNA	10 ng/µl	0,4 ng/µl	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2mM	1 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	15 µl

\* ilość polimerazy dodana według zaleceń producenta

**Tabela 7** Warunki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
I	95 °C	1 min	1
	95 °C	30 s	
II	56-65 °C	30 s	30
	70 °C	5 min	
III	70 °C	5 min	1
IV	5 °C	-	-

Po zakończeniu reakcji PCR próbki poddałam trawieniu enzymem restrykcyjnym *FastDigest DpnI* firmy Thermo Scientific. Zastosowałam 1 µl enzymu na 15 µl mieszaniny reakcyjnej. Inkubację prowadziłam przez 15 minut w temperaturze 37 °C.

### 1.3 Transformacja do komórek bakteryjnych

Końcowe produkty reakcji PCR w objętości 2 µl dodawałam do 50 µl zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* szczepu DH5α i pozostawiałam na lodzie na co najmniej 20 min. Transformację prowadziłam z wykorzystaniem techniki szoku cieplnego. Mieszaninę ogrzewałam do 42 °C przez 90 sekund, a następnie pozostawiałam na lodzie na 2 min. Po upływie wyznaczonego czasu dodawałam 950 µl pożywki LB i inkubowałam w 32 °C przez co najmniej 1 godzinę. W ostatnim etapie pobierałam 100 µl zawiesiny i siałam na szalkę Petriego z podłożem LA/Amp (LA z dodatkiem 0,1 mg/ml ampicyliny),

którą inkubowałam przez noc w temperaturze 32 °C. Równoległe do właściwej transformacji wykonywałam także próbę kontrolną bez dodatku DNA.

Wykorzystywany przeze mnie w niniejszej pracy skrót LA odnosi się do stałego podłoża mikrobiologicznego, w którego skład wchodzi agar, ekstrakt drożdżowy, trypton oraz chlorek sodu w proporcji masowej 1,5:1:2:2, natomiast LB do płynnej pożywki mikrobiologicznej, w której skład wchodzi ekstrakt drożdżowy, trypton oraz chlorek sodu w proporcji masowej 1:2:2. Do prowadzenia hodowli bakteryjnych korzystałam z komercyjnie dostępnych mieszanin LB-Miller i LB-Miller z agarem firmy Sigma Aldrich oraz LB i LB-Agar firmy A&A Biotechnology. Pożywki przygotowywałam zgodnie z zaleceniami producentów.

#### **1.4 Amplifikacja i izolacja DNA**

Pojedyncze kolonie wyhodowane po transformacji na szalkach Petriego zawierających podłoże LA/Amp wykorzystywałam do zaszczepienia 4 ml pożywki płynnej LB/Amp (LB z dodatkiem 0,1 mg/ml ampicyliny). Mieszaniny inkubowałam przez noc wytrząsając w 32 °C. Izolację i oczyszczanie DNA prowadziłam za pomocą zestawu do izolacji plazmidowego DNA *Plasmid Mini* firmy A&A Biotechnology według procedury dostarczonej przez producenta. Otrzymane w ten sposób plazmidy poddawałam elektroforezie kontrolnej w 1 % żelu agarozowym według procedury opisanej w punkcie IV.1.1 oraz sekwencjonowaniu w celu potwierdzenia ich zgodności z oczekiwanym produktem.

## **2. Nadprodukcja rekombinowanych białek**

### **2.1 Przygotowanie komórek kompetentnych**

Komórki bakteryjne *E. coli* siałam na płytce zawierające stałą pożywkę LA i inkubowałam przez noc w 37 °C. Wybraną pojedynczą kolonią bakteryjną zaszczepiałam 10 ml sterylnej pożywki płynnej LB i inkubowałam przez noc w 37 °C stale wytrząsając. Świeżą pożywkę LB o objętości 50 ml zaszczepiałam 500 µl bakterii z hodowli nocnej i inkubowałam w 37 °C przez około 2-3 godziny również stale wytrząsając, do momentu osiągnięcia OD<sub>600</sub> w granicach 0,6 - 0,7. Hodowle chłodziłam przez 20 min na lodzie i wirowałam przez 5 min w 4 °C z szybkością 4000 rpm. Supernatant zlewałam, a pozostały osad zawieszałam w 25 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> i chłodziłam

na lodzie przez 30 min. Bakterie ponownie wirowałam w takich samych warunkach, a pozostały osad zawieszałam w 2 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> i pozostawiałam na lodzie. Po upływie 1 godziny dodawałam 750 µl 50 % glicerolu (stężenie końcowe: około 14 %). Powstałą zawiesinę dzieliłam na części po 100 µl i 200 µl, a następnie mroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -80 °C.

## 2.2 Transformacja do komórek kompetentnych

Do 50 µl zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* szczepu BL21(DE3) dodawałam 1 µl roztworu plazmidowego DNA zawierającego gen ludzkiej cystatyny C typu dzikiego lub odpowiedniego mutanta punktowego (otrzymanego według procedury przedstawionej w punkcie IV.1). Transformację prowadziłam z wykorzystaniem techniki szoku cieplnego opisanego w punkcie IV.1.3.

## 2.3 Nadprodukcja białek

Pojedynczymi koloniami bakterii z hodowli na podłożu stałym otrzymanych po transformacji zaszczepiałam płynne pożywki LB/Amp o objętości 50 ml każda. Hodowle inkubowałam przez noc w 32 °C z ciągłym wytrząsaniem. Przygotowane wcześniej pożywki LB/Amp o objętości 1 l każda zaszczepiałam 10 ml hodowli nocnych i umieszczałam w inkubatorze ogrzonym do temperatury 32 °C. Bakterie wytrząsałam do momentu osiągnięcia wartości OD<sub>600</sub> powyżej 0,7, a następnie indukowałam nadprodukcję pożądanego białka poprzez podniesienie temperatury hodowli do 41 °C. Hodowle inkubowałam z wytrząsaniem przez kolejne 3 godziny. Bakterie wirowałam przez 10 min w 4 °C z szybkością 4700 rpm. Supernatanty zlewałam, a osady bakteryjne mroziłam w ciekłym azocie i przechowywałam w temperaturze -80 °C. Wydajność nadprodukcji oceniałam na podstawie przeprowadzonej później elektroforezy SDS-PAGE. W celu przygotowania próbki do analizy 500 µl hodowli bakteryjnych przed i po indukcji ekspresji wirowałam przez 2 min z szybkością 14000 rpm, a powstałe osady zawieszałam w 1x stężonym buforze obciążającym w ilości równej (OD<sub>600</sub> · 100) µl. Elektroforezę prowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.3.1.



## 2.4 Nadprodukcja białka znakowanego izotopowo

Wybrane białko (wariant V57G) znakowałam pojedynczo stosując izotop azotu  $^{15}\text{N}$ . Pojedynczymi koloniami bakterii z hodowli na podłożu stałym otrzymanych po transformacji zaszczepiałam płynne pożywki LB/Amp o objętości 25 ml każda. Hodowle inkubowałam przez noc w 32 °C z ciągłym wytrząsaniem. Przygotowane wcześniej pożywki LB/Amp o objętości 0,5 l każda zaszczepiałam 5 ml hodowli nocnych i umieszczałam w inkubatorze ogrzonym do temperatury 32 °C. Bakterie wytrząsałam do momentu osiągnięcia wartości  $\text{OD}_{600}$  około 0,4, a następnie wirowałam przez 10 min w 4 °C z szybkością 4700 rpm i zawieszałam ponownie w pożywce płynnej zawierającej znakowany komponent. Dokładny jej skład przedstawiłam w **Tabeli 8**. Do pożywki dodawałam roztwór soli (**Tabela 9**) sterylizowany poprzez filtrację, w ilości 1 ml roztworu na 100 ml pożywki. Hodowle inkubowałam z wytrząsaniem do momentu osiągnięcia wartości  $\text{OD}_{600}$  powyżej 0,7, a następnie podwyższałam ich temperaturę do 41 °C. Dalsza procedura postępowania nie różniła się od tej stosowanej w przypadku nadprodukcji białek nieznakowanych opisaną w poprzednim podrozdziale.

**Tabela 8** Skład pożywki do znakowania izotopowego.

Składnik	Stężenie końcowe
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	22 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	90 mM
$\text{NaCl}$	8,5 mM
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	19 mM

**Tabela 9** Skład mieszaniny soli.

Składnik	Stężenie końcowe
$\text{MgSO}_4$	416 mM
$\text{CaCl}_2$	14 mM
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	3,5 mM
glukoza	1100 mM

### 3. Oczyszczanie białek

#### 3.1 Elektroforeza SDS-PAGE

Elektroforezę wykonywałam z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych żeli gradientowych *Mini-Protean TGX Gels* firmy Bio-Rad lub przygotowanych samodzielnie, zgodnie z procedurą opisaną przez Sambrook i współpracowników [190], żeli o stałym 15 % stężeniu akrylamidów, stosując ilości składników przedstawione w **Tabeli 10**. Analizowane próbki białek mieszałam w proporcji 3:1 z 4x stężonym buforem obciążającym (0,25 M Tris o pH 6,8, 8 % SDS, 40 % glicerol, 0,01 % błękit bromofenolowy oraz 20 % 2-merkaptoetanol). Mieszanki ogrzewałam przez 5 min w temperaturze 95 °C. Proces elektroforezy prowadziłam w 1x stężonym buforze Tris-glicyna-SDS firmy Sigma Aldrich (komercyjnie dostępnym w formie 10x stężonej) w temperaturze pokojowej przy napięciu początkowym 100 V podniesionym do 200 V po osiągnięciu przez próbki poziomu żelu rozdzielającego. Rozdział prowadziłam do momentu osiągnięcia przez barwnik buforowy około 4/5 wysokości żelu. Jako odnośnika masowego używałam markera masowego PageRuler Plus Prestained Protein Ladder firmy Thermo Scientific. Wizualizacji dokonywałam za pomocą wybarwienia prążków w roztworze barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,2 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 % metanol, 10 % kwas octowy) oraz odbarwianiu tła w roztworze odbarwiającym (20 % etanol, 10 % kwas octowy). Zdjęcia żeli wykonywałam za pomocą urządzenia Fusion Fx firmy Vilber Lourmat.

**Tabela 10** Proporcje składników na 15 % żel do elektroforezy SDS-PAGE.

ŻEL ZAGĘSZCZAJĄCY (6 ml)		ŻEL ROZDZIELAJĄCY (20 ml)	
30 % akrylamid 0,8 % bisakrylamid	1 ml	30 % akrylamid 0,8 % bisakrylamid	10 ml
10 % SDS	60 µl	10 % SDS	200 µl
1,0 M Tris pH 6,8	750 µl	1,5 M Tris o pH 8,8	5 ml
TEMED	6 µl	TEMED	8 µl
10 % APS	60 µl	10 % APS	200 µl
H <sub>2</sub> O	4,1 ml	H <sub>2</sub> O	4,6 ml

### 3.2 Izolacja nadprodukowanych białek z komórek bakteryjnych

Osady bakteryjne rozmrażałam w wodzie z lodem i zawieszałam w buforze zawierającym 20 mM Tris o pH 7,5 oraz 10 % glicerol w proporcji 30 ml buforu na osad z 1 l hodowli. Zawiesiny poddawałam sonikacji w celu otwarcia komórek bakteryjnych. Proces prowadziłam w objętości 30 ml w czterech cyklach: 1 x 1 min sonikacji + 2 min przerwy oraz 3 x 2 min sonikacji + 2 min przerwy. Sonikowaną mieszaninę przez cały czas przechowywałam w lodzie. Otrzymane zawiesiny wirowałam przez 10 min w temperaturze 4 °C z prędkością 15000 rpm. Supernatanty oddzielałam od osadów, zamrażałam w ciekłym azocie i przechowywałam w -80 °C. Wydajność sonikacji kontrolowałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. 100 µl zawiesiny otrzymanej w wyniku sonikacji wirowałam przez 2 min z szybkością 14000 rpm. Do 60 µl supernatantu dodawałam 20 µl 4x stężonego buforu obciążającego, a osad bakteryjny osuszałam (przez odwrócenie próbówki) i zawieszałam w 300 µl 1x stężonego buforu obciążającego. Elektroforezę prowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.3.1.

### 3.3 Oczyszczanie białek

#### A. Chromatografia jonowymienna

W pierwszym etapie oczyszczania nadprodukowanych białek stosowałam chromatografię typu IEX. Proces prowadziłam na urządzeniu AKTA Pure wyposażonym w kolumnę HiTrap SP Fast Flow o objętości 5 ml wypełnioną kationitem – SP Sepharose Fast Flow. Kolumnę równowagowałam za pomocą 20 mM Tris o pH 7,5 (bufor A). Roztwór białka nanosiłam na kolumnę z szybkością 0,5 ml/min. Białko eluowałam za pomocą liniowo rosnącego gradientu stężenia buforu B o składzie 20 mM Tris i 1 M NaCl przy przepływie 2 ml/min. Wartość gradientu wynosiła 0-50 % buforu B w 30 min. Detekcję prowadziłam przy długości fali 280 nm. Czystość frakcji sprawdzałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.3.1. Wybrane frakcje przenosiłam do worka dializacyjnego o MWCO 6-8 kDa (Spectrapor). Roztwory dializowałam w celu ich odsolenia oraz wymiany buforu. Procesy prowadziłam w obniżonej temperaturze, w proporcji około 15 ml dializatu na 1 l buforu, według schematu: 1x do 20 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> przez noc oraz 3x do 10 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> po 3 godziny. Po zakończonej dializie roztwór białka liofilizowałam.

## **B. Chromatografia sączenia molekularnego**

Drugim etapem oczyszczania białek był rozdział monomeru i dimeru na kolumnie do sączenia molekularnego. Oczyszczanie prowadziłam na urządzeniu AKTA Prime, wyposażonym w kolumnę Superdex 75 10/300 GL, w systemie elucji izokratycznej. Białko rozpuszczałam w minimalnej objętości buforu elucyjnego złożonego z 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  i nanosiłam na kolumnę w objętości nie większej niż 1 ml jednorazowo. Oczyszczanie prowadziłam przy przepływie 0,5 ml/min, a detekcję przy długości fali 280 nm. Czystość frakcji sprawdzałam za pomocą elektroforezy natywnej w żelu agarozowym według procedury opisanej w punkcie IV.3.4. Frakcje rozdzielałam na te zawierające monomer i te zawierające dimer białka, a następnie liofilizowałam.

### **3.4 Elektroforeza natywna w żelu agarozowym**

Elektroforezę natywną w żelu agarozowym prowadziłam zgodnie z procedurą opisaną przez Jeppsona i współpracowników [173]. Jako buforu rozwijającego używałam buforu barbituranowego o składzie 88 mM barbituran sodu, 16 mM kwas barbiturowy oraz 2,5 mM EDTA, schłodzonego do temperatury około 4 °C. Nośnik elektroforetyczny przygotowywałam przez rozpuszczenie agarozy w buforze barbituranowym otrzymując stężenie agarozy równe 1 %. Żele o grubości 1 mm, przygotowywałam przez wylanie roztworu agarozy między szklane płyty z umieszczoną między nimi folią GelBond Film o grubości 0,2 mm firmy Lonza i pozostawienie do zestalenia. Na żele nanosiłam po 10 µl próbek frakcji pochodzących z oczyszczania i pozostawiałam do wchłonięcia. Rozdział prowadziłam przy napięciu 150 V przez 1 godzinę. Wizualizacji prążków dokonywałam w kilku krokach. Na początku nośnik elektroforetyczny umieszczałam w kwasie pikrynowym z dodatkiem kwasu octowego w proporcji 5:1 na 15 min, następnie go odsączałam i pozostawiałam do wyschnięcia w temperaturze 45 °C. Suchy żel umieszczałam w roztworze barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % metanol, 10 % kwas octowy) na kilka minut po czym przenosiłam go do roztworu odbarwiającego (20 % etanol, 10 % kwas octowy).

## **4. Charakterystyka białek**

### **4.1 Analiza chromatograficzna**

Do analizy wykorzystywałam próbki białek o stężeniu 1 mg/ml w roztworze PBS (Sigma Aldrich) z dodatkiem 0,5 mM Bza (chlorowodoru benzamidyny) stosowanego jako standard wewnętrzny. Analizy prowadziłam z wykorzystaniem chromatografu cieczowego firmy Shimadzu składającego się z pompy LC 20AD i detektora SPD 20A wyposażonego w analityczną kolumnę do sączenia molekularnego Superdex 75 Increase 3.2/300 firmy GE Healthcare. Pracowałam w systemie elucji izokratycznej, a jako fazę ruchomą stosowałam roztwór PBS. Analizy prowadziłam przez 35 min przy standardowym przepływie 0,1 ml/min i detekcji spektrofotometrycznej dla długości fali 280 nm.

### **4.2 Analiza LC-MS**

Niewielką ilość próbki białka, rozpuszczałam w 100 µl roztworu PBS i przekazywałam do analiz, które prowadzone były przez dr Justynę Sawicką lub dr Marię Dzierżyńską na urządzeniu LC-MS ESI-IT-TOF firmy Shimadzu w trybie jonizacji dodatniej. Chromatograf cieczowy wyposażony był w termostatowaną w temperaturze 40 °C kolumnę Kromasil C8, 5µm, 100Å o wymiarach 250 mm x 1 mm. Elucja związków prowadzona była przy stałym przepływie fazy ruchomej 0,8 ml/min, w gradiencie 5-100 % B w 25 min. Stosowano następujący układ rozpuszczalników: A – 0,2 % kwas mrówkowy, B – acetonitryl i 0,2 % kwas mrówkowy. Detekcja prowadzona była przy dwóch długościach fali, 223 i 254 nm. W spektrometrze mas ESI-TOF jako gaz rozpylający stosowano azot o przepływie 1,5 l/min. Temperatura igły rozpylającej wynosiła 200 °C, a napięcie do niej przyłożone 4,5 kV. Jonizacja próbki zachodziła pod ciśnieniem atmosferycznym. Napięcie detektora wynosiło 1,7 kV.

### **4.3 Badania konformacyjne metodą dichroizmu kołowego**

Widma CD zarejestrowane zostały przez dr Danutę Augustin-Nowacką na aparacie JASCO J-810. Analizy prowadzone były w roztworze PBS w temperaturze 22 °C w zakresie długości fali 250-350 nm dla stężenia białka 2 mg/ml oraz w zakresie 190-250 nm dla stężenia białka 0,1 mg/ml. Dodatkowo zarejestrowane zostały widma w gradiencie temperaturowym 20-95 °C dla dwóch długości fali, 218 i 222 nm, dla

stężenia białka 0,1 mg/ml. Pomiary wykonano w kuwetach o długości drogi optycznej 0,1 cm. Wyniki zaprezentuję w postaci funkcji zależności eliptyczności molowej  $\Theta$  [ $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ] od długości fali  $\lambda$  [nm] lub w postaci funkcji zależności pierwszej pochodnej  $\Theta$  od temperatury [ $^{\circ}\text{C}$ ].

#### 4.4 Dimeryzacja w obecności chlorowodoru guanidyny

Przygotowałam roztwory białka o stężeniu 1 mg/ml w PBS z dodatkiem 0,5 mM Bza oraz 0,5 M lub 1 M chlorowodoru guanidyny (Gdn), który stanowił łagodny środek denaturujący indukujący dimeryzację. Próbki inkubowałam przez 5 dni w stałej temperaturze 37  $^{\circ}\text{C}$ . Analizy wykonywałam z użyciem chromatografii sączenia molekularnego według procedury opisanej w punkcie IV.4.1. Na kolumnę nanosiłam po 10  $\mu\text{l}$  roztworów nierozcieńczonych, pochodzących bezpośrednio z inkubacji.

#### 4.5 Badania aktywności białek

Cystatyna C jako inhibitor proteaz cysteinowych wykazuje aktywność inhibicyjną wobec papainy, którą właśnie z tego względu wykorzystałam do badań aktywności biologicznej mutantów hCC. Jako inhibitora kontrolnego użyłam standardowego inhibitora kowalencyjnego papainy, E-64 (1-[(2S,3S)-*trans*-epoksusukcynylo-L-leucylo-amino]-4- guanidynobutanu) [191]. Substrat reakcji enzymatycznej stanowił roztwór BAPA (chlorowodoru p-nitroanilidu N-benzoilo-L-argininy) w DMSO. Reakcje prowadziłam na płytkach 96-dołkowych w buforze fosforanowym z dodatkiem DTT i EDTA. Stężenia początkowe poszczególnych składników reakcji enzymatycznej przedstawiłam w **Tabeli 11**.

Podstawową mieszaninę reakcyjną stanowiła papaina, bufor aktywujący oraz Brij 35 (niejonowy detergent) w stosunku objętościowym 1:5:11,5. Jako odnośnik zastosowałam mieszaninę 90  $\mu\text{l}$  buforu aktywującego i 10  $\mu\text{l}$  Brij 35, którą umieściłam w dołku nr 1. Do pozostałych dołków dodałam mieszaninę reakcyjną w objętości 87,5  $\mu\text{l}$  oraz po 10  $\mu\text{l}$  roztworów inhibitora w Brij 35 według rozcieńczeń przedstawionych w **Tabeli 12**. Tak przygotowane roztwory inkubowałam przez 30 min w temperaturze pokojowej, po czym do każdego z dołków (poza pierwszym) dodałam 2,5  $\mu\text{l}$  substratu BAPA i kontynuowałam inkubację przez kolejne 30 min. Po zakończeniu inkubacji mierzyłam absorbancję przy długości fali 405 nm.

**Tabela 11** Stężenia składników użyte do przeprowadzenia reakcji enzymatycznej.

	Składnik	Stężenie
Enzym	papaina	1 mg/ml
	E-64	10 $\mu$ M
Inhibitor	cystatyna C	0,5 mg/ml
	BAPA w DMSO	100 mM
Substrat	Brij 35	0,01 %
Surfaktant	sodowy bufor fosforanowy pH 6,5	0,4 M
	EDTA	4 mM
	DTT	4 mM

**Tabela 12** Schemat przygotowania serii rozcieńczeń inhibitora do reakcji enzymatycznej.

Nr dołka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inhibitor [ $\mu$ l]	-	0,0	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0	10,5	12,0	13,5	15,0
Brij 35 0,01 % [ $\mu$ l]	-	15,0	13,5	12,0	10,5	9,0	7,5	6,0	4,5	3,0	1,5	0,0

## 5. Badanie oddziaływania cystatyny C z jonami $\text{Cu}^{2+}$

### 5.1 Inkubacja białek z jonami miedzi

Próbkę białka o stężeniu 1 mg/ml inkubowałam z dodatkiem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w stosunku molowym 1 : 1 w temperaturze 37 °C przez 6 dni. Jako rozpuszczalnika używałam buforu octanowego o składzie 25 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  oraz 150 mM  $\text{NaCl}$ , o pH 6,95. Próbkę pobierałam w różnych odstępach czasowych (0 i 2 godziny, 1, 3 i 6 dni) i analizowałam za pomocą chromatografii sączenia molekularnego według procedury opisanej w punkcie IV.4.1. Jako fazy ruchomej używałam wyżej wymienionego buforu octanowego. Na kolumnę nanosiłam 10  $\mu$ l roztworu przygotowanego przez zmieszanie 5  $\mu$ l próbki z 10  $\mu$ l buforu octanowego z dodatkiem 0,5 M Bza.

## 5.2 Badanie zmian konformacyjnych metodą dichroizmu kołowego

Analizy CD przeprowadzone zostały w dwóch buforach. Wszystkie widma zarejestrowane zostały przez dr Danutę Augustin-Nowacką na aparacie JASCO J-810 w temperaturze 22 °C w kuwetach o szerokości 0,1 cm.

### A. Bufor MES

Przygotowywałam dwie próbki każdego z białek w buforze zawierającym 10 mM MES i 50 mM NaCl, pH 6,5 o stężeniach 1 oraz 0,1 mg/ml. Do obu próbek w równych odstępach czasowych dodawano jony  $\text{Cu}^{2+}$  i każdorazowo inkubowano je w temperaturze pokojowej przez 15 min. Pierwszy pomiar wykonano dla próbek niezawierających miedzi, a kolejne dla próbek z 0,5, 1 oraz 5 ekwiwalentami  $\text{Cu}^{2+}$  w stosunku do ilości białka. Po każdym dodaniu jonów rejestrowano widma CD. Próbki o wyższym stężeniu białka wykorzystane zostały do analizy w zakresie 250-350 nm, a o niższym do analizy w zakresie 190-250 nm.

### B. Bufor kakodylanowy

Przygotowałam próbki każdego z białek bez i z dodatkiem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w stosunku molowym 1 : 1. Analizy wykonane zostały w buforze zawierającym 10 mM kakodylan sodu oraz 50 mM NaCl o pH 6,9 w zakresie długości fali 250-350 nm dla stężenia białka 1 mg/ml oraz w zakresie 190-250 nm dla stężenia białka 0,1 mg/ml. Dodatkowo zarejestrowane zostały widma w gradiencie temperaturowym 20-95 °C dla dwóch długości fali (218 i 222 nm) dla stężenia białka 0,25 mg/ml.

## 5.3 Analiza oddziaływania białko-metal metodą spektroskopii EPR

Analizy EPR przeprowadzone zostały przez dr hab. Simona Drew w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Próbki przygotowano poprzez rozpuszczenie białka w 50 mM MES o pH 6,5 otrzymując stężenie 150  $\mu\text{M}$ . Roztwór zawierał także 150  $\mu\text{M}$  monoizotopowy  $^{65}\text{CuSO}_4$  oraz krioprotekcyjny 10 % v/v glicerol. Po przygotowaniu mieszaninę przeniesiono do probówek kwarcowych i zamrożono w ciekłym azocie. Widma zarejestrowano za pomocą spektrometru CMS8400 firmy Adani stosując parametry przedstawione w **Tabeli 13**. Korektę linii podstawowej widm przeprowadzono poprzez odjęcie widma 50 mM MES o pH 6,5.



**Tabela 13** Parametry pomiarów EPR.

Parametr	Wartość
Częstotliwość mikrofal	9,42 GHz
Tłumienie mikrofal	10 dB
Szybkość przemieszczania	10 Gs/s
Amplituda modulacji	10 Gs
Liczba punktów	4096
Wzmocnienie odbiornika	100
Stała czasowa	100 ms
Częstotliwość modulacji	100 kHz

#### 5.4 Analiza oddziaływania białko-metal metodą spektroskopii NMR

Analizy NMR przeprowadzone zostały przez dr Igora Zhukov w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Próbkę przygotowano poprzez rozpuszczenie 2,4 mg znakowanego  $^{15}\text{N}$  mutantu hCC V57G w 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 mM HEPES-d18 oraz 50 mM NaCl. Końcowe stężenie białka wynosiło około 0,4 mM. Jony miedzi wprowadzono przez dodanie małej ilości 110 mM wodnego roztworu  $\text{CuCl}_2$ . Stężenie końcowe  $\text{Cu}^{2+}$  wynosiło około 1 mM. Widma NMR zarejestrowano za pomocą spektrometru Inova 500 MHz pracującego przy 11,7 T (częstotliwość rezonansowa  $^1\text{H}$  500,606 MHz) w temperaturze 25 °C. Przesunięcia chemiczne  $^1\text{H}$  i  $^{15}\text{N}$  przypisano w odniesieniu do 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonianu sodu (DSS), stosując stosunek  $\delta = 0,101329118$  dla rezonansów  $^{15}\text{N}$  [192]. Zebrane dane NMR zostały przetworzone przy użyciu oprogramowania NMRPipe [193] i przeanalizowane za pomocą programu SPARKY [194].

## 6. Badanie wpływu jonów $\text{Cu}^{2+}$ na proces oligomeryzacji cystatyny C

### 6.1 Fibrylizacja białek

Podjęłam kilkanaście prób fibrylizacji cystatyny C oraz jej wariantów w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  stosując różne warunki inkubacji. Modyfikowałam takie parametry jak bufor, pH, stężenie białka oraz szybkość wytrząsania. Podczas każdego z eksperymentów

równocześnie inkubowałam próbki kontrolne niezawierające jonów metali. Dokładne warunki inkubacji przedstawiłam w **Tabeli 14**.

**Tabela 14** Warunki inkubacji cystatyny C i jej mutantów wykorzystane podczas prób fibrylizacji.

	Stężenie białka	Skład buforu	pH	Ilość jonów Cu <sup>2+</sup>	Temperatura	Wytrząsanie	Długość inkubacji
<b>1</b>	3 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	600 rpm	14 dni
<b>2</b>	3 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	300 rpm	21 dni
<b>3</b>	3 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	brak	14 dni
<b>4</b>	0,25 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	600 rpm	72 godziny
<b>5</b>	3 mg/ml	10 mM kakodylan sodu, 50 mM NaCl	6,9	1 : 1 (molowo)	48 °C	600 rpm	14 dni

Próbki inkubowanych roztworów pobierałam w różnych odstępach czasowych (w zależności od przebiegu eksperymentu) i analizowałam za pomocą:

- testów kolorymetrycznych opisanych w punkcie IV.6.2;
- chromatografii sączenia molekularnego opisanej w punkcie IV.4.1. – jako fazy ruchomej używałam buforu octanowego o pH 6,9; na kolumnę nanosiłam 10 µl roztworu przygotowanego przez zmieszanie 8 µl buforu octanowego z dodatkiem 0,5 M Bza z 4 µl próbki;
- transmisyjnej mikroskopii elektronowej opisanej w punkcie IV.6.3;
- spektroskopii mas opisanej w punkcie IV.4.2 – pobraną próbkę wirowałam i przekazywałam do analizy LC-MS ESI-TOF.

## 6.2 Testy kolorymetryczne

Do kontrolowania procesu oligomeryzacji wykorzystywałam dwa barwniki fluorescencyjne, tioflawinę T oraz ANS. Do wykonania testów kolorymetrycznych wykorzystywałam próbki pobrane podczas inkubacji białek opisanej w punkcie IV.6.1. Analizy spektrofluorometryczne przeprowadzałam na płytkach 96-dołkowych na urządzeniu Infinite M200 Pro firmy Tecan.

### A. Test tioflawinowy

Próbkę do analizy przygotowywałam poprzez zmieszanie 10  $\mu\text{l}$  próbki z inkubacji z 5  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  roztworu ThT oraz 85  $\mu\text{l}$  buforu, w którym prowadziłam inkubację badanego białka. Mieszaninę odstawiałam na 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie rejestrowałam widmo stosując następujące parametry pomiaru:

- pasmo wzbudzenia: 420 nm;
- zakres skanowania: 455-600 nm;
- ilość skanowań: 3 (wynik w postaci średniej arytmetycznej).

### B. Test ANS

Próbkę do analizy przygotowywałam poprzez zmieszanie 5  $\mu\text{l}$  próbki z inkubacji z 10  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  roztworu ANS oraz 85  $\mu\text{l}$  buforu, w którym prowadziłam inkubację badanego białka. Mieszaninę odstawiałam na 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie rejestrowałam widmo stosując następujące parametry pomiaru:

- pasmo wzbudzenia: 385 nm;
- zakres skanowania: 420-600 nm;
- ilość skanowań: 3 (wynik w postaci średniej arytmetycznej).

## 6.3 Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Obrazy z transmisyjnego mikroskopu elektronowego zarejestrowane zostały przez mgr Dorotę Łuszczek z Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego na urządzeniu FEI Tecnai Spirit Bio-Twin przy napięciu przyspieszającym elektrony o wartości 120 kV. Wszystkie próbki przygotowywane były do rejestracji zdjęć bezpośrednio w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej na Wydziale Biologii UG. Do analizy pobierano po 5  $\mu\text{l}$  roztworów, które наносzono na miedzianą siateczkę TEM o 300

oczkach z pokryciem formvar i cienką warstwą węglową, a następnie wybarwiano za pomocą 2  $\mu$ l 1,5 % roztworu octanu uracylu.

## 7. Rentgenografia strukturalna

### 7.1 Krystalizacja białek

Krystalizację białek prowadziłam metodą dyfuzji par w układzie wiszącej kropli w temperaturze 18 °C. Objętość stawianych kropli każdorazowo wynosiła 3  $\mu$ l. Na każdą kroplę składały się roztwór białka i roztwór krystalizacyjny w proporcji objętościowej 1:1. Eksperymenty przygotowywałam manualnie na przeznaczonych do tego płytkach 24-dołkowych XRL (Molecular Dimensions). W celu określenia wstępnych warunków krystalizacji wykorzystywałam komercyjnie dostępne zestawy roztworów krystalizacyjnych, wśród których znalazły się Morpheus, JCSG-plus i The BCS Screen firmy Molecular Dimensions oraz Index i PEG/Ion Screen firmy Hampton Research. Krystalizowane białka wraz z ich stężeniami i zastosowanymi zestawami krystalizacyjnymi przedstawiłam w **Tabeli 15**.

**Tabela 15** Krystalizowane warianty cystatyny C wraz z ich stężeniami oraz zastosowanymi zestawami roztworów krystalizacyjnych.

Zestaw	Białko	Stężenie [mg/ml]
Morpheus	WT	10
	H86A	10, 20 i 30
	H90A	10 i 20
	H86_90A	10 i 20
JCSG-plus	H86A	10
	H90A	10
	H86_90A	10
The BCS Screen	H86A	10
	H90A	10 i 20
	H86_90A	10
Index	WT	10, 15 i 20
	H86A	10
	H90A	10
	H86_90A	10 i 20
PEG/Ion Screen	WT	10
	H90A	10

Do optymalizacji warunków krystalizacji wykorzystałam ponad 230 samodzielnie przygotowanych mieszanin oraz komercyjnie dostępny zestaw roztworów wspomagających krystalizację *Additive Screen* firmy Hampton Research.

Krystalizację w obecności jonów miedzi (II) prowadziłam poprzez dodawanie do samodzielnie przygotowanych lub komercyjnie dostępnych roztworów, wodnego roztworu chlorku miedzi (II) o stężeniu końcowym 20, 50 lub 200  $\mu\text{M}$ . Oprócz tego (ze względu na problemy z krystalizacją białek w obecności jonów miedzi) kryształy białka hCC WT namaczałam w roztworze krystalizacyjnym z dodatkiem  $\text{Cu}^{2+}$  w stężeniu 200  $\mu\text{M}$  i inkubowałam przez 30 min, 1 oraz 2 godziny.

## 7.2 Pomiary dyfrakcyjne

Dane dyfrakcyjne dla czterech kryształów hCC WT, dwóch H90A oraz jednego H86A wykrystalizowanego bez obecności  $\text{Cu}^{2+}$  zarejestrowane zostały przez dr Martę Orlikowską na wiązce MX 14.1 synchrotronu BESSY II w Berlinie (Niemcy) wyposażonego w detektor PILATUS3 S 6M. Natomiast dane dyfrakcyjne dla kryształu hCC H86A powstałego w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  oraz kryształu H86\_90A zarejestrowane zostały przeze mnie na wiązce XRD2 synchrotronu ELLECTRA w Trieście (Włochy) wyposażonego w detektor PILATUS 6M. Pomiary przeprowadzone zostały z wykorzystaniem parametrów zebranych w **Tabeli 16** przedstawionej na kolejnej stronie.

**Tabela 16** Parametry pomiarów dyfrakcyjnych przeprowadzonych z wykorzystaniem synchrotronowego źródła promieniowania.

Parametr	WT				H86A		H90A		H86_90A
	WT	WT_Cu30min	WT_Cu1h	WT_Cu2h	H86A	H86A_Cu	H90A_1	H90A_2	H86_90A
Oznaczenie kryształu	WT	WT_Cu30min	WT_Cu1h	WT_Cu2h	H86A	H86A_Cu	H90A_1	H90A_2	H86_90A
Długość fali	0,9184 Å	0,9184 Å	0,9184 Å	0,9184 Å	0,9184 Å	1,000 Å	0,9184 Å	0,9184 Å	1,000 Å
Ilość zarejestrowanych obrazów	720	1100	1100	1100	1800	720	1800	720	720
Oscylacja	0,5 °	0,2 °	0,2 °	0,2 °	0,1 °	0,5 °	0,1 °	0,5 °	0,5 °
Ekspozycja	1 s	0,4 s	0,4 s	0,4 s	0,2 s	0,5 s	0,2	0,5 s	0,5 s
Odległość kryształu od detektora	471 mm	544 mm	544 mm	544 mm	470 mm	452 mm	470 mm	571 mm	520 mm

- WT** – kryształ niemoczony w roztworze jonów Cu<sup>2+</sup> po wykrystalizowaniu
- WT\_Cu30min** – kryształ moczony przez 30 min w roztworze jonów Cu<sup>2+</sup> po wykrystalizowaniu
- WT\_Cu1h** – kryształ moczony przez 1 godzinę w roztworze jonów Cu<sup>2+</sup> po wykrystalizowaniu
- WT\_4Cu2h** – kryształ moczony przez 2 godziny w roztworze jonów Cu<sup>2+</sup> po wykrystalizowaniu
- H86A** – kryształ otrzymany w warunkach pozbawionych jonów Cu<sup>2+</sup>
- H86A\_Cu** – kryształ otrzymany w warunkach zawierających jony Cu<sup>2+</sup>
- H90A\_1** – I kryształ otrzymany w warunkach pozbawionych jonów Cu<sup>2+</sup>
- H90A\_2** – II kryształ otrzymany w warunkach pozbawionych jonów Cu<sup>2+</sup>
- H86\_90A** – kryształ otrzymany w warunkach pozbawionych jonów Cu<sup>2+</sup>

### 7.3 Rozwiązywanie i udokładnianie struktur

Procesowanie danych dyfrakcyjnych - indeksowanie, integrowanie, skalowanie – dla wszystkich kryształów przeprowadziła dr Marta Orlikowska z wykorzystaniem programu XDSAPP [195]. Zawartość części asymetrycznej komórek elementarnych wyznaczałam samodzielnie za pomocą tzw. współczynnika Matthews, obliczanego na podstawie rozmiarów komórki, krystalograficznej grupy przestrzennej i sekwencji białka.

Z uwagi na fakt, że otrzymane przeze mnie kryształy mutantów posiadały taką samą symetrię i rozmiar komórki elementarnej jak struktury wyznaczone i zdeponowane w PDB, nie było konieczności rozwiązywania struktur. Mogłam zacząć od dopasowania wybranego modelu jako bryły sztywnej (ang. *rigid body refinement*) i przejść do udokładniania. Zastosowana przeze mnie procedura udokładniania wszystkich otrzymanych struktur krystalicznych polegała na ręcznej przebudowie modeli w programie *Coot* [196] oraz obliczeniach w programie *Refmac5* [197] z pakietu *CCP4*. Poprawność budowanego modelu oraz jego zgodność z mapą gęstości elektronowej kontrolowałam poprzez systematyczną analizę wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{free}$ . Poprawność geometryczną struktur tj. długości i kąty wiązań oraz oddziaływania łańcuchów bocznych sprawdzałam za pomocą programów *Coot* [196] oraz *MolProbity* [198]. Podstawą ustalenia poprawności geometrycznego ułożenia łańcuchów białek była analiza map Ramachandrana.

## V. Prezentacja i omówienie wyników

### 1. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych i nadprodukcja białek

Zaplanowałam i przeprowadziłam trzy punktowe ukierunkowane mutagenyzy wprowadzając następujące mutacje do genu cystatyny C:

- Wariant I - resztę His<sup>86</sup> zamieniłam na resztę alaniny (H86A),
- Wariant II - resztę His<sup>90</sup> zamieniłam na resztę alaniny (H90A),
- Wariant III - reszty His<sup>86</sup> i His<sup>90</sup> zamieniłam na reszty alaniny (H86\_90A).

Wprowadzone mutacje pozwoliły mi częściowo lub całkowicie wyeliminować reszty histydyny, które potencjalnie mogą brać udział w wiązaniu jonów miedzi (II). W pierwszej kolejności zaprojektowałam startery (oligonukleotydy) do reakcji PCR, których synteza zlecona została firmie Merck. Podczas projektowania kierowałam się kilkoma ogólnymi zasadami, między innymi: aby zawartość par GC wynosiła około 50-60 %, długość starterów nie była mniejsza niż 20 zasad (co może prowadzić do niespecyficznego wiązania z matrycą), startery nie posiadały sekwencji komplementarnych powodujących ich dimeryzację oraz aby temperatura mięknięcia była odpowiednio wysoka (około 70 °C lub wyższa). Poniżej znajdują się sekwencje zaprojektowanych przeze mnie starterów wraz z odpowiadającymi im sekwencjami aminokwasowymi. Wytłuszczone zostały fragmenty sekwencji, które uległy zmianie.

#### hCC WT

TTGGACAAC**TGCCCCTTC****CAT**GACCAGCC**CAT**CTGAAAAGGAAAGCATTCTGC  
 L D N C P F **H<sup>86</sup>** D Q P **H<sup>90</sup>** L K R K A F C

#### hCC H86A

GGACAAC**TGCCCCTTC****GCT**GACCAGCCACATCTG  
 D N C P F **A** D Q P H<sup>90</sup> L

#### hCC H90A

CCATGACCAGCC**AGCT**CTGAAAAGGAAAGCATTCTGC  
 H<sup>86</sup> D Q P **A** L K R K A F C

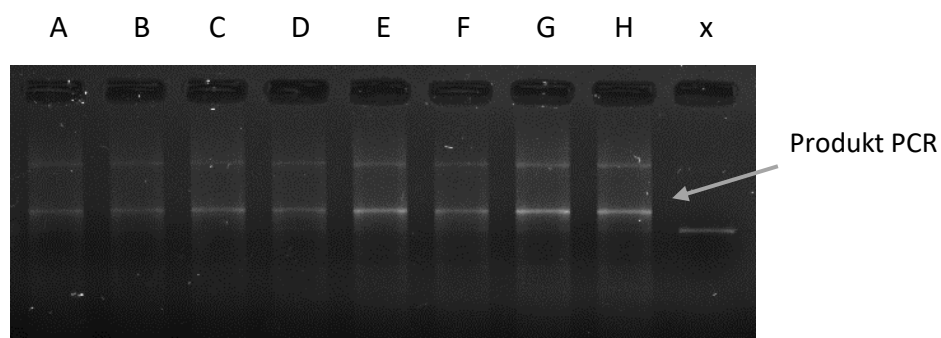
#### hCC H86\_90A

GGACAAC**TGCCCCTTC****GCT**GACCAGCC**AGCT**CTGAAAAGGAAAGC  
 D N C P F **A** D Q P **A** L K R K

Do wprowadzenia mutacji zastosowałam reakcję PCR, której warunki przedstawiłam w punkcie IV.1.2. Jako matrycę zastosowałam plazmidowe DNA



zawierające gen ludzkiej cystatyny C typu dzikiego – plazmid pHD313. W celu znalezienia optymalnej temperatury hybrydyzacji starterów z matrycą, reakcje przeprowadziłam w gradiencie temperaturowym 56-65 °C na 8 próbkach. Po zakończeniu reakcji mieszaniny reakcyjne analizowałam w 1 % żelu agarozowym. Przykładowy elektroforegram przedstawiłam na **Rycinie 36**.



A-H – kolejne próbki w gradiencie od 65 °C A do 56 °C H  
x – próbka kontrolna bez dodatku polimerazy

**Rycina 36** Elektroforegram produktów reakcji PCR prowadzonej w gradiencie temperaturowym od 65 °C (próbka A) do 56 °C (próbka H).

Na przedstawionym powyżej elektroforegramie produkt reakcji PCR widoczny jest w każdej z analizowanych próbek poza próbką kontrolną. Prążek próbki kontrolnej pochodził od matrycowego plazmidowego DNA użytego do mutagenезy. Przesunięcie elektroforetyczne produktów reakcji wynika z linearyzacji wektora pHD313 i na jego podstawie można wnioskować o poprawnym zajściu reakcji. Najlepsze efekty w postaci największego stężenia produktu uzyskałam dla próbek G (dla temperatury hybrydyzacji 57,1 °C) i H (dla temperatury hybrydyzacji 56 °C) w przypadku wszystkich trzech przeprowadzonych mutagenез. Z tego względu to właśnie te próbki poddawałam dalszej obróbce. W celu usunięcia matrycy przeprowadziłam trawienie enzymem restrykcyjnym *DpnI* degradującym zmetylowane (matrycowe) cząstki DNA.

Ostatnim etapem przygotowywania wektorów ekspresyjnych była amplifikacja produktów reakcji PCR w komórkach bakteryjnych *E. coli* szczepu DH5 $\alpha$ . Amplifikację oraz izolację amplifikowanych plazmidów przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.1.3. Ostatecznie otrzymałam:

- 60  $\mu$ l wektora ekspresyjnego dla białka H86A o stężeniu 103,56 ng/ $\mu$ l;

- 60  $\mu$ l wektora ekspresyjnego dla białka H90A o stężeniu 91,81 ng/ $\mu$ l;
- 60  $\mu$ l wektora ekspresyjnego dla białka H86\_90A o stężeniu 51,90 ng/ $\mu$ l.

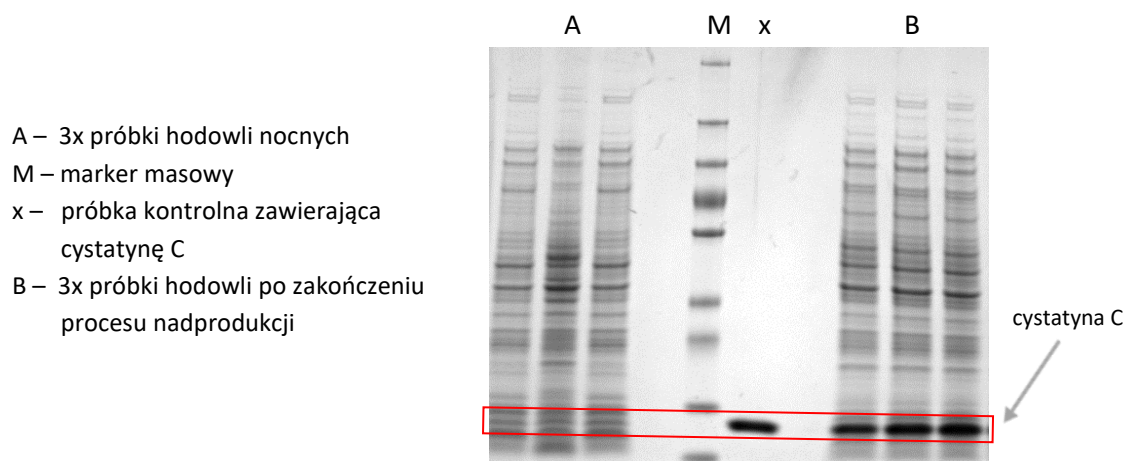
Pomiaru stężenia DNA dokonywałam na spektrofotometrze mikroobjętościowym Colibri LB 915. W celu potwierdzenia zgodności otrzymanych sekwencji z sekwencjami oczekiwanymi zleciłam sekwencjonowanie wszystkich trzech próbek DNA firmie Gemoned. Każdy z analizowanych plazmidów zawierał zakładaną mutację, co pozwoliło na wykorzystanie ich do dalszej pracy.

Wektory ekspresyjne, w celu nadprodukcji mutantów cystatyny C, transformowałam do chemikompetentnych komórek bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21(DE3), przygotowanych według procedury opisanej w punkcie IV.2.1. Szczep ten pozwala na wysoką nadprodukcję białek kierowanych do przestrzeni peryplazmatycznej. Hodowle bakteryjne prowadziłam w objętości 0,5 lub 1 litra. W przypadku nadprodukowanych przeze mnie mutantów nie zauważyłam istotnej różnicy w ilości otrzymanego białka w zależności od wielkości hodowli. Namnażanie bakterii w objętości 1 l trwało nieco dłużej ze względu na mniejsze napowietrzanie pożywki oraz większą ilość czasu potrzebną do osiągnięcia zadanej temperatury hodowli, jednak różnice te nie skutkowały koniecznością zmiany protokołu nadprodukcji.

W plazmidzie pHD313 znajduje się termowrażliwy represor cl857, dlatego ekspresję wprowadzonego genu indukowałam poprzez podniesienie temperatury hodowli z 32 °C do 41 °C. Skutkowało to inaktywacją wyżej wymienionego represora i rozpoczęciem produkcji pożądanego białka.

Wydajność prowadzonych procesów oceniałam na podstawie wyników elektroforezy SDS-PAGE próbek hodowli bakteryjnych. Na **Rycinie 37** przedstawiłam przykładowy elektroforegram otrzymany po przeprowadzeniu nadprodukcji cystatyny C typu dzikiego. W próbkach B widoczny jest intensywny prążek odpowiadający białku hCC WT, przy jednoczesnym braku cystatyny C w próbkach pobranych z hodowli nocnych (A), co sugeruje powodzenie procesu nadprodukcji. Ponieważ ilość białka wydawała się satysfakcjonująca, komórki bakteryjne poddałam dalszej obróbce.

Ze względu na bardzo duże podobieństwo elektroforegramów otrzymanych dla poszczególnych mutantów hCC w niniejszej rozprawie przedstawiać będę jedynie obrazy wybranych żeli.

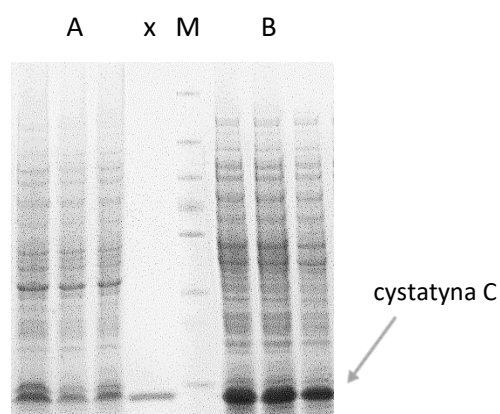


**Rycina 37** Elektroforegram próbek hodowli bakteryjnych pobranych podczas procesu nadprodukcji białek.

## 2. Izolacja i oczyszczanie białek

Do N-końca cystatyny C przyłączony został peptyd sygnałowy, którego zadaniem w trakcie nadprodukcji jest kierowanie białka do przestrzeni peryplazmatycznej komórek bakteryjnych. Zabieg ten przynosi dwie korzyści. Po pierwsze, umożliwia zamknięcie mostków disulfidowych obecnych w cząsteczce hCC. Cytosol komórkowy jako środowisko redukujące, wyklucza zajście tego procesu, co wiąże się z brakiem aktywności biologicznej cystatyny C. Drugą funkcją natomiast jest łatwość uwolnienia białka z komórki takimi sposobami jak zimny szok osmotyczny czy sonikacja. Jako pierwszy zastosowałam zimny szok osmotyczny [199]. Metoda ta polega na kilkukrotnym zamrażaniu i rozmrażaniu komórek bakteryjnych w buforze zawierającym 30 mM Tris o pH 8,0 i 10 % glicerol, co prowadzi do wstępnego uszkodzenia ścian komórkowych. Następnie inicjuje się obkurczenie błony komórkowej poprzez zawieszenie bakterii w roztworze 20 % sacharozy, 30 mM Tris o pH 7,5 oraz 1 mM EDTA, którego zadaniem jest wiązanie jonów metali obecnych w komórkach. Ostatnim etapem jest zawieszenie bakterii w zimnej wodzie, co prowadzi do tzw. szoku osmotycznego czyli pęcznienia komórek i ostatecznego pęknięcia ścian komórkowych. Metoda ta okazała się jednak mało wydajna. W każdej z otrzymanych w tym procesie frakcji (bufor Tris, sacharoza i woda) znajdowały się porównywalne ilości cystatyny C. Zimny szok osmotyczny finalnie prowadził do otrzymania produktu w ilości około 3-4 mg na 1 litr hodowli bakteryjnej.

Drugą testowaną i wykorzystaną przeze mnie, dla zdecydowanej większości nadprodukcji, metodą izolacji białek była sonikacja. Zastosowanie ultradźwięków powoduje powstanie efektu kawitacji czyli tworzenia pęcherzyków gazu w cieczy uszkadzających zewnętrzne struktury komórkowe. Ściana i błona komórkowa ulegają fragmentacji uwalniając całą zawartość komórki do roztworu. Proces sonikacji kontrolowałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE próbek pobranych zarówno z frakcji płynnej jak i z osadu. Przykładowy elektroforegram przedstawiłam na **Rycinie 38**.



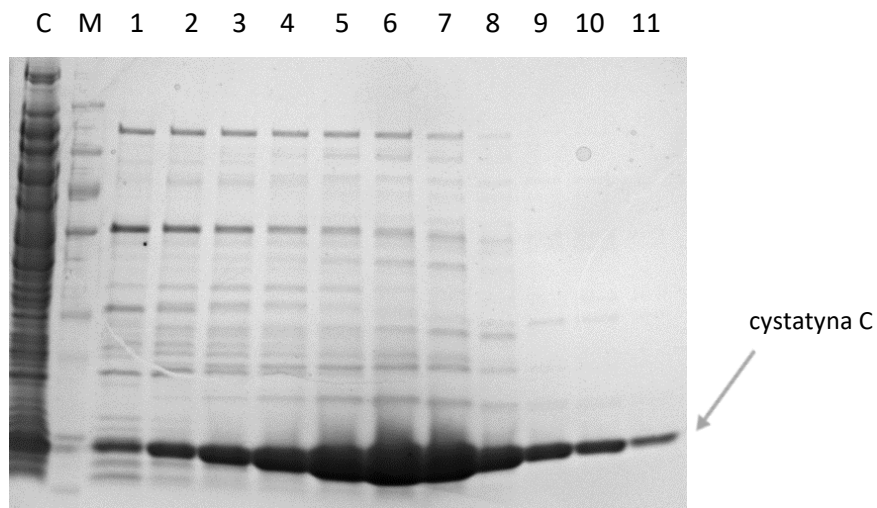
A – 3x osad bakteryjny po sonikacji  
 B – 3x supernatant po sonikacji  
 x – próbka kontrolna zawierająca cystatynę C  
 M – marker masowy

**Rycina 38** Elektroforegram próbek supernatantu i osadu powstałych w procesie sonikacji komórek bakteryjnych.

Cystatyna C dobrze rozpuszcza się w wodzie oraz szerokiej gamie buforów, dlatego podczas sonikacji większość białka przechodzi do frakcji płynnej z niewielką stratą pozostającą w osadzie. Metoda ta charakteryzowała się znacząco wyższą wydajnością od zimnego szoku osmotycznego. Prowadziła do otrzymania produktu w ilościach od 7 do 14 mg na 1 litr hodowli bakteryjnej, w zależności od nadprodukowanej muteiny.

Wyizolowane białka oczyszczałam za pomocą dwóch metod chromatograficznych. W pierwszej kolejności stosowałam chromatografię typu IEX (jonowymienną), która pozwalała na skuteczne oddzielenie cystatyny C od reszty zawartości supernatantu otrzymanego po sonikacji. Oczyszczania prowadziłam

w buforze Tris o pH 7,5 z użyciem kolumn wypełnionych kationitem. Czystość otrzymanych frakcji sprawdzałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, której przykładowy wynik (oczyszczanie białka H86A) przedstawiłam na **Rycinie 39**.

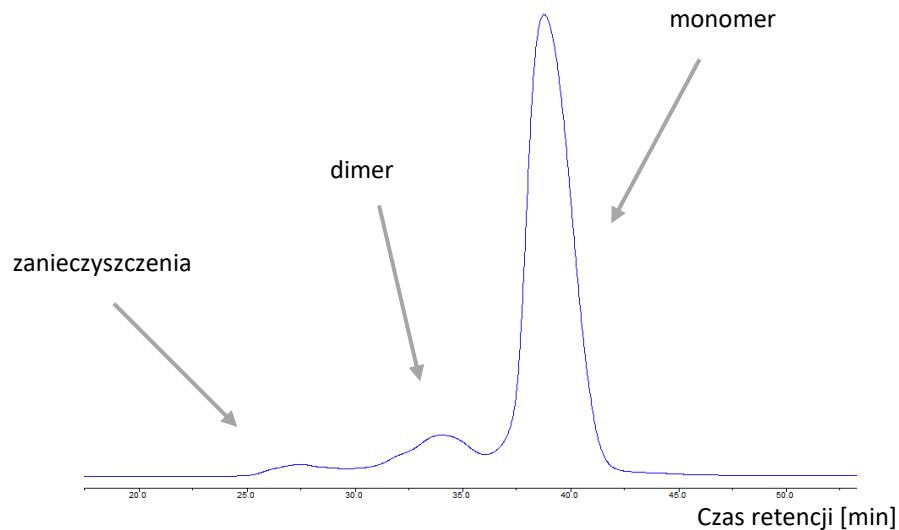


1-11 – kolejne frakcje z oczyszczania zawierające hCC H86A  
 C – roztwór przed oczyszczaniem  
 M – marker masowy

**Rycina 39** Elektroforegram frakcji otrzymanych w wyniku oczyszczania hCC H86A metodą chromatografii jonowymiennej.

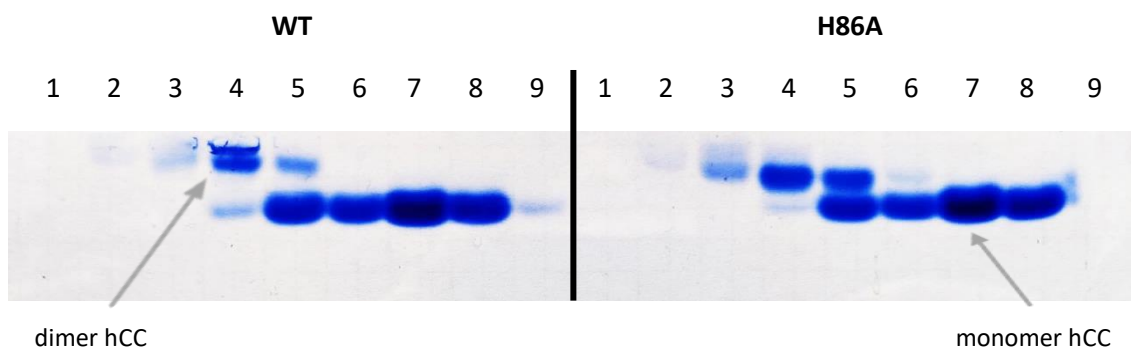
Frakcje zawierające pożądane białko (w przypadku powyższego oczyszczania była to każda z analizowanych elektroforetycznie frakcji) łączyłam i dializowałam według procedury opisanej w punkcie IV.3.3. Jak wynika z elektroforegramu, próbki nadal zawierały szereg zanieczyszczeń. Dializa umożliwiła mi przygotowanie białka do kolejnego oczyszczania poprzez jego odsolenie i wymianę buforu. Po zakończeniu procesu białka liofilizowałam i przechowywałam w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Drugie oczyszczanie prowadziłam z wykorzystaniem metody chromatografii sączenia molekularnego. Zliofilizowane białka rozpuszczałam w buforze elucyjnym zawierającym wodorowęglan amonu i nakładałam na kolumnę. Proces prowadziłam z wykorzystaniem elucji izokratycznej. Zastosowanie kolumny SEC pozwalało mi na rozdzielanie obecnych w liofilizacie form monomerycznej i dimerycznej hCC, co przedstawione zostało na **Rycinie 40**.



**Rycina 40** Chromatogram z oczyszczania białka hCC H86A metodą chromatografii SEC.

Analiza otrzymanych frakcji wymagała zastosowania metody nie wymuszającej denaturacji białek. Pierwotnie korzystałam z chromatografii sączenia molekularnego stosując analityczną kolumnę SEC, jednak sprawdzenie nawet niewielkiej ilości frakcji wymagało bardzo dużej ilości czasu, co mogło przyczynić się do oligomeryzacji i/lub strącania białek w roztworach otrzymanych po oczyszczaniu. Z tego względu postanowiłam zastosować elektroforezę natywną w żelu agarozowym, która umożliwia szybkie i dokładne sprawdzenie frakcji. Poniżej, na **Rycinie 41**, przedstawiłam elektroforegram otrzymany po oczyszczaniu białek hCC WT oraz H86A.



**Rycina 41** Elektroforegram wybranych frakcji (1-9) otrzymanych w wyniku oczyszczania hCC WT i H86A metodą chromatografii sączenia molekularnego.

Frakcje zawierające monomer i te zawierające dimer połączyłam osobno i zliofilizowałam otrzymując ostateczne produkty. Wprowadzone do sekwencji

cystatyny C mutacje punktowe miały dość istotny wpływ na wydajność prowadzonych ekspresji. Średnia ilość otrzymanego monomeru białka na 1 l hodowli bakteryjnej, obliczona jako średnia z trzech nadprodukcji, rozkładała się następująco:

- hCC WT – 6,8 mg/l
- hCC H86A – 9,3 mg/l
- hCC H90A – 8,3 mg/l
- hCC H86\_90A – 14 mg/l

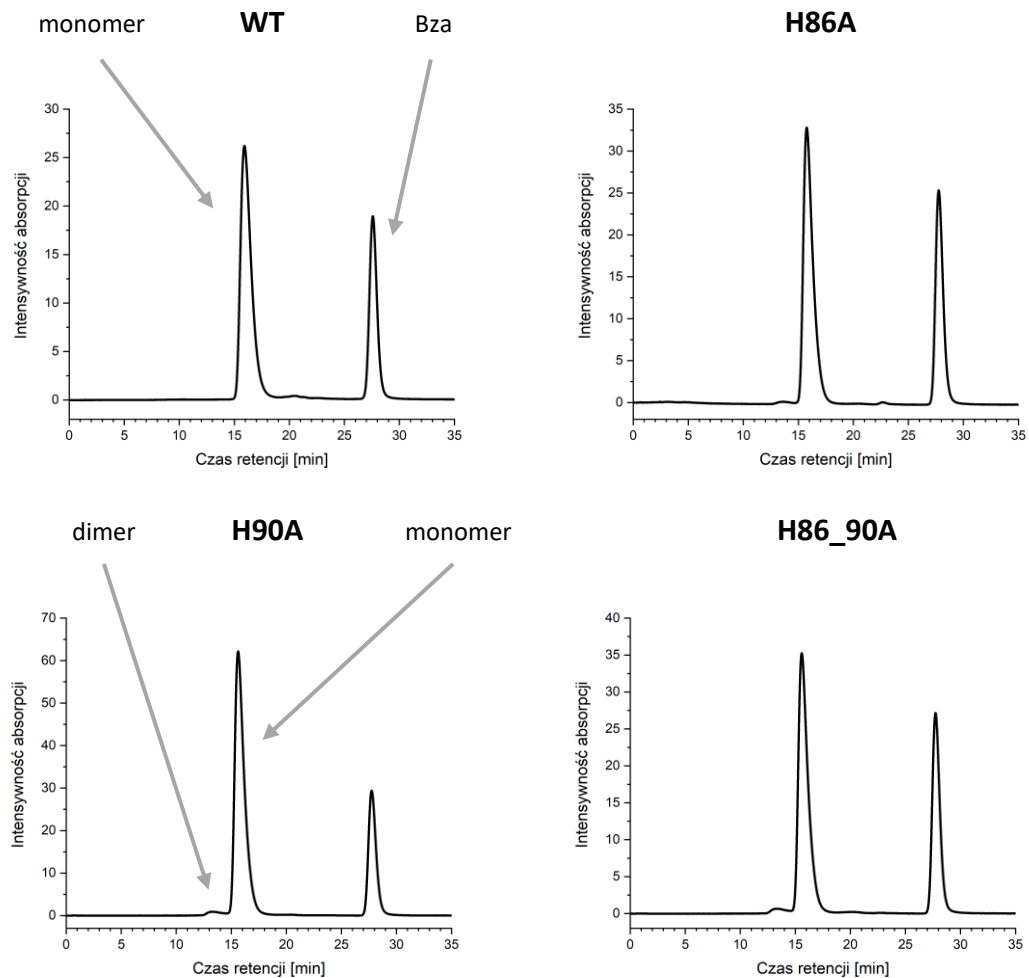
Poza wydajnością proces nadprodukcji nie różnił się w sposób istotny dla poszczególnych białek. Jedynie mutant H90A charakteryzował się znacząco większą od pozostałych zawartością formy dimerycznej i nieco gorszą rozpuszczalnością, co nie wpłynęło jednak na obniżenie otrzymywanej ilości monomeru.

### 3. Charakterystyka nadprodukowanych białek

#### 3.1 Analiza chromatograficzna

W celu kontroli czystości nadprodukowanych białek, liofilizaty rozpuszczałam w buforze PBS z dodatkiem chlorowodoru benzamidyny (Bza) jako odnośnika i analizowałam za pomocą chromatografii sączenia molekularnego według procedury opisanej w punkcie IV.4.1. Na podstawie chromatogramów określałam nie tylko czystość próbki, ale także zawartość formy monomerycznej i dimerycznej cystatyny C, która wskazywała na jakość przeprowadzonego drugiego oczyszczenia. Na **Rycinie 42**, przedstawiłam chromatogramy z analizy poszczególnych nadprodukowanych przeze mnie białek. Czas retencji monomerycznej formy cystatyny C wynosił około 16 minut. Pik odpowiadający tej wartości widoczny jest na każdym z zaprezentowanych chromatogramów. W próbkach mutantów widoczne są również śladowe ilości formy dimerycznej (pik z czasem retencji około 13 min oznaczony na chromatogramie H90A), które jednak nie mają wpływu na wyniki dalszych eksperymentów. W 28 minucie występuje pik pochodzący od odnośnika wewnętrznego (Bza), który miał na celu sygnalizowanie poprawności wykonywanej analizy. Nawet niewielkie przesunięcie pików mogłoby bowiem skutkować niepoprawną interpretacją danych i pomyleniem formy dimerycznej z monomeryczną. Zastosowanie dodatku Bza o znanym czasie retencji zapobiegało temu problemowi. Związek ten został dobrany tak, aby eluował z kolumny w charaktery-

stycznym dla objętości kolumny czasie, który jest wartością stałą dla danych warunków chromatograficznych.



**Rycina 42** Chromatogramy z analizy SEC hCC typu dzikiego i jej mutantów.

Wszystkie otrzymane przeze mnie białka, według przeprowadzonych analiz chromatograficznych, charakteryzowały się wysoką czystością i nadawały się do dalszych eksperymentów bez konieczności dodatkowego oczyszczania.

### 3.2 Analiza widm masowych

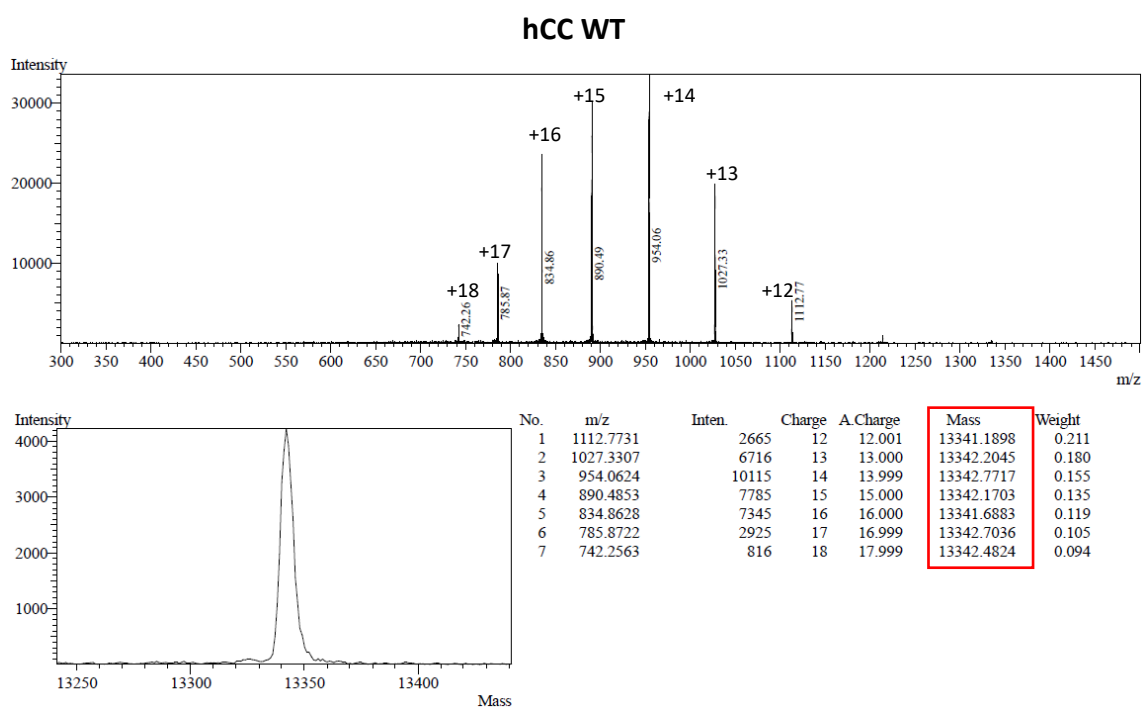
Potwierdzenie otrzymania białek z wprowadzoną mutacją uzyskałam za pomocą spektrometrii mas. Ludzka cystatyna C w postaci natywnej składa się ze 120 reszt aminokwasowych i, dla wariantu dzikiego, posiada masę równą 13 343 Da. Widma mas zarejestrowane zostały za pomocą aparatu LC-MS ESI-TOF. Średnie masy molowe mutantów wyliczyłam za pomocą programu Expasy (dostępnego na stronie



[www.expasy.org](http://www.expasy.org)). W obliczeniach uwzględniłam obecność dwóch mostków disulfidowych, których wyżej wymieniony program nie bierze pod uwagę. Zatem właściwe masy molowe wyznaczałam poprzez pomniejszenie mas wyliczonych przez Expasy o 4 Da. W ten sposób otrzymałam następujące wartości:

- masa molowa hCC H86A – 13 277 Da,
- masa molowa hCC H90A – 13 277 Da,
- masa molowa hCC H86\_90A – 13 211 Da.

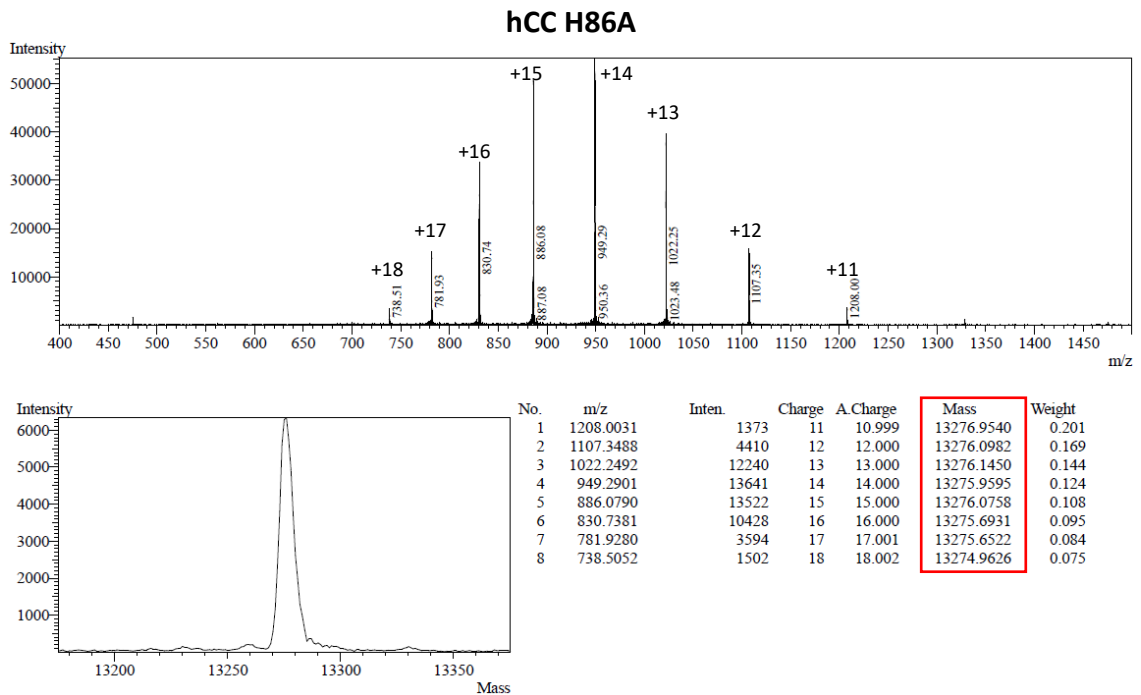
Zarejestrowane widma masowe pokazane na **Rycinach 43-46** dla odpowiednio hCC WT, H86A, H90A oraz H86\_90A przedstawiają gaussowski rozkład jonów wielokrotnie naładowanych oraz wartości mas po przeprowadzeniu dekonwolucji. Zgodnie z oczekiwaniami próbki charakteryzowały się wysoką czystością, a każdy z mutantów występował w formie monomerycznej i charakteryzował się masą zgodną z zakładaną mutacją.



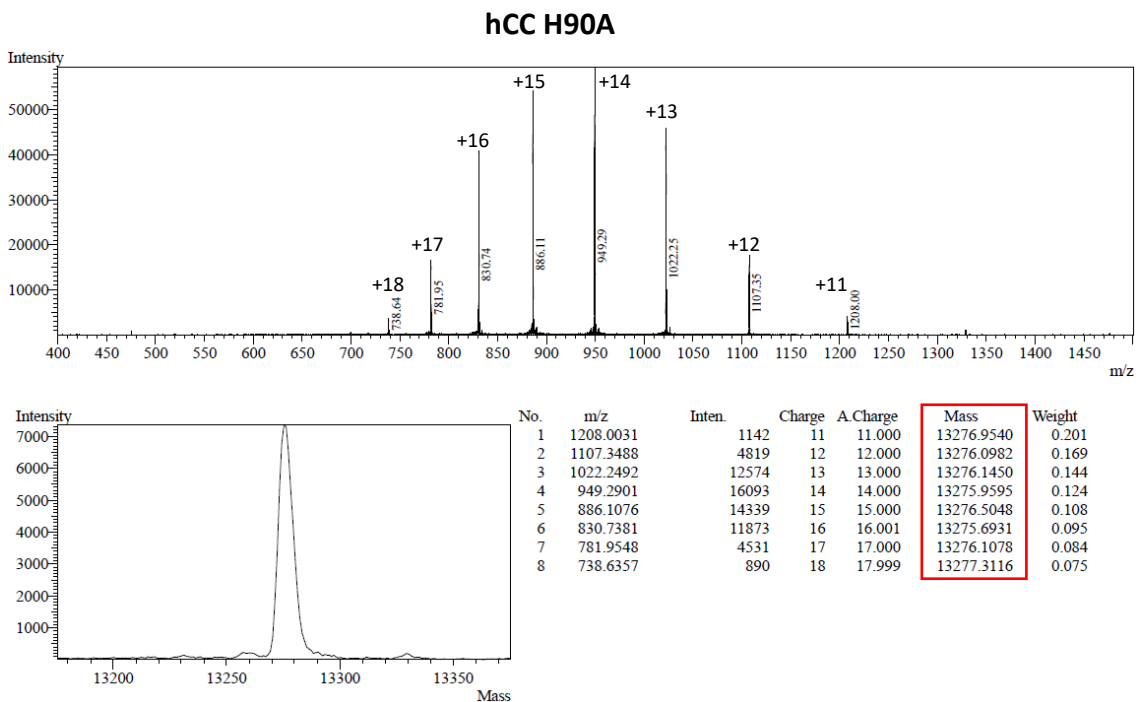
**Rycina 43** Widma masowe ESI-MS przed i po dekonwolucji dla monomeru cystatyny C typu dzikiego.

Masy cząsteczek analizowanych metodą ESI-MS mogą różnić się od mas oczekiwanych o 1-2 Da. Nie wynika to z otrzymania niewłaściwego lub uszkodzonego produktu, a jedynie z niedokładnie skalibrowanego sprzętu pomiarowego. Tak

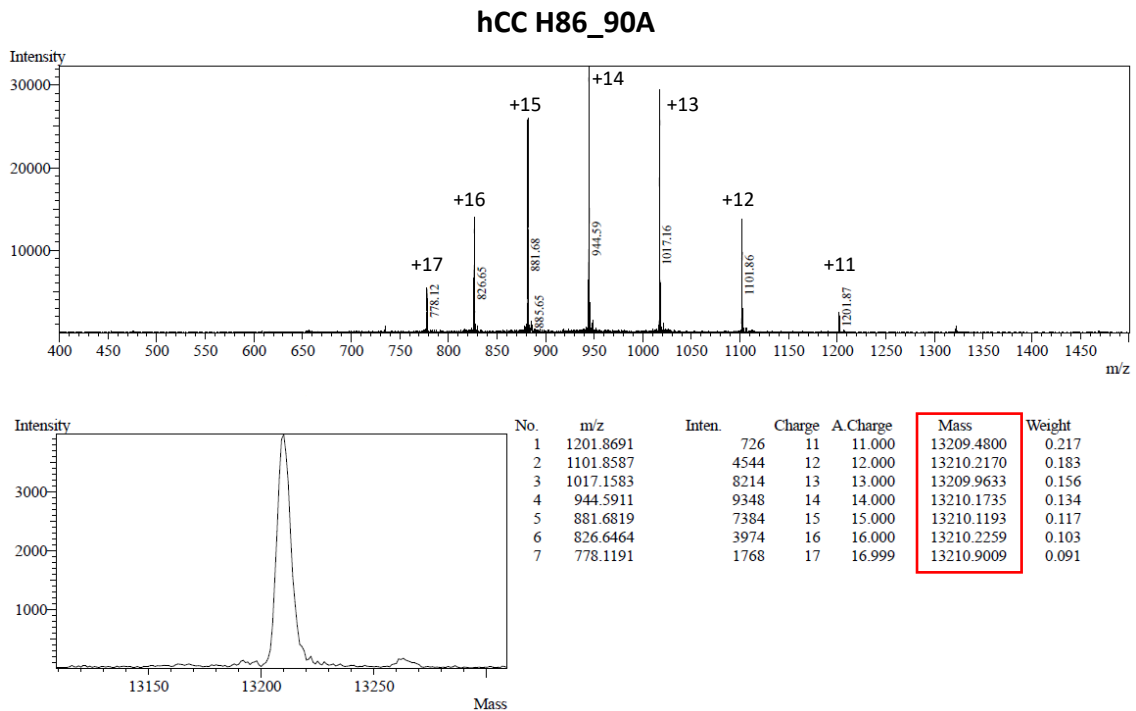
niewielkie różnice w wartościach znajdują się w granicy błędu, dlatego masę 13 341(2) Da dla cystatyny C typu dzikiego należy uznać za poprawną.



**Rycina 44** Widma masowe ESI-MS przed i po dekonwolucji dla mutantu hCC H86A.



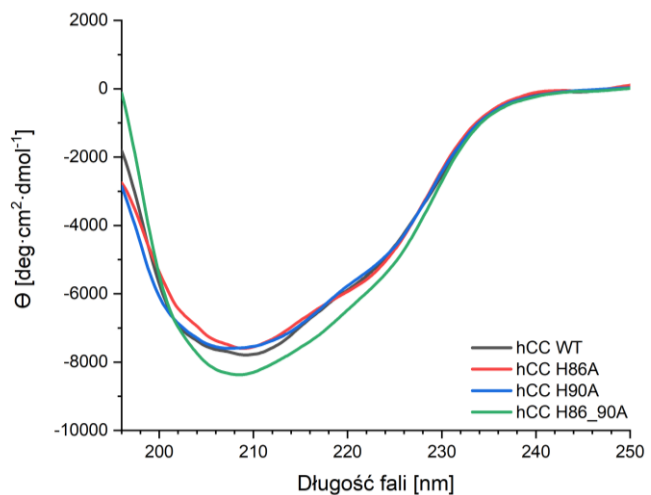
**Rycina 45** Widma masowe ESI-MS przed i po dekonwolucji dla mutantu hCC H90A.



**Rycina 46** Widma masowe ESI-MS przed i po dekonwolucji dla mutantu hCC H86\_90A.

### 3.3 Analiza widm dichroizmu kołowego

Wpływ wprowadzonej mutacji na strukturę drugo- i trzeciorzędową oraz stabilność termiczną białka (określaną za pomocą temperatury jego denaturacji) badałam za pomocą dichroizmu kołowego. Analizy wykonane zostały w zakresie 190-250 i 240-350 nm w warunkach izotermicznych w temperaturze 22 °C oraz przy długościach fal 218 i 222 nm w gradiencie temperatury 20-95 °C. Na **Rycinie 47**, przedstawiłam porównanie widm CD dla wszystkich analizowanych białek w zakresie długości fali 190-250 nm.

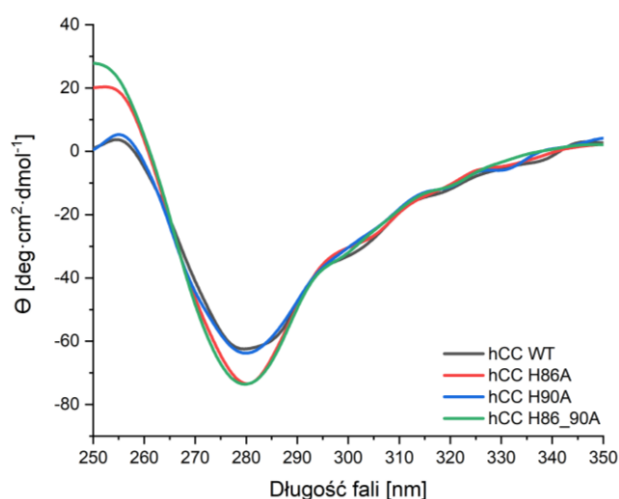


**Rycina 47** Widma CD w zakresie 190-250 nm dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów.

Wszystkie cztery nałożone na siebie widma CD charakteryzują się bardzo zbliżonym kształtem, co wskazuje na znaczne podobieństwo strukturalne. Kształt widm jest charakterystyczny dla struktury  $\beta$ -kartki, której minimum powinno występować w okolicy 218 nm. Minima eliptyczności dla poszczególnych białek rozkładają się następująco:

- hCC WT – 210 nm,
- hCC H86A – 209 nm,
- hCC H90A – 206 nm,
- hCC H86\_90A – 208 nm.

Obniżenie wartości długości fali wynika z większego nieuporządkowania struktury niż w przypadku samej  $\beta$ -kartki. Różnice w wartościach minimów są na tyle niewielkie, że mogą wynikać zarówno z drobnych różnic strukturalnych między poszczególnymi białkami jak i z błędów pomiarowych. Krzywe charakteryzują się zbliżonym kształtem, szerokością i intensywnością, co pozwala na stwierdzenie, że wszystkie cztery białka posiadają niemal identyczną strukturę drugorzędową. Poniżej, na **Rycinie 48**, nałożone zostały widma CD w zakresie długości fali 250-350 nm.

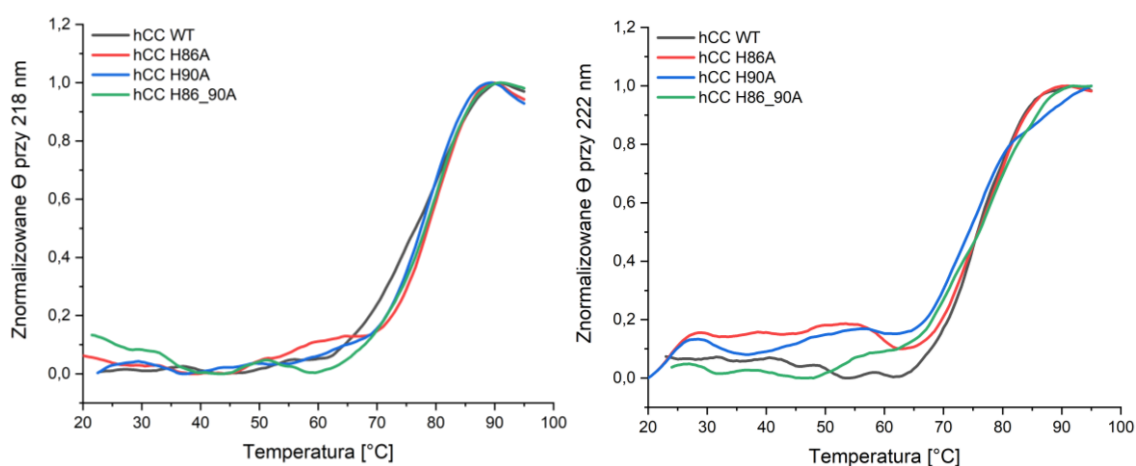


**Rycina 48** Widma CD w zakresie 250-350 nm dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów.

Wszystkie analizowane białka posiadają taką samą liczbę aminokwasów aromatycznych (tryptofanu, tyrozyny oraz fenyloalaniny) odpowiedzialnych za kształt widma w zakresie 250-350 nm. Sugeruje to, że w połączeniu z bardzo zbliżoną strukturą

drugorzędową, przy zachowanej strukturze trzeciorzędowej, wszystkie cztery widma powinny charakteryzować się i charakteryzują się zbliżonym kształtem. Wszystkie posiadają minimum eliptyczności przy długości fali 280 nm w pasmie absorpcji tryptofanu. Zmiany w intensywności eliptyczności molowej wynikają raczej z błędów stężeniowych i pomiarowych niż z różnic strukturalnych. Wskazują na to zbliżone kształty, szerokości i wartości minimów pasm widocznych na widmach.

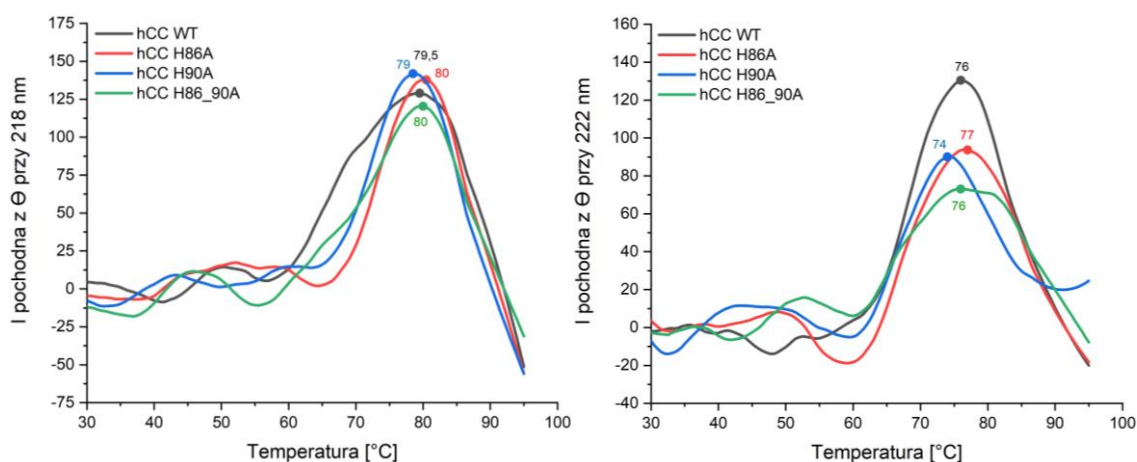
Oprócz analizy struktur wariantów cystatyny C, porównałam również ich stabilność poprzez zbadanie procesu termicznej denaturacji. Do tego celu wykorzystałam dwie długości fali 218 i 222 nm oraz gradient temperatury 20-95 °C. Długość fali 218 nm pozwala obserwować zmiany zachodzące w strukturze  $\beta$ -kartki, a 222 nm w strukturze  $\alpha$ -helisy. Otrzymane widma przestawiłam na **Rycinie 49**. Dla ułatwienia interpretacji uzyskane dane zostały znormalizowane.



**Rycina 49** Widma temperaturowe CD dla dwóch długości fali: 218 nm (z lewej) i 222 nm (z prawej), dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów.

Intensywny wzrost wartości eliptyczności dla każdego z białek przy obu długościach fali rozpoczyna się w temperaturze około 60-65°C. Co ciekawe, w tej temperaturze cząsteczki cystatyny C zaczynają tworzyć formę dimeryczną [147]. Cały proces rozpoczyna się od zerwania powierzchni styku dwóch fragmentów  $\beta$ -pasm (nici  $\beta_2$  i  $\beta_3$ ) oraz odsunięcia  $\alpha$ -helisy. Wzrost intensywności eliptyczności molowej po przekroczeniu temperatury dimeryzacji odpowiada za zmiany zachodzące w skutek termicznej denaturacji. Zarejestrowane widma CD oraz widoczne na nich różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami w całym zakresie temperatur sugerują, że procesy

rozfałdowywania badanych białek mogą przebiegać w nieco odrębny sposób, ale nie pozwalają na ustalenie ich mechanizmów. W celu znalezienia dokładnej temperatury denaturacji obliczyłam pierwszą pochodną z eliptyczności molowej uzyskując wykresy przedstawione na **Rycinie 50**. Ze względu na bardzo duże zaszumienie wykresy zostały wygładzone.



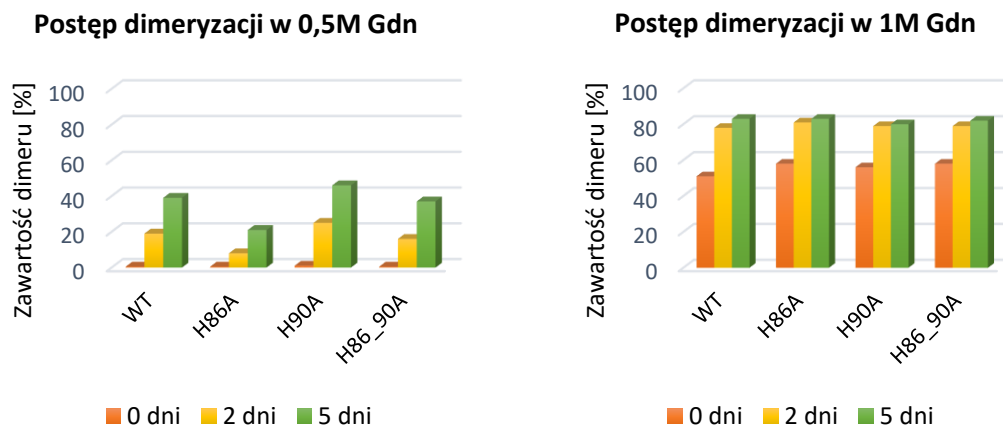
**Rycina 50** Wykresy zależności  $I$  pochodnej z  $\Theta$  od temperatury dla dwóch długości fali: 218 i 222 nm, dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów.

Temperatura denaturacji struktur  $\beta$ -karkowych badanych białek znajduje się w okolicy 79–80 °C, natomiast struktur  $\alpha$ -helikalnych w zakresie 76–77 °C dla białek hCC WT, H86A i H86\_90A oraz 74 °C dla białka H90A.

Badania wykonane metodą dichroizmu kołowego udowodniły, że wprowadzone mutacje nie wpłynęły znacząco na strukturę nadprodukowanych białek w stosunku do cystatyny C typu dzikiego. Wszystkie białka charakteryzują się niemal identyczną strukturą II i III-rzędową oraz temperaturą denaturacji. Jedyną rozbieżnością jest nieco niższa stabilność temperaturowa białka hCC H90A, co potwierdza zjawisko jego podwyższonej (w stosunku do innych badanych białek) tendencji do dimeryzacji. Badania nad wariantem chorobotwórczym L68Q cystatyny C, pozwoliły wysnuć wniosek, że im mniejsza stabilność strukturalna, czyli także termiczna, tym większa zdolność do dimeryzacji i/lub oligomeryzacji mutantu hCC [147].

### 3.4 Dimeryzacja

W warunkach zbliżonych do fizjologicznych (bufor PBS o pH 7,4, temperatura 37 °C) cystatyna C dimeryzuje w znikomym stopniu. Proces ten można wymusić na kilka sposobów. Jednym z nich jest wspomniane wcześniej podwyższenie temperatury do około 65 °C, a drugim zastosowanie czynnika denaturującego [200], którym może być chlorowodorek guanidyny (Gdn) zastosowany w niniejszym badaniu. Gdn należy do grona substancji chaotropowych. Zaburza tworzenie wiązań wodorowych, co prowadzi do osłabienia siły oddziaływania białka z cząsteczkami wody i destabilizacji jego struktury. Analizowane białka inkubowałam przez 5 dni z dodatkiem 0,5 M i 1 M chlorowodoru guanidyny. Postęp dimeryzacji kontrolowałam za pomocą chromatografii sączenia molekularnego, a rezultaty przedstawiłam na **Rycinie 51**. Procentową zawartość formy dimerycznej określiłam na podstawie pól powierzchni pików otrzymanych w wyniku rozdziału chromatograficznego.



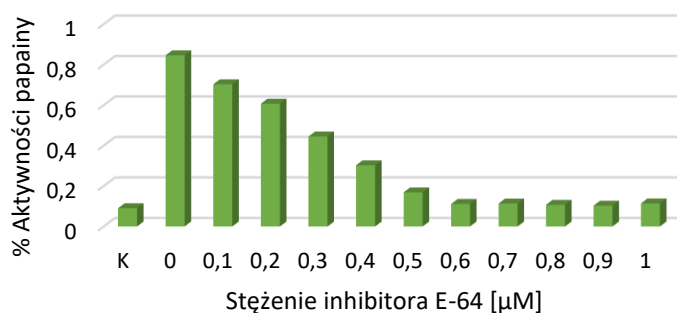
**Rycina 51** Wykresy przedstawiające postępy dimeryzacji cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów w 0,5 M i 1 M chlorowodoru guanidyny monitorowany za pomocą chromatografii sączenia molekularnego.

Najniższy przyrost ilości dimeru zaobserwowałam dla białka H86A w 0,5 M Gdn, jednak sama tendencja do jego przyrostu w czasie pozostała taka sama jak w przypadku białka typu dzikiego. 1 M stężenie Gdn stanowi już dość silny czynnik destabilizujący strukturę, dlatego białka dimeryzowały tuż po jego dodaniu. Przyrost formy dimerycznej zatrzymał się w okolicach 80 % zawartości dimeru w przypadku każdego z białek. Sugeruje to, że przy tym stosunku monomer/dimer ustala się stan równowagi utrudniający lub nawet uniemożliwiający całkowitą dimeryzację. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzić można, iż nadprodukowane mutanty w łagodnych

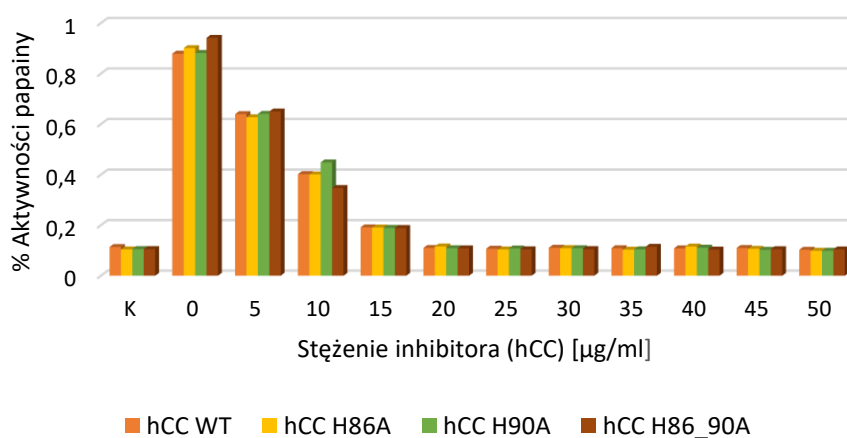
warunkach denaturujących (0,5 M Gdn) mają zbliżoną do cystatyny C typu dzikiego tendencję do dimeryzacji, zwłaszcza mutant H86\_90A. Białko H90A dimeryzuje nieco łatwiej, a H86A nieco słabiej w stosunku do hCC WT. Przy zastosowaniu silniejszych warunkach destabilizujących strukturę (1 M Gdn) różnice w szybkości i stopniu dimeryzacji pomiędzy poszczególnymi białkami nie wystąpiły.

### 3.5 Analiza aktywności biologicznej

W celu sprawdzenia czy i w jaki sposób wprowadzone do sekwencji cystatyny C mutacje wpłynęły na jej aktywność biologiczną przeprowadziłam badanie aktywności nadprodukowanych białek względem papainy. Eksperyment przeprowadziłam z wykorzystaniem inhibitora E-64 jako odnośnika (**Rycina 52**) według procedury opisanej w punkcie IV.4.5. Wyniki zaprezentowałam na **Rycinie 53**. W każdym przypadku próbkę nr 1 stanowiła mieszanina reakcyjna bez dodatku papainy, natomiast próbki 2-12 zawierały coraz wyższe stężenia inhibitora w postaci E-64 lub wybranego białka.



**Rycina 52** Wykresy przedstawiające postępowanie inhibicji papainy w zależności od stężenia inhibitora E-64; K - próba kontrolna.



**Rycina 53** Wykresy przedstawiające postępowanie inhibicji papainy w zależności od stężenia poszczególnych wariantów cystatyny C; K - próba kontrolna



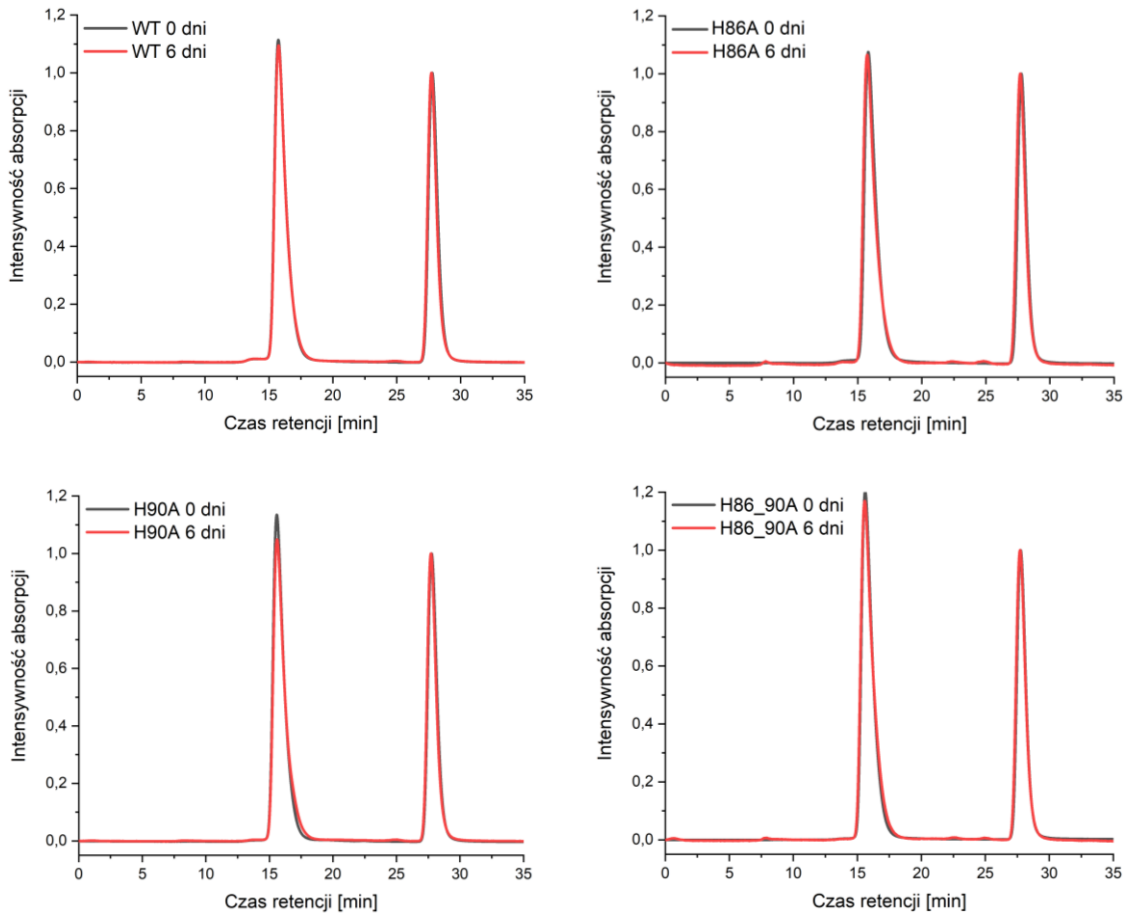
Papaina katalizuje reakcję hydrolizy obecnej w mieszaninie reakcyjnej BAPA, w wyniku której wydzielona zostaje p-nitroanilina o żółtym zabarwieniu i absorpcji promieniowania z maksimum przy długości fali ok. 405 nm. Wraz ze wzrostem ilości inhibitora enzymu obniża się zatem wydajność reakcji i absorbancja maleje. Wartości absorbancji dla poszczególnych białek są bardzo zbliżone, co świadczy o niemal takiej samej aktywności inhibicyjnej. Wykres dla inhibitora E-64, dla którego reakcje prowadzone były równocześnie z reakcjami dla badanych białek, potwierdza poprawne przeprowadzenie eksperymentu.

Na podstawie przedstawionych w tym rozdziale wyników można stwierdzić, że mutacje wprowadzone do sekwencji cystatyny C nie wpłynęły znacząco ani na zmianę struktury ani właściwości nadprodukowanych mutantów. Wszystkie trzy białka: H86A, H90A oraz H86\_90A, charakteryzują się zbliżoną do hCC typu dzikiego temperaturą denaturacji (H90A nieco niższą), podobnie reagują na czynniki stymulujące dimeryzację oraz wykazują aktywność inhibicyjną wobec papainy na takim samym poziomie.

## 4. Badanie oddziaływania białko-metal

### 4.1 Inkubacja białek z jonami $\text{Cu}^{2+}$ i $\text{Zn}^{2+}$

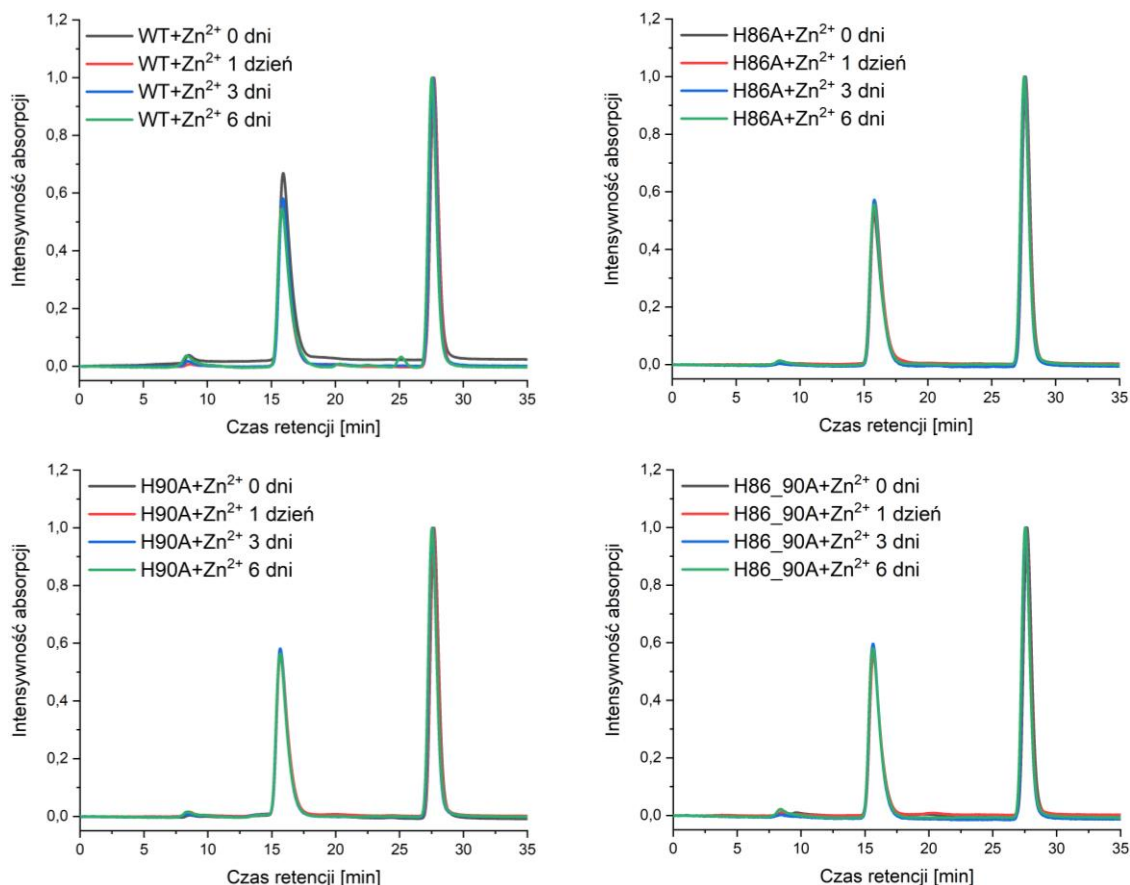
W buforze octanowym o pH 6,95 i w temperaturze 37 °C przez 6 dni inkubowałam cztery warianty cystatyny C z dodatkiem jonów  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Cu}^{2+}$ , według procedury przedstawionej w punkcie IV.5.1. Eksperyment ten miał na celu sprawdzenie czy obecność ww. jonów indukuje zmiany w strukturze białek prowadzące do dimeryzacji i/lub dalszej oligomeryzacji. Mieszaniny analizowałam za pomocą chromatografii sączenia molekularnego. Równolegle do każdego z eksperymentów inkubowałam próbki kontrolne w postaci białek bez dodatku jonów metali. Próbki te po sześciu dniach nadal pozostawały w formie monomerycznej w niezmienionym stężeniu, co zobrazowałam na **Rycinie 54**. Warunki zastosowane do inkubacji nie wpłynęły zatem na właściwości cystatyny C typu dzikiego, ani żadnego z badanych mutantów.



**Rycina 54** Chromatogramy z analizy próbek kontrolnych zaraz po rozpuszczeniu białek w buforze i po 6 dniach inkubacji. pik przy 16 min – analizowane białko; pik przy 28 min – chlorowoderek benzamidyny

### A. Inkubacja z $Zn^{2+}$

Na **Rycinie 55**, przedstawiłam wyniki analiz dla próbek roztworów białek z dodatkiem jonów cynku (II) w stosunku molowym 1:1. Na chromatogramach nie zaobserwowałam żadnych istotnych zmian dotyczących stężenia inkubowanych białek w czasie. Każde z nich do końca eksperymentu pozostało w formie monomerycznej. Ze względu na skłonności cystatyny C do dimeryzacji, brak zmian sugeruje brak silniejszego oddziaływania białko- $Zn^{2+}$  (brak miejsca wiążącego w białku) i/lub brak wpływu tych jonów na dimeryzację i oligomeryzację hCC. Na tym etapie zdecydowałam więc o zaprzestaniu dalszych badań z udziałem jonów cynku (II).

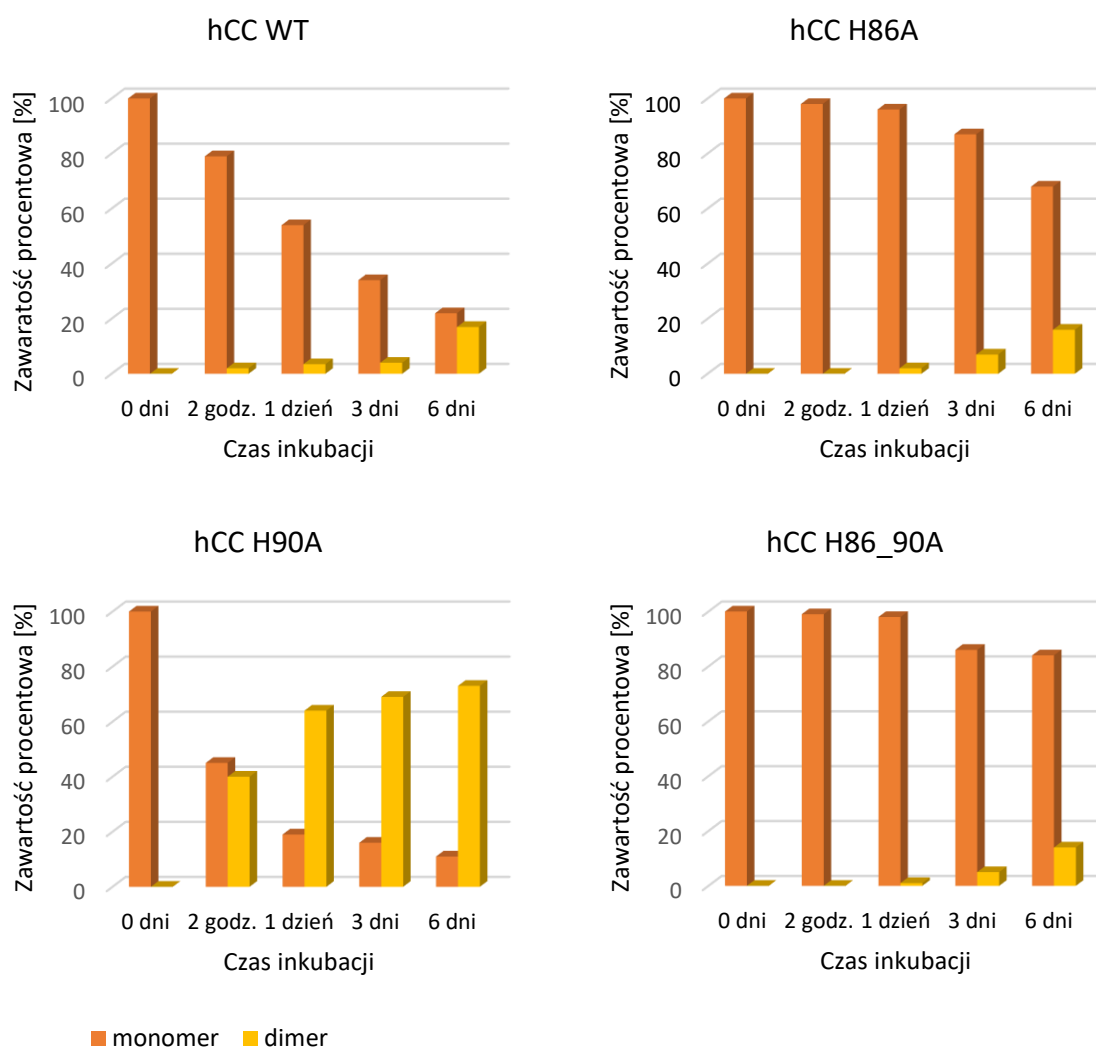


**Rycina 55** Chromatogramy z analizy roztworów pochodzących z 0, 1, 3 i 6 dnia inkubacji wariantów cystatyny C z dodatkiem jonów Zn<sup>2+</sup>. pik przy 16 min – analizowane białko; pik przy 28 min – chlorowodorek benzamidyny

## B. Inkubacja z Cu<sup>2+</sup>

Na **Rycinie 56** przedstawiłam wyniki analiz chromatograficznych w postaci wykresów zależności procentowej zawartości form mono- i dimerycznej od czasu inkubacji próbek białek z dodatkiem jonów miedzi (II). Zawartość procentową obliczyłam na podstawie pól powierzchni poszczególnych pików otrzymanych z analiz chromatograficznych w stosunku do powierzchni pików otrzymanego w dniu 0 uwzględnionego jako 100 %. Dodatek Cu<sup>2+</sup>, w przeciwieństwie do jonów cynku, istotnie wpłynął na dyspersyjność próbek cystatyny C. Zmiany zachodzące w roztworze najbardziej widoczne były dla hCC typu dzikiego oraz wariantu H90A. Już po pierwszym dniu inkubacji w każdej z badanych próbek zaobserwowałam przyrost formy dimerycznej, której zawartość w mieszaninie zwiększała się wraz z upływem czasu. W przypadku białka typu dzikiego oraz wariantu H90A zjawisku temu towarzyszyło

pojawienie się w inkubowanych roztworach białego osadu sugerującego strącanie nierozpuszczalnych agregatów powstałych na skutek oddziaływania białko-metal. Oznacza to, że proces łączenia cząsteczek nie zakończył się jedynie na dimeryzacji, a przebiegł dalej w kierunku tworzenia większych struktur oligomerycznych.



**Rycina 56** Wykresy zależności zawartości form mono- i dimerycznych od dnia inkubacji poszczególnych wariantów cystatyny C z jonami miedzi (II).

hCC WT po 6 dniach inkubacji zawierał ponad 4 razy mniej monomeru niż w dniu 0 i wykazywał stopniowy, aczkolwiek powolny, przyrost formy dimerycznej w czasie. Analizę chromatograficzną próbki cystatyny C typu dzikiego wykonałam także w siódmym dniu inkubacji. Nie zarejestrowałam wtedy żadnego pików poza pikiem pochodzącym od odnośnika, co wskazuje na całkowitą oligomeryzację białka. Podobnie do hCC WT zachował się wariant H90A z tą różnicą, że charakteryzował się najwyższym

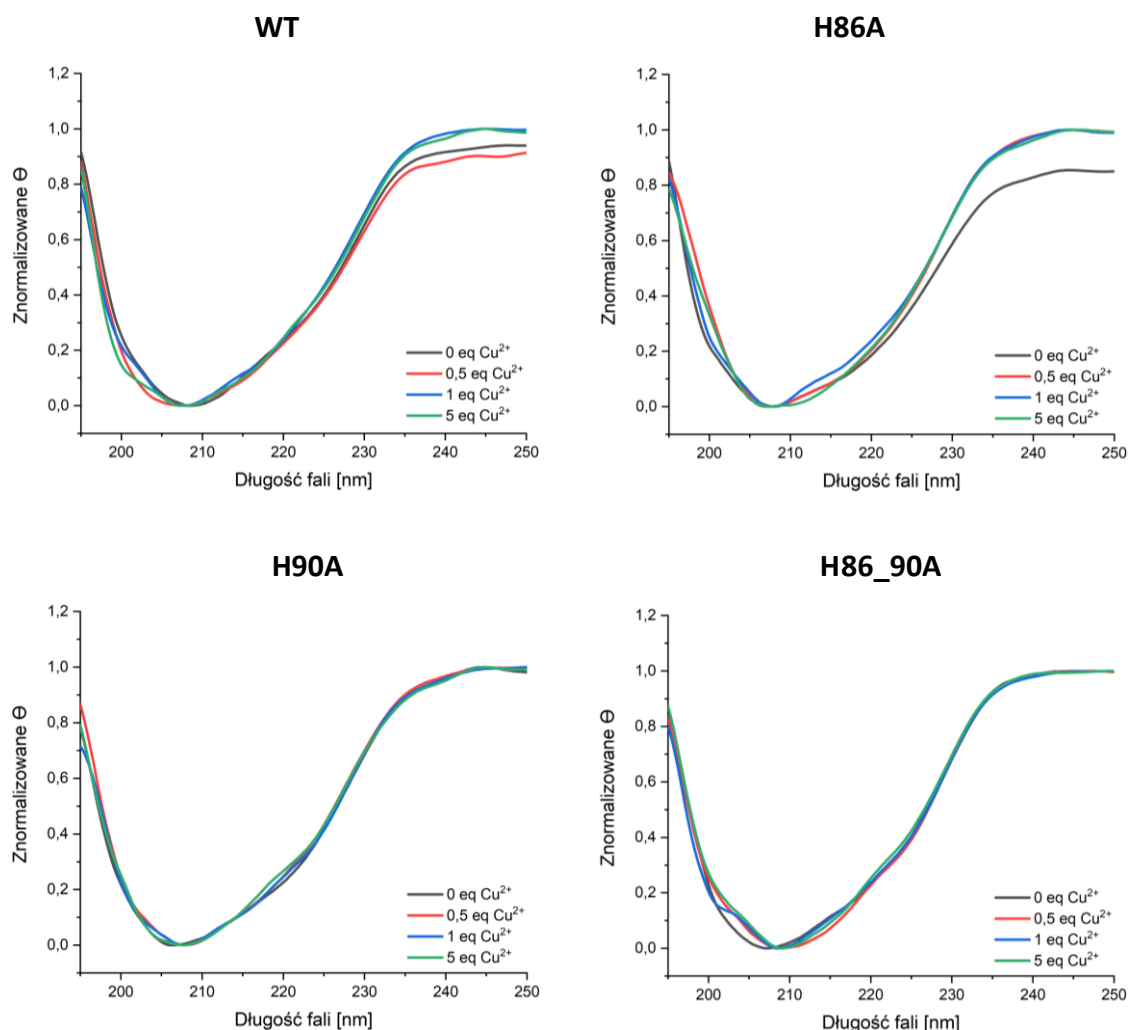
stopniem dimeryzacji w ostatnim dniu eksperymentu, w którym zawierał przeszło 9 razy mniej monomeru niż w dniu 0. Tutaj po raz kolejny potwierdziła się jego podwyższona skłonność do tworzenia dimerów. Dla białko H86A również zarejestrowałam spadek ilości monomeru jednak był on widocznie mniejszy niż w przypadku WT i H90A. Przyrost formy dimerycznej natomiast nie odbiegał mocno od białka typu dzikiego. Najmniejsze zmiany, zgodnie z przewidywaniami, zaobserwowałam dla białka H86\_90A. Wykazało się ono bardzo niewielkim spadkiem zawartości formy monomerycznej w trakcie trwania eksperymentu. Wynik ten sugeruje niezwykle istotny wpływ reszt histydyn w procesie oddziaływania białko-Cu<sup>2+</sup>. Najistotniejsza wydaje się być reszta His<sup>86</sup>, której usunięcie znacznie spowolniło proces oligomeryzacji. Eksperyment ten udowodnił, że cystatyna C posiada miejsce/a wiążące dla jonów miedzi (II), oraz że Cu<sup>2+</sup> indukuje proces dimeryzacji i dalszej agregacji cystatyny C.

#### 4.2 Badanie zmian konformacyjnych metodą dichroizmu kołowego

W kolejnym etapie badań sprawdziłam czy i w jaki sposób jony miedzi (II) wpływają na konformację cystatyny C. Wykorzystałam do tego metodę dichroizmu kołowego, a procedurę eksperymentu opisałam w punkcie IV.5.2. Pierwszym krokiem było dobranie odpowiedniego buforu, który nie oddziałuje z jonami Cu<sup>2+</sup>. Zabieg ten miał zapobiec tworzeniu konkurencyjnych dla białka oddziaływań z miedzią, co mogłoby zaburzyć wyniki eksperymentów. Pierwszy wybór padł na bufor MES, który wykorzystałam do miareczkowania roztworów białek jonami Cu<sup>2+</sup>. Zakres używalności buforu MES plasuje się w granicach pH 5,5-6,7, dlatego do przeprowadzenia analiz wybrałam pH o wartości 6,5. Do próbek zawierających cystatynę C, dodawano jony Cu<sup>2+</sup> w ilości końcowej równej 0, 0,5, 1 oraz 5 ekwiwalentów w stosunku do ilości białka. Następnie próbki analizowano w zakresie 190-250 nm oraz 250-350 nm. Na **Rycinie 57** oraz **Rycinie 58** przedstawiłam otrzymane wyniki. Dla ułatwienia interpretacji i porównania poszczególnych widm wartości eliptyczności molowej zostały znormalizowane.

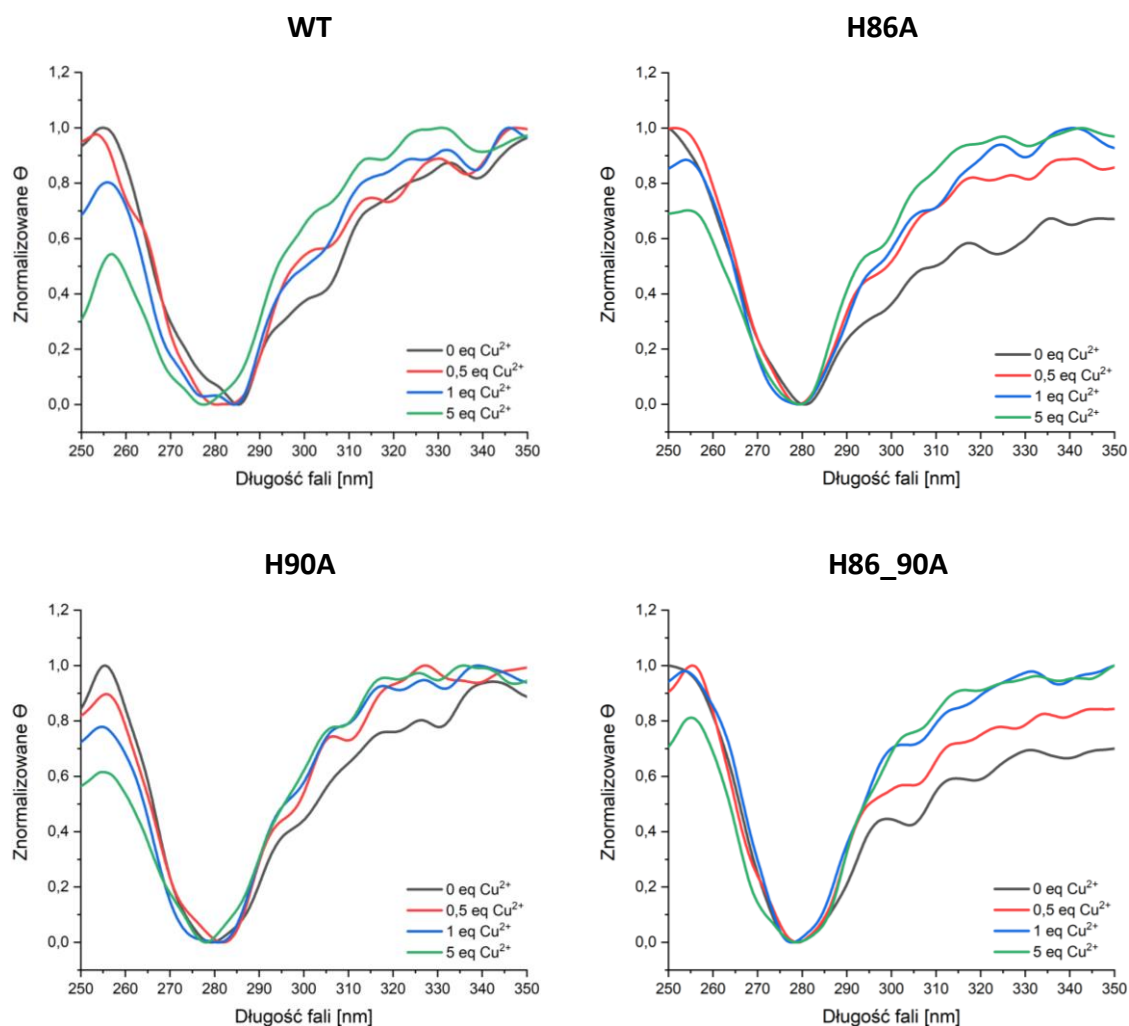
W tych eksperymentach nie zaobserwowałam żadnych znaczących zmian w strukturze II-rzędowej badanych białek zachodzących pod wpływem obecności jonów miedzi (II). W przypadku wariantów H90A oraz H86\_90A nastąpiło jedynie przesunięcie

minimum  $\Theta$  o niecałe 2 nm w kierunku wyższych długości fali, co może świadczyć o niewielkim wzroście uporządkowania struktury już po dodaniu pierwszej porcji jonów.



**Rycina 57** Widma CD w zakresie 190-250 nm dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów rejestrowane w trakcie miareczkowania jonami miedzi (II).

Na widmach CD wykonanych w zakresie 250-350 nm, przedstawionych na kolejnej stronie, dla białek WT oraz H90A zaobserwować można drobne zmiany zachodzące pod wpływem dodatku jonów. Obecność miedzi nieznacznie zaburzyła strukturę III-rzędową tych dwóch wariantów cystatyny C. Efekt ten sugeruje, że jony miedzi (II) prawdopodobnie oddziałują z badanymi białkami (wbudowują się w miejsce wiążące) jednak nie powodują przy tym znaczących zmian konformacyjnych. Podobny efekt nie jest widoczny dla hCC H86A i H86\_90A, dla których na zarejestrowanych widmach nie obserwujemy żadnych znaczących zmian.

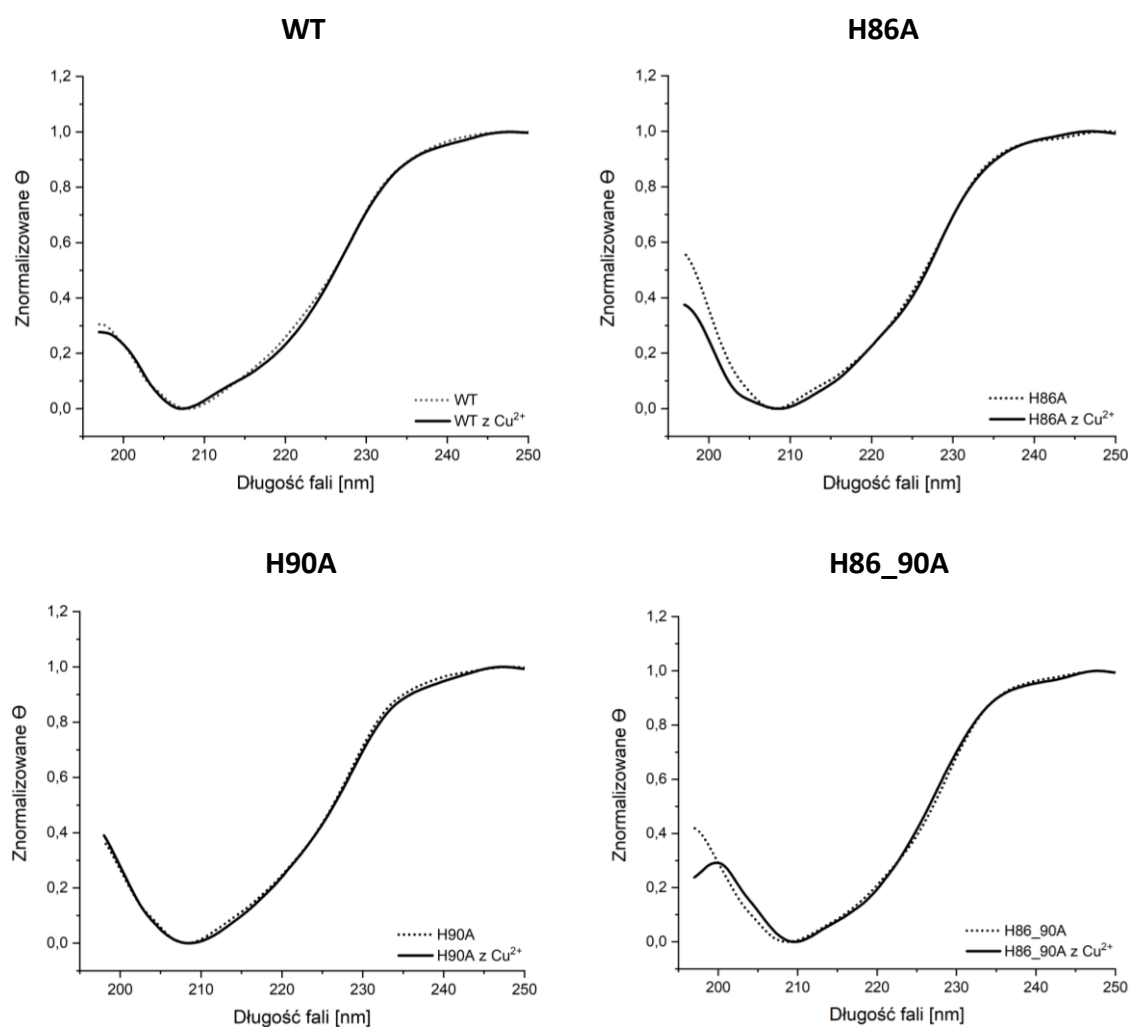


**Rycina 58** Widma CD w zakresie 250-350 nm dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów rejestrowane w trakcie miareczkowania jonami miedzi (II).

Drugi eksperyment wykorzystujący metodę dichroizmu kołowego polegał na przeprowadzeniu standardowych analiz w zakresie 190-250 nm i 250-350 nm oraz zarejestrowaniu widm temperaturowych dla długości fali 218 i 222 nm. Wykonałam go dla próbek białek zawierających jony miedzi (II) w stosunku molowym 1:1 analizując jednocześnie próbki kontrolne niezawierające ww. jonów. Eksperyment ten początkowo wykonałam w buforze MES jednak nie zarejestrowałam wtedy żadnych istotnych różnic zachodzących pod wpływem oddziaływania białko-metal. W drugiej kolejności postanowiłam wykorzystać bufor kakodylanowy, którego zakres używalności leży w granicach pH 5,0-7,4, co pozwoliło mi na podniesienie pH analizowanych roztworów do 6,9. Według literatury żaden z badanych buforów nie oddziałuje z jonami miedzi (II) [201,202], a jednak otrzymane wyniki różniły się od siebie w stopniu istotnym.

Zastosowanie buforu kakodylanowego pozwoliło mi na zaobserwowanie zmian na widmach CD między próbkami zawierającymi i niezawierającymi  $\text{Cu}^{2+}$ . W niniejszej rozprawie przedstawiłam zatem wyniki eksperymentów prowadzonych w buforze kakodylanowym o pH 6,9. Wszystkie widma rejestrowane były zaraz po rozpuszczeniu białek w buforze z dodatkiem  $\text{Cu}^{2+}$ . Dłuższa (kilkugodzinna) inkubacja mogłaby doprowadzić do efektu opisanego w punkcie V.4.1 czyli dimeryzacji i/lub oligomeryzacji badanych białek. Celem tego eksperymentu było natomiast sprawdzenie czy oddziaływanie białko-metal powoduje zmiany konformacyjne, które dopiero w dalszej kolejności prowadzą do dimeryzacji.

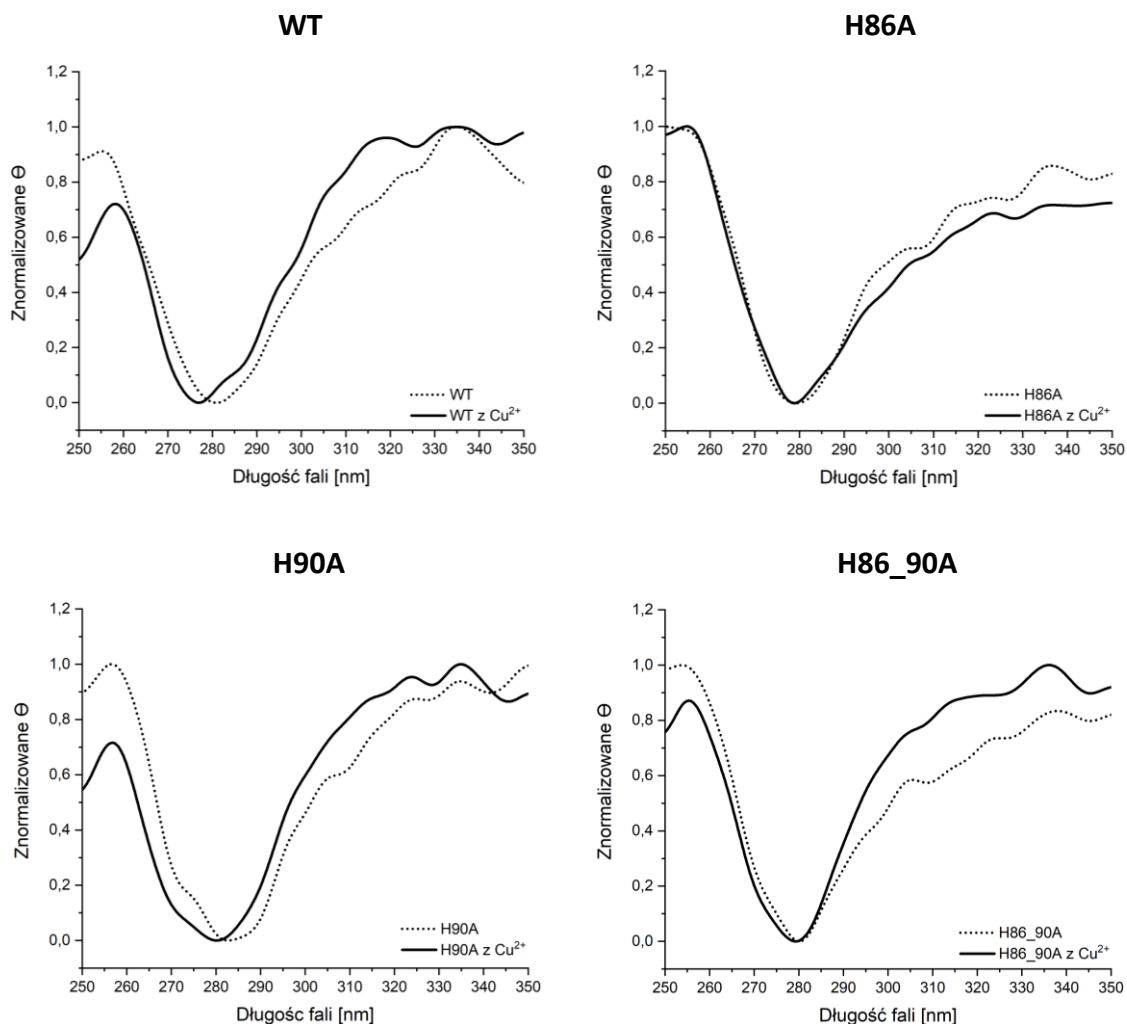
Analiza w zakresie 190-250 nm przedstawiona na **Rycinie 59** nie wykazała żadnych zmian zachodzących pod wpływem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w strukturze II-rzędowej badanych wariantów hCC.



**Rycina 59** Widma CD w zakresie 190-250 nm dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów z dodatkiem jonów miedzi (II) w stosunku molowym 1:1 w buforze kakodylanowym.



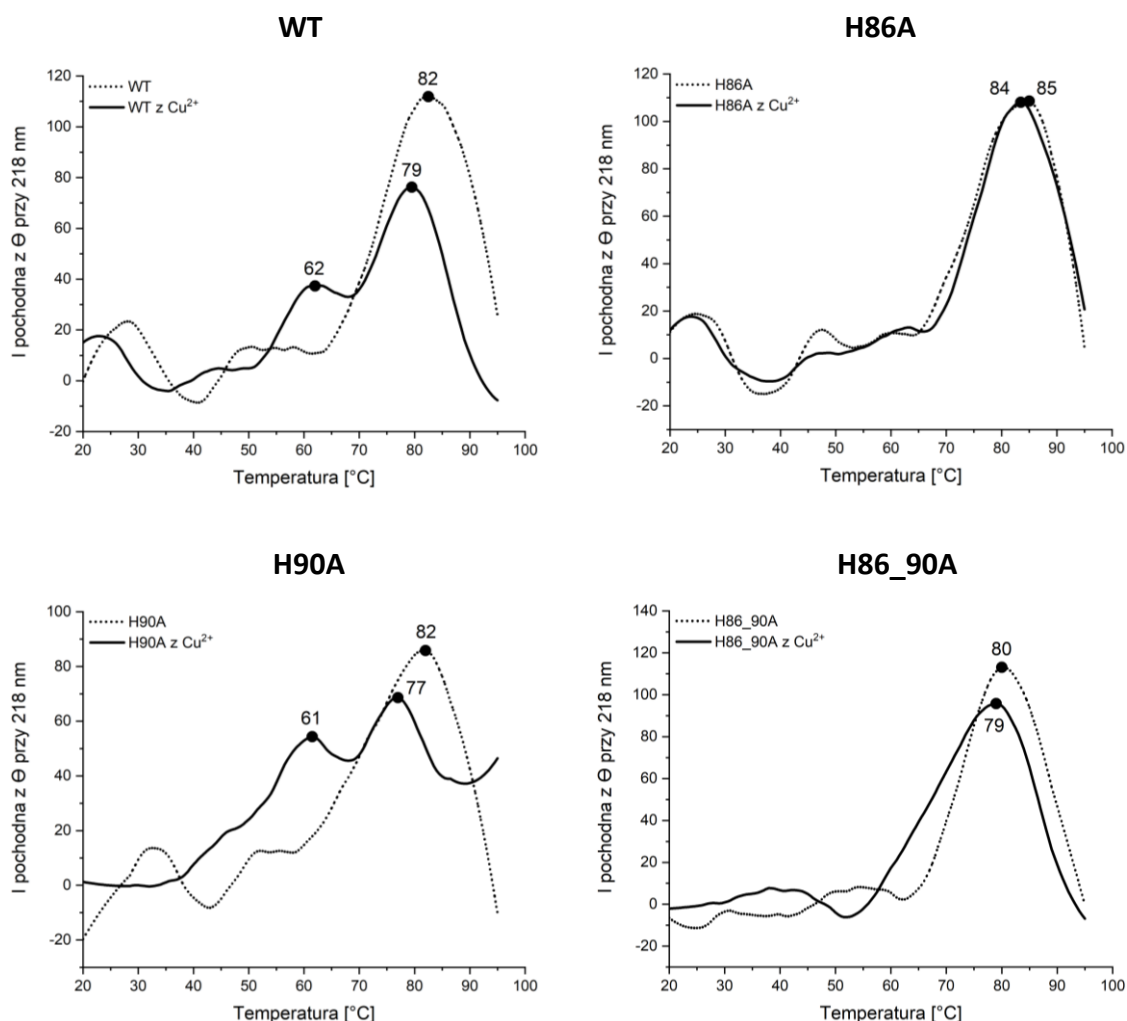
Analiza w zakresie 250-350 nm przedstawiona na **Rycinie 60** potwierdziła widoczne także w poprzednim eksperymencie przeprowadzonym w buforze MES niewielkie zmiany kształtu widm dla białek WT i H90A pod wpływem  $\text{Cu}^{2+}$  oraz brak zmian dla pozostałych wariantów.



**Rycina 60** Widma CD w zakresie 250-350 nm dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów z dodatkiem jonów miedzi (II) w stosunku molowym 1:1 w buforze kakodylanowym.

Różnice w wynikach otrzymanych dla dwóch testowanych buforów pojawiły się dopiero przy rejestrowaniu widm w gradiencie temperatury. Zmiany w procesie denaturacji zaobserwowane w buforze MES były niejednoznaczne i zdecydowanie mniej widoczne niż te zarejestrowane w buforze kakodylanowym, dlatego poniżej przedstawiałam jedynie te drugie. Wykresy zależności I pochodnej z  $\Theta$  od

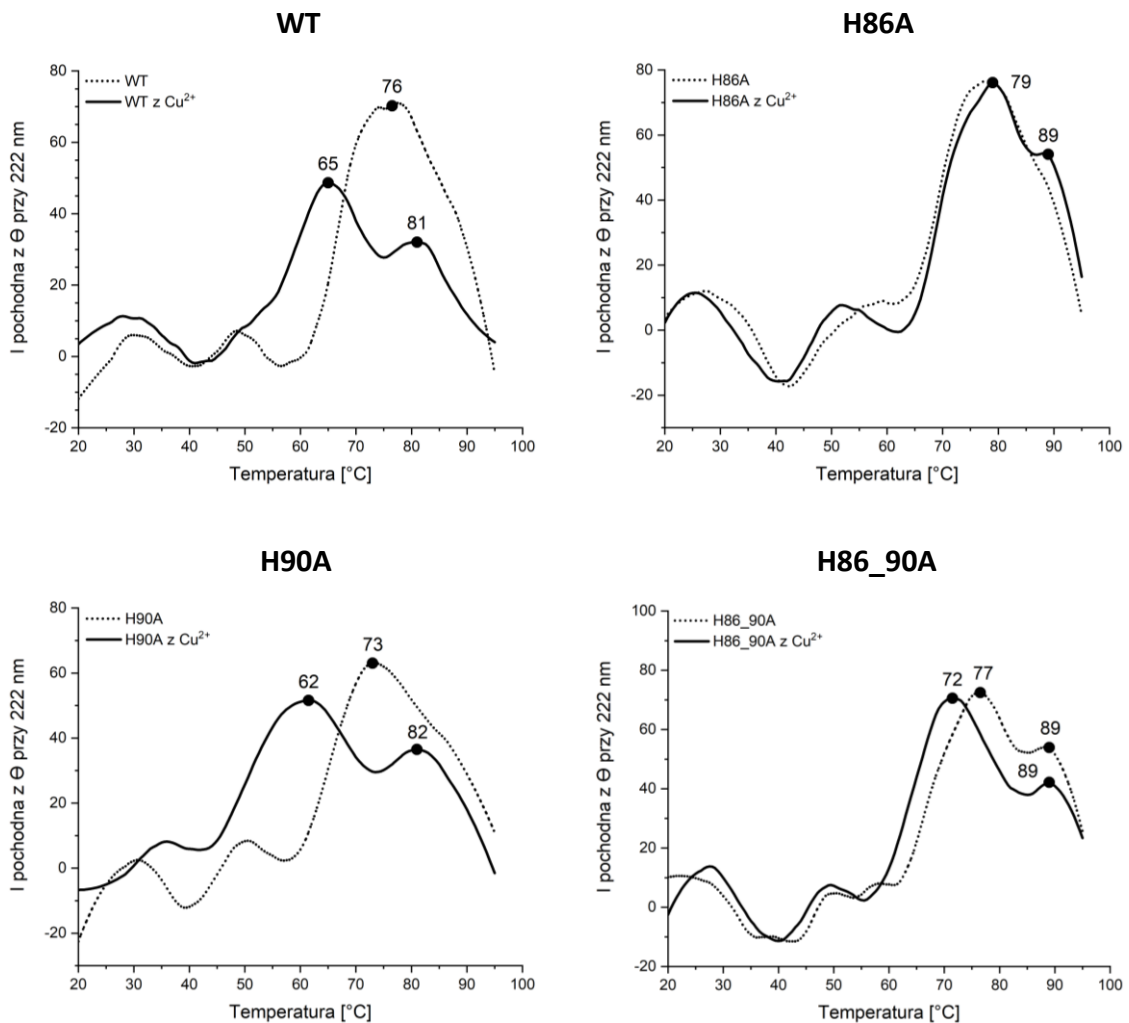
temperatury przy długościach fali 218 i 222 nm znajdują się odpowiednio na **Rycinie 61** i **Rycinie 62**. Dla ułatwienia interpretacji widma zostały wygładzone.



**Rycina 61** Wykresy zależności  $I$  pochodnej z  $\Theta$  od temperatury przy długości fali 218 nm, dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów.

Na widmach rejestrowanych w gradiencie temperatury zarówno przy długości fali 218 nm (**Rycina 61**) jak i 222 nm (**Rycina 62**), po raz kolejny największe zmiany obserwujemy dla cystatyny C typu dzikiego oraz mutantu H90A. Dodatek jonów Cu<sup>2+</sup> do roztworów tych białek spowodował obniżenie stabilności ich struktur II-rzędowych oraz sprawił, że zmiany konformacyjne rozpoczęły się w temperaturze dużo niższej niż w przypadku białek nieoddziałujących z jonami. Co więcej, na otrzymanych widmach zaobserwować można, że denaturacja zarówno struktur  $\beta$ -kartkowych jak i  $\alpha$ -helikalnych w obecności miedzi zachodzi dwuetapowo, przy czym etap pierwszy

rozpoczyna się już w temperaturze około 50 °C. Wynik ten sugeruje, że oddziaływanie z  $\text{Cu}^{2+}$  obniża stabilność cząsteczki cystatyny C, co byłoby zgodne z efektem oligomeryzacji indukowanej jonami miedzi (II). Pierwszy etap denaturacji prawdopodobnie rozpoczyna się od dimeryzacji hCC, która według przedstawionych wykresów rozpoczyna się w temperaturze dużo niższej niż literaturowe 60-65 °C [147].



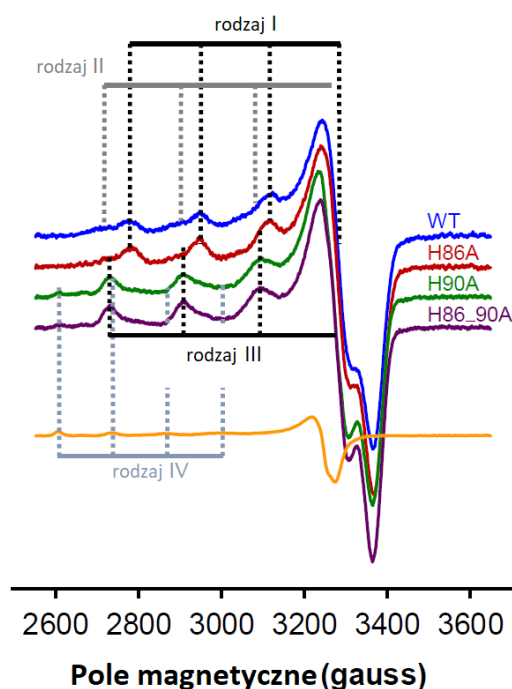
**Rycina 62** Wykresy zależności I pochodnej z  $\Theta$  od temperatury przy długości fali 222 nm, dla cystatyny C typu dzikiego i jej mutantów.

Na widmach zarejestrowanych dla białek H86A oraz H86\_90A nie obserwujemy tak istotnego obniżenia temperatury denaturacji. Wykresy przedstawiające analizy próbek z dodatkiem miedzi i bez, w znacznej mierze pokrywają się ze sobą. Dla białka H86\_90A zaobserwować można jedynie, że zmiany konformacyjne struktur  $\beta$ -kartkowych w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  rozpoczęły się w temperaturze o prawie 10 °C

niższej niż w próbce kontrolnej (**Rycina 61** - skok krzywej rozpoczyna się w temperaturze około 52 °C; w próbce kontrolnej to około 62 °C).

#### 4.3 Analiza EPR kompleksu hCC-Cu<sup>2+</sup>

Bufor MES, mimo że okazał się mniej użyteczny w analizach CD w gradiencie temperatury, to jest mniej szkodliwy od buforu kakodylanowego, który stanowi substancję silnie toksyczną i niebezpieczną dla środowiska. Z tego względu do kolejnych doświadczeń wykorzystałam pierwszy z wymienianych odczynników. Badania EPR wykonane zostały w celu potwierdzenia oddziaływania jonów Cu<sup>2+</sup> z analizowanymi resztami histydyny. Badania te dostarczyły szeregu nowych informacji o miejscach koordynacji jonów w białku, a otrzymane wyniki przedstawiłam na **Rycinie 63**.



**Rycina 63** Znormalizowane widma EPR wykonane dla cystatyny C typu dzikiego i jej wariantów w 50 mM MES o pH 6,0 wraz z widmem kontrolnym.

Widmo cystatyny C typu dzikiego wykazuje dwa główne typy kompleksów – rodzaj I i II. Usunięcie His<sup>86</sup> nie wpłynęło na rodzaj I, ale spowodowało utratę kompleksu II-go rodzaju i pojawienie się nowego, III. Wprowadzenie natomiast mutacji w pozycję His<sup>90</sup> wyeliminowało rodzaj I i II na korzyść rodzaju III. Dodatkowo w widmie mutantu H90A pojawia się IV rodzaj kompleksu o wyglądzie charakterystycznym dla jonu

$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , którego obecność świadczy o obniżeniu poziomu oddziaływania białko-metal. Widmo białka H86\_90A jest identyczne z widmem wariantu H90A. Wynik analizy EPR może zatem zasugerować, że reszta His<sup>90</sup> bierze udział w dwóch głównych typach kompleksów – I i II, a jej usunięcie skutkuje obniżeniem powinowactwa białka do jonów  $\text{Cu}^{2+}$ . Reszta His<sup>86</sup> natomiast bierze udział w koordynacji typu II razem z His<sup>90</sup>. Rodzaj III charakteryzuje się bardzo niskim powinowactwem i zachodzi bez udziału analizowanych reszt histydynowych. Wyniki te rzuciły zatem nowe światło na badania oddziaływania  $\text{hCC-Cu}^{2+}$  i silnie zasugerowały, że to reszta His<sup>90</sup>, a nie jak się wcześniej wydawało His<sup>86</sup>, głównie odpowiada za koordynację jonów  $\text{Cu}^{2+}$ .

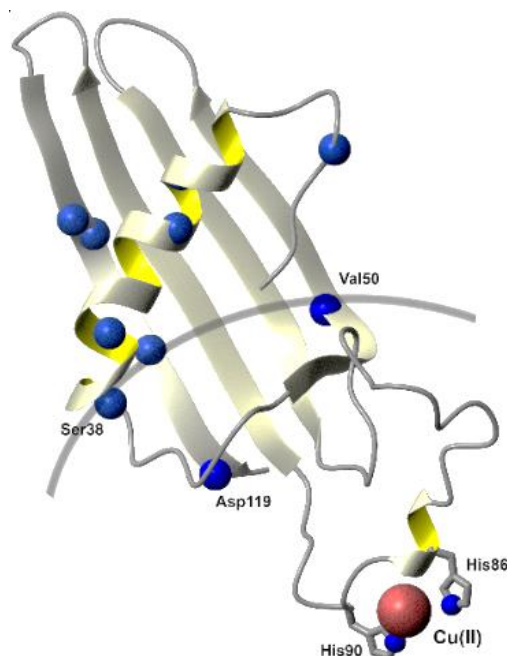
#### 4.4 Analiza NMR kompleksu $\text{hCC-Cu}^{2+}$

Kolejną metodą pozwalającą na wykrycie miejsc wiązania jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w białku jest magnetyczny rezonans jądrowy. Miedź jest paramagnetykiem i ze względu na obecność niesparowanych elektronów silnie oddziałuje z otaczającymi ją jądrami atomowymi. Niesparowane elektrony mogą wpływać zarówno na czasy relaksacji pobliskich protonów jak i na ich przesunięcia chemiczne, co pozwala na odszukanie miejsc oddziaływania jonów z białkiem [203]. Do badań NMR wykorzystany został wariant  $\text{hCC V57G}$  znakowany  $^{15}\text{N}$ , który nadprodukowałam i oczyściłam według procedur opisanych w punktach IV.2 i IV.3. Cystatyna C typu dzikiego dimeryzuje podczas rejestracji widm NMR, dlatego do badań zastosowano wariant stabilizowany przeciwko dimeryzacji [146].

Otrzymane wyniki wskazują, że widma 2D  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$  HSQC uzyskane dla białka analizowanego bez miedzi i dla białka związanego z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  są bardzo zbliżone do danych zarejestrowanych podczas wcześniejszych eksperymentów NMR przeprowadzonych na wariantcie V57G [146]. Sugeruje to, że nasycenie jonami miedzi prowadzi tylko do niewielkich zmian w strukturze analizowanego białka, co jest zgodne z moimi wcześniejszymi wynikami pochodzącymi z analiz CD (punkt V.4.2).

Paramagnetyczny charakter jonu  $\text{Cu}^{2+}$  skutkuje poszerzeniem linii rezonansowych obserwowanych dla grup amidowych znajdujących się najbliżej miejsca wiązania metalu. Największe zmiany zaobserwowano we fragmencie Glu<sup>67</sup> – Phe<sup>96</sup>, w którym znajdują się obie analizowane reszty histydyny. Dalsza analiza danych doświadczalnych ujawniła jednak także inne sygnały, które wykazują zwiększoną

szerokość linii, co może sugerować występowanie szeregu niespecyficznych oddziaływań białko-metal. Możliwe miejsca wiązania  $\text{Cu}^{2+}$  z głównym wskazaniem na fragment Glu<sup>67</sup> – Phe<sup>96</sup> przedstawione zostały na **Rycinie 64**.



**Rycina 64** Struktura NMR wariantu V57G cystatyny C z zaznaczonymi grupami amidowymi (niebieskie kulki) charakteryzującymi się wzrostem szerokości linii rezonansowych pod wpływem działania jonów  $\text{Cu}(\text{II})$  oraz z zaznaczonym jonem miedzi (II) (czerwona kulka) oddziałującym z dwoma resztami histydyny w pętli AS.

## 5. Badanie wpływu jonów $\text{Cu}^{2+}$ na fibrylizację cystatyny C

W organizmie człowieka w stanie chorobowym oligomeryzacja mutantu L68Q zachodzi szybko i samorzutnie, gdyż wariant ten jest wysoce niestabilny i łatwo agreguje. Otrzymanie i badanie go w warunkach laboratoryjnych z uwagi na jego właściwości jest dość trudne, ponieważ rozpuszczony w roztworze o pH około 7 i niższym szybko dimeryzuje [204]. Z tego względu eksperymenty dotyczące fibrylizacji hCC postanowiłam wykonać głównie na białku typu dzikiego (charakteryzującego się wyższą stabilnością) oraz dodatkowo, na nadprodukowanych przeze mnie mutantach. Agregacja hCC WT nie zachodzi jednak samoistnie, a musi zostać wymuszona odpowiednimi parametrami środowiska. W literaturze znaleźć można ustalone już warunki fibrylizacji cystatyny C typu dzikiego [155]. Zakładają one zastosowanie podczas inkubacji próbek wysokiego

stężenia białka (3 mg/ml), niskiego pH (4,0), buforu octanowego oraz podwyższonej temperatury (48 °C) i to właśnie od takich warunków postanowiłam rozpocząć kolejną serię eksperymentów, w których w dalszej kolejności modyfikowałam poszczególne parametry (bufor, stężenie białka, moc wytrząsania oraz pH). Jedyną stałą stosowaną w każdym eksperymencie była ilość jonów miedzi (II), którą każdorazowo dodawałam zgodnie z proporcją 1:1 (molowo) w stosunku do ilości białka. Równoległe do każdego eksperymentu inkubowałam próbki kontrolne niezawierające jonów metalu. W trakcie trwania inkubacji, co kilka dni, pobierałam próbki roztworów i analizowałam je za pomocą metod spektrofлуorymetrycznych sprawdzając zmiany konformacyjne przy użyciu barwnika ANS oraz obecność fibryli za pomocą tioflawiny T. Dodatkowo wybrane próbki poddawałam analizie chromatograficznej oraz analizie TEM.

### 5.1 Fibrylizacja w pH 4,0

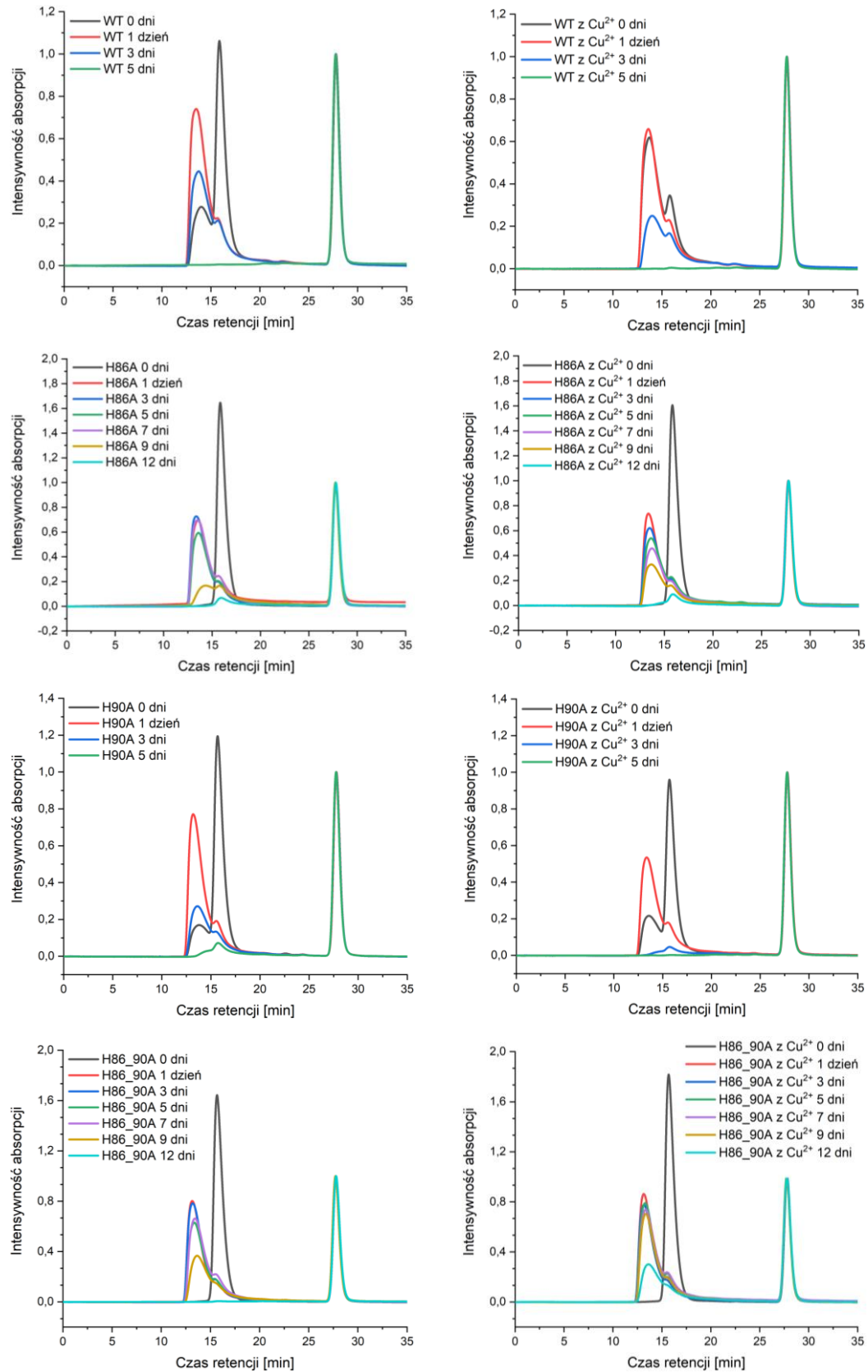
#### Eksperyment I

Warunki fibrylizacji cystatyny C wykorzystane podczas Eksperymentu I przedstawiłam w **Tabeli 17** i były one zgodne z warunkami literaturowymi [155]. Do badania wykorzystałam hCC typu dzikiego oraz pozostałe trzy nadprodukowane przeze mnie warianty.

**Tabela 17** Warunki fibrylizacji białek wykorzystane w Eksperymentcie I.

Stężenie białka	Skład buforu	pH	Ilość jonów Cu <sup>2+</sup>	Temperatura	Wytrząsanie	Długość inkubacji
3 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	600 rpm	14 dni

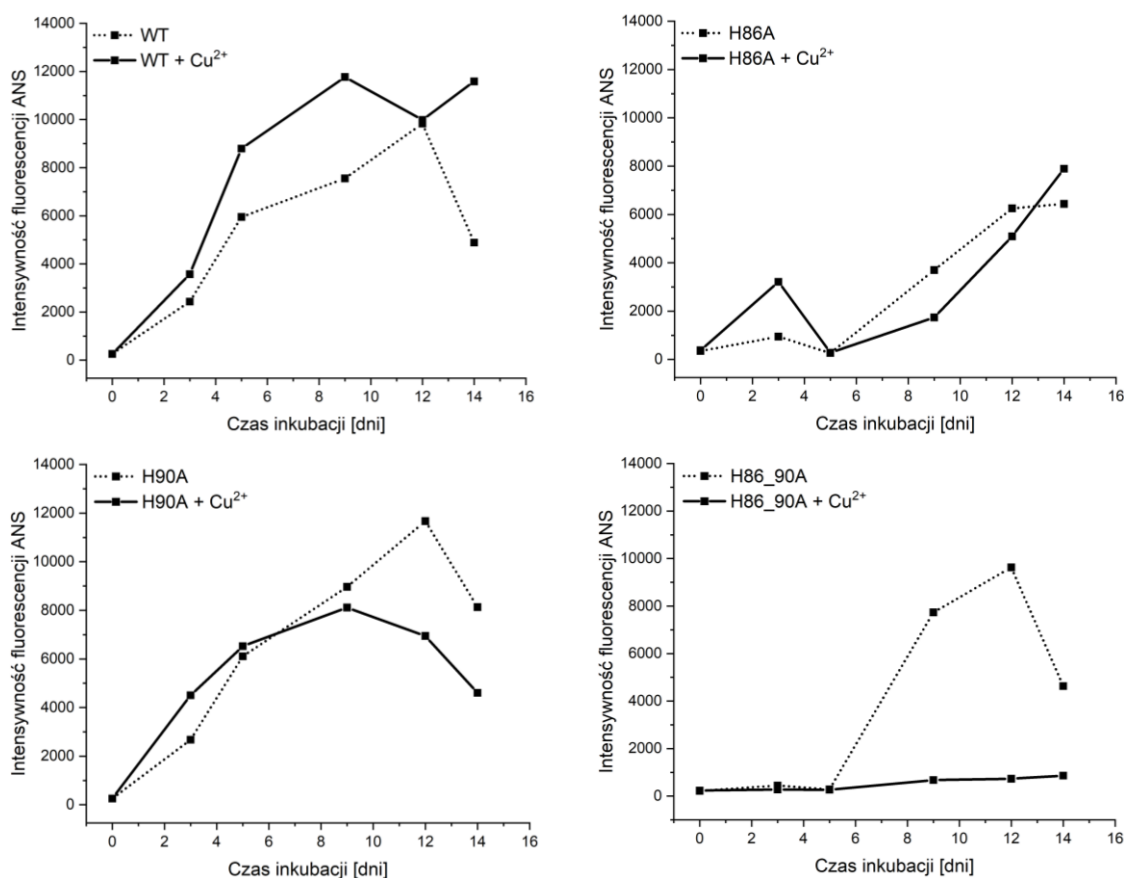
Podczas pierwszych prób fibrylizacji białka inkubowałam przez 21 dni. Okazało się jednak, że po około dwóch tygodniach otrzymane fibryle zaczynały się ze sobą zlepiać tworząc większe struktury, co skutkowało znacznym obniżeniem ich oddziaływania z tioflawiną T. W związku z powyższym w dalszej części rozprawy przedstawię wyniki otrzymane do maksymalnie 14-tego dnia inkubacji. W pierwszej kolejności, na **Rycinie 65**, umieściłam wyniki analiz chromatograficznych próbek pobranych w 0, 1, 3, 5 oraz dla wybranych w 7, 9 i 12 dniu inkubacji. Wykresy uprzednio znormalizowałam w celu ułatwienia ich interpretacji.



**Rycina 65** Chromatogramy z analizy SEC próbek cystatyny C i jej mutantów pobranych podczas inkubacji w warunkach Eksperymentu I. pik przy 13 min – dimer białka; pik przy 16 min – monomer białka; pik przy 28 min – chlorowodorek benzamidyny

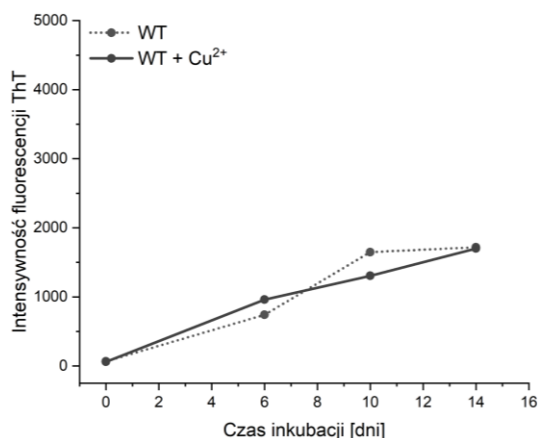


Białka WT i H90A po 5 dniach inkubacji całkowicie zoligomeryzowały czego dowodem jest widoczny na chromatogramach brak sygnałów od rozpuszczalnych form białka (monomeru i dimeru). W próbkach zawierających jony miedzi proces ten w obu przypadkach przebiegł nieco szybciej. Jest to widoczne szczególnie dla białka typu dzikiego inkubowanego z  $\text{Cu}^{2+}$ , które zdimeryzowało zaraz po rozpuszczeniu w buforze inkubacyjnym. Białka H86A oraz H86\_90A w postaci mono- lub dimerycznej pozostały w roztworze znacznie dłużej. Wariant H86A w 12 dniu inkubacji wykazywał jeszcze obecność śladowych ilości formy monomerycznej. Wariant H86\_90A inkubowany bez jonów miedzi (II), w tym samym czasie całkowicie zoligomeryzował, podczas gdy inkubowany z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  znajdował się jeszcze w znaczącej ilości w roztworze. Kolejne, zaprezentowane na **Rycinie 66**, wyniki dotyczą analizy inkubowanych próbek metodą spektrofлуometry wykorzystującą barwnik fluorescencyjny ANS.



**Rycina 66** Wykresy zależności intensywności fluorescencji ANS przy 470 nm od dnia inkubacji białek w warunkach Eksperymentu I.

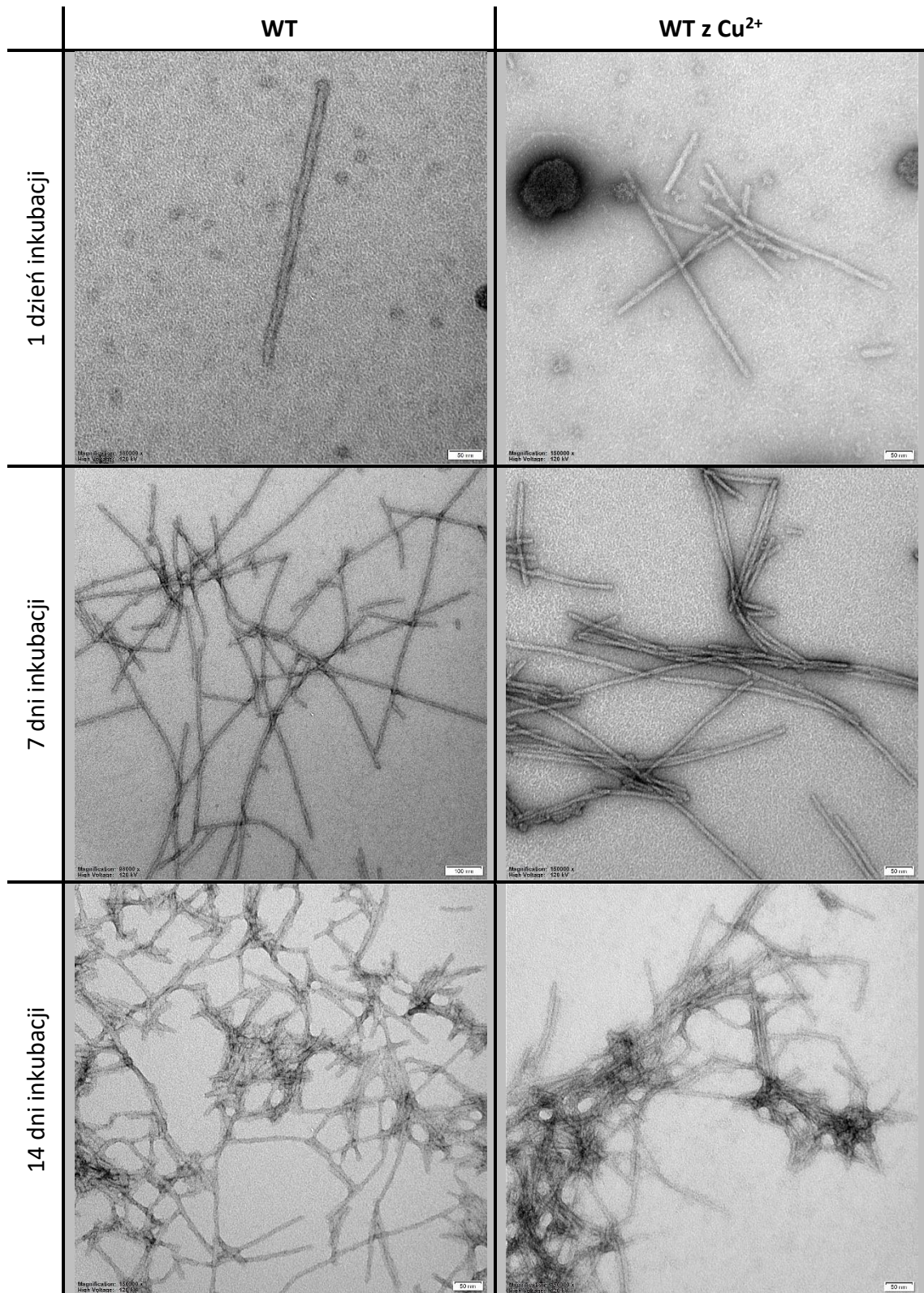
W każdej z analizowanych próbek poza próbką H86\_90A z  $\text{Cu}^{2+}$  można zauważyć wzrost intensywności fluorescencji w czasie inkubacji, co wiąże się ze zmianami konformacyjnymi i oligomeryzacją białek. Dla wariantów WT, H86A oraz H90A obie krzywe (dla próbek z miedzią i bez) charakteryzują się zbliżoną tendencją wzrostową. Wyniki te po przeprowadzeniu kilku powtórzeń okazały się jednak mało powtarzalne. Każdorazowo pokazywały podobną tendencję wzrostową do dnia 10-14 jednak same wartości intensywności fluorescencji odbiegały od siebie na tyle, że postanowiłam przy kolejnych eksperymentach nie wykonywać ponownie tego doświadczenia. Bardziej wiarygodnym testem monitorującym zmiany zachodzące w roztworze i wykrywającym obecność fibryli w badanych próbkach miał być test tioflawinowy. Poniżej, na **Rycinie 67**, przedstawiłam wyniki testu tioflawinowego dla cystatyny C typu dzikiego.



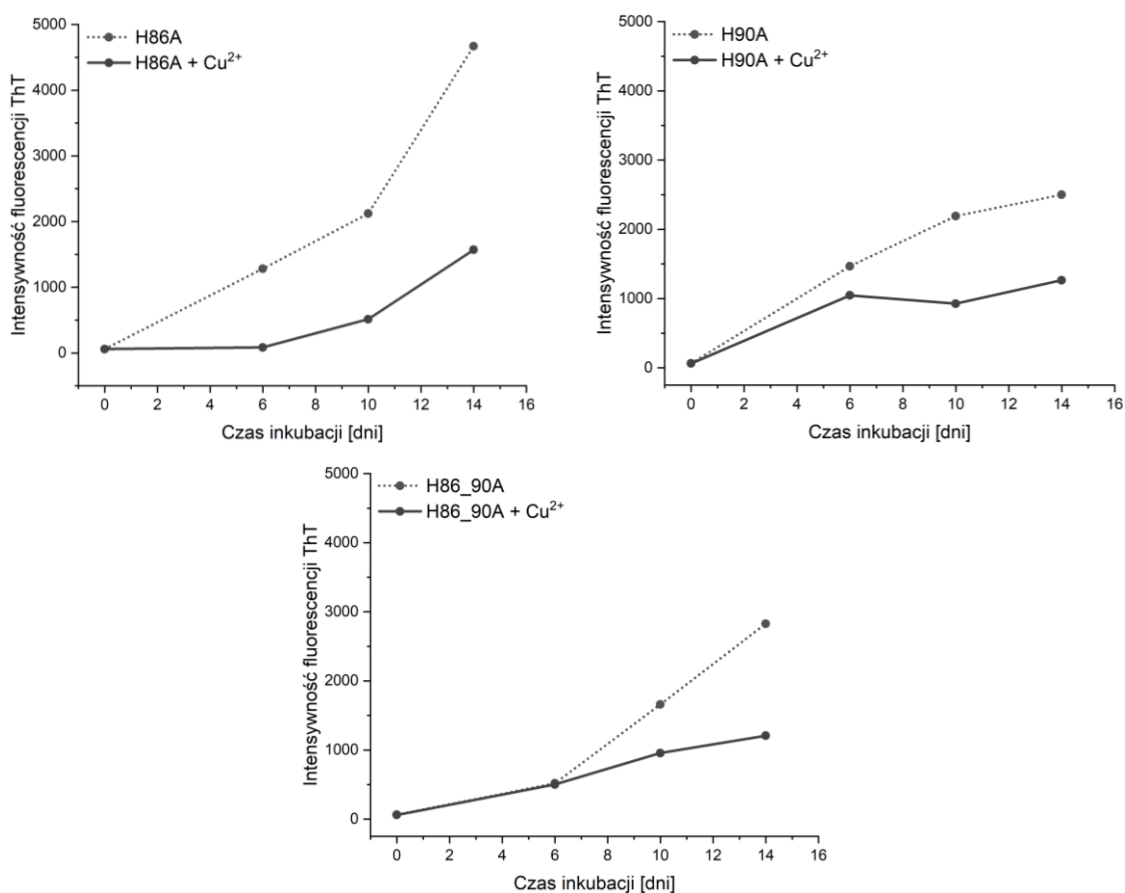
**Rycina 67** Wykres zależności intensywności fluorescencji ThT przy 485 nm od dnia inkubacji próbek cystatyny C typu dzikiego w warunkach Eksperymentu I.

Intensywność emisji fluorescencji tioflawiny T nie różniła się znacząco dla próbki inkubowanej z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  i próbki inkubowanej bez nich. Obie charakteryzowały się stałym przyrostem wartości intensywności fluorescencji aż do 14 dnia eksperymentu, co świadczyło o prawdopodobnym pojawieniu się w obu roztworach fibryli białkowych lub struktur fibrylopodobnych. Potwierdzeniem tej hipotezy były wykonane w dalszej kolejności zdjęcia TEM przedstawione w **Tabeli 18**.

**Tabela 18** Zdjęcia TEM próbek cystatyny C typu dzikiego pobranych w 1, 7 i 14 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu I.



W próbkach hCC typu dzikiego protofibryle pojawiły się już po kilkunastu godzinach inkubacji zarówno w roztworze z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  jak i bez. W dniu 7 dojrzałe już fibryle w obu próbkach charakteryzowały się bardzo zbliżoną morfologią. Były to długie proste włókna o różnej długości i szerokości w granicach 10-14 nm. W 14 dniu inkubacji, kiedy tioflawina wykazywała największą intensywność fluorescencji, w obu przypadkach fibryle zaczynały już zlepiać się ze sobą tworząc większe zbite agregaty. Dodatek jonów miedzi w niniejszym eksperymencie nie wpłynął zatem na zdolność do fibrylizacji cystatyny C typu dzikiego. Nieco inaczej wyniki prezentowały się dla pozostałych wariantów hCC. Wykresy intensywności emisji fluorescencji ThT dla białek H86A, H90A i H86\_90A przedstawiłam na **Rycinie 68**.

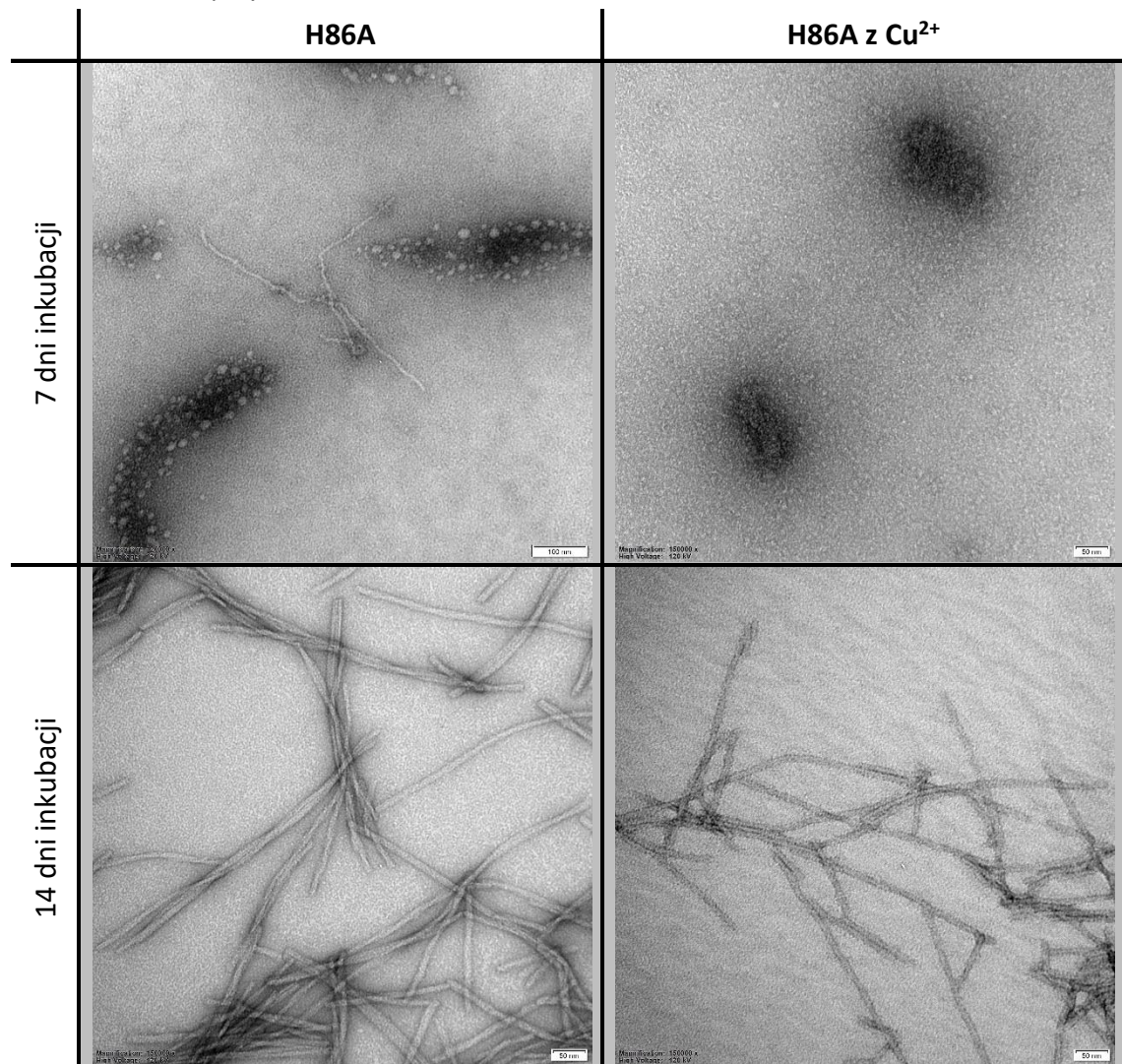


**Rycina 68** Wykresy zależności intensywności fluorescencji ThT przy 485 nm od dnia inkubacji białek w warunkach Eksperymentu I.

W przypadku pozostałych wariantów hCC zaobserwować można, że intensywność fluorescencji tioflawiny T również rośnie w czasie, ale dla próbek z dodatkiem

jonów miedzi (II) wykazuje ona wartości niższe. Może się to wiązać z formowaniem włókiełek o nieco innej, mniej uporządkowanej budowie wewnętrznej. Dotyczy to zwłaszcza białka H86A, dla którego ta różnica intensywności fluorescencji między próbką z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  i bez nich w dniu 14 jest największa. Występowanie różnic morfologicznych powstałych fibryli lub ich brak sprawdziłam za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Wykonane zdjęcia przedstawiłam w **Tabelach 19-21**.

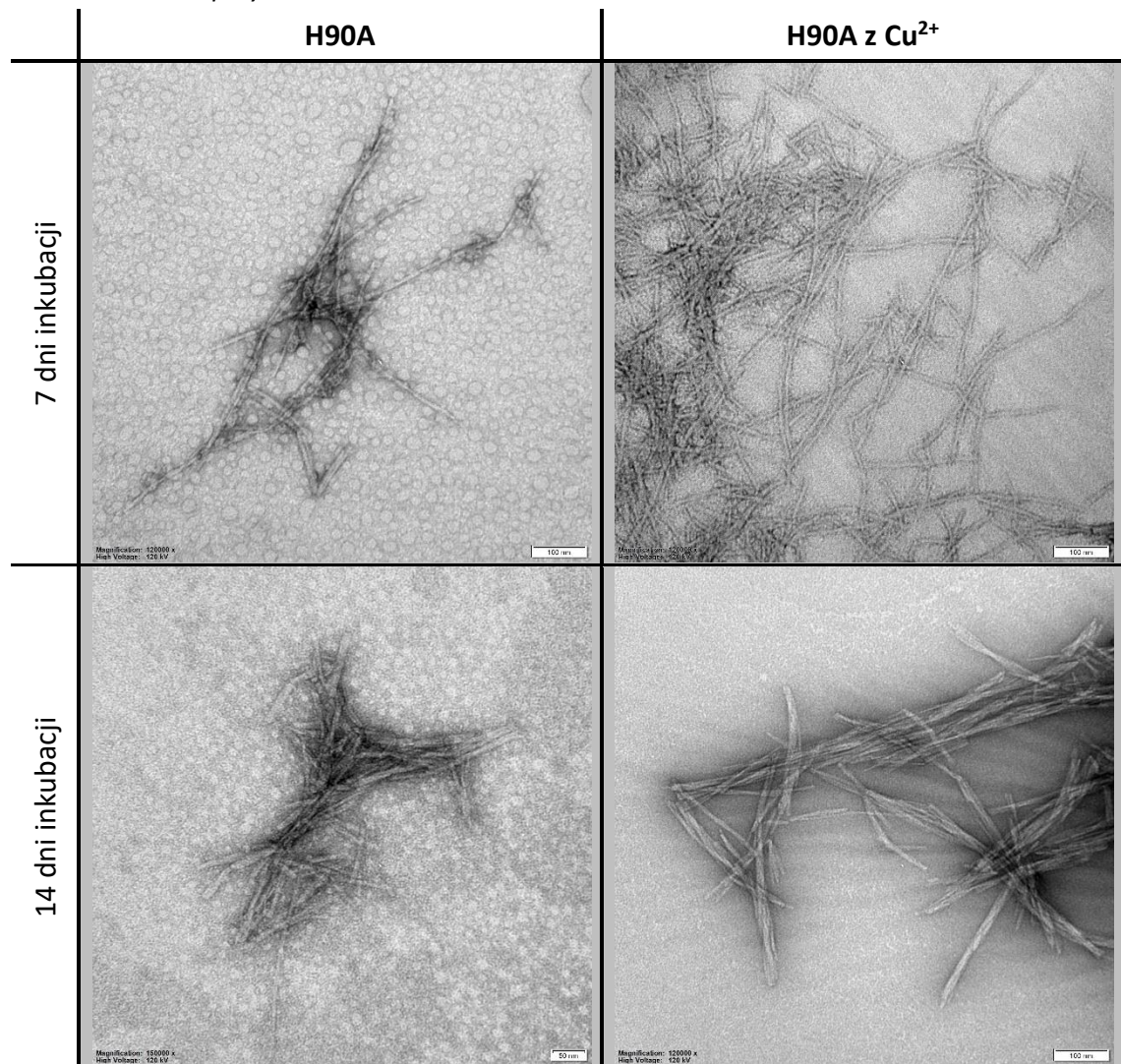
**Tabela 19** Zdjęcia TEM próbek białka hCC H86A pobranych w 7 i 14 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu I.



Dla muteiny hCC H86A, pomimo wzrostu intensywności fluorescencji ThT również w 7 dniu inkubacji, w roztworach nie zaobserwowałam typowych dojrzałych struktur fibrylarnych. Z tioflawiną T mogły zatem oddziaływać mniejsze, rozpuszczalne oligomery, które stanowiły zarodki fibryli widocznych na zdjęciach wykonanych

w 14 dniu inkubacji lub protofibryle obecne w próbce H86A bez  $\text{Cu}^{2+}$ . W 14 dniu inkubacji dojrzałe już fibryle w roztworze niezawierającym jonów miedzi (II) zaczęły skręcać się ze sobą nawzajem, co w warunkach naturalnych w dalszej kolejności prowadzi do utworzenia złogów białkowych. Fibryle obecne w roztworze zawierającym jony  $\text{Cu}^{2+}$  wyglądają natomiast na gorzej uformowane, pozlepiane ze sobą i nieco cieńsze.

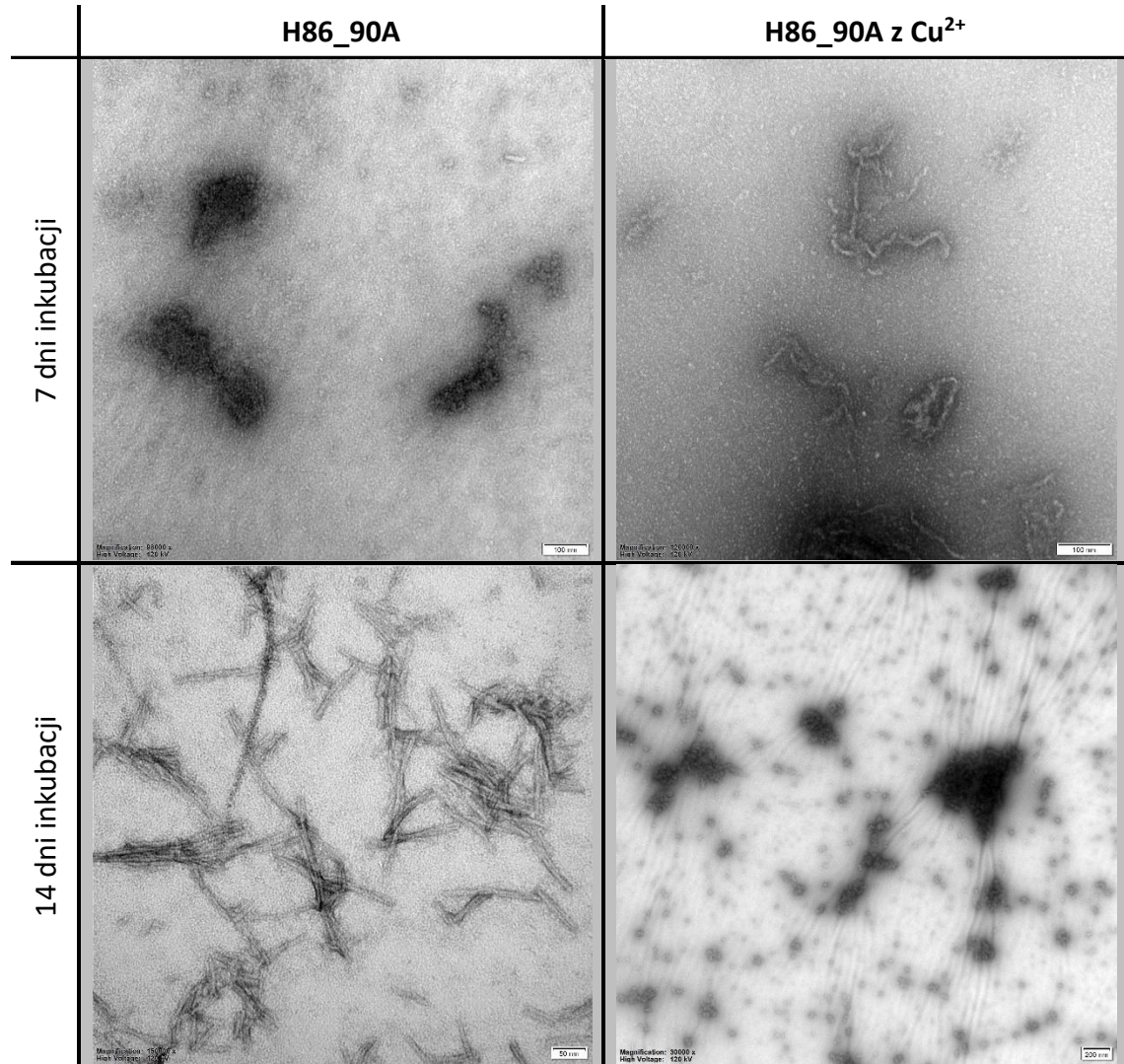
**Tabela 20** Zdjęcia TEM próbek białka hCC H90A pobranych w 7 i 14 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu I.



Wariant H90A podczas fibrylizacji zachował się podobnie do cystatyny C typu dzikiego. Na zdjęciach TEM zaobserwowałam znaczne ilości długich, prostych włókien białkowych o szerokości około 10 nm, które pojawiły się już w 7 dniu inkubacji. Na zdjęciach z dnia 14 widać za to zdecydowanie krótsze i grubsze włókna zbudowane z pozlepianych fibryli. Włókna te charakteryzują się szerokością

o wartościach w granicach 17-24 nm i wyglądają podobnie w próbkach zawierających i niezawierających jonów miedzi (II).

**Tabela 21** Zdjęcia TEM próbek białka hCC H86\_90A pobranych w 7 i 14 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu I.



W próbce wariantu H86\_90A niezawierającej jonów miedzi (II) w dniu 7 inkubacji nie zaobserwowałam żadnych struktur fibrylopodobnych. Pojawiły się one dopiero w dniu 14 inkubacji, jednak były bardzo krótkie i pozlepiane ze sobą. Morfologicznie odbiegały od wyglądu fibryli utworzonych przez warianty WT i H90A. Dodatkowo w próbce inkubowanej z Cu<sup>2+</sup> włókienka w ogóle się nie uformowały. W dniu 14 widać jedynie kilka skupisk białka, przypominających agregaty o wysoce nieuporządkowanej strukturze wewnętrznej.

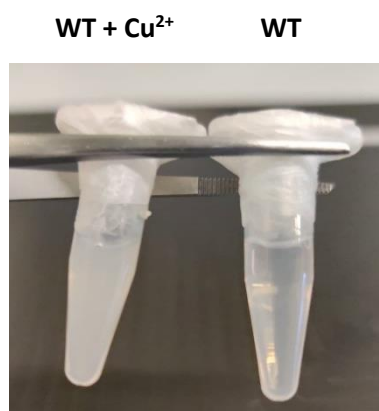
## Eksperyment II

Pierwotne warunki fibrylizacji cystatyny C zakładają zastosowanie silnego wytrząsania próbek przez cały okres inkubacji. W kolejnym eksperymencie postanowiłam sprawdzić czy obniżenie siły wytrząsania wpłynie na zachowanie białek, a przede wszystkim czy w warunkach słabiej indukujących fibrylizację, jony  $\text{Cu}^{2+}$  będą w stanie same ją zaindukować. Dokładne warunki inkubacji zastosowane w Eksperymencie II przedstawiłam w **Tabeli 22**.

**Tabela 22** Warunki fibrylizacji wykorzystane w Eksperymencie II.

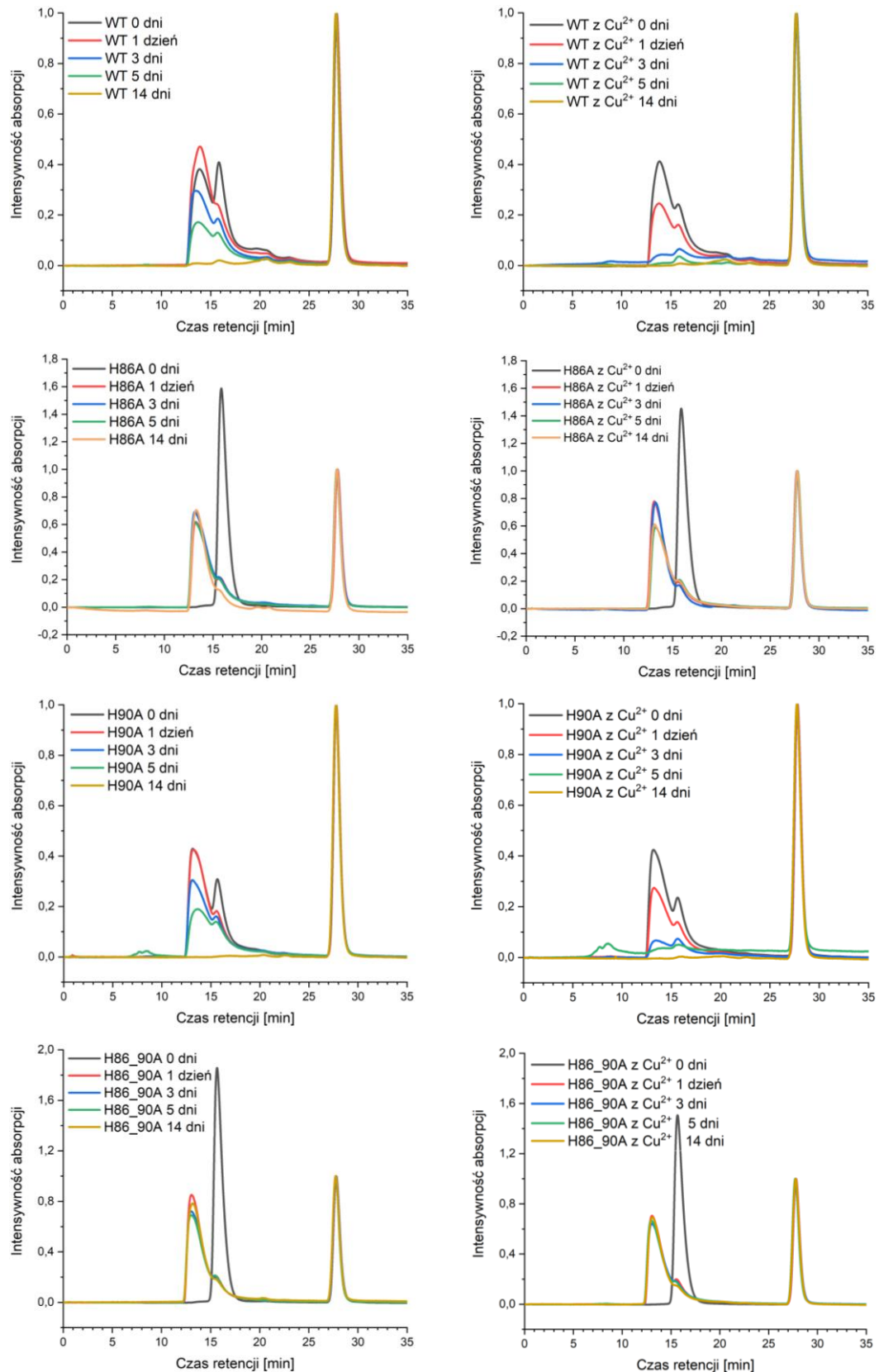
Stężenie białka	Skład buforu	pH	Ilość jonów $\text{Cu}^{2+}$	Temperatura	Wytrząsanie	Długość inkubacji
3 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	300 rpm	21 dni

Na **Rycinie 70** (na kolejnej stronie) umieściłam wyniki analiz chromatograficznych próbek pobranych w 0, 1, 3, 5 i 14 dniu inkubacji. Wykresy znormalizowałam w celu ułatwienia interpretacji. Po 14 dniach inkubacji białka H86A oraz H86\_90A nadal pozostawały rozpuszczone w dużej ilości w roztworze, głównie w formie dimerycznej. Natomiast białka WT oraz H90A całkowicie zagregowały. W roztworach białek WT i H90A inkubowanych w pH 4,0, niezależnie od mocy wytrząsania, już po kilkunastu/kilkudziesięciu godzinach wytrącał się biały osad. W próbkach z dodatkiem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  proces ten zawsze zachodził o kilka godzin szybciej, co przedstawiłam na **Rycinie 69**.



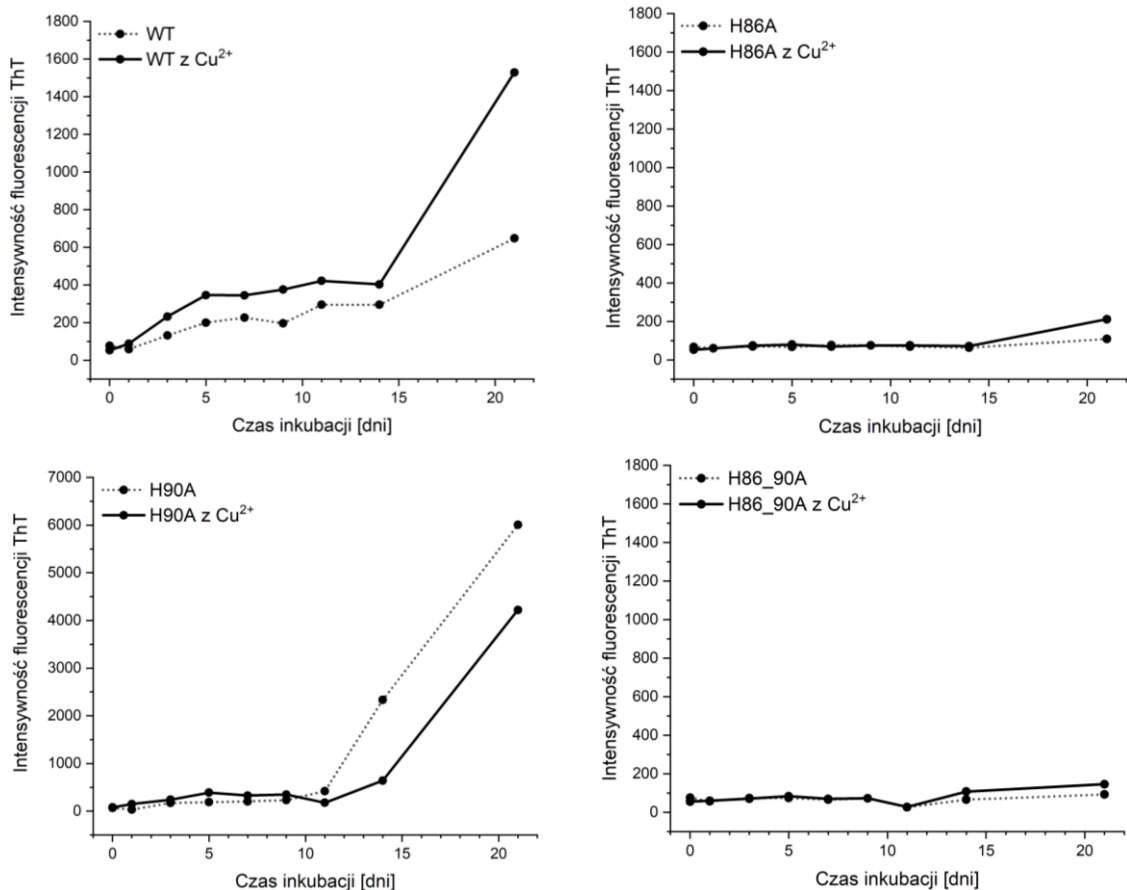
**Rycina 69** Próbki cystatyny C typu dzikiego inkubowane przez 24 godziny w warunkach Eksperymentu II. Z lewej próbka z wytrąconym pod wpływem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  białym osadem białkowym. Z prawej próbka inkubowana bez dodatku jonów miedzi.





**Rycina 70** Chromatogramy z analizy SEC próbek cystatyny C i jej mutantów pobranych podczas inkubacji w warunkach Eksperymentu II. pik przy 13 min – dimer białka; pik przy 16 min – monomer białka; pik przy 28 min – Bza

Wytrącający się osad stanowiły nierozpuszczalne agregaty białkowe, które najczęściej występowały w postaci struktur o charakterze fibrylarnym. Przy okazji Eksperymentu II postanowiłam sprawdzić czy wzrost intensywności fluorescencji zależy od tworzącego się w roztworze osadu czy od rozpuszczalnych oligomerów niewidocznych gołym okiem. Test tioflawinowy wykonałam jednocześnie na próbkach zawierających osad oraz próbkach zawierających sam supernatant. Badanie to jednoznacznie potwierdziło, że to właśnie nierozpuszczalne agregaty odpowiedzialne są za wiązanie barwnika. Odpowiedź ThT dla próbek zawierających sam supernatant, w przypadku wszystkich badanych białek, była na poziomie tła. W dalszej części rozprawy, na **Rycinie 71**, przedstawiłam zatem wyniki tylko dla próbek mierzonych z osadem.

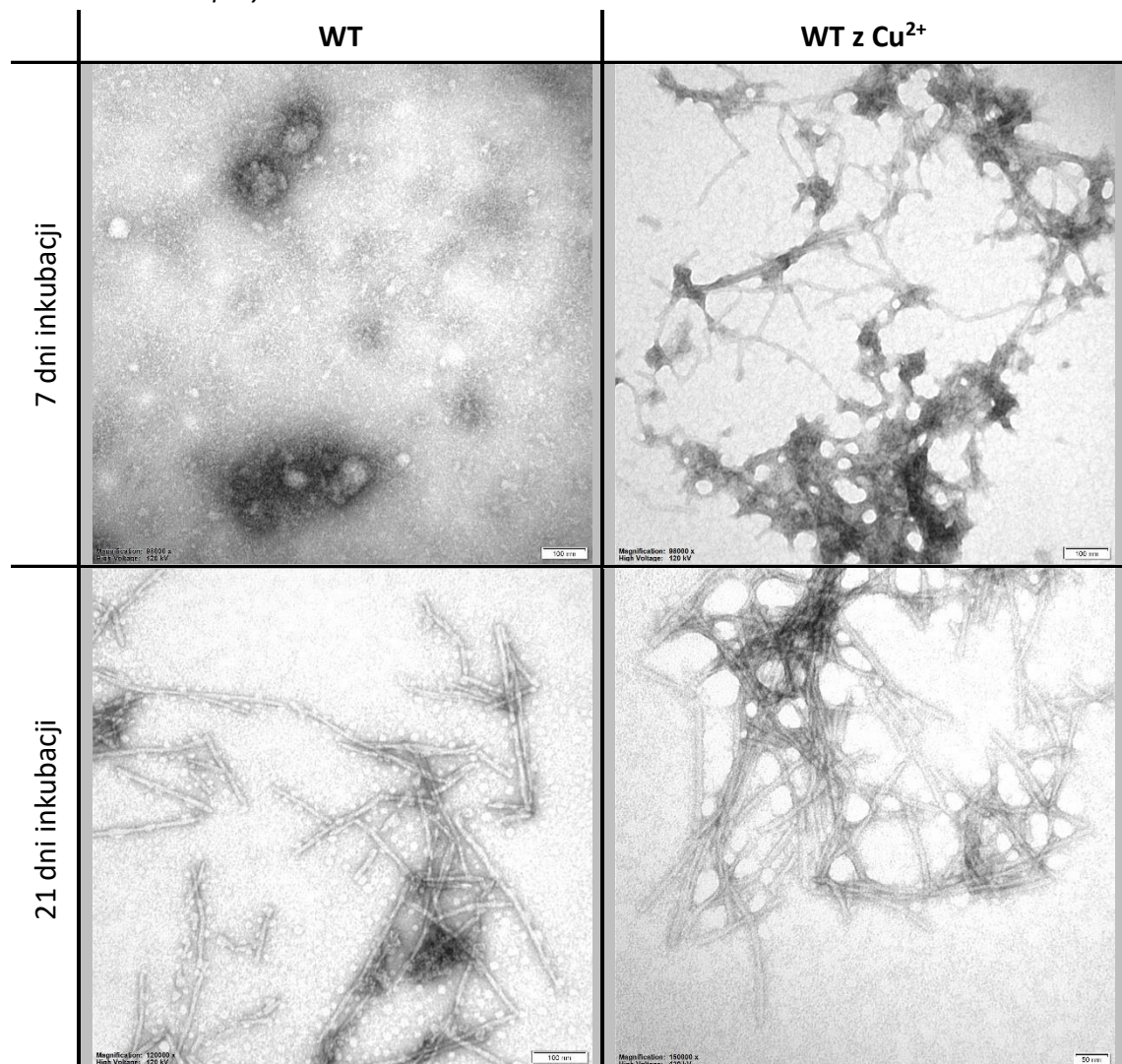


**Rycina 71** Wykresy zależności intensywności fluorescencji ThT przy 485 nm od dnia inkubacji próbek białek w warunkach Eksperymentu II.

W Eksperymentie II fibryle formowały się wolniej, co skłoniło mnie do przedłużenia inkubacji do 21 dni. Szybki wzrost intensywności fluorescencji ThT dla

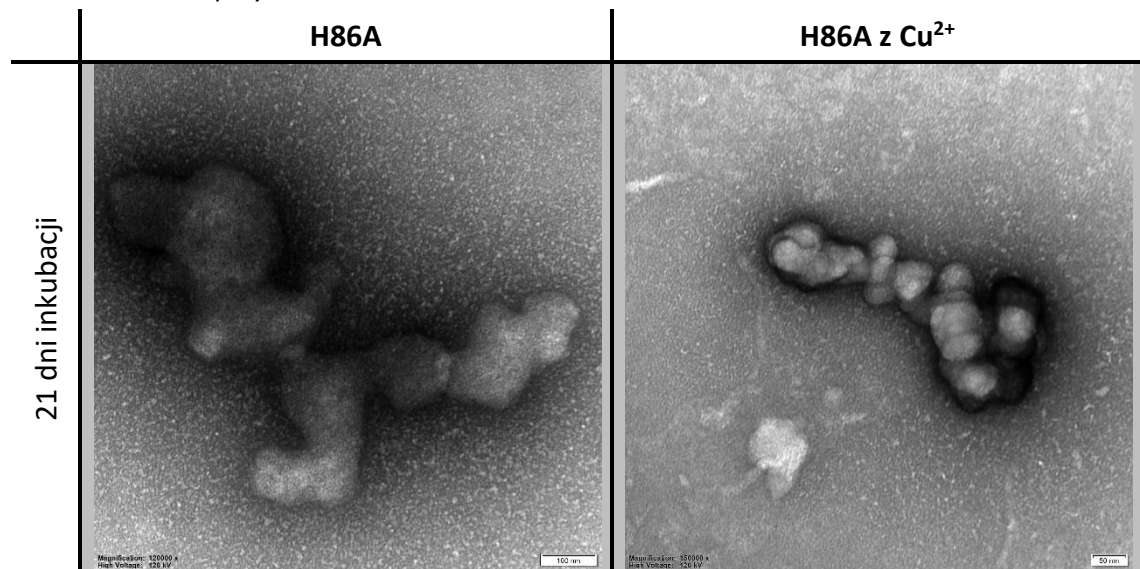
białka typu dzikiego nastąpił dopiero po 14 dniu inkubacji, a dla wariantu H90A po dniu 11. Dodatek jonów  $\text{Cu}^{2+}$  do hCC WT doprowadził do większego przyrostu intensywności fluorescencji w stosunku do próbki niezawierającej jonów.  $\text{Cu}^{2+}$  mogło zaindukować zatem szybsze formowanie struktur fibrylarnych. Odwrotna sytuacja miała miejsce dla wariantu H90A. Tutaj dodatek jonów miedzi (II) skutkowało obniżeniem przyrostu wartości fluorescencji czyli obniżeniem szybkości tworzeni fibryli białkowych lub tworzeniem agregatów charakteryzujących się mniej uporządkowaną strukturą. W próbkach białek H86A i H86\_90A, według testu tioflawinowego, nie pojawiły się żadne struktury fibrylarne zdolne do oddziaływania z ThT. W celu potwierdzenia otrzymanych danych wykonałam zdjęcia TEM próbek w 7 i 21 dniu inkubacji, które przedstawiłam w Tabelach 23-26.

**Tabela 23** Zdjęcia TEM próbek białka hCC WT pobranych w 7 i 21 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu II.



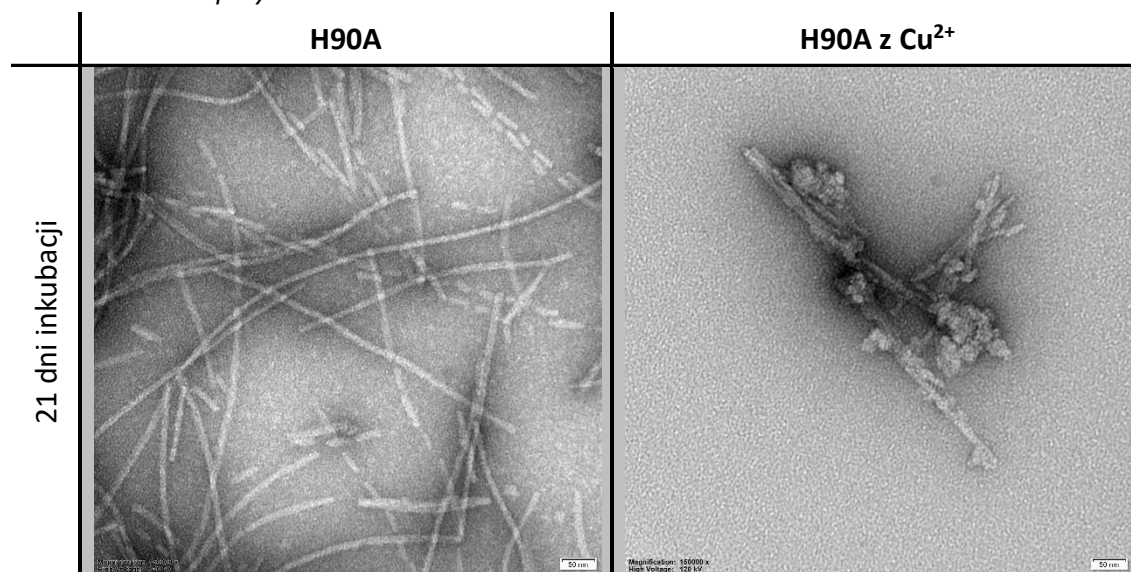
Po 7 dniach inkubacji w próbce niezawierającej jonów miedzi (II) nie zarejestrowano obecności protofibrili, które pojawiły się w próbce z dodatkiem  $\text{Cu}^{2+}$ . W tym przypadku jony miedzi (II) przyspieszyły proces fibrylizacji i wpłynęły korzystnie na formowanie wysoko uporządkowanych struktur  $\beta$ -karkowych. Zdjęcia TEM potwierdziły zatem wyniki testu tioflawinowego dla białka typu dzikiego. Obecne w obu próbkach w dniu 21 inkubacji fibryle charakteryzują się podobną morfologią. Są to długie, proste włókna o szerokości 8-10 nm w próbce „WT” oraz około 13 nm w próbce „WT z  $\text{Cu}^{2+}$ ”.

**Tabela 24** Zdjęcia TEM próbek białka hCC H86A pobranych w 21 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu II.



Zgodnie z oczekiwaniami (brak odpowiedzi ThT w teście tioflawinowym) do samego końca trwania eksperymentu w próbkach zawierających wariant H86A nie pojawiły się żadne struktury fibrylopodobne. Zamiast tego białko wytrąciło się w postaci dużych nierozpuszczalnych, amorficznych agregatów widocznych na powyższych zdjęciach TEM.

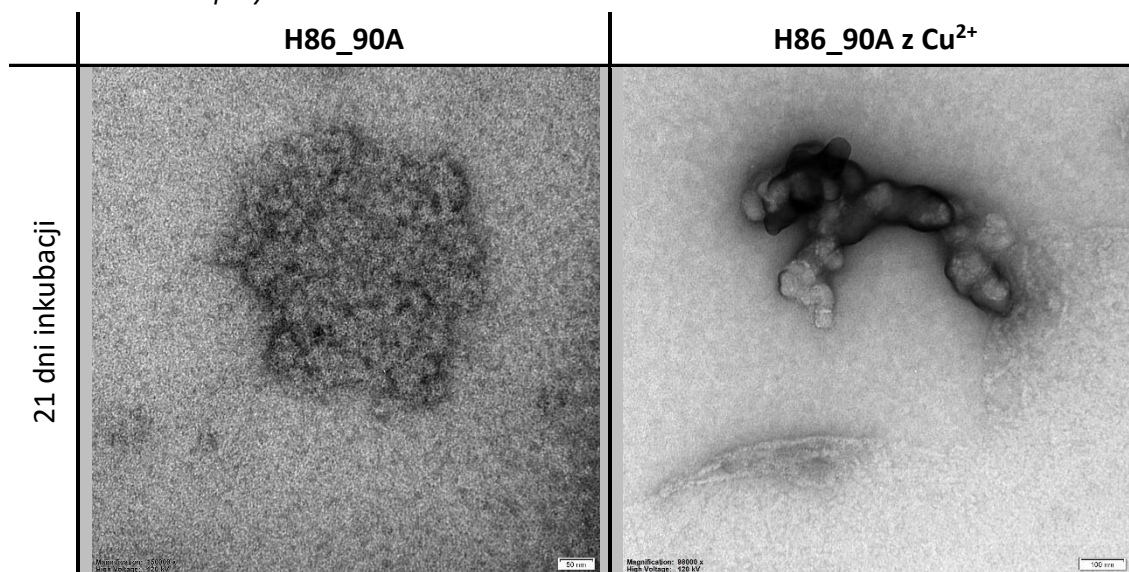
**Tabela 25** Zdjęcia TEM próbek białka hCC H90A pobranych w 21 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu II.



W 7 dniu inkubacji wariantu H90A na zdjęciach TEM nie zaobserwowałam żadnych struktur o charakterze włókienkowym. Zmieniało się to w 21 dniu inkubacji, kiedy to w próbce niezawierającej jonów miedzi (II), dla której zanotowałam bardzo wysoki wzrost intensywności fluorescencji ThT, zaobserwowałam w pełni uformowane proste fibryle białkowe o różnych długościach. Zupełnie inaczej wyglądała próbka H90A inkubowana z Cu<sup>2+</sup>. Na większości jej zdjęć TEM widać było duże, nierozpuszczalne, amorficzne agregaty białkowe, co nie zgadzało się ze znacznym wzrostem intensywności fluorescencji ThT w trakcie inkubacji. Jedno ze zdjęć (to przedstawione w **Tabeli 25**) tłumaczy zaistniałe zjawisko. Widać na nim krótkie podłużne struktury fibrylopodobne oblepione amorficznymi agregatami białkowymi. Te krótkie włókienka zbudowane są najprawdopodobniej z wysoko uporządkowanych struktur  $\beta$ -karktowych i to właśnie one oddziaływały z tioflawiną T. Struktury te różnią się jednak znacznie pod względem morfologicznym od fibryli uzyskanych podczas inkubacji białka bez dodatku Cu<sup>2+</sup>. Są grubsze i krótsze, a w dodatku postrzępione i pozlepiane ze sobą, co wskazuje na zajście mniej specyficznego i uporządkowanego procesu agregacji.

Zdjęcia TEM wykonane dla podwójnego mutantu cystatyny C (**Tabela 26**) również okazały się zgodne z oczekiwaniami. Nie zaobserwowałam na nich obecności fibryli białkowych, ani żadnych struktur o charakterze włókienkowym. W obu próbkach z roztworu wytrąciły się jedynie duże, amorficzne agregaty.

**Tabela 26** Zdjęcia TEM próbek białka hCC H86\_90A pobranych w 21 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu II.



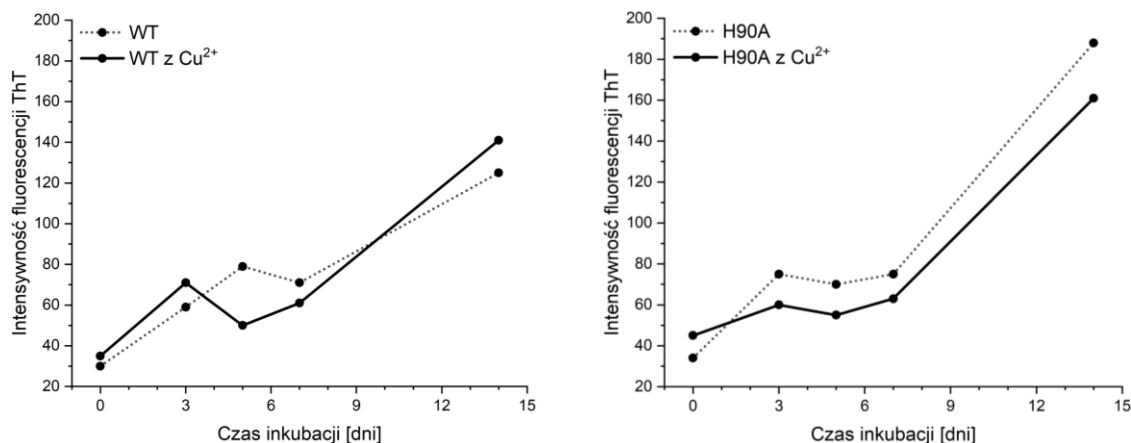
### Eksperyment III

W kolejnym eksperymencie postanowiłam sprawdzić jak na proces agregacji białek wpłynie całkowity brak wytrąsania podczas całego okresu inkubacji. Do badania wykorzystałam cystatynę C typu dzikiego oraz wariant H90A czyli białka, które uformowały fibryle w poprzednim eksperymencie. Dokładne warunki kolejnej inkubacji przedstawiłam w **Tabeli 27**.

**Tabela 27** Warunki fibrylizacji wykorzystane w Eksperymentcie III.

Stężenie białka	Skład buforu	pH	Ilość jonów Cu <sup>2+</sup>	Temperatura	Wytrąsanie	Długość inkubacji
3 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	brak	14 dni

W żadnej z badanych próbek nie zaobserwowałam agregatów o charakterze włókienkowym, co wnioskuję z wyników testu tioflawinowego przedstawionych na **Rycinie 72**. Odpowiedź ThT nie przekroczyła wartości 200, nawet po 14 dniach inkubacji. We wszystkich próbkach pojawił się natomiast osad, co może sugerować utworzenie agregatów o charakterze niefibrylarnym i strukturalnie nieuporządkowanym. Ze względu na całkowite strącenie białek potwierdzone metodą chromatografii sączenia molekularnego, eksperyment przerwałam po dwóch tygodniach inkubacji.



**Rycina 72** Wykresy zależności intensywności fluorescencji ThT przy 485 nm od dnia inkubacji próbek białek w warunkach Eksperymentu III.

#### Eksperyment IV

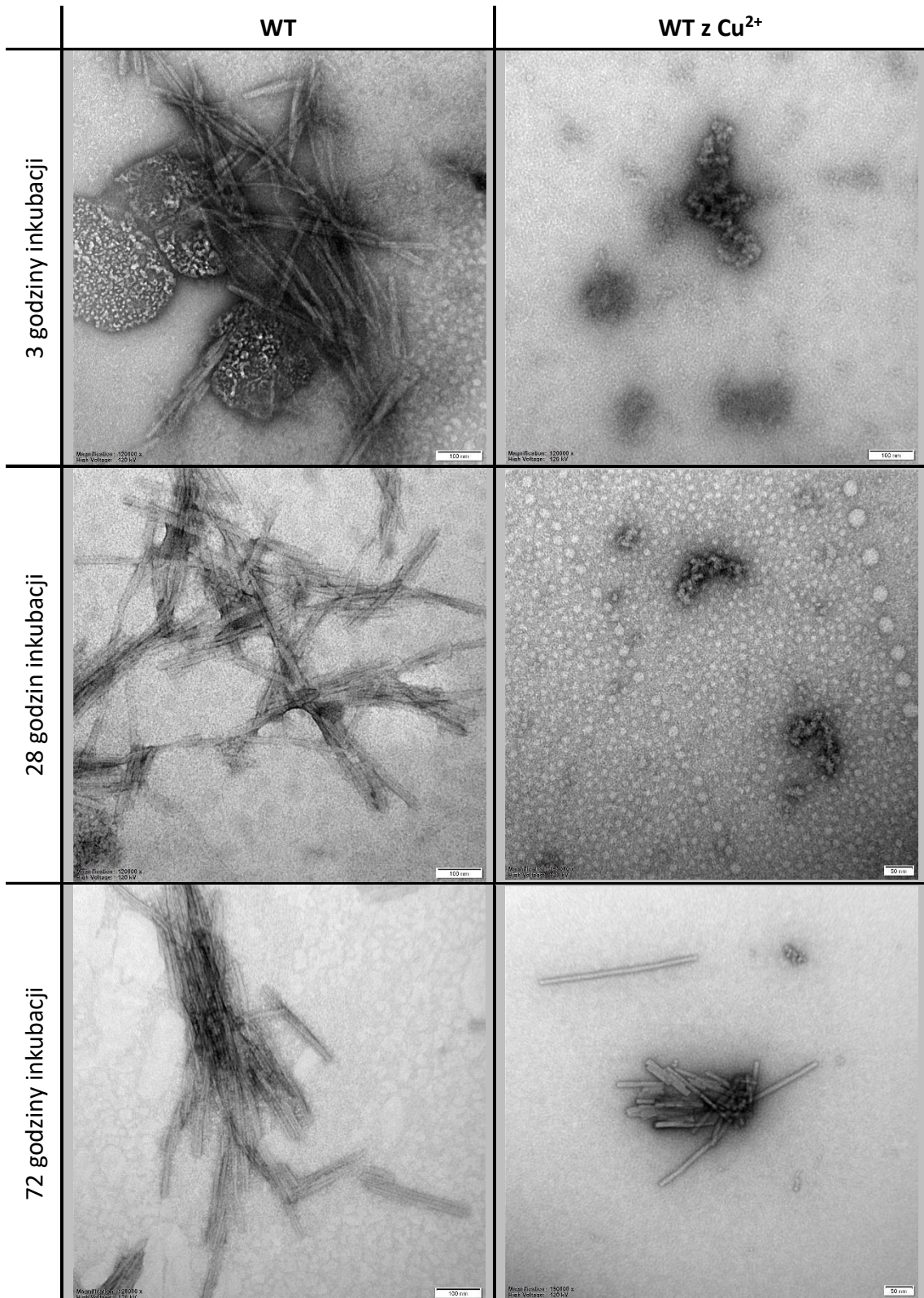
Kolejne badanie postanowiłam przeprowadzić tylko dla cystatyny C typu dzikiego w warunkach zastosowanych w Eksperymentie I (czyli z silnym wytrząsaniem), ale stosując przy tym dużo niższe stężenie białka równe 0,25 mg/ml. Wybór takich warunków związany był z badaniami wykonanymi przez Jahic i współpracowników [205], w których pomimo zastosowania tak niskiego stężenia białka udało się otrzymać fibryle. Obniżenie stężenia pozwoliło mi spowolnić proces oligomeryzacji i zbadać jego początkowe etapy. Dokładne warunki prowadzonej fibrylizacji przedstawiłam w **Tabeli 28**.

**Tabela 28** Warunki fibrylizacji wykorzystane w Eksperymentie IV.

Stężenie białka	Skład buforu	pH	Ilość jonów Cu <sup>2+</sup>	Temperatura	Wytrząsanie	Długość inkubacji
0,25 mg/ml	25 mM octan sodu, 150 mM NaCl	4,0	1 : 1 (molowo)	48 °C	600 rpm	72 godziny

Tym razem próbki białka inkubowałam zaledwie 72 godziny wykonując w międzyczasie test tioflawinowy oraz zdjęcia TEM. Podczas trwania całego eksperymentu odpowiedź ThT plasowała się na poziomie tła (była znikoma), dlatego zakładałam brak jakichkolwiek struktur fibrylopodobnych w badanych roztworach. Pomimo tego zleciłam wykonanie zdjęcia TEM próbek po 3, 28 i 72 godzinach inkubacji. Otrzymane obrazy przedstawiłam w **Tabeli 29**.

**Tabela 29** Zdjęcia TEM próbek cystatyny C typu dzikiego pobranych w 3, 28 i 72 godzinie inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu IV.



Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego okazały się dość zaskakujące. Pomimo negatywnego wyniku testu tioflawinowego na zdjęciach TEM



zaobserwowałam długie proste struktury włókienkowe. Brak oddziaływania uformowanych włókienek z tioflawiną T może świadczyć o tym, że widoczne na zdjęciach struktury nie mają jeszcze typowej budowy fibrylarnej, a raczej protofibrylarną, z której w dalszej kolejności powinny uformować się dojrzałe fibryle białkowe. Ponad to widoczne na zdjęciach agregaty są mocno pozlepiane (dotyczy to głównie próbki WT bez dodatku  $\text{Cu}^{2+}$ ). Dodatek jonów miedzi (II) znacznie opóźnił proces fibrylizacji. Jedną z teorii tłumaczących to zjawisko mówi o tym, że jony  $\text{Cu}^{2+}$  stabilizują formy dimeryczne i/lub niskooligomeryczne białka, co chwilowo zapobiega tworzeniu większych agregatów, a druga, że miedź zmienia mechanizm oligomeryzacji nie wpływając jednak na morfologię powstałych struktur (wskazują na to poprzednie eksperymenty).

## 5.2 Fibrylizacja w pH 6,9

Zastosowanie niskiego pH (4,0) do fibrylizacji cystatyny C mogło spowodować protonowanie pierścieni histydynowych. Proces ten zależy od wielu czynników takich jak położenie reszt His w łańcuchu oraz ich otoczenie chemiczne. Protonowanie jednak uniemożliwiłoby oddziaływanie z dodatnio naładowanymi jonami  $\text{Cu}^{2+}$ , a wpływ na proces fibrylizacji miałyby jedynie oddziaływania niespecyficzne. Z tego względu w kolejnych etapach postanowiłam sprawdzić czy obecność jonów  $\text{Cu}^{2+}$  umożliwi fibrylizację cystatyny C typu dzikiego w warunkach, w których normalnie ta fibrylizacja nie zachodzi czyli w pH zbliżonym do fizjologicznego. Zakres używalności buforu octanowego waha się w granicach pH 3,6-5,6, dlatego kolejny eksperyment przeprowadziłam w buforze kakodylanowym.

### Eksperyment V

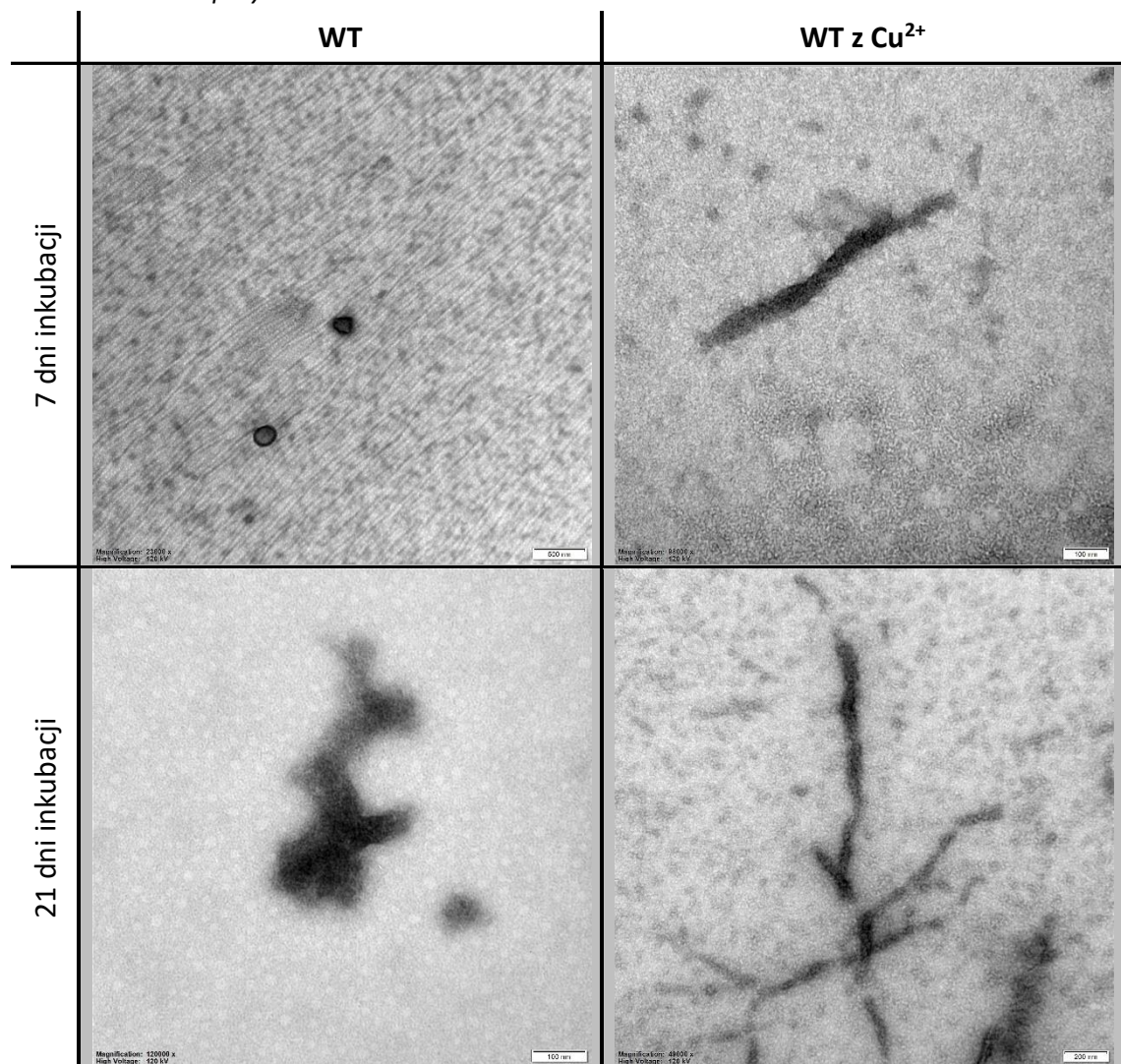
Ostatni już eksperyment związany z fibrylizacją wykonałam tylko na białku typu dzikiego w buforze kakodylanowym, w warunkach przedstawionych w **Tabeli 30**.

**Tabela 30** Warunki fibrylizacji wykorzystane w Eksperymentcie V.

Stężenie białka	Skład buforu	pH	Ilość jonów $\text{Cu}^{2+}$	Temperatura	Wytrząsanie	Długość inkubacji
3 mg/ml	10 mM kakodylan sodu, 50 mM NaCl	6,9	1 : 1 (molowo)	48 °C	600 rpm	21 dni

W próbce zawierającej jony miedzi (II) biały osad strącił się już po 3 godzinach inkubacji podczas gdy osad w próbce niezawierającej  $\text{Cu}^{2+}$  w dużych ilościach pojawił się dopiero po 13 dniach trwania eksperymentu. W obu próbkach każdorazowo test tioflawinowy dawał wynik negatywny. Intensywność fluorescencji ThT plasowała się na poziomie tła. Pomimo tego postanowiłam wykonać zdjęcia TEM próbek pobranych w 7 i 14 dniu inkubacji. Wybrane z nich przedstawiam w **Tabeli 31**.

**Tabela 31** Zdjęcia TEM próbek białka hCC WT pobranych w 7 i 21 dniu inkubacji prowadzonej w warunkach Eksperymentu V.



W próbkach inkubowanych bez dodatku jonów miedzi (II) w 21 dniu inkubacji widoczne są zbite agregaty białkowe, które w żaden sposób nie przypominają włókien białkowych. Natomiast w próbce inkubowanej z dodatkiem  $\text{Cu}^{2+}$  na obu zdjęciach widać wydłużone pseudofibrylarne struktury. Agregaty te nie są typowymi fibrylami bądź

protofibrilami, gdyż nawet w minimalnym stopniu nie oddziałują z tioflawiną T. Ponadto na zdjęciach TEM są ciemne i mocno zbite. Morfologicznie, poza wydłużonym kształtem, nie przypominają fibryli białkowych. Mimo tych różnic inkubacja w buforze kakodylanowym pozwoliła mi na otrzymanie agregatów fibrylopodobnych w pH zbliżonym do fizjologicznego. Co więcej, było to możliwe jedynie w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ , które zaindukowały proces agregacji tuż po rozpuszczeniu białek w buforze inkubacyjnym.

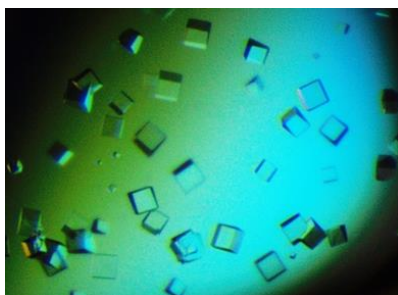
## 6. Krystalizacja białek i analiza struktur krystalicznych

Mutanty cystatyny C nadprodukowane i scharakteryzowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej nie były nigdy wcześniej otrzymywane i badane. Do tej pory w bazie PDB umieszczono już kilka struktur wariantów cystatyny C, łącznie z białkiem typu dzikiego. Duża część dotychczasowych eksperymentów wprowadzających mutacje do sekwencji hCC miała za zadanie ustalić mechanizm jej dimeryzacji czyli stabilizować lub destabilizować strukturę cząsteczki [144,145,146,206]. Moje badania natomiast opierały się na charakterystyce oddziaływania białko- $\text{Cu}^{2+}$ . Postanowiłam zatem podjąć próbę krystalizacji nadprodukowanych przeze mnie mutantów w obecności jonów miedzi (II) w celu znalezienia potencjalnego miejsca wiążącego. Zadanie to nie było łatwe ze względu na indukowaną jonami  $\text{Cu}^{2+}$  agregację białka opisaną w poprzednich rozdziałach. Zdecydowana większość testowanych warunków krystalizacji powodowała szybkie wytrącanie hCC z roztworów w postaci białego (białko zagregowane) lub brązowego (białko zdenaturowane) osadu. Z tego względu strategia, którą przyjąłam polegała, w pierwszej kolejności, na znalezieniu warunków krystalizacji białka bez dodatku jonów miedzi (II), a następnie podjęciu prób krystalizacji z tych samych roztworów, ale z dodatkiem niewielkiego stężenia  $\text{Cu}^{2+}$ , znacznie poniżej proporcji molowej 1:1 (białko : metal) w celu spowolnienia procesu precypitacji. Strategia ta dała efekt tylko w przypadku białka H86A. Krystalizacja wariantów H90A oraz H86\_90A zakończyła się na etapie otrzymania ich struktur krystalicznych bez obecności  $\text{Cu}^{2+}$ , a kryształy białka hCC WT namaczone były w jonach miedzi (II) już po wykrystalizowaniu.

## 6.1 Krystalizacja

### A. Cystatyna C typu dzikiego

Cystatyna C typu dzikiego wykryła w pięciu różnych warunkach krystalizacyjnych. Kryształy pochodzące z czterech z nich podczas wstępnych badań dyfrakcyjnych nie rozpraszają promieniowania rentgenowskiego. Kryształy z kropli piątej powstały w warunkach nr 37 pochodzących z zestawu Index (kryształ oznaczony dalej jako *WT*). Roztwór krystalizacyjny zawierał wodny roztwór 25 % w/v PEG 1500. Podjęłam próbę optymalizacji wyżej wymienionych warunków poprzez manipulację stężeniem PEG 1500 oraz stężeniem białka, jednak nie przyniosła ona oczekiwanych efektów (w żadnej z kropli kryształy nie pojawiły się). Z tego powodu wszystkie opisane dalej eksperymenty prowadziłam na kryształach otrzymanych z kropli pierwotnej, które przedstawione zostały na **Rycinie 73**.



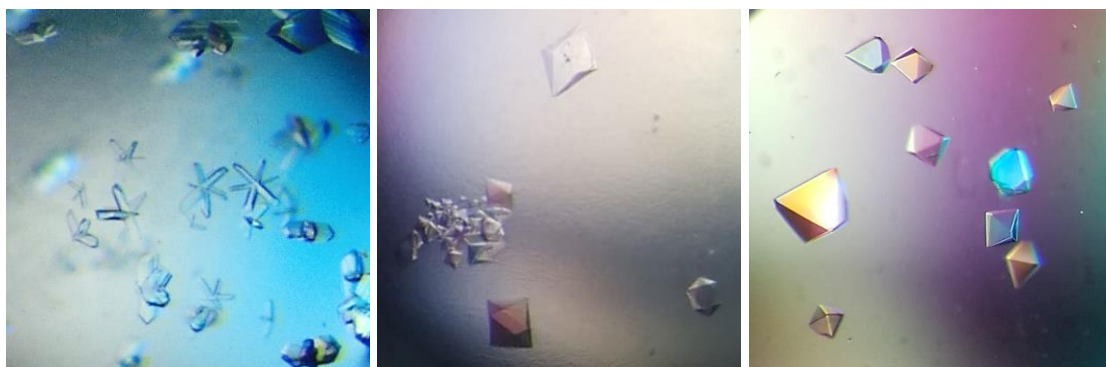
**Rycina 73** Kryształy cystatyny C typu dzikiego otrzymane w roztworze 25 % w/v PEG 1500.

Próbkę krystalizacji cystatyny C typu dzikiego w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  podjęłam ze stężenia 10 mg/ml. Przygotowałam dwa roztwory krystalizacyjne złożone z wodnego roztworu 25 % w/v PEG 1500. Do pierwszego z nich dodałam jony miedzi tak, by ich stężenie końcowe wynosiło 50  $\mu\text{M}$ , a do drugiego 200  $\mu\text{M}$ . W obu kroplach już po kilkunastu godzinach pojawił się drobny osad sugerujący strącenie białka, co uniemożliwiało powstanie kryształów. Podczas kolejnej próby wykorzystałam znane już wcześniej warunki krystalizacji hCC typu dzikiego: 100 mM octan sodu o pH 4,8, 20 mM chlorek wapnia oraz MPD dodane do rezerwuaru w objętości 100  $\mu\text{l}$  w drugim i czwartym dniu krystalizacji [207]. Do wyżej opisanych warunków dodałam jony  $\text{Cu}^{2+}$  w stężeniu 20  $\mu\text{M}$  (niższym niż poprzednio w celu uniknięcia agregacji i wytrącania białka). Po tygodniu inkubacji w kropli pojawiły się kubiczne kryształy, jednak ich słabe rozpraszanie promieniowania uniemożliwiło zebranie dobrej jakości danych

dyfrakcyjnych. Z tego względu postanowiłam namoczyć wykryzalizowane wcześniej kryształy (w warunkach Index (37) - **Rycina 73**) w roztworze jonów miedzi (II). Wybrane kryształy przeniesione zostały do przygotowanej wcześniej kropli zawierającej  $\text{Cu}^{2+}$  w stężeniu 200  $\mu\text{M}$ . Po odpowiednim czasie inkubacji (30 min – kryształ *WT\_Cu30min*, 1 godzina – kryształ *WT\_Cu1h* oraz 2 godziny – kryształ *WT\_Cu2h*) kryształy namoczono w roztworze macierzystym z dodatkiem krioprotektanta w postaci 25 % v/v PEG 400, a następnie zamrożono.

### B. Mutant hCC H86A

Kryształy mutantu H86A pojawiły się w 16 różnych warunkach krystalizacyjnych, a wybrane z nich przedstawiłam na **Rycinie 74**.



**Rycina 74** Kryształy mutantu hCC H86A otrzymane w warunkach od lewej *Morpheus (1-45)*, *Morpheus (2-37)* i *The BCS Screen (1-37)*.

Dokładne składy wymienionych w tej części rozprawy roztworów krystalizacyjnych znajdują się w punkcie V.6.1.E. Większość z otrzymanych kryształów nie rozpraszała promieniowania rentgenowskiego lub wykazywała rozdzielczość obrazów dyfrakcyjnych rzędu 6-12 Å. Optymalizowałam 6 wybranych warunków manipulując pH roztworów i stężeniami ich składników. Wyboru warunków dokonywałam na podstawie jakości danych dyfrakcyjnych otrzymanych we wstępnych pomiarach synchrotronowych. Do optymalizacji wybrałam następujące roztwory (ich składy przedstawia **Tabela 32** na końcu podrozdziału):

- Index (26) – stężenie białka 10 mg/ml,
- Morpheus (1-9) – stężenie białka 20 i 30 mg/ml,
- Morpheus (1-45) – stężenie białka 20 i 30 mg/ml,

- Morpheus (2-33) – stężenie białka 20 mg/ml,
- Morpheus (2-37) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,
- Morpheus (2-38) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml.

Kryształy pojawiły się w większości optymalizowanych warunków. Podczas badań dyfrakcyjnych zebrano łącznie 14 zbiorów danych o rozdzielczości w zakresie 1,95-3 Å. W niniejszej pracy przedstawiam tylko jeden – charakteryzujący się najlepszymi parametrami. Otrzymano go dla kryształu przedstawionego na **Rycinie 75**, powstałego w warunkach pierwotnych Morpheus (1-9) – kryształ oznaczony dalej jako *H86A*.



**Rycina 75** Kryształy mutantu hCC H86A otrzymane w warunkach Morpheus (1-9) z białka o stężeniu 20 mg/ml.

Podjęłam także próbę krystalizacji białka hCC H86A w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ . Wykorzystałam roztwory Morpheus (1-9) oraz Morpheus (1-45), które uzupełniłam o jony miedzi (II) w stężeniu końcowym równym 20  $\mu\text{M}$ . Kryształy pojawiły się w obu warunkach, jednak obrazy dyfrakcyjne o lepszej jakości zarejestrowałam dla kryształu z roztworu pierwszego (kryształ oznaczony dalej jako *H86A\_Cu*).

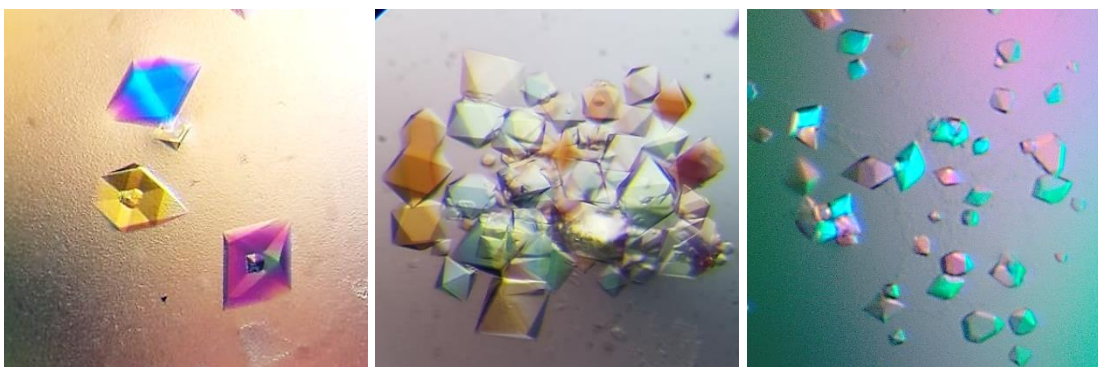
### C. Mutant hCC H90A

Kryształy mutantu H90A pojawiły się w aż 25 różnych warunkach, a wybrane z nich przedstawiłam na **Rycinie 76**.

Większość z otrzymanych kryształów słabo rozpraszała promieniowanie rentgenowskie lub, ze względu na bardzo mały rozmiar, nie nadawała się do wyłowienia z kropli. Zadowolające dane dyfrakcyjne uzyskałam dla dwóch kryształów, a do optymalizacji wybrałam trzy warunki, w których manipulowałam stężeniami składników:

- The BCS Screen (1-38) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,

- Morpheus (2-37) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,
- Morpheus (2-38) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml.



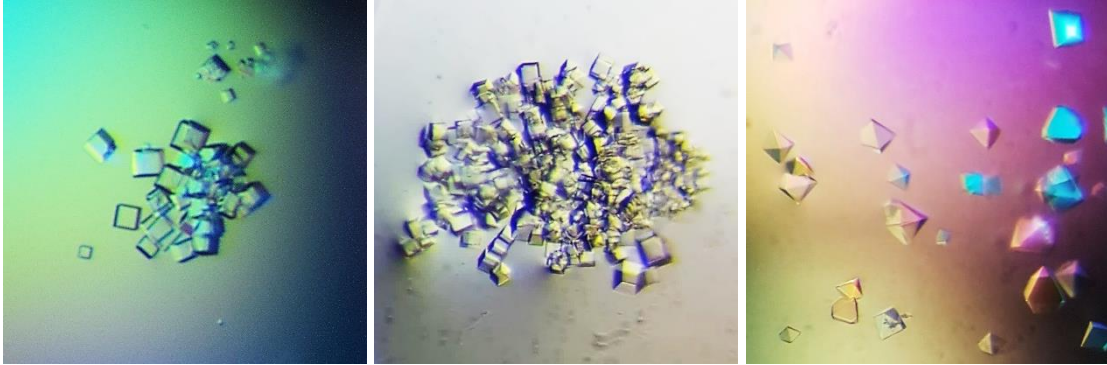
**Rycina 76** Kryształy mutantu hCC H90A otrzymane w warunkach (od lewej):  
Morpheus (2-37), Morpheus (2-38) i The BCS Screen (1-1).

Kryształy, które pojawiły się w optymalizowanych warunkach były zbyt małe by można było je wyłowić lub wykazywały rozdzielczość obrazów dyfrakcyjnych na poziomie 4 Å. Z tego względu do rozwiązania struktur wybrałam dane dla kryształów otrzymanych w warunkach pierwotnych: The BCS Screen (1-38) (oznaczony dalej jako *H90A\_1*) ze stężenia białka 10 mg/ml oraz Morpheus (2-38) (oznaczony dalej jako *H90A\_2*) ze stężenia białka 20 mg/ml. Przed pomiarami dyfrakcji kryształ *H90A\_1* umieszczony został na kilka sekund w roztworze macierzystym z dodatkiem krioprotektanta w postaci 25 % w/v glicerolu, a następnie zamrożony w ciekłym azocie. Warunki krystalizacyjne z zestawu Morpheus zawierają dodatek poli(tlenków etylenu), które posiadają właściwości krioprotekcyjne. Z tego względu kryształ *H90A\_2* mógł zostać zamrożony od razu po wyjęciu z kropli.

Próbkę krystalizacji hCC H90A w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  podjęłam dla białka o stężeniu 10 mg/ml. Wykorzystałam do tego cały zestaw PEG/Ion oraz, dodatkowo, roztwór The BCS Screen (1-38). Wszystkie mieszaniny uzupełniłam o jony miedzi (II) w stężeniu końcowym równym 20  $\mu\text{M}$ . W każdej kropli w ciągu kilku dni pojawił się osad sugerujący strącenie białka, co całkowicie uniemożliwiło utworzenie kryształów. Namaczanie kryształu H90A w warunkach The BCS Screen (1-38) wzbogaconych o jony miedzi (II) również nie przyniosło efektu. Namaczane kryształy nie rozpraszały promieniowania rentgenowskiego.

#### D. Mutant hCC H86\_90A

Kryształy mutantu H86\_90A pojawiły się w 10 różnych warunkach krystalizacyjnych, a wybrane z nich przedstawiam na **Rycinie 77**.



**Rycina 77** Kryształy mutantu hCC H86\_90A otrzymane w warunkach (od lewej): Index (13), Index (16) i The BCS Screen (1-37).

Wszystkie otrzymane kryształy charakteryzowały się obrazami dyfrakcyjnymi o rozdzielczości rzędu 4-12 Å. Na podstawie wstępnych badań rentgenograficznych wybrałam i optymalizowałam manipulując pH roztworów i stężeniami składników, 5 najbardziej obiecujących warunków. Do optymalizacji wybrałam następujące roztwory:

- Index (13) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,
- Index (16) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,
- JCSG plus (1-18) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,
- Morpheus (2-37) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml,
- Morpheus (2-38) – stężenie białka 10 i 20 mg/ml.

Kryształy pojawiły się w większości wyżej wymienionych warunków. Najlepszą jakością obrazów dyfrakcyjnych charakteryzowały się kryształy z optymalizowanego roztworu Index (16) (0,1 M Tris o pH 8,0, 0,2 M mrówczan magnezu dwuwodny), ze stężenia białka 20 mg/ml (kryształ oznaczony dalej jako H86\_90A). Ze względu na duże trudności w znalezieniu warunków krystalizacji hCC H86\_90A, w przypadku tego białka nie podjęłam prób krystalizacji w obecności jonów Cu<sup>2+</sup>.



## E. Składy roztworów krystalizacyjnych

W poniższej tabeli (**Tabela 32**) przedstawiłam dokładne składy roztworów krystalizacyjnych użytych do otrzymania kryształów opisanych w niniejszym rozdziale.

**Tabela 32** Składy wybranych roztworów krystalizacyjnych.

Nazwa roztworu	Skład
The BCS Screen (1-1)	0,1M octan sodu o pH 4,5; 30% v/v roztwór PEG <sup>1</sup>
The BCS Screen (1-37)	0,2M azotan amonu; 0,1M kakodylan sodu o pH 5,3; 22,5% v/v roztwór PEG <sup>1</sup>
The BCS Screen (1-38)	0,1M MES o pH 6,5; 22,5% v/v roztwór PEG <sup>1</sup> ; 10% v/v 2-propanol
Index (13)	0,1M Bis-Tris o pH 5,5; 0,3M mrówczan magnezu dwuwodny
Index (16)	0,1M Tris o pH 8,5; 0,3M mrówczan magnezu dwuwodny
Index (26)	1,1M winian diamonu o pH 7,0
Index (37)	25% w/v PEG 1500
Morpheus (1-9)	0,06M sole <sup>5</sup> ; 0,1M bufor 1 <sup>6</sup> ; 50% v/v mieszanina strącająca 1 <sup>8</sup>
Morpheus (1-45)	0,12M alkohole <sup>2</sup> ; 0,1M bufor 1 <sup>6</sup> ; 50% v/v mieszanina strącająca 1 <sup>8</sup>
Morpheus (2-33)	0,1M kwasy karboksylowe <sup>4</sup> ; 0,1M bufor 1 <sup>6</sup> ; 50% v/v mieszanina strącająca 1 <sup>8</sup>
Morpheus (2-37)	0,1M aminokwasy <sup>3</sup> ; 0,1M bufor 2 <sup>7</sup> ; 50% v/v mieszanina strącająca 1 <sup>8</sup>
Morpheus (2-38)	0,1M aminokwasy <sup>3</sup> ; 0,1M bufor 2 <sup>7</sup> ; 50% v/v mieszanina strącająca 2 <sup>9</sup>
JCSG plus (1-18)	0,1M bufor cytrynianowo-fosforanowy o pH 4,2; 40% v/v etanol; 5 % w/v PEG 1000

<sup>1</sup> roztwór PEG – 25 % v/v PEG 400, 25 % v/v PEG 500 MME, 25 % v/v PEG 600, 25 % w/v PEG 1000

<sup>2</sup> alkohole – 0,2 M 1,6-heksanodiol, 0,2 M 1-butanol, 0,2 M 1,2-propanodiol, 0,2 M 2-propanol, 0,2 M 1,4-butanodiol, 0,2 M 1,3-propanodiol

<sup>3</sup> aminokwasy – 0,2 M DL-kwas glutaminowy jednowodny, 0,2 M DL-alanina, 0,2 M DL-glicyna, 0,2 M chlorowodorek DL-lizyny, 0,2 M DL-seryna

<sup>4</sup> kwasy karboksylowe – 0,2 M mrówczan sodu, 0,2 M octan sodu, 0,2 M cytrynian trójsodowy dwuwodny, 0,2 M winian sodowo-potasowy czterowodny, 0,2 M oksamian sodu

<sup>5</sup> sole – 0,3 M chlorek magnezu sześciowodny, 0,3 M chlorek wapnia dwuwodny

<sup>6</sup> bufor 1 – 1 M Tris, 1 M BICINE, pH 8,5

<sup>7</sup> bufor 2 – 1 M imidazol, 1 M MES, pH 6,5

<sup>8</sup> mieszanina strącająca 1 – 40 % v/v PEG 500 MME, 20 % w/v PEG 20000

<sup>9</sup> mieszanina strącająca 2 – 40 % v/v glikol etylenowy, 20 % w/v PEG 8000

## 6.2 Analiza danych dyfrakcyjnych

Dokładną charakterystykę danych dyfrakcyjnych otrzymanych dla wybranych kryształów poszczególnych wariantów cystatyny C przedstawiłam w **Tabeli 34** na kolejnej stronie.

Wyniki analizy zawartości komórek elementarnych na podstawie objętości Matthews'a umieściłam poniżej w **Tabeli 33**. Każda z komórek statystycznie wykazuje dość wysoką zawartość rozpuszczalnika (około 50-75 %), co jest cechą charakterystyczną dla kryształów białkowych. Analiza sugeruje występowanie jednej lub dwóch cząsteczek w części asymetrycznej dla kryształów hCC WT, H90A oraz H86\_90A i prawdopodobnie dziewięciu cząsteczek dla kryształów H86A.

**Tabela 33** Wyniki analizy potencjalnej zawartości części asymetrycznych komórek elementarnych dla badanych kryształów hCC na podstawie objętości Matthews'a [208]. Rzeczywisty skład wyróżniony został pogrubieniem. Do obliczeń wykorzystano masy molowe.

Białko/Kryształ		Ilość cząsteczek w części asymetrycznej	Objętość Matthews'a [Å <sup>3</sup> /Da]	Zawartość rozpuszczalnika
WT	WT	1	<b>4,57</b>	~ 73 %
	WT_Cu30min			
	WT_Cu1h			
	WT_Cu2h			
H86A	H86A	9	2,64	~ 53 %
		10	2,37	~ 48 %
	H86A_Cu	11	2,16	~ 43 %
H90A	H90A_1	2	<b>3,41</b>	~ 64 %
		3	2,27	~ 46 %
	H90A_2	2	<b>5,15</b>	~ 76 %
		3	3,44	~ 64 %
	4	2,58	~ 52 %	
H86_90A	H86_90A	1	<b>4,71</b>	~ 74 %
		2	2,36	~ 48 %

**Tabela 34** Dane krystalograficzne oraz charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla otrzymanych kryształów cystatyny C i jej mutantów.

	WT				H86A		H90A		H86_90A
Oznaczenie kryształu	WT	WT_Cu30min	WT_Cu1h	WT_Cu2h	H86A	H86A_Cu	H90A_1	H90A_2	H86_90A
Grupa przestrzenna	I432	I432	I432	I432	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P6 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	I432
Komórka elementarna	a = 139,59 Å	a = 139,24 Å	a = 139,73 Å	a = 139,96 Å	a = 83,55 Å b = 102,04 Å c = 135,86 Å	a = 83,68 Å b = 102,10 Å c = 136,57 Å	a = 76,97 Å c = 97,33 Å	a = 90,75 Å c = 144,41 Å	a = 140,48 Å
Rozdzielczość	3,30 Å (3,49-3,30 Å)*	3,26 Å (3,46-3,26 Å)	2,90 Å (3,07-2,90 Å)	3,15 Å (3,34-3,15 Å)	1,95 Å (2,07-1,95 Å)	2,98 Å (3,03-2,98 Å)	1,95 Å (2,07-1,95 Å)	2,95 Å (3,13-2,95 Å)	2,65 Å (2,70-2,65 Å)
Liczba refleksów zarejestrowanych	280135	56694	253507	197972	509969	315294	168839	339439	524331
Liczba refleksów niezależnych	3758	3853	9818	7714	84147	24579	23807	13327	7167
R <sub>meas</sub> [%]	23,1 (126,1)*	37,3 (249,9)	21,3 (235,0)	22,6 (111,9)	7,0 (74,2)	29,6 (149,8)	8,0 (78,5)	11,5 (140,1)	8,0 (371,0)
<I>/<σI>	32,14 (5,67)*	8,93 (1,20)	16,56 (1,75)	17,11 (3,58)	16,92 (1,77)	10,3 (2,1)	14,70 (1,68)	29,03 (2,72)	50,90 (2,00)
Kompletność [%]	100,1 (101,4)*	99,8 (99,7)	100,1 (100,8)	99,9 (99,4)	98,4 (92,4)	100,0 (100,0)	99,6 (98,5)	99,9 (99,9)	100,0 (100,0)
Krotność	74.54	14.71	25.82	25.66	6,06	12,8	7,09	25,47	73,2

\* wartości w nawiasach dotyczą ostatniego zakresu rozdzielczości

Analizowane dane dyfrakcyjne wykazały różnice w grupach przestrzennych dla poszczególnych kryształów badanych białek. W bazie PDB dostępny jest szereg struktur krystalicznych cystatyny C typu dzikiego jak i jej mutantów o różnych grupach przestrzennych i wymiarach komórek elementarnych. Pozwoliło mi to na dopasowanie odpowiednich modeli jako brył sztywnych (ang. *rigid body refinement*) do otrzymanych przeze mnie map gęstości elektronowej (**Tabela 35**). Jako model dla kryształów krystalizujących w grupie I432 (*WT*, *WT\_Cu30min*, *WT\_Cu1h*, *WT\_Cu2h* oraz *H86\_90A*) przyjąłem strukturę dimeru ludzkiej cystatyny C (kod PDB: 1G96). Dla kryształów mutantu H90A o grupach przestrzennych  $P6_1$  (*H90A\_1*) oraz  $P4_12_12$  (*H90A\_2*) użyłam odpowiednio monomerycznej (kod PDB: 3NX0) oraz dimerycznej (kod PDB: 1TIJ) formy cystatyny C.

**Tabela 35** Parametry modeli użytych jako brył sztywnych.

Kod PDB	Grupa przestrzenna	Parametry komórki elementarnej	
1G96 [143]	I432	a = 140,53 Å b = 140,53 Å c = 140,53 Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
3NX0 [144]	$P6_1$	a = 76,32 Å b = 76,32 Å c = 97,72 Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$
1TIJ [154]	$P4_12_12$	a = 91,49 Å b = 91,49 Å c = 144,45 Å	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$

Analiza danych dyfrakcyjnych kryształów *H86A* i *H86A\_Cu* wykazała, że oba charakteryzują się grupą przestrzenną  $P2_12_12_1$ . Grupa ta do tej pory nie wystąpiła w żadnych innych kryształach cystatyny C, ani typu dzikiego, ani w kryształach jej mutantów, co uniemożliwiło wykorzystanie metody dopasowania modelu jako bryły sztywnej. Analiza potencjalnej zawartości wskazała na występowanie minimum 8 cząsteczek białka w częściach asymetrycznych obu komórek elementarnych. Próba rozwiązania struktur metodą podstawienia cząsteczkowego również okazała się nieskuteczna. Żaden z dostępnych modeli lub jego fragmentów nie pozwolił na uzyskanie przybliżonych wartości faz. Z tego względu, pomimo podjęcia wielu prób, nie

udało się rozwiązać struktur krystalicznych z żadnego z uzyskanych zestawów danych (ani dla kryształu *H86A* ani dla *H86A\_Cu*).

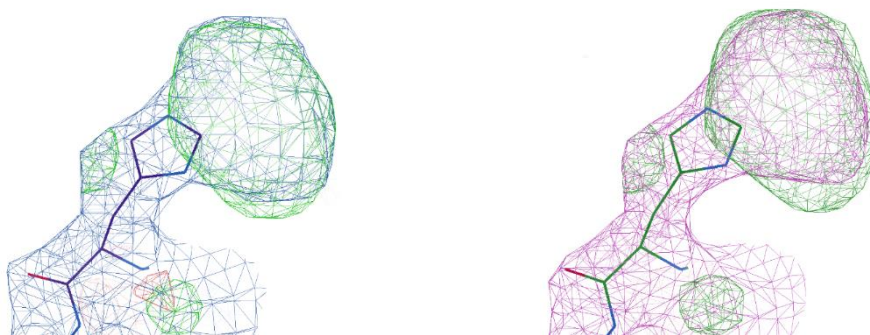
### 6.3 Analiza map gęstości elektronowej hCC WT

Ze względu na niską rozdzielczość danych dyfrakcyjnych, i w konsekwencji map gęstości elektronowej, oraz fakt, że struktura dimeryczna hCC WT w grupie przestrzennej I432 została już zdeponowana w bazie PDB, żadnej z otrzymanych struktur nie udokładniałam. Porównywałam jedynie mapy gęstości elektronowej otrzymane dla wszystkich czterech kryształów cystatyny C typu dzikiego, skupiając się głównie na fragmentach zawierających reszty His<sup>86</sup> i His<sup>90</sup>. W okolicy reszty histydyny 86 nie zauważyłam żadnych istotnych różnic pomiędzy mapami uzyskanymi dla kryształu niemoczonego i moczonego w jonach miedzi (II). Zmiany zaobserwowałam za to w obrębie bardziej wystawionej na działanie środowiska His<sup>90</sup>. Już po 30 min namaczania kryształu w roztworze jonów Cu<sup>2+</sup>, przy His<sup>90</sup> pojawiła się dodatkowa chmura gęstości elektronowej. To samo zjawisko powtórzyło się przy kryształach moczonych przez 1 i 2 godziny, co przedstawiałam na **Rycinie 78**.



hCC WT niemoczony w roztworze Cu<sup>2+</sup>

hCC WT moczony 30 min w roztworze Cu<sup>2+</sup>



hCC WT moczony 1 godzinę w roztworze Cu<sup>2+</sup>

hCC WT moczony 2 godziny w roztworze Cu<sup>2+</sup>

**Rycina 78** Mapy gęstości elektronowej  $2F_o - F_c$  w rejonie reszty His<sup>90</sup>.

Pojawienie się dodatniej mapy różnicowej (zaznaczonej kolorem zielonym na **Rycinie 78**) w okolicy pierścienia imidazolowego histydyny 90 połączyć można z obecnością jonów miedzi (II) w roztworze, w którym zanurzone zostały kryształy. Dodatkowa chmura gęstości elektronowej najprawdopodobniej kryje hydratowany jon  $\text{Cu}^{2+}$ . Niestety niska rozdzielczość map gęstości elektronowej nie pozwoliła na jednoznaczną identyfikację. Niemniej jednak dodatkową dodatnią mapę różnicową zlokalizowałam wyłącznie przy His<sup>90</sup>. Przy pierścieniu reszty His<sup>86</sup> nie zaobserwowałam analogicznych zmian. Wydawało się, że obie reszty histydyny są dostępne dla rozpuszczalnika, jednak bardziej wnikliwa analiza wykazała, że po wygenerowaniu cząsteczek symetrycznych (zgodnie z symetrią I432) dostęp do reszty His<sup>86</sup> jest utrudniony w wyniku zawady sterycznej. Reszty Tyr<sup>42</sup> i Arg<sup>51</sup> z cząsteczki symetrycznej znacznie utrudniają przedostanie się rozpuszczalnika w okolice tego pierścienia imidazolowego.

#### 6.4 Analiza struktur krystalicznych

Uzyskane dane dyfrakcyjne pozwoliły mi na otrzymanie i udokładnienie dwóch struktur krystalicznych mutantu H90A oraz jednej mutantu H86\_90A ludzkiej cystatyny C. We wszystkich trzech przypadkach na mapach gęstości elektronowej widoczne były reszty aminokwasowe od 11 do 120. Początkowy, N-końcowy fragment cystatyny C uległ odszczepieniu w czasie procesu krystalizacji lub ze względu na wysoką labilność konformacyjną jest niewidoczny na mapach gęstości elektronowej. Takie zjawisko zaobserwowane zostało także podczas wcześniejszych badań rentgenograficznych nad hCC [144,145,146,209]. Podsumowanie podstawowych parametrów charakteryzujących udokładnione struktury oraz analizę ich jakości geometrycznej umieściłam w **Tabeli 36** na kolejnej stronie.

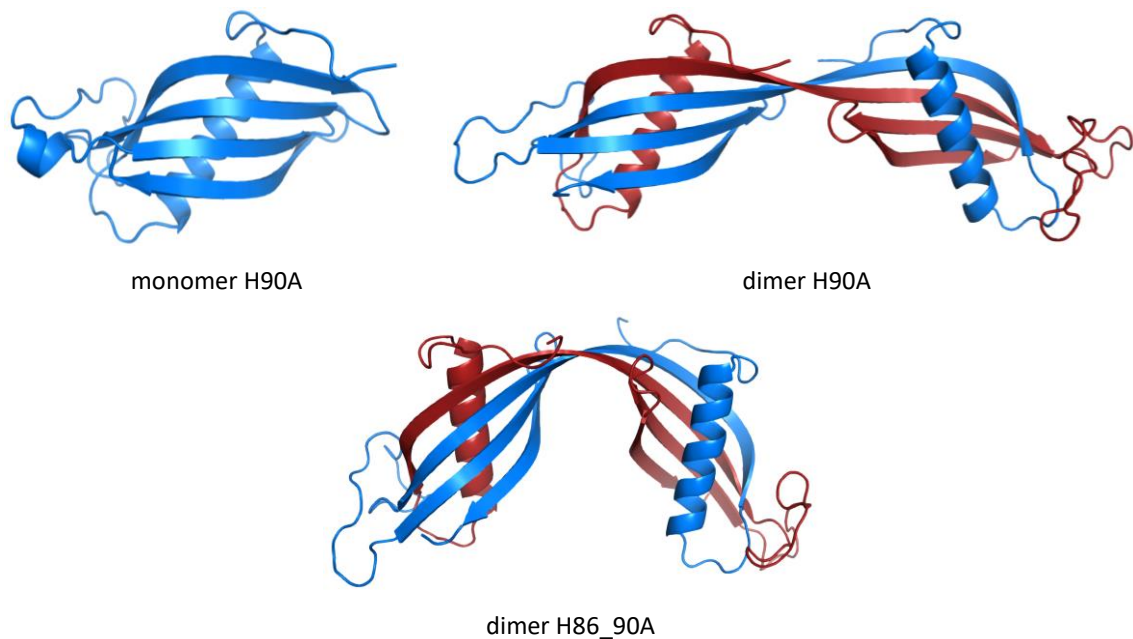
Wszystkie struktury charakteryzują się współczynnikami rozbieżności ( $R$  i  $R_{\text{free}}$ ) o wartościach mieszczących się w zakresie 19,90 - 25,74 %. Analizy map Ramachandrana wskazały na obecność 95% lub więcej reszt aminokwasowych w obszarze uprzywilejowanym oraz na ich brak w obszarze niedozwolonym.

**Tabela 36** Podsumowanie udokładniania struktur krystalicznych wariantów H90A (formy mono- i dimerycznej) i H86\_90A ludzkiej cystatyny C oraz analiza ich jakości geometrycznej.

	monomer H90A	dimer H90A	dimer H86_90A
Grupa przestrzenna	P6 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	I432
Rozdzielczość	1,95 Å	2,95 Å	2,65 Å
R / R <sub>free</sub> [%]	19,90 / 22,67	22,51 / 25,74	22,27 / 25,07
Liczba atomów białka	1745	1718	861
Liczba cząsteczek wody	148	36	2
Liczba cząsteczek PEG	1	2	0
Liczba jonów chlorkowych	0	2	0
Liczba cząsteczek propanolu	4	0	0
<b>Mapa Ramachandrana</b>			
Obszary uprzywilejowane [%]	98 %	95 %	95 %
Obszary dozwolone [%]	2 %	5 %	5 %
Obszary dopuszczalne [%]	0 %	0 %	0 %
<b>RMSD od idealnego</b>			
Długości wiązań [Å]	0,007	0,004	0,006
Kąty wiązań [°]	1,34	1,32	1,41

Trójwymiarowe modele udokładnionych struktur przedstawiłam na **Rycinie 79**. Białko H86\_90A jak i jedna z form H90A wykryły w postaci dimerycznej. Oba białka uległy klasycznej trójwymiarowej wymianie domen opisanej w punkcie 1.3.4. Sześcienna forma krystaliczna mutantu H86\_90A zawiera tylko jedną kopię białka w części asymetrycznej, a idealnie symetryczny dimer uzyskano w wyniku operacji symetrii (krystalograficzna oś dwukrotna). W przypadku tetragonalnej formy mutantu H90A w części asymetrycznej znajdują się dwa łańcuchy białka tworzące dimer. W obu przypadkach dimer powstaje w wyniku wymiany  $\alpha$ -helisy oraz dwóch pasm  $\beta$ -nici ( $\beta$ 1 i  $\beta$ 2) pochodzących z jednej cząsteczki oraz trzech  $\beta$ -nici ( $\beta$ 3,  $\beta$ 4 i  $\beta$ 5) pochodzących z drugiej cząsteczki białka. Struktury uzyskanych dimerów hCC różnią się jednak wyglądem. W dimerze białka H90A struktury  $\beta$ -kartek ulegają wymianie niemal równoległe, podczas gdy w dimerze H86\_90A formują one kąt 100°. Białko H90A wykryło również w formie monomerycznej, a uzyskana jakość danych dyfrakcyjnych (1,95 Å) jest jedną z lepszych uzyskanych dla ludzkiej cystatyny C. Zarówno

forma monomeryczną jak i dimeryczną białka H90A zostały zdeponowane w Białkowej Bazie Danych w postaci współrzędnych poszczególnych atomów. Można je odnaleźć pod kodami 7PU2 (monomer) oraz 7PU3 (dimer). Mutant H86\_90A nie został zdeponowany ze względu na słabą jakość mapy gęstości elektronowej, a w konsekwencji słabą jakość samego modelu.



**Rycina 79** Struktury krystaliczne mutantów H90A i H86\_90A ludzkiej cystatyny C.

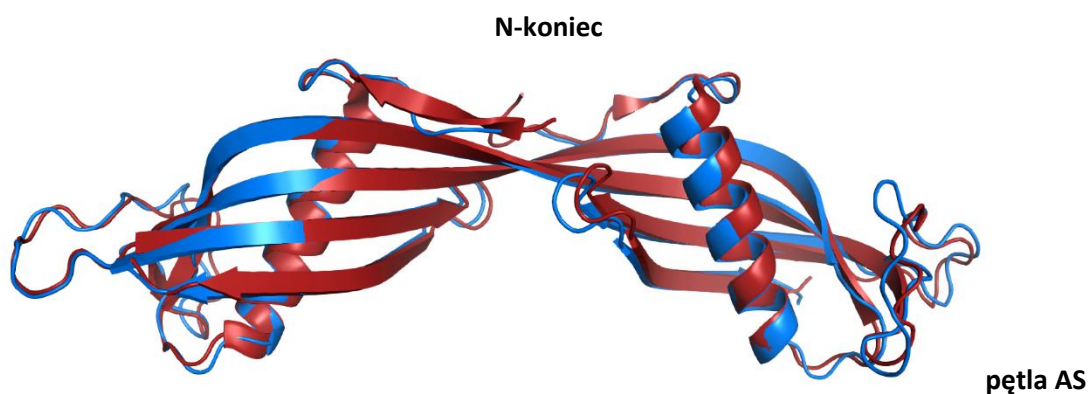
Na otrzymane struktury białek nałożyłam przy użyciu programu PyMol [210] zdeponowane wcześniej w bazie PDB modele hCC. Parametrem pozwalającym scharakteryzować podobieństwo nałożonych struktur jest wartość RMSD pomiędzy nakładanymi atomami. RMSD określamy jako średnie kwadratowe odchylenie od analizowanego kryterium, którym w tym przypadku jest położenie poszczególnych atomów Ca. Z wartości odchylen przedstawionych w **Tabeli 37** wynika, że nakładane struktury charakteryzują się wysokim podobieństwem, zwłaszcza mutant H86\_90A i monomer H90A, dla których wartość RMSD nie przekracza 0,4 Å.



**Tabela 37** Wartości RMSD jakimi charakteryzują się porównania udokładnianych struktur mutantów cystatyny C i modeli użytych do ich rozwiązania.

Białko	Model (kod PDB)	Wartość RMSD
H90A monomer	3NX0	0,193
H90A dimer	1TIJ	1,054
H86_90A	1G96	0,320

Największe różnice zaobserwowałam przy nałożeniu struktury dimeru H90A na model natywnego białka (1TIJ). Są one widoczne głównie w labilnych i słabo ustrukturyzowanych fragmentach łańcuchów białek. Takimi obszarami są między innymi pętle (zwłaszcza pętla AS) oraz N- i C-końce, co przedstawiłam na **Rycinie 80**.



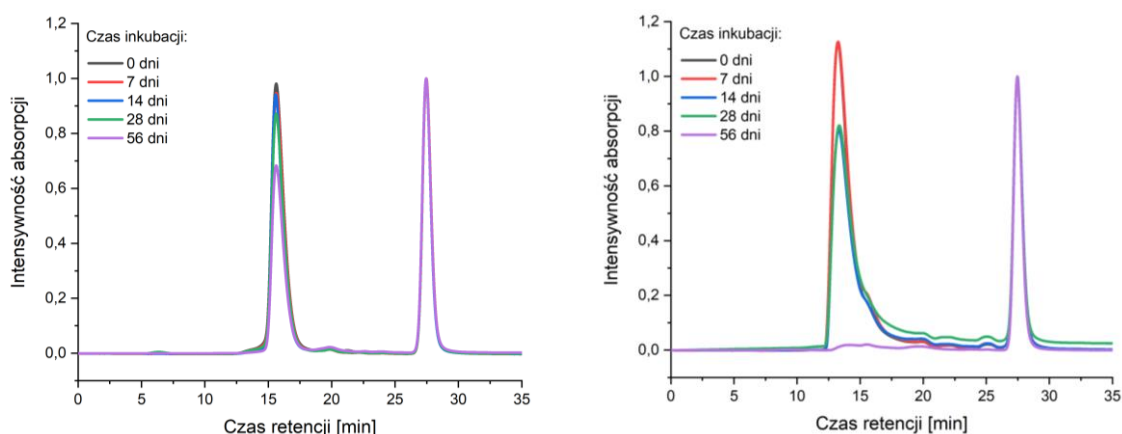
**Rycina 80** Udokładniona dimeryczna struktura krystaliczna mutantu H90A i nałożony na nią model o kodzie PDB 1TIJ.

Wykryształowanie jednego wariantu cystatyny C (H90A) w dwóch różnych formach – monomerycznej i dimerycznej – nie udało się nigdy wcześniej, dlatego postanowiłam przeanalizować to zjawisko. Obie krystalizacje przebiegały w warunkach o takim samym pH i w obecności PEG oraz buforu MES (**Tabela 38**).

**Tabela 38** Warunki krystalizacji form monomerycznej i dimerycznej mutantu H90A cystatyny C.

	monomer H90A	dimer H90A
Bufor	0,1 M MES	0,1 M imidazol/MES
pH	6,5	6,5
Mieszanina strącająca	5,6 % v/v PEG 400 5,6 % v/v PEG 500 MME 5,6 % v/v PEG 600 5,6 % w/v PEG 1000	20 % v/v glicerol 10 % PEG 8000
Dodatki	10 % v/v propanol	0,02 M DL-kwas glutaminowy 0,02 M DL-alanina 0,02 M DL-glicyna 0,02 M chlorowodorek DL-lizyny 0,02 M DL-seryna

Główna różnica w składnikach mieszanin krystalizacyjnych polegała na obecności propanolu w warunkach krystalizacji monomeru i obecności mieszaniny aminokwasów w warunkach krystalizacji dimeru. Aby uzyskać pewność, że za proces dimeryzacji odpowiedzialne były warunki krystalizacji, przygotowałam roztwór białka w wodzie, podzieliłam na dwie porcje, do każdej z nich dodałam jeden z roztworów krystalizacyjnych, w których powstały kryształy i inkubowałam. Eksperyment trwał 56 dni (mniej więcej tyle rosły kryształy) i w międzyczasie pobierałam próbki, które analizowałam za pomocą chromatografii sączenia molekularnego. Otrzymane w ten sposób chromatogramy przedstawiłam na **Rycinie 81**.



**Rycina 81** Chromatogramy SEC z analizy próbek białka hCC H90A pobranych z inkubacji mutantu H90A w warunkach krystalizacji monomeru (z lewej) i dimeru (z prawej). pik przy 14 min – dimer; pik przy 16 min – monomer; pik przy 27 min - Bza

Z powyższych chromatogramów jasno wynika, że to właśnie składy roztworów krystalizacyjnych zdecydowały o formie w jakiej białko wykryłizowało. W warunkach krystalizacji monomeru białko stabilnie utrzymywało formę monomeryczną (pik około 16 min) przez cały okres inkubacji. Natomiast w warunkach krystalizacji dimeru białko zdimeryzowało tuż po dodaniu go do roztworu krystalizacyjnego i utrzymywało formę dimeryczną (pik około 14 min) przez cały okres inkubacji. Analizując składy obu roztworów bez dodatkowych badań, nie można określić, który ze składników mógł doprowadzić do tak szybkiej, prawie natychmiastowej, dimeryzacji.

Opisane wcześniej właściwości mutantu H90A, czyli niższa w stosunku do innych badanych wariantów stabilność konformacyjna skutkująca podwyższoną tendencją do dimeryzacji, w teorii powinna utrudnić lub nawet uniemożliwić jego krystalizację w postaci monomerycznej. Nie znaleziono do tej pory warunków krystalizacji hCC typu dzikiego, w których białko utrzymałoby formę monomeryczną. Nie udało mi się tego dokonać również dla wariantu H86\_90A charakteryzującego się nieco wyższą stabilnością konformacyjną od hCC WT. Jednak wykonany przeze mnie eksperyment na białku H90A udowodnił, że wykryłizowanie niestabilizowanego przeciw dimeryzacji wariantu cystatyny C w postaci monomeru jest możliwe i zależy od odpowiednio dobranego składu roztworu krystalizacyjnego. Wariant ten, podobnie jak białko typu dzikiego, w zależności od warunków ma zdolność to stabilnego utrzymywania formy monomerycznej lub utworzenia formy dimerycznej. hCC WT i H90A rozpuszczone w PBS nie dimeryzują (**Rycina 42**). Przy zastosowaniu łagodnego czynnika indukującego dimeryzację nie tworzą one większych oligomerów (jak w przypadku zastosowania jonów miedzi (II) czy niskiego pH), tylko pozostają w formie dimerycznej, co w przypadku białka H90A umożliwiło jego krystalizację.

## Podsumowanie

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiłam wyniki badań dotyczących wpływu jonów miedzi na strukturę i oligomeryzację cystatyny C oraz jej wybranych wariantów. Wykonane przeze mnie prace badawcze i ich wyniki pozwoliły mi na zrealizowanie większości z postawionych sobie wcześniej celów.

W ramach badań doktorskich przygotowałam wektory ekspresyjne i nadprodukowałam w systemie bakteryjnym *E. coli* trzy nowe mutanty cystatyny C – H86A, H90A oraz H86\_90A. Otrzymane białka oczyściłam i scharakteryzowałam porównując ich budowę i właściwości do hCC typu dzikiego. Badania aktywności inhibicyjnej względem papainy oraz badania struktury z wykorzystaniem dichroizmu kołowego nie wykazały istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami, a białkiem dzikim. Badania CD w gradiencie temperatury wskazały natomiast na obniżoną stabilność konformacyjną mutantu H90A, co w trakcie kolejnych analiz skutkowało jego znacznie podwyższoną tendencją do dimeryzacji. Mutacja wprowadzona została we fragmencie łańcucha, który według dotychczasowych badań, nie powinien wpływać na proces trójwymiarowej wymiany domen (w pętli AS). Jednak usunięcie reszty His<sup>90</sup> spowodowało destabilizację łańcucha na tyle dużą, że pod wpływem czynników nawet słabo indukujących dimeryzację wariant ten dimeryzował w stopniu dużo wyższym niż białko typu dzikiego. Wskazuje to na możliwą, choć nieopisaną jeszcze, rolę pętli AS w procesie dimeryzacji cystatyny C.

Wpływ jonów miedzi (II) na strukturę i stabilność konformacyjną wariantów hCC badałam za pomocą takich technik jak dichroizm kołowy oraz chromatografia sączenia molekularnego. Obecność jonów Cu<sup>2+</sup> nie wpływa na strukturę drugo- i trzeciorzędową białka, ale podczas dłuższej interakcji prowadzi do zainicjowania procesu trójwymiarowej wymiany domen i dimeryzacji (zwłaszcza w przypadku białek WT oraz H90A), która jest początkiem dalszej oligomeryzacji białka. Dodatkowo, oddziaływanie z jonami miedzi (II) istotnie obniża stabilność termiczną białka typu dzikiego oraz wariantu H90A. Do rozpoczęcia zmian konformacyjnych w ich strukturach wystarczy temperatura o około 10-15 °C niższa niż w przypadku próbek kontrolnych niezawierających Cu<sup>2+</sup>. Podobne zachowanie białek hCC WT oraz H90A podczas

wykonywanych eksperymentów sugeruje, że to obecność reszty His<sup>86</sup> jest kluczowa w oddziaływaniu cystatyna C – jony miedzi(II). Usunięcie wspomnianej reszty (co miało miejsce w białkach H86A oraz H86\_90A) obniżyło wrażliwość obu mutantów na obecność miedzi w roztworze.

Badania EPR wskazały na istnienie czterech rodzajów kompleksów tworzonych przez jony miedzi (II) w roztworze wodnym zawierającym monomeryczną formę cystatyny C (stabilizowaną przeciw dimeryzacji). Jednak tylko dwa z nich uwzględniają udział badanych reszt histydyliny: His<sup>86</sup> oraz His<sup>90</sup>. Analizy NMR potwierdziły oddziaływanie jonu miedzi (II) z obiema resztami histydyliny w pętli AS, jednak wykazały także występowanie szeregu dodatkowych, niespecyficznych oddziaływań w innych regionach cząsteczki. Powinowactwo reszty His<sup>90</sup> do ww. jonów potwierdziły również badania rentgenograficzne na białku typu dzikiego. Po namoczeniu kryształów hCC WT w roztworze miedzi (II) na otrzymanych z badań dyfrakcyjnych mapach gęstości elektronowej, w obrębie reszty His<sup>90</sup> zaobserwowałam pojawienie się dodatkowej mapy różnicowej, która prawdopodobnie stanowi hydratowany jon miedzi (II). Przy reszcie His<sup>86</sup> nie zauważyłam podobnych zmian ze względu na jej położenie. Dostęp do reszty His<sup>86</sup> jest utrudniony w wyniku obecności w jej bliskiej sąsiedztwie reszt Tyr<sup>42</sup> i Arg<sup>51</sup> cząsteczki symetrycznej.

Podjęte przeze mnie próby fibrylizacji cystatyny C w obecności badanych jonów udowodniły, że ich obecność nie wpływa na morfologię otrzymanych włókien białkowych, co potwierdziłam za pomocą zdjęć z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wyjątkiem był mutant H90A, który w warunkach słabszego wytrząsania (300 rpm – wytrząsanie słabsze od literaturowego 600 rpm) i w obecności chlorku miedzi utworzył głównie duże, zbite agregaty białkowe, wśród których zaobserwowałam niewielkie i pozlepiane struktury fibrylarne oddziałujące z tioflawiną T. Eksperyment wykonany na białku dzikim w stężeniu 12x niższym od literaturowego udowodnił natomiast, że miedź wpływa na początkowe etapy oligomeryzacji. Struktury protofibrylarne w próbce z miedzią pojawiły się kilkadziesiąt godzin później niż w próbce kontrolnej. Cu<sup>2+</sup> prawdopodobnie ma zdolność do stabilizowania dimerycznych i/lub niskooligomerycznych, rozpuszczalnych form białka, co prowadzi do opóźnienia agregacji, jednak nie wpływa na strukturę i morfologię tworzących się fibryli.

Ostatnim etapem moich badań doktorskich była krystalizacja nadprodukowanych białek w obecności jonów miedzi w celu ustalenia miejsca wiążącego. Niestety indukowana  $\text{Cu}^{2+}$  dimeryzacja, a dalej oligomeryzacja białek prowadziła do szybkiego strącania osadów białkowych w kroplach krystalizacyjnych i uniemożliwiała tworzenie kryształów. Udało mi się jednak otrzymać trzy struktury krystaliczne wariantów H90A oraz H86\_90A bez udziału jonów miedzi. Odpowiednio dobrane składy roztworów krystalizacyjnych pozwoliła mi na wykrywanie mutantu H90A w dwóch formach – monomerycznej i dimerycznej, co nie udało się wcześniej dla żadnego innego wariantu hCC. Obie struktury zdeponowane zostały w Białkowej Bazie Danych i znaleźć je można pod kodami 7PU2 (monomer) oraz 7PU3 (dimer). Struktura białka H86\_90A nie została zdeponowana ze względu na słabą jakość modelu. Wszystkie trzy otrzymane struktury krystaliczne nie różniły się znacząco od modeli dostępnych w PDB. Główne różnice zaobserwowałam we fragmentach labilnych i słabo ustrukturyzowanych takich jak pętle oraz N- i C-końce.

## Summary

Neurodegenerative diseases related to the aggregation of amyloidogenic proteins in the brain tissue (like Alzheimer's and Parkinson's disorders) are serious medical, economic, and social problems. Due to the lack of drugs and appropriate therapies, neurodegenerative amyloidosis remains incurable and lethal. The subject of my dissertation is cystatin C (hCC), which belongs to a wide group of amyloidogenic proteins. Its pathogenicity is related to an inherited point mutation in the gene, which leads to the overproduction of an easily oligomerizing variant L68Q and disease called hereditary cystatin C amyloid angiopathy. My doctoral research aimed to prove that copper ions (commonly present in the brain tissue) influence the structure and aggregation of cystatin C.

During realization of my PhD project I prepared expression vectors and overproduced in the *E. coli* bacterial system three new cystatin C mutants - H86A, H90A and H86\_90A. Their biological activity and structures proved to be very similar to those of the wild type (WT) protein. The circular dichroism studies with the temperature gradient showed reduced conformational stability of the H90A mutant. It results in a significantly increased tendency to dimerization. The point mutation (H90A) was introduced in the AS loop which, according to previous research, should not affect the process of three-dimensional domain swapping. However, the removal of the His90 residue destabilized the protein chain which suggests a possible, but yet undescribed, role of the AS loop in the cystatin C dimerization.

I investigated the influence of copper(II) ions on the structure and conformational stability of hCC variants using circular dichroism and molecular filtration chromatography. The presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions does not affect the protein structure, but prolonged incubation leads to dimerization (especially in the cases of WT and H90A proteins). Additionally, the interactions with copper(II) ions significantly reduce the thermal stability of the wild type protein and the H90A variant. Similar data for hCC WT and H90A proteins suggests that the presence of the His86 residue has a key role in the cystatin C - copper(II) ions interaction. Removal of the mentioned residue (in cases of H86A and double H86\_90A variants) decreased the sensitivity of both mutants to the presence of copper in the solution.

The EPR studies showed four complexes formed by copper(II) ions in an aqueous solution containing the monomeric form of cystatin C (stabilized against dimerization). However, only two of them involve studied His86 and His90. NMR spectra confirmed the interaction of the copper(II) ions with both histidine residues in the AS loop but also indicated the presence of number of additional, non-specific interactions with copper in different parts of the protein.

Fibrillation of cystatin C in the presence of copper ions proved that ions do not affect the morphology of protein fibers. The exception was the H90A mutant which, under weaker shaking conditions (300 rpm) and in the presence of copper chloride, formed mainly large protein aggregates among which I observed small fibrillar structures interacting with thioflavin T.

Another experiment performed on WT protein at a low protein concentration, proved that copper influences the most likely the first stages of the oligomerization process. The protofibrillary structures in the sample with the addition of copper appeared several hours earlier than in the control sample.  $\text{Cu}^{2+}$  probably stabilize dimeric and/or low-oligomeric soluble forms of the protein, which leads to a delay in the aggregation but does not affect the structure and morphology of the formed fibrils.

The last stage of my PhD research was the crystallization of overproduced proteins in the presence of copper ions to establish the metal binding site. Unfortunately, dimerization and further protein oligomerization induced by  $\text{Cu}^{2+}$  led to rapid precipitation of protein deposits in the crystallization droplets and prevented the formation of crystals. However, I obtained three crystal structures of the H90A (monomeric and dimeric) and H86\_90A variants without the presence of copper ions. Both H90A structures are deposited in the Protein Data Bank under 7PU2 (monomer) and 7PU3 (dimer) codes. The structure of the H86\_90A protein was not deposited due to the poor quality of the model.

In conclusion, copper(II) ions – cystatin C interactions are weak and rather unspecified. However, one of the most preferred binding sites includes tested His86 and His90. My research confirmed that the presence of copper(II) leads to dimerization and further oligomerization of cystatin C. The major roles of  $\text{Cu}^{2+}$  ions in this process are inducing dimerization and probably stabilizing soluble, small protein oligomers.



---

**Literatura**

- [1] L. Stomma, *A jeśli było inaczej. Antropologia historii*, Wydawnictwo Sens, Poznań, **2008**, s. 8.
- [2] *Guinness World Records - Oldest person ever (female)*, dostęp: 04.11.2021, [www.guinnessworldrecords.com/world-records/oldest-person-\(female\)](http://www.guinnessworldrecords.com/world-records/oldest-person-(female)).
- [3] *Otępienie*, Encyklopedia popularna PWN, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **1991**.
- [4] E. C. Mormino *et al.*, Episodic memory loss is related to hippocampal-mediated  $\beta$ -amyloid deposition in elderly subjects, *Brain*, **2009**, 132(5), s. 1310–1323.
- [5] H. Jahn, Memory loss in alzheimer's disease, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **2013**, 15(4), s. 445–454.
- [6] J. Cerejeira, L. Lagarto, E. B. Mukaetova-Ladinska, Behavioral and psychological symptoms of dementia, *Front. Neurol.*, **2012**, 3, s. 73.
- [7] *WHO Mortality Database - WHO*, dostęp: 10.11.2020, [www.who.int/data/data-collection-tools/who-mortality-database](http://www.who.int/data/data-collection-tools/who-mortality-database).
- [8] World Health Organisation, *Dementia*, **2019**, dostęp: 25.03.2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- [9] World Health Organisation, *Global action plan on the public health response to dementia 2017-2025*, **2017**.
- [10] B. Puła, S. Debek, K. Jamroziak, Principles of amyloidosis classification and nomenclature, *Hematologia*, **2018**, 9(3), s. 167–172.
- [11] J. D. Sipe *et al.*, Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification, *Amyloid*, **2016**, 23(4), s. 209–213.
- [12] A. Szwed, K. Miłowska, The role of proteins in neurodegenerative disease, *Postep. w Hig. i Med. Doświadczalnej*, **2012**, 66, s. 187–195.
- [13] C. A. Ross, M. A. Poirier, Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat. Med.*, **2004**, 10(7), s. S10-S17.
- [14] J. P. Taylor, J. Hardy, K. H. Fischbeck, Toxic proteins in neurodegenerative disease, *Science*, **2002**, 296(5575), s. 1991–1995.
- [15] A. Laganowsky *et al.*, Atomic view of a toxic amyloid small oligomer, *Science*, **2012**, 335(6073), s. 1228–1231.
- [16] D. Dziewulska, J. Rafałowska, The role of protein conformational disturbances in the pathomechanism of the extrapyramidal system diseases, *Neurol. Neurochir. Pol.*, **2005**, 39(5), s. 397-404.
- [17] L. Gan *et al.*, Converging pathways in neurodegeneration from genetics to mechanisms, *Nat. Neurosci.*, **2018**, 21(10), s. 1300–1309.

- [18] F. Bemporad, M. Ramazzotti, From the evolution of protein sequences able to resist self-assembly to the prediction of aggregation propensity, *International Review of Cell and Molecular Biology*, **2017**, 329, s. 1–47.
- [19] Q. Liu, E. A. Craig, Mature proteins braced by a chaperone, *Nature*, **2016**, 539(7629), s. 361–362.
- [20] G. A. Collins, A. L. Goldberg, The Logic of the 26S Proteasome, *Cell*, **2017**, 169(5), s. 792–806.
- [21] R. Raynes, L. C. Pomatto, K. J. Davies, Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways, *Mol. Aspects Med.*, **2016**, 50, s. 41–55.
- [22] J. Tyedmers, A. Mogk, B. Bukau, Cellular strategies for controlling protein aggregation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, 11(11), s. 777–788.
- [23] B. Morel, L. Varela, A. I. Azuaga, F. Conejero-Lara, Environmental conditions affect the kinetics of nucleation of amyloid fibrils and determine their morphology, *Biophys. J.*, **2010**, 99(11), s. 3801–3810.
- [24] D. S. Eisenberg, M. R. Sawaya, Structural studies of amyloid proteins at the molecular level, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, 86(1), s. 69–95.
- [25] D. Eisenberg, M. Jucker, The amyloid state of proteins in human diseases, *Cell*, **2012**, 148(6), s. 1188–1203.
- [26] J. Adamcik, R. Mezzenga, Amyloid polymorphism in the protein folding and aggregation energy landscape, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2018**, 57(28), s. 8370–8382.
- [27] A. K. Schütz *et al.*, Atomic-resolution three-dimensional structure of amyloid  $\beta$  fibrils bearing the osaka mutation, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2015**, 54(1), s. 331–335.
- [28] A. W. Fitzpatrick, G. M. Vanacore, A. H. Zewail, Nanomechanics and intermolecular forces of amyloid revealed by four-dimensional electron microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, 112(11), s. 3380–3385.
- [29] M. Siddiqi, P. Alam, S. Kumar Chaturvedi, Y. Shahein, R. Khan, Mechanisms of protein aggregation and inhibition, *Front. Biosci.*, **2017**, 9, s. 1–20.
- [30] C. Soto, S. Pritzkow, Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases, *Nat. Neurosci.*, **2018**, 21(10), s. 1332–1340.
- [31] J. Adamcik *et al.*, Microtubule-binding R3 fragment from tau self-assembles into giant multistranded amyloid ribbons, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2016**, 55(2), s. 618–622.
- [32] S. Zhang *et al.*, Coexistence of ribbon and helical fibrils originating from hIAPP 20-29 revealed by quantitative nanomechanical atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110(8), s. 2798–2803.

- [33] I.- Usov, J. Adamcik, R. Mezzenga, Polymorphism complexity and handedness inversion in serum albumin amyloid fibrils, *ACS Nano*, **2013**, 7(12), s. 10465–10474.
- [34] C. Lara, S. Handschin, R. Mezzenga, Towards lysozyme nanotube and 3D hybrid self-assembly, *Nanoscale*, **2013**, 5(16), s. 7197–7201.
- [35] M. Malmberg *et al.*, Disentangling the amyloid pathways: A mechanistic approach to etiology, *Front. Neurosci.*, **2020**, 14(256).
- [36] A. K. Buell, The nucleation of protein aggregates - from crystals to amyloid fibrils, *International Review of Cell and Molecular Biology*, **2017**, 329, s. 187–226.
- [37] M. Jucker, L. C. Walker, Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases, *Nat. Neurosci.*, **2018**, 21(10), s. 1341–1349.
- [38] A. K. Srivastava *et al.*,  $\beta$ -Amyloid aggregation and heterogeneous nucleation, *Protein Sci.*, **2019**, 28(9), s. 1567–1581.
- [39] C. M. Bantle *et al.*, Infection with mosquito-borne alphavirus induces selective loss of dopaminergic neurons, neuroinflammation and widespread protein aggregation, *NPJ Park. Dis.*, **2019**, 5(1), s. 1-15.
- [40] S. Linse *et al.*, Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104(21), s. 8691–8696.
- [41] J. Habchi *et al.*, Cholesterol catalyses A $\beta$ 42 aggregation through a heterogeneous nucleation pathway in the presence of lipid membranes, *Nat. Chem.*, **2018**, 10(6), s. 673–683.
- [42] M. Törnquist *et al.*, Secondary nucleation in amyloid formation, *Chem. Commun.*, **2018**, 54(63), s. 8667–8684.
- [43] C. M. Dobson, The amyloid phenomenon and its links with human disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2017**, 9(6).
- [44] F. Rousseau, J. Schymkowitz, L. S. Itzhaki, Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2012**, 747, s. 137–152.
- [45] M. Bonjack-Shterengartz, D. Avnir, The enigma of the near-symmetry of proteins: Domain swapping, *PLOS One*, **2017**, 12(7).
- [46] A. M. Gronenborn, Domain Swapping, *Encyclopedia of Biophysics*, Springer, **2013**, s. 498–503.
- [47] S. K. Chaturvedi, M. K. Siddiqi, P. Alam, R. H. Khan, Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection, *Process Biochem.*, **2016**, 51(9), s. 1183–1192.
- [48] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.*, **2016**, 8(4), s. 409–427.
- [49] F. T. Chan *et al.*, Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation, *Analyst*, **2013**, 138(7), s. 2156–2162.

- [50] K. Brännström *et al.*, Scanning electron microscopy as a tool for evaluating morphology of amyloid structures formed on surface plasmon resonance chips, *Data Br.*, **2018**, 19, s. 1166–1170.
- [51] F. S. Ruggeri, T. Šneideris, S. Chia, M. Vendruscolo, T. P. Knowles, Characterizing individual protein aggregates by infrared nanospectroscopy and atomic force microscopy, *J. Vis. Exp.*, **2019**, 151.
- [52] K. L. Morris, L. C. Serpell, X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils, *Methods Mol. Biol.*, **2012**, 849, s. 121–135.
- [53] M. Wördehoff, W. Hoyer,  $\alpha$ -Synuclein aggregation monitored by thioflavin T fluorescence assay, *Bio-Protocol*, **2018**, 8(14).
- [54] M. R. Nilsson, Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, *Methods*, **2004**, 34(1), s. 151–160.
- [55] M. Giryč *et al.*, Combined thioflavin T–congo red fluorescence assay for amyloid fibril detection, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2016**, 4(3).
- [56] M. Chin-Chan *et al.*, Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases, *Front. Cell. Neurosci.*, **2015**, 9.
- [57] L. Calderón-Garcidueñas *et al.*, Prefrontal white matter pathology in air pollution exposed Mexico City young urbanites and their potential impact on neurovascular unit dysfunction and the development of Alzheimer’s disease, *Environ. Res.*, **2016**, 146, s. 404–417.
- [58] D. Beauchemin, R. Kisilevsky, A Method Based on ICP-MS for the Analysis of Alzheimer’s Amyloid Plaques, *Anal. Chem.*, **1998**, 70(5), s. 1026–1029.
- [59] M. A. Lovell *et al.*, Copper, iron and zinc in Alzheimer’s disease senile plaques, *J. Neurol. Sci.*, **1998**, 158(1), s. 47–52.
- [60] E. Nam, G. Nam, M. H. Lim, Synaptic copper, amyloid- $\beta$ , and neurotransmitters in Alzheimer’s disease,” *Biochemistry*, **2020**, 59(1), s. 15–17.
- [61] K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, M. Valko, Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders, *Mol. Cell. Biochem.*, **2010**, 345(1–2), s. 91–104.
- [62] S. Bolognin, L. Messori, P. Zatta, Metal ion physiopathology in neurodegenerative disorders, *NeuroMolecular Med.*, **2009**, 11(4), s. 223–238.
- [63] I. F. Scheiber, J. F. Mercer, R. Dringen, Metabolism and functions of copper in brain, *Prog. Neurobiol.*, **2014**, 116, s. 33–57.
- [64] R. Hansch, R. R. Mendel, Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2009**, 12(3), s. 259–266.
- [65] M. Angelova, S. Asenova, V. Nedkova, R. Koleva-Kolarova, Copper in the human organism, *Trakia J. Sci.*, **2011**, 9, s. 88–98.
- [66] D. Huster, S. Lutsenko, Wilson disease: Not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism, *Mol. Biosyst.*, **2007**, 3(12), s. 816–824.

- [67] M. Ogórek *et al.*, Rola miedzi w procesie spermatogenezy, *Rev. Postep. Hig Med Dosw*, **2017**, 71, s. 662–680.
- [68] S. L. Sensi, A. Granzotto, M. Siotto, R. Squitti, Copper and zinc dysregulation in Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2018**, 39(12), s. 1049–1063.
- [69] A. Ahuja *et al.*, Copper mediated neurological disorder: Visions into amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer and Menkes disease, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2015**, 29, s. 11–23.
- [70] T. Kanti Das, M. R. Wati, K. Fatima-Shad, Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease, *Arch. Neurosci.*, **2014**, 2(3).
- [71] H. Sies, *et al.*, Oxidative stress, *Annu. Rev. Biochem.*, **2017**, 86(1), s. 715–748.
- [72] H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuźmicka, M. Tarasiewicz, Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu, *Bromatol. i Chem. Toksykol.*, **2010**, 1, s. 9–14.
- [73] G. La Penna, M. S. Li, Computational models explain how copper binding to amyloid- $\beta$  peptide oligomers enhances oxidative pathways, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, 21(17), s. 8774–8784.
- [74] I. Murray *et al.*, Membrane-mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid proteins, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282(13), s. 9335–9345.
- [75] S. Jun, J. R. Gillespie, B. K. Shin, S. Saxena, The second Cu(II)-binding site in a proton-rich environment interferes with the aggregation of amyloid- $\beta$ (1-40) into amyloid fibrils, *Biochemistry*, **2009**, 48(45), s. 10724–10732.
- [76] D. Yugay *et al.*, Copper ion binding site in  $\beta$ -amyloid peptide, *Nano Lett.*, **2016**, 16(10), s. 6282–6289.
- [77] J. Mayes *et al.*, Amyloid fibrils in Alzheimer disease are not inert when bound to copper ions but can degrade hydrogen peroxide and generate reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289, s. 12052–12062.
- [78] A. I. Mot, P. J. Crouch, Biometals and Alzheimer's Disease, *Biometals in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutics*, **2017**, 1, s. 1–9.
- [79] S. C. Dodani *et al.*, Copper is an endogenous modulator of neural circuit spontaneous activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111(46), s. 16280–16285.
- [80] A. H. Kim, G. A. Kerchner, D. W. Choi, Blocking Excitotoxicity, *CNS Neuroprotection*, **2002**, s. 3-36.
- [81] W. Danysz, C. G. Parsons, Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - searching for the connections, *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, 167(2), s. 324–352.
- [82] F. Celsi *et al.*, Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **2009**, 1787(5), s. 335–344.

- [83] Z. K. Mathys, A. R. White, Copper and Alzheimer's disease, *Neurotoxicity of metals*, **2017**, s. 199–216.
- [84] M. L. Schlieff, T. West, A. M. Craig, D. M. Holtzman, J. D. Gitlin, Role of the Menkes copper-transporting ATPase in NMDA receptor-mediated neuronal toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103(40), s. 14919–14924.
- [85] Y. H. Hung, A. I. Bush, R. A. Cherny, Copper in the brain and Alzheimer's disease, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, 15(1), s. 61–76.
- [86] M. L. Schlieff, A. M. Craig, J. D. Gitlin, NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, **2005**, 25(1), s. 239–246.
- [87] E. Madsen, J. D. Gitlin, Copper and iron disorders of the brain, *Annu. Rev. Neurosci.*, **2007**, 30(1), s. 317–337.
- [88] Alzheimer's Association, 2015 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's Dement.*, **2015**, 11(3), s. 332–384.
- [89] R. J. Castellani, R. K. Rolston, M. A. Smith, Alzheimer disease, *Dis. a Mon.*, **2010**, 56(9), s. 484–546.
- [90] C. G. Lyketsos *et al.*, Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease, *Alzheimer's and Dementia*, **2011**, 7(5), s. 532–539.
- [91] C. Reitz, C. Brayne, R. Mayeux, Epidemiology of Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **2011**, 7(3), s. 137–152.
- [92] K. J. Barnham *et al.*, Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(19), s. 17401–17407.
- [93] G. Multhaup *et al.*, The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I), *Science*, **1996**, 271(5254), s. 1406–1409.
- [94] A. D. Armemdariz *et al.*, Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App, *Physiol. Genomics*, **2005**, 20(1), s. 45–54.
- [95] S. A. Bellingham *et al.*, Copper depletion down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  precursor protein gene, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(19), s. 20378–20386.
- [96] T. Kawarabayashi *et al.*, Dimeric amyloid  $\beta$  protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **2004**, 24(15), s. 3801–3809.
- [97] P. Gamez, A. B. Caballero, Copper in Alzheimer's disease: Implications in amyloid aggregation and neurotoxicity, *AIP Adv.*, **2015**, 5(9).
- [98] C. J. Sarell, S. R. Wilkinson, J. H. Viles, Substoichiometric levels of Cu<sup>2+</sup> ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- $\beta$  from Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(53), s. 41533–41540.

- [99] C. S. Atwood *et al.*, Dramatic aggregation of Alzheimer by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273(21), s. 12817–12826.
- [100] V. A. Streltsov *et al.*, The structure of the amyloid- $\beta$  peptide high-affinity copper II binding site in Alzheimer disease, *Biophys. J.*, **2008**, 95(7), s. 3447–3456.
- [101] V. Minicozzi *et al.*, Identifying the minimal copper- and zinc-binding site sequence in amyloid- $\beta$  peptides, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(16), s. 10784–10792.
- [102] S. C. Drew *et al.*, Pleomorphic copper coordination by Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(3), s. 1195–1207.
- [103] C. D. Syme *et al.*, Copper binding to the amyloid- $\beta$  peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A $\beta$ -(1-28): Insights from a range of complementary spectroscopic techniques, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, s. 18169–18177.
- [104] F. Hane, Z. Leonenko, Effect of metals on kinetic pathways of amyloid- $\beta$  aggregation, *Biomolecules*, **2014**, 4(1), s. 101–116.
- [105] F. Tahmasebinia, S. Emadi, Effect of metal chelators on the aggregation of beta-amyloid peptides in the presence of copper and iron, *BioMetals*, **2017**, 30(2), s. 285–293.
- [106] B. Nizynski, W. Dzwolak, K. Nieznanski, Amyloidogenesis of tau protein, *Protein Sci.*, **2017**, 26(11), s. 2126–2150.
- [107] M. A. Chabrier *et al.*, Synergistic effects of amyloid- $\beta$  and wild-type human tau on dendritic spine loss in a floxed double transgenic model of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Dis.*, **2014**, 64, s. 107–117.
- [108] C. Bacchella *et al.*, Binding and reactivity of copper to R1 and R3 fragments of tau protein, *Inorg. Chem.*, **2020**, 59(1), s. 274–286, Jan. 2020.
- [109] X. Y. Su *et al.*, Hydrogen peroxide can be generated by tau in the presence of Cu(II), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, 358(2), s. 661–665.
- [110] W. Poewe *et al.*, Parkinson disease, *Nat. Rev. Dis. Prim.*, **2017**, 3(1), s. 1–21.
- [111] A. Schrag, Epidemiology of Movement Disorders, *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, edycja V, **2007**, J. Jankovic, E. Tolosa, s. 50–65.
- [112] J. Valls-Sole, Neurophysiology of motor control and movement disorders, *Parkinson's Disease and Movement Disorders*, edycja V, **2007**, J. Jankovic, E. Tolosa, s. 7-22.
- [113] D. J. Selkoe, Showing transmitters the door: Synucleins accelerate vesicle release, *Nat. Neurosci.*, **2017**, 20(5), s. 629–631.
- [114] V. N. Uversky, J. Li, A. L. Fink, Evidence for a partially folded intermediate in  $\alpha$ -synuclein fibril formation, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276(14), s. 10737–10744.

- [115] M. Ingelsson, Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other lewy body disorders, *Frontiers in Neuroscience*, **2016**, 10(9), s. 408.
- [116] L. Breydo, J. W. Wu, V. N. Uversky,  $\alpha$ -Synuclein misfolding and Parkinson's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, **2012**, 1822(2), s. 261–285.
- [117] C. G. Dudzik, E. D. Walter, G. L. Millhauser, Coordination features and affinity of the Cu<sup>2+</sup> site in the  $\alpha$ -synuclein protein of Parkinson's disease, *Biochemistry*, **2011**, 50(11), s. 1771–1777.
- [118] Y. Jinsmaa *et al.*, Divalent metal ions enhance DOPAL-induced oligomerization of alpha-synuclein, *Neurosci. Lett.*, **2014**, 569, s. 27–32.
- [119] V. N. Uversky, J. Li, A. L. Fink, Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human  $\alpha$ -synuclein: A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276(47), s. 44284–44296.
- [120] H. Zhang, J. C. Rochet, L. A. Stanciu, Cu(II) promotes amyloid pore formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 464(1), s. 342–347.
- [121] M. Cassandri *et al.*, Zinc-finger proteins in health and disease, *Cell Death Discov.*, **2017**, 3(1), s. 1–12.
- [122] R. Chitturi *et al.*, A review on role of essential trace elements in health and disease, *J. Dr. NTR Univ. Heal. Sci.*, **2015**, 4(2), s. 75.
- [123] W. Maret, Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key element of life, **2013**, *Adv. Nutr.*, 4(1), s. 82–91.
- [124] W. Maret, Zinc and the zinc proteome, *Metallomics and the cell*, Springer, **2013**, s. 479–501.
- [125] M. Valko, K. Jomova, C. J. Rhodes, K. Kuča, K. Musílek, Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease, *Arch. Toxicol.*, **2016**, 90(1), s. 1–37.
- [126] I. Zawisza, M. Rózga, W. Bal, Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A $\beta$ , APP,  $\alpha$ -synuclein, PrP), *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256(19–20), s. 2297–2307.
- [127] A. I. Bush *et al.*, Rapid induction of Alzheimer A $\beta$  amyloid formation by zinc, *Science*, **1994**, 265(5177), s. 1464–1467.
- [128] D. Mizuno, M. Kawahara, The molecular mechanisms of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia, *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14(11), s. 22067–22081.
- [129] M. Abrahamson, M. Alvarez-Fernandez, C. M. Nathanson, Cystatins, *Biochemical Society Symposium*, **2003**, 70, s. 179–199.
- [130] A. J. Barrett, The cystatins: A diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors, *Biomedica Biochimica Acta*, **1986**, 45(11–12), s. 1363–1374.



- [131] A. Grubb, Cystatin C - properties and use as diagnostic marker, *Adv. Clin. Chem.*, **2000**, 35, s. 63–99.
- [132] M. Mussap, M. Plebani, Biochemistry and clinical role of human cystatin C, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **2004**, 41(5–6), s. 467–550.
- [133] T. Hansen *et al.*, Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium, *J. Rheumatol.*, **2000**, 27(4), s. 859–65.
- [134] K. Takeyabu *et al.*, Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema, *Eur. Respir. J.*, **1998**, 12, s. 1033–1039.
- [135] B. Vray, S. Hartmann, J. Hoebeker, Immunomodulatory properties of cystatins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2002**, 59(9), s. 1503–1512.
- [136] K. H. Freundéus *et al.*, Macrophage responses to interferon- $\gamma$  are dependent on cystatin C levels, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2009**, 41(11), s. 2262–2269.
- [137] S. Gauthier, G. Kaur, W. Mi, B. Tizon, E. Levy, Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases, *Front. Biosci. - Sch.*, **2011**, 3(2), s. 541–554.
- [138] M. Sastre *et al.*, Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid  $\beta$  inhibits in vitro amyloid fibril formation, *Neurobiol. Aging*, **2004**, 25(8), s. 1033–1043.
- [139] L. Ciccone, C. Shi, D. di Lorenzo, A. C. van Baelen, and N. Tonali, The positive side of the Alzheimer's disease amyloid cross-interactions: The case of the A $\beta$  1-42 peptide with tau, TTR, CysC, and ApoA1, *Molecules*, **2020**, 25(10).
- [140] J. Sabotič, J. Kos, Microbial and fungal protease inhibitors - Current and potential applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2012**, 93(4), s. 1351–1375.
- [141] M. Pikuła *et al.*, Cystatin C peptidomimetic derivative with antimicrobial properties as a potential compound against wound infections, *Bioorganic Med. Chem.*, **2017**, 25(4), s. 1431–1439.
- [142] M. Warwas, A. Piwowar, Urinary cystatin C as a biomarker of renal tubular injury, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **2011**, 65, s. 65.
- [143] R. Janowski *et al.*, Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping., *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, 8(4), s. 316–20.
- [144] M. Orlikowska *et al.*, Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C, *J. Struct. Biol.*, **2011**, 173(2), s. 406–413.
- [145] R. Kolodziejczyk *et al.*, Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation, *FEBS J.*, **2010**, 277(7), s. 1726–1737.
- [146] M. Maszota-Zieleniak *et al.*, NMR and crystallographic structural studies of the extremely stable monomeric variant of human cystatin C with single amino acid substitution, *FEBS J.*, **2020**, 287(2), s. 361–376.
- [147] I. Ekiel, M. Abrahamson, Folding-related dimerization of human cystatin C, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(3), s. 1314–1321.

- [148] Y. Xu *et al.*, Developmental regulation of synthesis and dimerization of the amyloidogenic protease inhibitor cystatin C in the hematopoietic system, *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289(14), s. 9730–9740.
- [149] M. Abrahamson, Cystatins - Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases, *Cienc. Cult.*, **1993**, 45(5), s. 299–299.
- [150] M. Alvarez-Fernandez *et al.*, Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(27), s. 19195–19203.
- [151] E. Levy *et al.*, Stroke in icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases, *J. Exp. Med.*, **1989**, 169, s. 1771–1778, 1989.
- [152] A. Palsdottir, A. O. Snorraddottir, L. Thorsteinsson, Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects., *Brain Pathol.*, **2006**, 16(1), s. 55–59.
- [153] A. Szymańska *et al.*, Governing the monomer-dimer ratio of human cystatin C by single amino acid substitution in the hinge region, *Acta Biochim. Pol.*, **2009**, 56(3), s. 455–463.
- [154] R. Janowski *et al.*, 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular  $\beta$ -sheets, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **2005**, 61(3), s. 570–578.
- [155] M. Wahlbom *et al.*, Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282(25), s. 18318–18326.
- [156] R. Janowski, M. Abrahamson, A. Grubb, M. Jaskolski, Domain swapping in N-truncated human cystatin C, *J. Mol. Biol.*, **2004**, 341, s. 151–160.
- [157] P. J. Davis, D. Holmes, J. P. Waltho, R. A. Staniforth, Limited proteolysis reveals that amyloids from the 3D domain-swapping cystatin B have a non-native  $\beta$ -sheet topology," *J. Mol. Biol.*, **2015**, 427(15), s. 2418–2434.
- [158] R. Paramore *et al.*, Mapping local structural perturbations in the native state of stefin B (cystatin B) under amyloid forming conditions, *Front. Mol. Neurosci.*, **2012**, 5(8), s. 1–30.
- [159] E. Žerovnik *et al.*, High affinity copper binding by stefin B (cystatin B) and its role in the inhibition of amyloid fibrillation, *FEBS J.*, **2006**, 273(18), s. 4250–4263.
- [160] A. Szymańska, A. Marciniak, E. Krzyżak, J. Brasuń, First studies on the interactions of the C-terminal cystatin C fragment 85–94 with Cu(II) ions, *J. Coord. Chem.*, **2019**, 72(9), s. 1592–1602.
- [161] J. R. Brody, S. E. Kern, History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **2004**, 333(11), s. 1–13.
- [162] J. Kustos, A. Dybus, Techniki wykorzystywane w ukierunkowanej mutagenie białek, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, **2017**, 16(4), s. 35–44.

- [163] Addgene The Nonprofit Plasmid Repository 2020, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, [online] dostęp: 03.12.2020, <https://www.protocols.io/view/polymerase-chain-reaction-pcr-4wggxbw.html>.
- [164] M. Joshi, J. D. Deshpande, "Polymerase chain reaction: methods, principles and application, *Int. J. Biomed. Res.*, **2011**, s. 81–97.
- [165] S. Li, M. F. Wilkinson, Site-directed mutagenesis: A two-step method using PCR and DpnI, *Biotechniques*, **1997**, 23(4), s. 588–590.
- [166] F. Bolivar *et al.*, Construction and characterization of new cloning vehicle II. A multipurpose cloning system, *Gene*, **1977**, 2, s. 95–113.
- [167] L. G. Davis, M. D. Dibner, J. F. Battey, pBR322, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, **1986**, s. 24–25.
- [168] X. Soberon, L. Covarrubias, F. Bolivar, Construction and characterization of new cloning vehicles IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325, *Gene*, **1980**, 9(3–4), s. 287–305.
- [169] M. Abrahamson, H. Dalbøge, I. Olafsson, S. Carlsen, A. Grubb, Efficient production of native, biologically active human cystatin C by *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **1988**, 236(1), s. 14–18.
- [170] H. Dalbege *et al.*, High-level expression of active human cystatin C in *Escherichia coli*, *Gene*, **1989**, 79(46), s. 173964.
- [171] *Procedure of ion exchange chromatography*, dostęp: 08.12.2020, <https://microbenotes.com/ion-exchange-chromatography/>.
- [172] *SizeExChrom.png - Wikimedia Commons*, dostęp: 08.12.2020, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SizeExChrom.png>.
- [173] J. O. Jeppson, C. B. Laurell, B. Franzén, Agarose gel electrophoresis, *Clin. Chem.*, **1979**, 25(4), s. 629–638.
- [174] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2005**, 1751(2), s. 119–139.
- [175] *Alignment in Magnetic Fields*, dostęp: 16.12.2020, [http://bio.groups.et.byu.net/mri\\_training\\_b\\_Alignment\\_in\\_Magnetic\\_Fields.phtml](http://bio.groups.et.byu.net/mri_training_b_Alignment_in_Magnetic_Fields.phtml).
- [176] P. J. Hore, *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press, **2015**.
- [177] J. A. Weil, J. R. Bolton, *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley & Sons, **2007**.
- [178] B. J. Inkson, Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization, *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, Elsevier, **2016**, s. 17–43.
- [179] G. Słowik, Podstawy mikroskopii elektronowej i jej wybrane zastosowania w charakterystyce katalizatorów nośnikowych, *Adsorbenty i katalizatory. Wybrane technologie a środowisko*, Uniwersytet Rzeszowski, **2012**, s. 224–231.

- [180] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2010**, 1804(7), s. 1405–1412.
- [181] M. R. Krebs, E. H. Bromley, A. M. Donald, The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications, *J. Struct. Biol.*, **2005**, 149(1), s. 30–37.
- [182] O. K. Gasymov, B. J. Glasgow, ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2007**, 1774(3), no. 3, s. 403–411.
- [183] W. K. Ranatunga, D. Su, M. F. Romero, Obtaining Crystals, *Mol. Life Sci.*, **2018**, s. 841–848.
- [184] B. Rupp, *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*, Garland Science, **2009**.
- [185] N. E. Chayen, E. Saridakis, Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal, *Nat. Methods*, **2008**, 5(2), s. 147–153.
- [186] *Summary of the Process of X-Ray Crystallography*, dostęp: 04.02.2021  
<https://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-7-nucleic-acids/71-dna-structure-and-replic/structure-of-dna.html>.
- [187] *Figure 14.23.9*, dostęp: 29.12.2020,  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Bruice\)/14%3A\\_NMR\\_Spectroscopy/14.23%3A\\_X-Ray\\_Crystallography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Bruice)/14%3A_NMR_Spectroscopy/14.23%3A_X-Ray_Crystallography).
- [188] G. Taylor, The phase problem, *Acta Crystallogr.*, **2003**, 59(11), s. 1881–1890.
- [189] J. M. Rondeau, H. Schreuder, Protein crystallography and drug discovery, *The Practice of Medicinal Chemistry*, Elsevier, **2015**, s. 511–537.
- [190] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
- [191] K. Hanada *et al.*, Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, **1978**, 42(3), s. 523–528.
- [192] D. S. Wishart *et al.*, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shift referencing in biomolecular NMR, *J. Biomol. NMR*, **1995**, 6(2), s. 135–140.
- [193] F. Delaglio *et al.*, NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR*, **1995**, 6(3), s. 277–293.
- [194] W. Lee, M. Tonelli, J. L. Markley, NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy, *Bioinformatics*, **2015**, 31(8), s. 1325–1327.
- [195] M. Krug, M. S. Weiss, U. Heinemann, U. Mueller, XDSAPP: A graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS, *J. Appl. Crystallogr.*, **2012**, 45(3), s. 568–572.
- [196] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: Model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **2004**, 60(12), s. 2126–2132.

- [197] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr.*, **1997**, 53(3), s. 240–255.
- [198] S. C. Lovell *et al.*, Structure validation by C $\alpha$  geometry:  $\phi, \psi$  and C $\beta$  deviation, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **2003**, 50(3), s. 437–450.
- [199] N. G. Nossal *et al.*, The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase, *J. Biol. Chem.*, **1966**, 241(13), s. 3055–3062.
- [200] I. Ekiel, M. Abrahamson, Folding-related dimerization of human cystatin C, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(3), s. 1314–1321.
- [201] A. Kandegedara, D. B. Rorabacher, Noncomplexing tertiary amines as ‘better’ buffers covering the range of pH 3–11. Temperature dependence of their acid dissociation constants, *Anal. Chem.*, **1999**, 71(15), s. 3140–3144.
- [202] A. Tesmar *et al.*, Buffer contribution to formation enthalpy of copper(II)–bicine complex determined by isothermal titration calorimetry method, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **2016**, 126(1), s. 97–102.
- [203] P. Faller *et al.*, Methods and techniques to study the bioinorganic chemistry of metal–peptide complexes linked to neurodegenerative diseases, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256(19–20), s. 2381–2396.
- [204] B. Gerhartz, I. Ekiel, M. Abrahamson, Two stable unfolding intermediates of the disease-causing L68Q variant of human cystatin C, *Biochemistry*, **1998**, 37(49), s. 17309–17317.
- [205] A. Jahić, M. Tušek Žnidarič, S. Pintar, S. Berbić, E. Žerovnik, The effect of three polyphenols and some other antioxidant substances on amyloid fibril formation by Human cystatin C, *Neurochem. Int.*, **2020**, 140, s. 104806.
- [206] M. Orlikowska *et al.*, Structural characterization of V57D and V57P mutants of human cystatin C, an amyloidogenic protein, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2013**, 69(4), s. 577–586.
- [207] M. Kozak *et al.*, Expression of a selenomethionyl derivative and preliminary crystallographic studies of human cystatin C, *Acta Crystallogr.*, **1999**, 55(11), s. 1939–1942.
- [208] C. X. Weichenberger, B. Rupp, Ten years of probabilistic estimates of biocrystal solvent content: new insights via nonparametric kernel density estimate, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2014**, 70(6), s. 1579–1588.
- [209] R. Janowski *et al.*, Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping, *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, 8(4), s. 316–320.
- [210] W. L. DeLano, Pymol: An open-source molecular graphics tool, *CCP4 Newsl. protein Crystallogr.*, **2002**, 40(1), s. 82–92.