

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék



XXXII. OTDK Biológia szekció 2015

**DIÁKKÖRI DOLGOZAT**

Poliolok hatása amiloid fibrillumok képződésére

**Szabó Kitti**

Biológus MSc szakos hallgató II. évfolyam

Témavezető: Dr. Kotormán Márta

## **Tartalomjegyzék**

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| <b><u>Rövidítések jegyzéke</u></b> .....                     | 3  |
| <b><u>Bevezetés és célkitűzés</u></b> .....                  | 4  |
| <b><u>Irodalmi áttekintés</u></b> .....                      | 5  |
| Protein folding és misfolding.....                           | 5  |
| Az Alzheimer-kór.....                                        | 7  |
| Az amiloid fibrillumok képződésének gátlása .....            | 9  |
| A tripszin szerkezete .....                                  | 11 |
| <b><u>Anyagok és módszerek</u></b> .....                     | 12 |
| Anyagok .....                                                | 12 |
| Módszerek.....                                               | 12 |
| Tripszin módosítása PMSF-al .....                            | 12 |
| Fluoreszcencia spektroszkópia.....                           | 13 |
| Tioflavin T kötődés .....                                    | 13 |
| Az enzimaktivitás meghatározása .....                        | 13 |
| Turbiditás mérés.....                                        | 13 |
| Az aggregáció kinetikája.....                                | 14 |
| Kongóvíz kötődés.....                                        | 14 |
| <b><u>Kísérleti eredmények és értékelésük</u></b> .....      | 15 |
| Fluoreszcenciás mérések.....                                 | 15 |
| PMS-tripszin turbiditásának vizsgálata.....                  | 16 |
| A tripszin aggregációjának követése pH = 4,0-nél .....       | 17 |
| <b><u>Összefoglalás</u></b> .....                            | 25 |
| <b><u>Irodalomjegyzék</u></b> .....                          | 26 |
| <b><u>Köszönetnyilvánítás</u></b> .....                      | 30 |
| <b><u>Tételes szerzői hozzájárulás nyilatkozat</u></b> ..... | 31 |

## **Rövidítések jegyzéke**

|           |                                             |
|-----------|---------------------------------------------|
| A $\beta$ | $\beta$ amiloid peptid                      |
| ANS       | 8-anilino-1-naftalin-szulfonsav             |
| APP       | amiloid prekursor protein                   |
| AQ        | antrakinon                                  |
| ApoE      | apolipoprotein E                            |
| BAEE      | N $_{\alpha}$ -benzoil-L-arginil-etilészter |
| EGCG      | epigallocatechin gallát                     |
| NSAID     | nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer   |
| PEG       | polietilén glikol                           |
| PMSF      | fenil-metil-szulfonil-fluorid               |
| ThT       | tioflavin T                                 |

## **Bevezetés és célkitűzés**

Az amiloid fibrillumok jelenléte hozzájárul számos betegség komplikációihoz, mint pl. a szivacsos agyvelőgyulladáséhoz, az Alzheimer-, a Parkinson-, vagy a Huntington-kóréhoz, a II-es típusú diabéteszéhez, az elsődleges és a másodlagos szisztémás amiloidóziséhoz (Stefani, 2004). A legtöbb fehérje képes bizonyos körülmények között amiloid fibrillumokat képezni, ugyanis az amiloid fibrillumok képzésére való hajlam a polipeptid lánc peptid gerincének általános tulajdonsága (Dobson, 1999). Vízoldékony fehérjék *in vitro* aggregációja figyelhető meg enyhe denaturáló körülmények között, magas hőmérsékleten, az izoelektromos pont közelébe eső pH értéknél, vagy poláros szerves oldószerek jelenlétében (Ohnishi és Takano, 2004). Az ilyen körülmények a részlegesen kitekередett szerkezeteken keresztül segítik elő az aggregációt (Shokri és mtsai., 2013). A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a felületi töltéseknek is fontos szerepük van a fehérjék aggregációjában (Rezaei-Ghaleh és mtsai., 2007; Simon és mtsai., 2012).

Célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk az amiloid fibrillumok keletkezését tripszin modell-fehérjét használva szerves oldószerek: etanol, metanol és 1,4 dioxán jelenlétében fluoreszcencia spektroszkópiával, turbiditás mérésekkel, az aggregáció kinetikájának követésével, valamint kongó vörös kötődéssel. Vizsgálni akartuk a fibrillum képződés gátlhatóságát is. A natív szerkezet kémiai vegyületekkel való stabilizálása növeli a fibrillum képződés energia gátját és így hatékony terápiás stratégia lehet a fehérje konformációs betegségek megelőzésében (Marinelli és mtsai., 2013; Soldi és mtsai., 2006; Hård és Lendel, 2012). Terveztük tanulmányozni különböző poliolok (mono- és diszacharidok, aldózok, ketózok, dezoxi cukor, cukor alkohol, valamint polietilén glikol) aggregációra kifejtett gátló hatását. A poli hidroxil vegyületekkel növelhető a fehérjék natív szerkezetének stabilitása, így alkalmazásukkal gátlható a fehérjék aggregációjának hatékonysága.

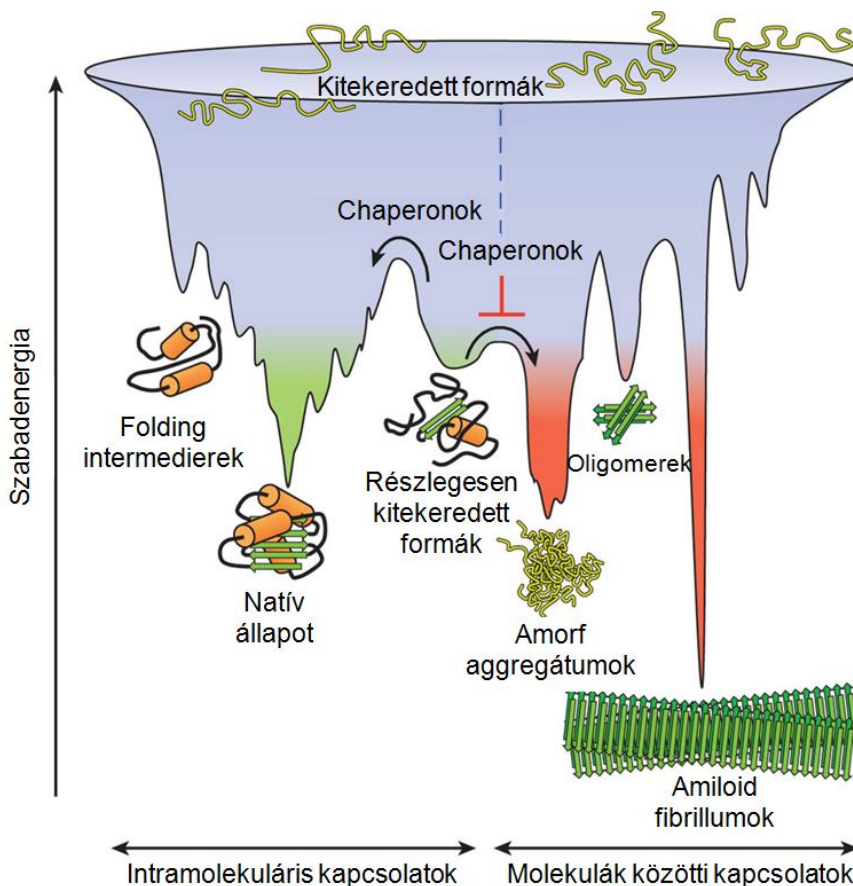
## Irodalmi áttekintés

### Protein folding és misfolding

A fehérjéknek szerteágazó szerepük van az élővilágban, és szinte az összes biológiai folyamatban részt vesznek. Nélkülözhetetlenségükre Jöns Jakob Berzelius svéd vegyész már 1838-ban rájött és elnevezte őket proteineknek, utalva arra, hogy „elsődleges fontosságú” vegyületekről van szó (Stryer, 1995). A fehérjék L-aminosavakból felépülő makromolekulák, felépítésükben húszféle aminosav vesz részt, melyek peptidkötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Szintézisük után felveszik az aminosav sorrendjük által meghatározott térszerkezetüket. A fehérjék a natív térszerkezet kialakítására törekednek, vagyis azt az állapotot akarják elérni, ahol alacsonyabb a szabadenergia szintjük. A fehérjék natív térszerkezetének kialakulását két kutató is vizsgálta. Az egyikük az amerikai Christian Anfinsen volt, aki ribonukleáz enzimmel végezte kísérleteit és bebizonyította, hogy az aminosavak sorrendje határozza meg a harmadlagos szerkezetet (Anfinsen, 1973). A másik, pedig a biokémikus Cyrus Levinthal, aki a fehérjék feltekeredésének sebességét vizsgálta és kutatási eredményei alapján megállapította, hogy ahhoz, hogy egy fehérje elérje a natív szerkezetét, nem járhatja be az összes lehetséges konformációs állapotot, mivel az túl időigényes lenne (Berg és mtsai., 2007).

Ahogy az 1. ábrán is látszik a fehérjék natív konformációja a polipeptidlánc viszonylag stabil állapota. Azokat a szabadenergia felületeket, amelyeket az ábrán zöld színnel jelöltek, a fehérjék akkor érintik, amikor közelednek a natív állapothoz. Itt intramolekuláris kapcsolatokkal stabilizált harmadlagos szerkezetek jellemzőek. A fehérjék natív térszerkezetének kialakítása *in vivo* a chaperon fehérjék segítségével történik meg, valamint ezek azok a segítő fehérjék, amelyek megakadályozzák a részlegesen kitekeredett formák amorf aggregátumokká való alakulását is. Az amorf aggregátumok létrejötte meglehetősen koncentrációfüggő, amelyek a fehérjék részlegesen kitekeredett formáiból keletkeznek. Ilyenkor a fehérjék belsejében, védett helyen található hidrofób részek a felszínre kerülnek és így aggregációs hajlamuk megnő. Ha különböző molekulák foldingja történik egyidejűleg azonos kompartmentben, akkor a folding szabadenergia felülete átfedhet az intermolekuláris aggregációéval, amorf aggregátumok, toxikus oligomerek vagy rendezett amiloid fibrillumok jöhetnek létre. Megfelelő *in vitro* körülmények között sok fehérje hajlamos rendezett, termodinamikailag stabil amiloid fibrillumokat képezni. A piros színnel jelölt amorf aggregátumokat és az amiloid fibrillumokat molekulák közötti kapcsolatok stabilizálják (Hartl és mtsai., 2011). A hibásan feltekeredett fehérjék akkumulációja különféle degeneratív megbetegedéseket válthat ki, amelyeket összefoglaló néven amiloidózisoknak

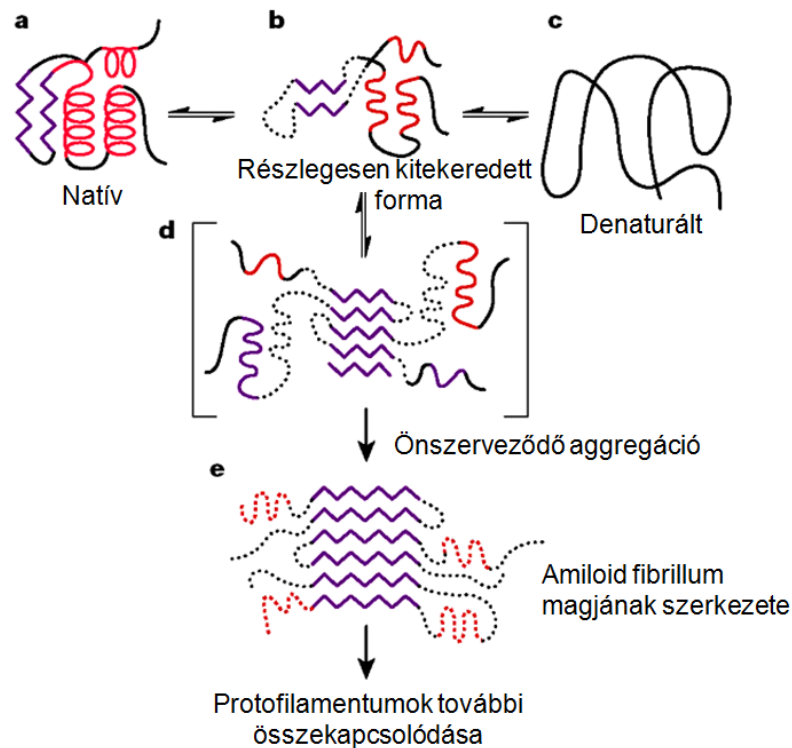
nevezünk (Simon és mtsai., 2012). A misfoldig folyamatához, azaz a fehérjék nem megfelelő térszerkezetének kialakulásához, valamilyen pontmutációs esemény, ill. a dajkafehérjék nem megfelelő működése vezethet (Chaudhuri és Paul, 2006).



1. ábra: Fehérje folding és aggregáció versengő reakciói (Hartl és mtsai., 2011).

A 2. ábrán az amiloid fibrillum képződés javasolt mechanizmusa látható. Az amiloid plakkok kialakulása során az addig globuláris (oldható) fehérje szerkezete megváltozik külső környezeti hatásokra, illetve mutáció hatására. A konformáció változás a natív szerkezettől eltérő, részlegesen kitekeredett „olvadt gombóc” formát hoz létre. A fehérje ezután denaturálódhat, vagy a részlegesen kitekeredett forma  $\beta$ -lemez szerkezetű elemei (doménjei) egymás mellé rendeződhetnek. Így egy  $\beta$ -redőben gazdag képlet, oligomer keletkezik. Erre a képletre jellemző, hogy a  $\beta$ -lemez struktúrákat - amelyek egymás mellett helyezkednek el - H-híd kötések tartják együtt. Az így kialakult szerkezet mintaként szolgál további fehérje molekulák hozzákapcsolódásához. A stabil, főleg  $\beta$ -lemezből felépülő mag képezi a protofilamentumot az amiloid fibrillumon belül. A  $\beta$ -lemez szerkezetű polipeptid láncok a képződött oldhatatlan amiloid fibrillum hossz tengelyére merőlegesen helyezkednek el. A

folyamat végén kialakult vízben nem oldható amiloid fibrillumok a sejtek pusztulását okozhatják (Krebs és mtsai., 2004; Selkoe, 2003). Ahhoz, hogy egy fehérje aggregátumot amiloid fibrillumnak nevezzünk, három kritériumnak kell megfelelnie. Tartalmaznia kell  $\beta$ -lemez struktúrát, fibrilláris morfológiát kell mutatnia és jellegzetesen festődnie kell pl. kongóvírral (Nilsson, 2004).

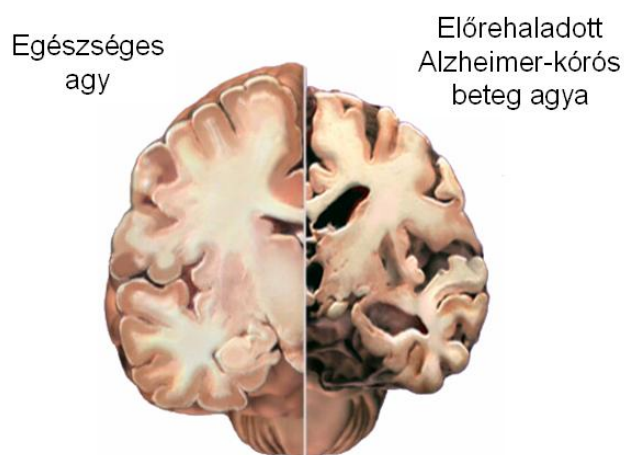


2. ábra: Az amiloid fibrillum képződés javasolt mechanizmusa (Selkoe, 2003).

## Az Alzheimer-kór

Napjainkban egyre magasabb a neurodegeneratív megbetegedések száma, közülük is első helyet foglalja el az Alzheimer-kór. A betegség során megfigyelhető a jellegzetes  $\beta$ -amiloid peptidből ( $A\beta$ ) felépülő plakkok neuronokon kívüli- és a tau ( $\tau$ ) fehérje egy abnormális formájának a neuronokon belüli akkumulációja. Az  $A\beta$  az amiloid prekursor protein (APP) hasítása révén keletkezik. A 39–43 aminosavból álló  $A\beta$  kísérletesen a toxikus mechanizmusok széles sorát mutatja *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Ezzel szemben az  $A\beta$  bizonyos kísérleti körülmények között néhány érdekes neuroprotektív és fiziológiai tulajdonságot is mutat utalva arra, hogy az  $A\beta$  fiziológiás és patológiás szerepe különböző faktoroktól függhet. Az Alzheimer-kórban a  $\tau$  fehérje hiperfoszforilált formája van jelen. A

kórt elsőként Alois Alzheimer írta le 1907-ben. A betegség szellemi leépüléssel és a kognitív képességek csökkenésével jár, főként a 65 év felettieket sújtja, de akár már 40 éves korban is jelentkezhet. A betegség gyakorisága az elmúlt években egyre nő. Világszerte körülbelül 35 millió embert érint (Anstey és mtsai., 2013). Becslések szerint jelenleg 5,2 millió amerikai szenved Alzheimer-kórban. Közülük 200000-en 65 évnél fiatalabbak, 5 millióan pedig 65 évesek, vagy idősebbek. Mivel a várható élettartam növekszik, így 2050-re az Alzheimer-kóros betegek száma várhatóan megháromszorozódik (Alzheimer's Association, 2014; Rubio-Perez és Morillas-Ruiz, 2012; Carrillo-Mora és mtsai., 2014; Sadik és Wilcock, 2003). Az Alzheimer-kór genetikai rizikó faktora az apolipoprotein E (ApoE) fehérjét kódoló APOE gén 4-es alléljának jelenléte (Spinney, 2014). Az Alzheimer-kór esetén az agy krónikus gyulladása figyelhető meg, mely súlyos szöveti romláshoz vezet. Az egészséges- és az előrehaladott Alzheimer-kóros beteg agyának összehasonlítása alapján jól látható hogyan változik a sejtvesztés a betegség következtében (3. ábra).



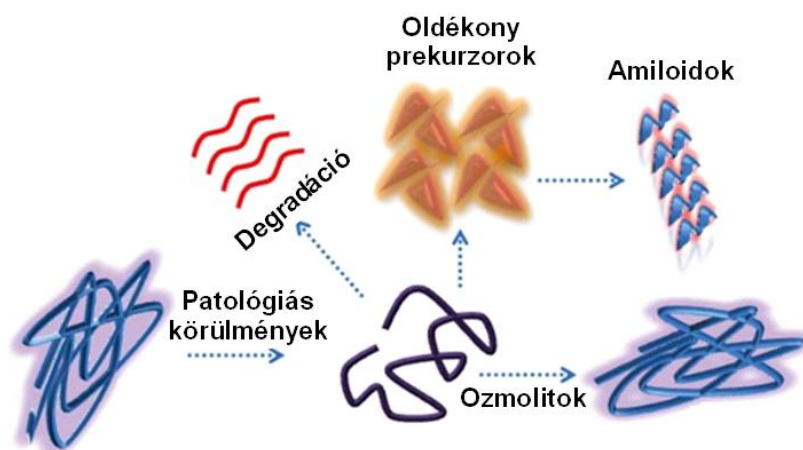
3. ábra: Egészséges- és előrehaladott Alzheimer-kóros beteg agyának összehasonlítása.  
[http://www.alz.org/braintour/healthy\\_vs\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/braintour/healthy_vs_alzheimers.asp)

$\beta$ -lemezt megszakító peptiddel való kezelés csökkenti az agy gyulladását. Epidemiológiai vizsgálatok során megfigyelték, hogy a nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerekkel (NSAID) pl. aszpirinnel való kezelés csökkenti az Alzheimer-kór kialakulásának kockázatát. Sajnos a NSAID-ok klinikai vizsgálata nem volt nagyon gyümölcsöző az Alzheimer-kóros betegeknél. Specifikus  $A\beta$  csökkentő NSAID-okat használva a jövőben kideríthető, hogy klinikailag hatékonyak-e. Egyik lehetséges hipotézis szerint a NSAID-ok segítenek csökkenteni a betegség gyakoriságát, de nem hasznosak, ha már a betegség megjelent. A gyulladáskeltő válaszokat ellensúlyozni lehet polifenolokkal. Ezekkel a természetes

vegyületekkel való kiegészítés új terápiás vonalat jelenthet ennek az agyi rendellenességnek a megközelítésében (Rubio-Perez és Morillas-Ruiz, 2012; Thomas és mtsai., 2001). Az Alzheimer-kór kezelésére javasolt további stratégiák lehetnek pl. az APP-ből A $\beta$ -t termelő  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretáz részleges gátlása, a koleszterin-szint csökkentő gyógyszerek alkalmazása, vagy a Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> kelátor clioquinol antibiotikummal való kezelés is (Hardy és Selkoe, 2002).

#### Az amiloid fibrillumok képződésének gátlása

Sok állat, növény és mikroorganizmus ozmolitok akkumulációja által növeli a makromolekulái stabilitását stressz körülmények között. A természetben előforduló ozmolitok eltolják a folding egyensúlyát a natív konformáció irányába, stabilizálják a fehérjéket. Az ozmolitok olyan kis méretű szerves vegyületek, melyek különböző kémiai osztályokhoz tartozhatnak, így lehetnek aminosavak (prolin és glicin), metilaminok (betain és trimetilamin-N-oxid) és poliolok. Megvédik a fehérjéket a misfoldingtól, így hatékony terápiás ágensek lehetnek. Patológias körülmények között a natív, funkcionálisan aktív fehérje részlegesen kitekeredik, így lehetővé válik vagy a nem kívánatos degradációja, vagy pedig olyan oldékony prekurzorokká alakulása, melyek amiloidokat tudnak képezni. Az ozmolitok segítik a részlegesen kitekeredett formát natív konformációjává visszaalakítani, így megelőzhetők velük a fehérje konformációs betegségek (4. ábra) (Khan és mtsai., 2010).



4. ábra: Az ozmolitok használatának lehetséges terápiás mechanizmusa (Khan és mtsai., 2010).

A trehalózt hatékonyan találták az A $\beta$  aggregációjának gátlásában és citotoxicitásának csökkentésében (Liu és mtsai., 2005). A természetben előforduló extremolitról az  $\alpha$ -D-mannozil-glicerátról kimutatták, hogy védi a fehérjéket különböző stressz körülmények között és szignifikáns gátló hatása van az A $\beta$  amiloid képződés ellen (Ryu és mtsai., 2008).

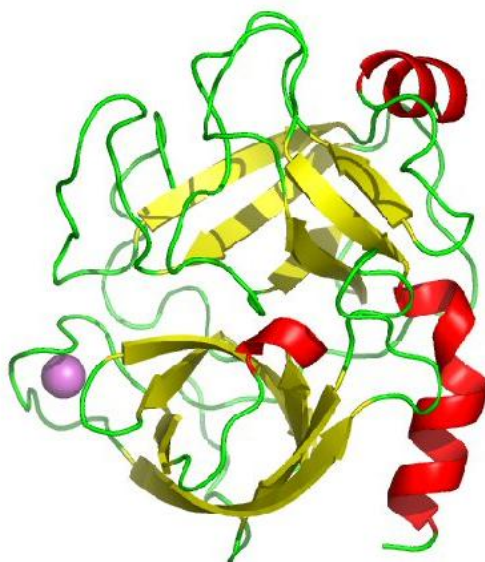
Kimutatták az aromás kölcsönhatások szerepét az amiloid fibrillum képződésben. Aromás vegyületek, különösen a kis méretű polifenolok hatékonyan gátolják a fibrillumok *in vitro* képződését azáltal, hogy aromás kölcsönhatásokat alakítanak ki az amiloidogén fehérjével. Feltételezik, hogy a vörös borban található polifenolok megakadályozhatják az Alzheimer-kór kialakulását, nem csupán a reaktív oxigén gyökök befogása által, hanem közvetlenül gátolják a fibrillaris  $\beta$ -amiloid lerakódását az agyban (Porat és mtsai., 2006). Az élelmiszerekben vagy a gyógynövény készítményekben előforduló polifenolokat, mint például az epigallocatechin gallátot (EGCG), a kurkumint és a rezveratrolt már tanulmányozták amiloid inhibitorként. A tea katechin polifenol az EGCG különböző fehérjék aggregációját gátolhatja és folyamatban van az elbírálása az Alzheimer-kórral kapcsolatos klinikai vizsgálatokban. A természetes polifenolok oxidatív intermedierei a kinonok (benzokinonok (BQ), naftokinonok (NQ), antrakinonok (AQ) és fenantrakinonok (PQ)) széles körben előfordulnak a gyógynövényekben és az élelmiszerekben. A rebarbara kivonatban megtalálható AQ számos bioaktív származéka olyan gyógyszer, amelyeket az amiloidózissal összefüggő betegségek, mint pl. az Alzheimer-kór kezelésére lehet használni. Az egyik antrakinonról az emodinről (EM) leírták, hogy hatékonyan gátolja a tau aggregációját és neuroprotektív hatást mutat. A rebarbara antrakinonok befolyásolhatják a fehérje misfoldingot és az aggregációt. Tesztelték az anti-amiloid hatását 4 egyszerű kinonnak és 4 rebarbarában előforduló természetes antrakinon-származéknak. Különböző mértékben mind a 8 kinon gátolta az inzulin oligomerizációját, különösen az 1,4-benzokinon vagy az 1,4-naftokinon. Bár néhány növényi kinonról azt gondolják, hogy allergének, a kinonok továbbra is fontos forrásai az anti-amiloid inhibitoroknak (Gong és mtsai., 2014). Az eredmények azt mutatják, hogy a szabadgyökök fokozzák a fibrillum képződést, így a gyökfogók (pl. aszkorbinsav, trolox és rifampicin) gátolják az A $\beta$  aggregációját. Ezeknek a vegyületeknek a hidrofób és/vagy aromás jellege jelentősen hozzájárul a fibrillum képződést gátló hatásukhoz, míg az antioxidáns hatásuk főleg a destabilizáció támogatásában nyilvánul meg (Shoval és mtsai., 2007).

Olyan kémiai vegyületek, amelyek szelektíven stabilizálják a natív  $\alpha$ -héliceket a fehérjékben, növelik a fibrilláció energia gátját, így használhatók az amiloid képződés elleni harcban molekuláris szinten (Marinelli és mtsai., 2013). Ghosh és munkatársai vizsgálatai azt mutatták, hogy a hosszú szénláncú polietilén glikolok (PEG-ek) (PEG 20000 és PEG 35000) kulcs szerepet játszhatnak a tojás fehérje lizozim natív szerkezetének stabilizálásában, chaperon szerű aktivitást mutatva, így megelőzve a fehérje fibrillációját (Ghosh és mtsai., 2014). Ragi és munkatársai vizsgálták a humán szérum albumin kölcsönhatását PEG-el és azt találták, hogy a PEG hidrogén híd kötésekkel kapcsolódik a fehérjéhez (Ragi és mtsai., 2005),

míg mások szerint hidrofób kölcsönhatásokkal kötődik a fehérjékhez (Hamada és mtsai., 2009). Kimutatták, hogy a polioloknak védő hatásuk van a fehérje denaturáció különböző típusaival szemben, és hogy a nagy molekulatömegű poliolok stabilizálják a fehérje szerkezetet (Naseem és Khan, 2003).

#### A tripszin szerkezete

A modell fehérjeként választott tripszin két doménből épül fel, mindkettő natív szerkezetében 6-6 antiparallel  $\beta$ -lemez található, melyek két egymáshoz képest merőleges állású  $\beta$  hordót képeznek (5. ábra) (Nagano és mtsai., 1999). A tripszin szerves oldószerek jelenlétében különböző másodlagos szerkezeteket vesz fel. A  $\beta$ -lemez szerkezet aránya 31 és 53 % között változik a jelen lévő szerves oldószer természetétől és koncentrációjától függően a cirkuláris dikroizmus mérések alapján (Simon és mtsai., 2001), így alkalmas a fibrillumképződés tanulmányozására.



5. ábra: A tripszin szerkezete.  
Lilával a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot jelölve.

<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase2.html>

## Anyagok és módszerek

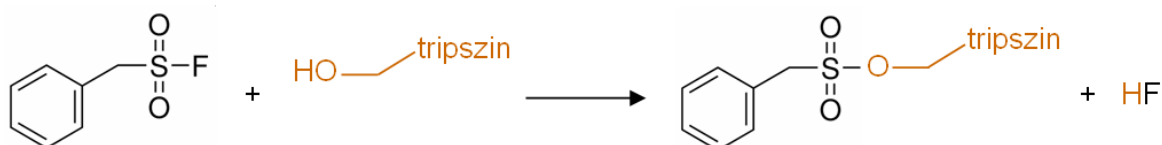
### Anyagok

Az N $\alpha$ -benzoil-L-arginil-etilészter (BAEE) szubsztráttal mért 9000 U/mg specifikus aktivitású tripszint a Sigma-Aldrich Kft. forgalmazta. 1 U az az enzim mennyiség, amely pH = 7,6-nál percenként 0,001 abszorpció-növekedést okoz 25 °C-on, 253 nm-nél. A 8-anilino-1-naftalin-szulfonsavat (ANS) és a tioflavin T-t (ThT) is a Sigma-Aldrich Kft.-től vettük. A BAEE, az L-szorbóz, a PEG 4000 és 6000 a Fluka terméke volt. A D-glükózt és az etanolt a Molar Chemicals Kft gyártotta. A többi vegyszert a Reanal Finomvegyszergyár ZRt.-től szereztük be. A D-xilitet étkezési „nyírfacukor”-ként vettük.

### Módszerek

#### Tripszin módosítása PMSF-al

A tripszin fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) történő kovalens módosítása az aktív centrumban lévő szerin aminosav oldalláncot érinti, így az enzim elveszti katalitikus aktivitását (6. ábra). Erre azért van szükség, mert az enzim neutrális pH-n autolizálna, ami befolyásolná fibrillum képződés hatékonyságát.



6. ábra: Tripszin gátlása PMSF-al.

8,4  $\mu\text{l}$  100 mM 2-propanolban oldott PMSF-ot, majd 20  $\mu\text{l}$  50 mg/ml 0,001 N HCl-ban oldott tripszint adtunk 2 ml 0,05 M kálium-foszfát pufferhez (pH = 7,0) folyamatos kevertetés mellett. Az előbbi mennyiségek adagolását még négyszer megismételtük, mindig 5 percet vártunk a következő adagolás előtt. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten (25 °C-on) inkubáltuk 30 percig. A reagens fölöslegétől Sephadex G 25 oszlopon való géliszűréssel szabadultunk meg 0,05 M K-foszfát pufferes (pH = 7,0) elúcióval. 1 ml-es frakciókat szedtünk, majd megmértük a minták extinkcióját 280 nm-en és aktivitást mérve ellenőriztük a módosítás hatékonyságát. Megállapítottuk, hogy a módosító reagens enzimhez viszonyított 20-szoros feleslegével a tripszin 95 %-át sikerült fenil-metil-szulfonil tripszinné alakítani.

## Fluoreszcencia spektroszkópia

A kísérleteket Hitachi F-2500 FL spektrofluoriméterrel végeztük 5 nm gerjesztési és 10 nm emissziós résbeállításokkal 1 cm-es küvettát használva. A mérésekhez 150 µg/ml koncentrációjú enzimoldatot 60 % metanol koncentráció mellett 5 mM foszfát puffer jelenlétében (pH = 7,0) 1 napig szoba hőmérsékleten inkubáltuk, majd 100 µl mintához 900 µl 50 µM ANS oldatot adtunk, mely 10 mM nátrium-foszfát puffer jelenlétében pH = 7,0-nél 150 mM NaCl-ot is tartalmazott. Az ANS fluoreszcencia vizsgálatakor 365 nm gerjesztési hullámhossznál az emissziós spektrumokat 400–600 nm hullámhossz-tartományban vettük fel. A fluoreszcenciás spektrumok felvétele 30 perccel az ANS-nak a mintákhoz való hozzáadása után történt.

## Tioflavin T kötődés

300 µg/ml tripszin tartalmú mintákat 24 °C-on inkubáltuk 24 óráig különböző szerves oldószer koncentrációknál 10 mM foszfát puffer jelenlétében pH = 7,0-nél. 100 µl mintához 0,9 ml 65 µM ThT oldatot adtunk (10 mM nátrium foszfát, pH = 7,0, 150 mM NaCl), majd 5 perc múlva mértük a fluoreszcenciát. A gerjesztési hullámhossz 440 nm volt, az emissziót pedig 485 nm-nél mértük, 5 nm gerjesztési és 10 nm emissziós résbeállításokkal 1 cm-es küvettát használva.

## Az enzimaktivitás meghatározása

A tripszin aktivitásának meghatározása a BAEE és az N-benzoil-L-arginin karboxilát formájának spektrális különbségén alapul. Az enzim aktivitását Schwert és Takenaka szerint mértük, fotometriásan követve az extinkció növekedését 253 nm-en pH = 8,0-nál (Schwert és Takenaka, 1955). A reakciót 20 µl 0,15 mg/ml fehérje koncentrációjú enzimoldattal indítottuk. A reakcióidő 3 perc volt.

## Turbiditás mérés

A turbiditás méréseknél 350 nm-en követtük az extinkció változását Hitachi U-2000 spektrofotométert használva 1 cm-es küvettával. A tripszin koncentrációja a turbiditás méréseknél 0,15 mg/ml volt etanolos és metanolos közegben, míg 1,4 dioxán jelenlétében 0,3 mg/ml volt 10 mM foszfát pufferben pH = 7,0-nél, illetve 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/citromsav pufferben pH = 4,0-nél. Az oldószer koncentráció 30–80 % (v/v) között változott. A mintákat 24 óráig inkubáltuk 24 °C-on a mérések előtt.

### Az aggregáció kinetikája

Az aggregáció kinetikájának tanulmányozása során 15–30 percig követtük a minták extinkció változását Hitachi U-2000 spektrofotométerrel 350 nm-en 60 % szerves oldószer tartalomnál PEG 6000 jelenlétében és PEG nélkül pH = 4,0-nél 0,15–0,3 mg/ml fehérjekoncentráció mellett. Az értékek leolvasása percenként történt.

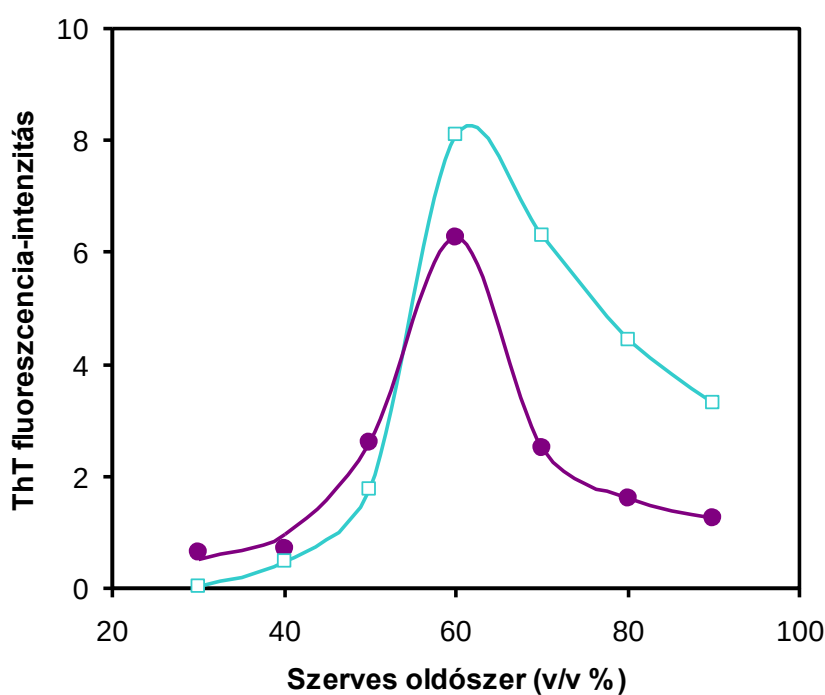
### Kongóvörös kötődés

Az amiloid-specifikus kongóvörös kötődést 5 mM foszfát puffer jelenlétében mértük pH = 7,0-nél 150 mM NaCl jelenlétében. A kongó vörös koncentrációja 11  $\mu$ M, a fehérjéé pedig 2,5  $\mu$ M volt. 200  $\mu$ l 60 % szerves oldószer tartalmú, 1 napig 24 °C-on pH = 4,0-en inkubált mintát összekevertünk 0,8 ml kongóvörös oldattal, majd 15 perc múlva felvettük az abszorpciós spektrumot 400–600 nm hullámhossz-tartományban 1 cm-es küvettát használva. Amiloid fibrillumok jelenlétében az abszorpciós maximum magasabb hullámhosszak felé való eltolódását (vörös eltolódás), és abszorpciós intenzitás növekedést mértünk. A minták abszorpciós spektrumaiból kivontuk a kongóvörös és a fehérje spektrumát, az így kapott differencia spektrum jól tükrözi a kongóvörös amiloid fibrillumokhoz való kötődésekor tapasztalt spektrális változást.

## Kísérleti eredmények és értékelésük

### Fluoreszcenciás mérések

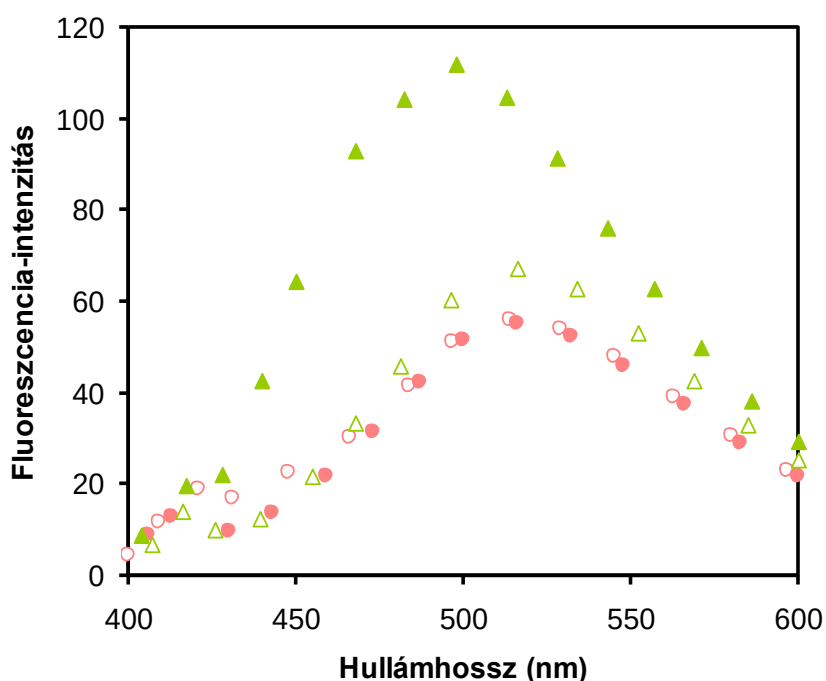
A tioflavin T-t széles körben használják amiloid fibrillumok azonosítására, hiszen a fibrillumokhoz való szelektív kötődésekor jelentősen megnövekszik a fluoreszcenciás intenzitása (Biancalana és Koide, 2010). A tioflavin T kötődés oldószer koncentráció függését vizsgálva megállapítottuk, hogy 60 % oldószer koncentrációnál volt mérhető a maximális fluoreszcenciás intenzitás 24 órás inkubáció után etanol és metanol oldószerekben pH = 7,0-nél 10 mM foszfát puffer jelenlétében, vagyis 60 % oldószer koncentráció mellett keletkezett a legtöbb fibrillum (7. ábra). 440 nm gerjesztési hullámhossznál, az emissziót 485 nm-nél mértük, 5 nm gerjesztési és 10 nm emissziós résbeállításokkal 1 cm-es küvettával. Az 1,4 dioxán koncentráció függésének vizsgálatakor is 60 % oldószer koncentrációnál mértük a legnagyobb fluoreszcenciás intenzitást (az adatokat nem tüntettük fel).



7. ábra: Tioflavin T kötődés oldószekoncentráció függése 24 órás inkubáció után 24 °C-on pH = 7,0-nél. Enzim koncentráció: 30 µg/ml. Etanol (●), metanol (□).

A laborban végzett korábbi kísérletek szerint szerves oldószerek jelenlétében a fehérje szerkezet lazulása volt megfigyelhető ANS-al. Az ANS nem tud kötődni a natív enzim hidrofíl felületéhez, hanem csak a részlegesen kitekeredett fehérje hidrofób régiójához,

melynek eredményeként megnövekszik a fluoreszcenciás intenzitása, és az emissziós maximuma ( $\lambda_{\text{max}}$ ) az alacsonyabb hullámhossz felé tolódik el (kék eltolódás) (Edwin és Jagannadham, 1998). A 8. ábrán jól látható, hogy 60 % metanol jelenlétében az ANS-nak magának a fluoreszcenciás intenzitás maximuma 516 nm-nél van, míg tripszinnel együtt a maximum értéke 498 nm-re tolódott és közben a fluoreszcenciás intenzitás értéke 1,7-szeresére nőtt pH = 7,0-nél 5 mM nátrium-foszfát puffer jelenlétében. A mintákat 24 °C-on 24 óráig inkubáltuk az ANS hozzáadása előtt, majd 30 perc múlva vettük fel a fluoreszcenciás spektrumokat 400 és 600 nm között. Ugyanakkor puffer jelenlétében nem tapasztaltunk spektrális változást, hiszen pufferes közegben nem változott a fehérje szerkezete.

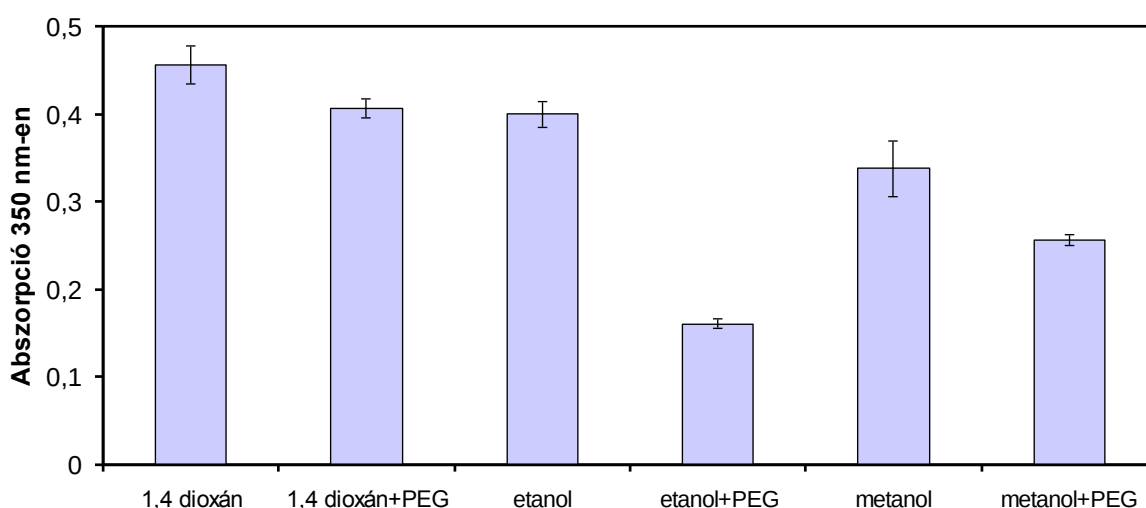


8. ábra: Tripszin-ANS fluoreszcencia spektrumok 5 mM nátrium-foszfát puffer jelenlétében pH = 7,0-nél (●), 60 % metanol koncentrációnál (▲) 24 °C-on való 24 órás inkubáció után az ANS spektrumaival pufferben (○) és 60 % metanolban (△).  
Fehérje koncentráció: 15 µg/ml. Gerjesztési hullámhossz: 365 nm.

#### PMS-tripszin turbiditásának vizsgálata

A tripszin pH = 7,0-nél autolízisre hajlamos. Az autolízis viszont megváltoztatja a fehérje amiloid fibrillum képzési hajlamát. Az autolízis kivédésére fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) irreverzibilisen módosítottuk az enzim aktív centrumában lévő szerin aminosav oldalláncot, így inaktívtuk az enzimet. Korábbi kísérletek alapján tudtuk, hogy a poliolok közül a PEG-ek jelentősen gátolják a tripszin aggregációját pH = 7,0-nél. A PMS-

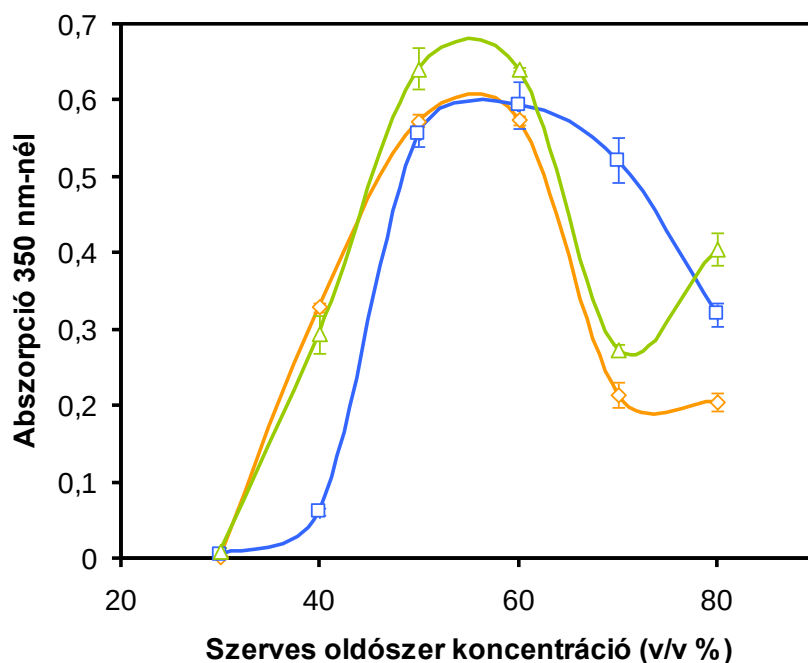
tripszint használtuk a PEG 4000 aggregációt gátló hatásának vizsgálatára. Megmértünk a minták turbiditását 60 % 1,4 dioxán, 60 % etanol és 60 % metanol koncentrációnál 50 mg/ml PEG 4000 jelenlétében és nélküle. A turbiditás mérés felhasználható az aggregátumok mennyiségének becslésére (Necula és mtsai., 2007). Megállapítottuk, hogy az 50 mg/ml PEG 4000 jelenléte 1,4 dioxánban 0,3 mg/ml fehérje koncentrációnál 11 %-kal, míg etanolban 60 %-kal, metanolban pedig 24 %-kal csökkentette az aggregátumok mennyiségét 60 % oldószer koncentrációnál 1 napos 24 °C-on való inkubáció után 0,15 mg/ml fehérje koncentráció mellett (9. ábra).



9. ábra: PMS-tripszin turbiditás változása 24 °C-on pH = 7,0-nél 60 % szerves oldószer koncentráció mellett 50 mg/ml PEG 4000 jelenlétében és nélküle 24 órás inkubáció után. Fehérje koncentráció: 0,15 mg/ml az etanolos és a metanolos közegben, 0,3 mg/ml az 1,4 dioxános közegben.

A tripszin aggregációjának követése pH = 4,0-nél

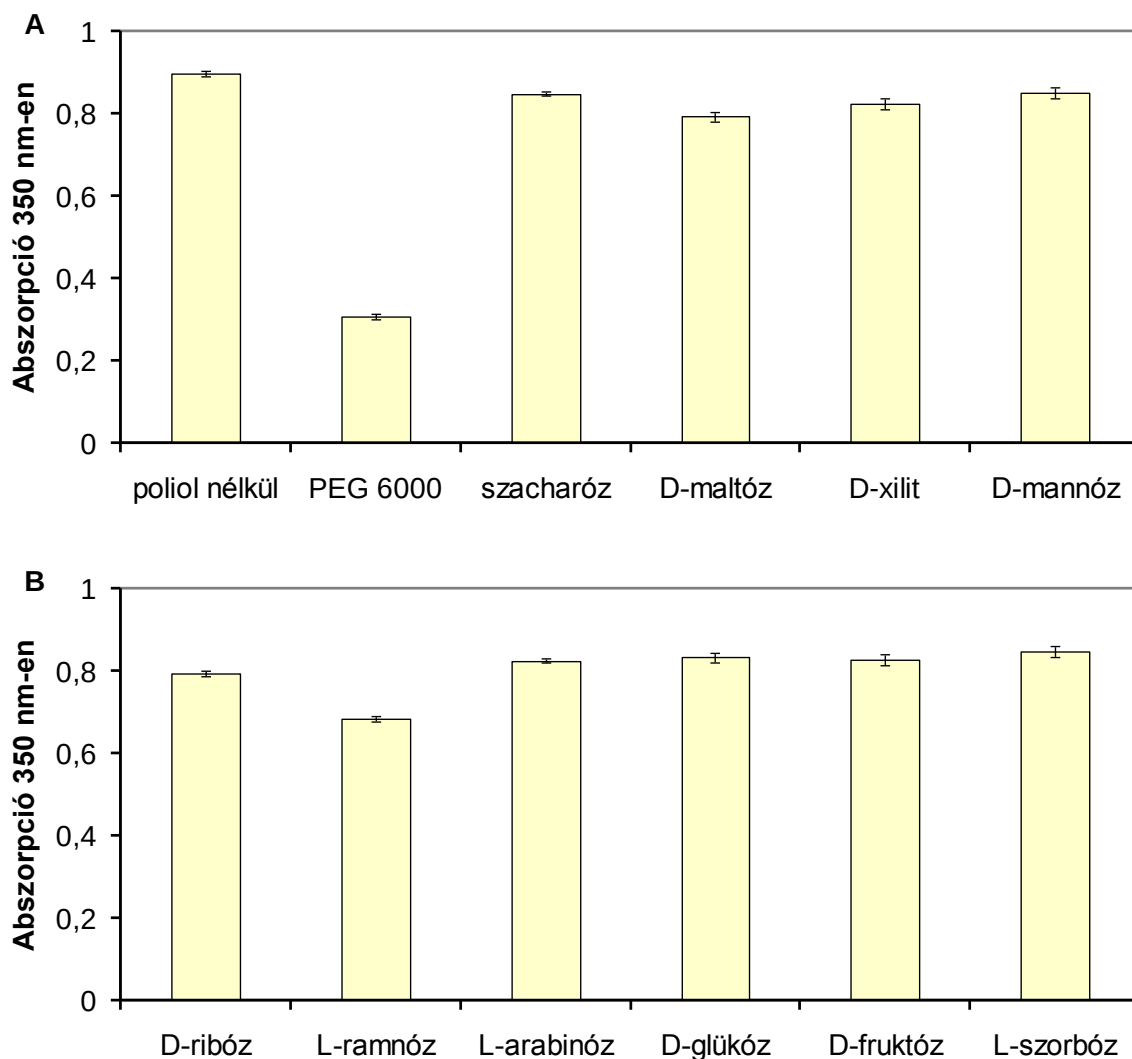
Azért, hogy ne kelljen az autolízis kivédésére PMSF-os módosítást csinálni, a további kísérleteinket pH = 4,0-nél végeztük 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/citromsav pufferben. Megvizsgáltuk a tripszin turbiditás változását különböző koncentrációjú etanol, metanol és 1,4 dioxán jelenlétében 24 °C-on való 24 órás inkubáció után. A fehérje koncentráció etanolos és metanolos közegben 0,15 mg/ml volt, míg 1,4 dioxán jelenlétében 0,3 mg/ml tripszin koncentrációt alkalmaztunk. 50–60 % oldószer koncentrációnál mértünk a legnagyobb turbiditást mindhárom oldószerben (10. ábra). Így a további vizsgálatokat 60 % oldószer koncentrációnál végeztük.



10. ábra: Tripszin turbiditás változása 24 °C-on pH = 4,0-nél különböző koncentrációjú etanol (◇), metanol (□) és 1,4-dioxán (△) jelenlétében 24 órás inkubáció után. Fehérje koncentráció: 0,15 mg/ml az etanolos- és a metanolos közegben, 0,3 mg/ml a 1,4 dioxános közegben.

Megvizsgáltuk különböző polioloknak a tripszin aggregációjára kifejtett hatását. Az általunk vizsgált poli-hidroxi vegyületek között volt mono- és diszacharid, aldóz, ketóz, cukoralkohol, dezoxi cukor és polietilén glikol egyaránt. 350 nm-en megmértük a minták extinkcióját 24 °C-on való 24 órás inkubáció után, pH = 4,0-nél 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/citromsav puffer jelenlétében, 60 % etanol koncentrációnál, 50 mg/ml poliol jelenlétében és nélküle 0,15 mg/ml fehérje koncentráció mellett. A mérési eredményeinket a 11. ábrán tüntettük fel. Az aggregáció legjelentősebb mértékű gátlását a PEG 6000 esetében mértük, 50 mg/ml-es koncentrációban 34 %-ra csökkentette az aggregátumok mennyiségét a PEG 6000-et nem tartalmazó mintához képest. A többi poliol aggregációt csökkentő hatása 24 és 5 % között változott, tehát lényegesen elmaradt a PEG 6000 hatásához képest. Így a további vizsgálatok során a PEG 6000 aggregációra kifejtett hatását tanulmányoztuk részletesebben. A natív szerkezet kémiai vegyületekkel való stabilizálása növeli a fibrillum képződés energia gátját és így hatékony terápiás stratégia lehet a fehérje konformációs betegségek megelőzésében (Marinelli és mtsai., 2013; Soldi és mtsai., 2006; Hård és Lendel, 2012). A polietilén glikol (PEG) nem toxikus, biokompatibilis, vízdékony, hidrofil nem-ionos polimer. A PEG-ek a fehérjék típusától és a kísérleti körülményektől függően elősegítik vagy gátolják a fehérjék

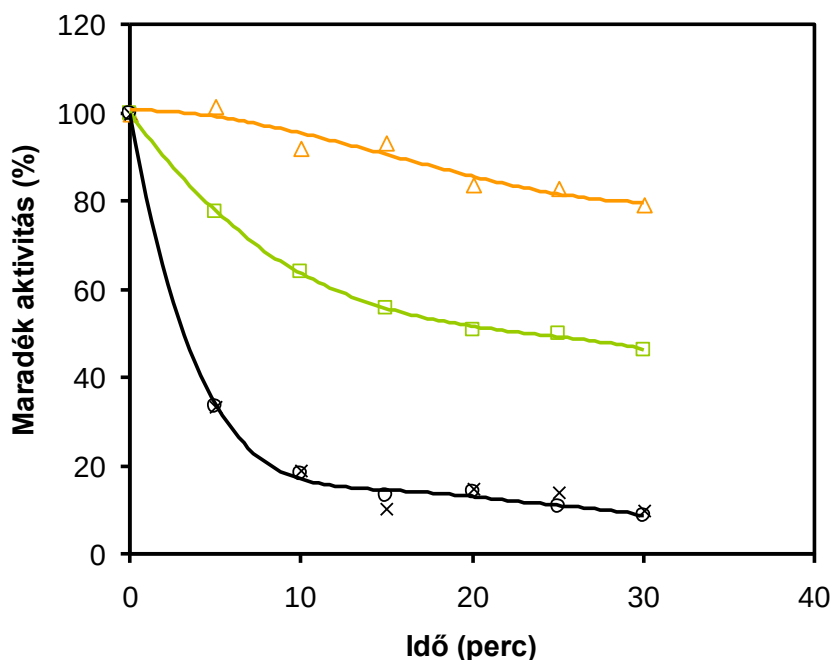
aggregációját (Ma és mtsai., 2012). Traumás agysérülés utáni polietilén glikol kezelés redukálta a  $\beta$ -amiloid prekursor fehérje akkumulációját degenerálódó axonokban (Koob és Borgens, 2006). A hosszú láncú PEG-ek meggátolják a tojás fehérje lizozim alkálisó közvetített fibrillációját (Ghosh, 2014).



11. ábra: Tripszin turbiditás változása 24 °C-on pH = 4,0-nél 60 % etanol koncentrációjánál 50 mg/ml poliol jelenlétében és nélküle 24 órás inkubáció után.  
Fehérje koncentráció: 0,15 mg/ml.

Megvizsgáltuk a tripszin aktivitásának változását is 60 % etanol koncentráció mellett PEG 6000 nélkül és különböző PEG 6000 koncentrációk mellett is. Azt kaptuk, hogy 25 mg/ml-es koncentrációban a PEG 6000 nem befolyásolja az aktivitás csökkenésének mértékét. Az 50 és a 75 mg/ml-es koncentrációjú PEG 6000 jelenléte viszont koncentrációtól függő mértékben mérsékelte a tripszin aktivitás vesztesét, jelezve a PEG 6000 fehérje szerkezetet stabilizáló hatását (12. ábra). Mivel a polietilén glikolok hidrogén-híd kötésekkel,

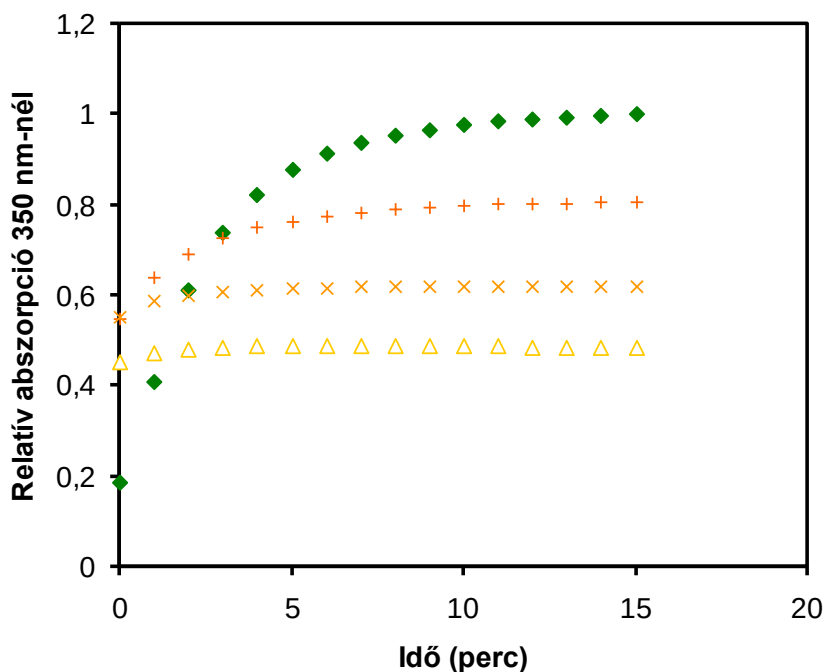
vagy hidrofób kölcsönhatás révén kapcsolódni tudnak a fehérjékhez (Ragi és mtsai., 2005; Hamada és mtsai., 2009; Wu és mtsai., 2013), védő hatásuk van a fehérje denaturáció különböző típusaival szemben (Naseem és Khan, 2003), képesek stabilizálni a fehérjéket (Bhat és Timasheff, 1992; Shimizu és Smith, 2004).



12. ábra: Tripszin aktivitásának változása 60 % etanol koncentráció mellett PEG 6000 nélkül (x) és 25 mg/ml (○), 50 mg/ml (□) és 75 mg/ml PEG 6000 (△) jelenlétében. Fehérje koncentráció: 0,15 mg/ml.

Az aggregáció kinetikájának tanulmányozásakor követtük az extinkció változását 350 nm-en időben PEG 6000 jelenlétében és nélküle 60 % szerves oldószer koncentrációnál pH = 4,0-nél, hogy megvizsgáljuk a PEG 6000 aggregációra kifejtett hatását. Az abszorpciót percenként rögzítettük 15–30 percen keresztül. 60 % 1,4-dioxán koncentráció mellett a tripszin hiperbola alakú görbével jellemezhető kinetika szerint aggregálódott, 15 perc alatt már elérte a maximális értéket. 50 mg/ml PEG 6000 jelenlétében 62 %-ra csökkent az aggregátumok mennyisége a PEG 6000-et nem tartalmazó mintához képest. A PEG 6000 aggregációt gátló hatása növekvő koncentrációval nőtt (13. ábra). 60 % etanol jelenlétében egy igen rövid lag fázis volt megfigyelhető, szigmoid alakú görbét kaptunk. 50 mg/ml PEG 6000 koncentráció mellett a turbiditás értéke 41 %-ra csökkent a PEG 6000-et nem tartalmazó mintához képest 30 perces inkubációt követően. 60 % metanol koncentráció mellett az 50 mg/ml PEG 6000 jelenléte 67 %-ra csökkentette a 350 nm-en mért extinkció értékét 30 perces

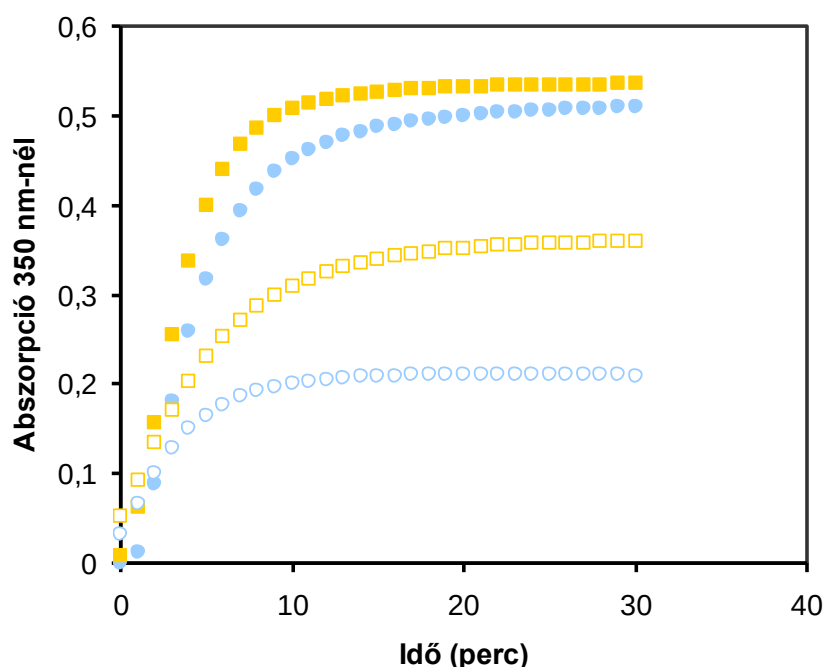
inkubáció után (14. ábra). Kimutatták, hogy a poliolkok másodlagos szerkezetet megőrző hatása növekszik a koncentrációval és a hidroxil csoportok számával (Naeem és mtsai., 2006). A PEG-ek a fehérjék típusától és a kísérleti körülményektől függően elősegítik vagy gátolják a fehérjék aggregációját (Ma és mtsai., 2012), a mi esetünkben jelentősen gátolták az aggregációt.



13. ábra: Tripszin aggregációjának kinetikája 60 % 1,4-dioxán jelenlétében PEG 6000 nélkül (◆), 25 mg/ml (+), 50 mg/ml (x) és 75 mg/ml PEG 6000 (Δ) jelenlétében követve az extinkció változását 350 nm-nél pH = 4,0-nél. Fehérje koncentráció: 0,3 mg/ml.

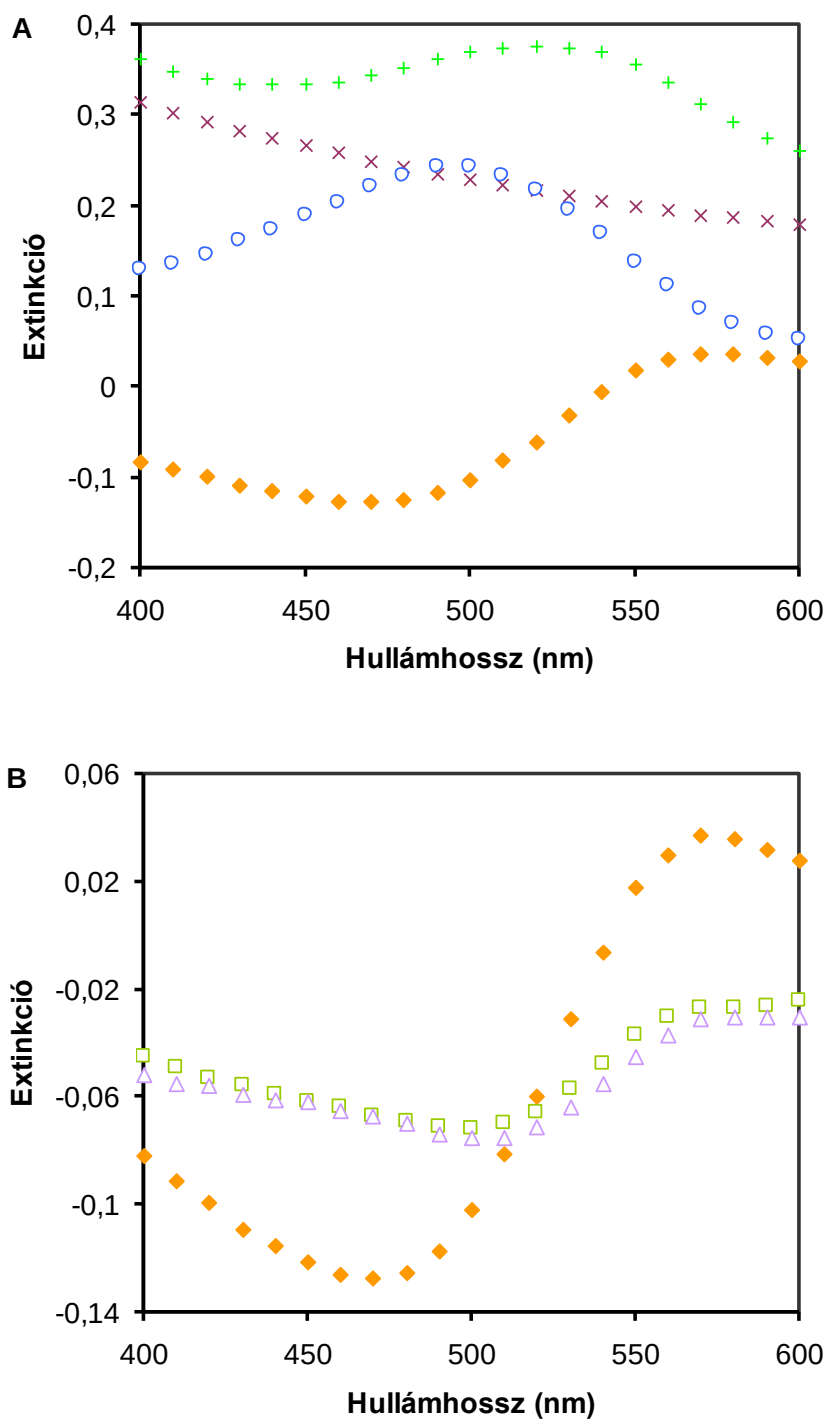
A kongóvörös amiloid fibrillumok jelenlétének kimutatására széles körben használt diazo festék, ugyanis viszonylag nagy specifitással képes kötődni amiloid fibrillumokhoz. Az amiloid fibrillumokra jellemző  $\beta$ -lemez szerkezet jelenléte előfeltétele a kongóvörös kötődésének. A kongóvörös amiloid fibrillumokhoz való kötődését jellemző spektrális változás kíséri. Fibrillumok jelenlétében a kongóvörös elnyelési maximuma 490 nm-ről 510 nm-re tolódik, és nő az abszorpciós intenzitás. A módszer előnye, hogy csak spektrofotométer kell hozzá, nem igényel radioaktív jelölést vagy drága reagenseket. Gyors és egyszerű módszer (Klunk és mtsai., 1999). A kongóvörös kötődési kísérleteinket a 15. ábrán tüntettük fel. A 15. A ábrán jól látszik, hogy 60 % etanol koncentrációnál amiloid fibrillumok jelenlétében a kongóvörös elnyelési maximuma magasabb hullámhosszra tolódott, és nőtt az intenzitás mértéke is. Az általunk vizsgált 3 oldószerben: etanolban, metanolban és 1,4

dioxánban kiszámoltuk a differencia spektrumokat is 60 % oldószer koncentráció mellett 50- és 100 mg/ml PEG 6000 koncentráció jelenlétében és nélküle is (15. B, C, D ábra). A differencia spektrumokat úgy számoltuk ki, hogy a tripszin + kongóvörös spektrumából kivontuk a kongóvörös és a tripszin spektrumát. A differencia spektrumok alakja jól tükrözi az amiloid fibrillumok jelenlétében bekövetkezett spektrális változást.

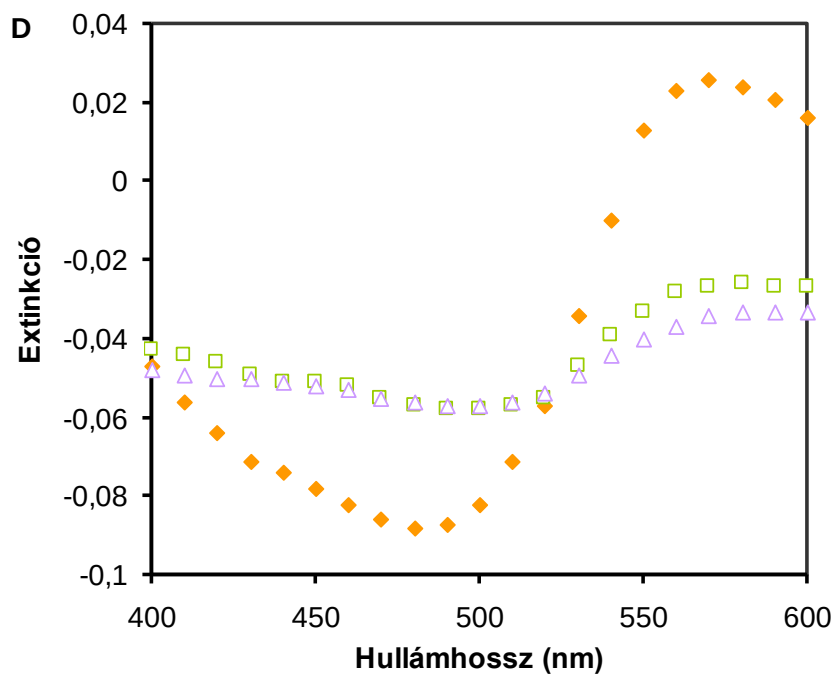
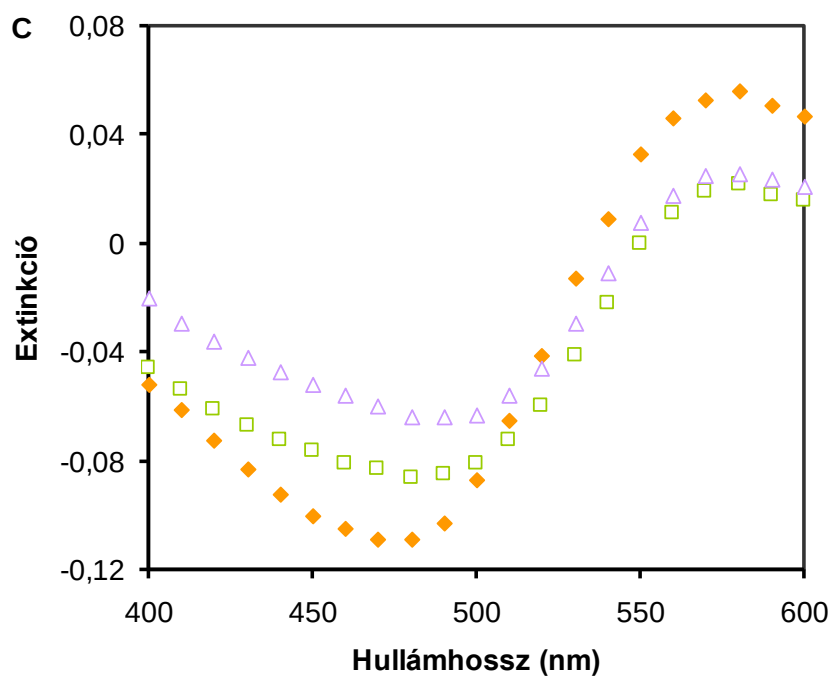


14. ábra: Tripszin aggregációjának kinetikája 60 % etanolban PEG 6000 nélkül (●), és 50 mg/ml PEG 6000 jelenlétében (○), 60 % metanolban PEG 6000 nélkül (■) és 50 mg/ml PEG 6000 jelenlétében (□) követve az extinkció változását 350 nm-nél pH = 4,0-nél. Fehérje koncentráció: 0,15 mg/ml.

Fontos lenne a mérési eredményeinket megerősíteni transzmissziós elektron mikroszkópos felvételek készítésével is. Így kideríthető lenne, hogy a turbiditás mérések alapján megállapított csökkenés az aggregátumok mennyiségében PEG 6000 jelenlétében egyben a fibrillumok mennyiségének csökkenését is jelenti-e? Ezek a kísérletek most vannak folyamatban.



15. A, B ábra: Kongóvörös abszorpciós és differencia spektrumok (A). Tripszin + kongóvörös (+), kongóvörös magában (○), tripszin magában (x), differencia spektrum 60 % etanolban (◆). Tripszin differencia spektrumok 60 % etanolban (B), 50 mg/ml PEG 6000 (◻), és 100 mg/ml PEG 6000 jelenlétében (△), valamint PEG 6000 nélkül (◆). A fehérje koncentrációja 0,06 mg/ml, a kongóvöröse pedig 11  $\mu$ M volt.



15. C, D ábra: Kongóvörös differencia spektrumok 60 % metanolban (C) és 60 % 1,4-dioxánban (D) 50 mg/ml PEG 6000 ( $\square$ ), és 100 mg/ml PEG 6000 jelenlétében ( $\triangle$ ), valamint PEG 6000 nélkül ( $\diamond$ ). A fehérje koncentrációja 0,06 mg/ml, a kongóvöröse pedig 11  $\mu$ M volt.

## Összefoglalás

Fibrillum képződés tanulmányozása során tripszin modellfehérjével dolgoztunk szerves oldószeres közegben. Tioflavin T kötődés vizsgálata során megállapítottuk, hogy pH = 7,0-nél a maximális fibrillum képződés 60 % oldószer koncentrációnál figyelhető meg etanolban, metanolban és 1,4 dioxánban egyaránt. A részlegesen kitekeredett fehérje hidrofób régiójához kötődő ANS-al sikerült kimutatni a fehérje szerkezetének lazulását 60 % metanolos közegben. PMS-tripszin turbiditásának vizsgálatával megállapítottuk, hogy az 50 mg/ml PEG 4000 jelenléte 1,4 dioxánban 0,3 mg/ml fehérje koncentrációnál 11 %-kal, míg etanolban 60 %-kal, metanolban pedig 24 %-kal csökkentette az aggregátumok mennyiségét 60 % oldószer koncentrációnál 1 napos 24 °C-on való inkubáció után 0,15 mg/ml fehérje koncentráció mellett pH = 7,0-nél.

A tripszin aggregációjának vizsgálata során pH = 4,0-nél megállapítottuk, hogy 50–60 % szerves oldószer koncentrációnál mérhető a legtöbb aggregátum mindhárom oldószerben. A kongó vörös kötődést vizsgálva a differencia spektrumok alakja jól tükrözte az amiloid fibrillumok jelenlétében bekövetkezett spektrális változást. Az aggregációt különböző poli hidroxí vegyületekkel gátoltuk, legeredményesebbnek polietilén glikol 6000-et találtuk, 50 mg/ml-es koncentrációban 34 %-ra csökkentette az aggregátumok mennyiségét a PEG 6000-et nem tartalmazó mintához képest 60 % etanol koncentráció mellett. Az 50 és a 75 mg/ml-es koncentrációjú PEG 6000 jelenléte koncentrációtól függő mértékben mérsékelte a tripszin aktivitás vesztesét, jelezve a PEG 6000 fehérje szerkezetet stabilizáló hatását. A PEG 6000 aggregációt gátló hatása növekvő koncentrációval nőtt. Eredményeink alapján megállapítható, hogy PEG 6000-el növelhető a tripszin natív szerkezetének stabilitása, így alkalmazásával gátolható az aggregáció hatékonysága.

## **Irodalomjegyzék**

- Alzheimer's Association: 2014 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement.*, 10(2) (2014) e47–e92.
- Anfinsen C.B.: Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, 181(4096) (1973) 223–230.
- Anstey K.J., Cherbuin N., Herath P.M.: Development of a new method for assessing global risk of Alzheimer's disease for use in population health approaches to prevention, *Prev. Sci.*, 14(4) (2013) 411–421.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: *Biochemistry* (6<sup>th</sup> ed.). W. H. Freeman and Company, New York, (2007) 25–64.
- Bhat R., Timasheff S.N.: Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols, *Protein Sci.*, 1(9) (1992) 1133–1143.
- Biancalana M., Koide S.: Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta*, 1804(7) (2010) 1405–1412.
- Carrillo-Mora P., Luna R., Colín-Barenque L.: Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014 (2014) 795375.
- Chaudhuri T.K., Paul S.: Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches, *FEBS J.*, 273(7) (2006) 1331–1349.
- Dobson C.M.: Protein misfolding, evolution and disease, *Trends Biochem. Sci.*, 24(9) (1999) 329–332.
- Edwin F., Jagannadham M.V.: Sequential unfolding of papain in molten globule state, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3) (1998) 654–660.
- Ghosh S., Pandey N.K., Dasgupta S.: Crowded milieu prevents fibrillation of hen egg white lysozyme with retention of enzymatic activity, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 138 (2014) 8–16.
- Gong H., He Z., Peng A., Zhang X., Cheng B., Sun Y., Zheng L., Huang K.: Effects of several quinones on insulin aggregation, *Sci. Rep.*, 4 (2014) 5648.
- Hamada H., Arakawa T., Shiraki K.: Effect of additives on protein aggregation, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10(4) (2009) 400–407.
- Hård T., Lendel C.: Inhibition of amyloid formation, *J. Mol. Biol.*, 421(4-5) (2012) 441–465.
- Hardy J., Selkoe D.J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, 297(5580) (2002) 353–356.

- Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M.: Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature*, 475 (2011) 324–332.
- <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Peptidase2.html>
- [http://www.alz.org/braintour/healthy\\_vs\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/braintour/healthy_vs_alzheimers.asp)
- Khan S.H., Ahmad N., Ahmad F., Kumar R.: Naturally occurring organic osmolytes: From cell physiology to disease prevention, *IUBMB Life*, 62(12) (2010) 891–895.
- Klunk W.E., Jacob R.F., Mason R.P.: Quantifying amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) aggregation using the Congo red-A $\beta$  (CR-A $\beta$ ) spectrophotometric assay, *Anal. Biochem.*, 266(1) (1999) 66–76.
- Koob A.O., Borgens R.B.: Polyethylene glycol treatment after traumatic brain injury reduces beta-amyloid precursor protein accumulation in degenerating axons, *J. Neurosci. Res.*, 83(8) (2006) 1558–1563.
- Krebs M.R., Macphee C.E., Miller A.F., Dunlop I.E., Dobson C.M., Donald A.M.: The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101(40) (2004) 14420–14424.
- Liu R., Barkhordarian H., Emadi S., Park C.B., Sierks M.R.: Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42, *Neurobiol. Dis.*, 20(1) (2005) 74–81.
- Ma Q., Fan J.B., Zhou Z., Zhou B.R., Meng S.R., Hu J.Y., Chen J., Liang Y.: The contrasting effect of macromolecular crowding on amyloid fibril formation, *PLoS One*, 7(4) (2012) e36288.
- Marinelli P., Castillo V., Ventura S.: Trifluoroethanol modulates amyloid formation by the all  $\alpha$ -helical URN1 FF domain, *Int. J. Mol. Sci.*, 14(9) (2013) 17830–17844.
- Naeem A., Ashraf M.T., Akram M., Khan R.H.: Comparative study of effects of polyols, salts, and alcohols on trichloroacetic acid-induced state of cytochrome C, *Biochemistry (Mosc.)*, 71(10) (2006) 1101–1109.
- Nagano N., Hutchinson E.G., Thornton J.M.: Barrel structures in proteins: automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels, *Protein Sci.*, 8(10) (1999) 2072–2084.
- Naseem F., Khan R.H.: Effect of ethylene glycol and polyethylene glycol on the acid-unfolded state of trypsinogen, *J. Protein Chem.*, 22(7-8) (2003) 677–682.
- Necula M., Kaye R., Milton S., Glabe C.G.: Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct, *J. Biol. Chem.*, 282(14) (2007) 10311–10324.

- Nilsson M.R.: Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, *Methods*, 34(1) (2004) 151–160.
- Ohnishi S., Takano K.: Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(5) (2004) 511–524.
- Porat Y., Abramowitz A., Gazit E.: Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism, *Chem. Biol. Drug Des.*, 67(1) (2006) 27–37.
- Ragi C., Sedaghat-Herati M.R., Ouameur A.A., Tajmir-Riahi H.A.: The effects of poly(ethylene glycol) on the solution structure of human serum albumin, *Biopolymers*, 78(5) (2005) 231–236.
- Rezaei-Ghaleh N., Ebrahim-Habibi A., Moosavi-Movahedi A.A., Nemat-Gorgani M.: Role of electrostatic interactions in 2,2,2-trifluoroethanol-induced structural changes and aggregation of alpha-chymotrypsin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 457(2) (2007) 160–169.
- Rubio-Perez J.M., Morillas-Ruiz J.M.: A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines, *ScientificWorldJournal*, 2012 (2012) 756357.
- Ryu J., Kanapathipillai M., Lentzen G., Park C.B.: Inhibition of beta-amyloid peptide aggregation and neurotoxicity by alpha-d-mannosylglycerate, a natural extremolyte, *Peptides*, 29(4) (2008) 578–584.
- Sadik K., Wilcock G.: The increasing burden of Alzheimer disease, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 17 (2003) Suppl 3:S75–9.
- Schwert G.W., Takenaka Y.: A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 570–575.
- Selkoe D.J.: Folding proteins in fatal ways, *Nature*, 426 (2003) 900–904.
- Shimizu S., Smith D.J.: Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces, *J. Chem. Phys.*, 121(2) (2004) 1148–1154.
- Shokri M.M., Ahmadian S., Bemporad F., Khajeh K., Chiti F.: Amyloid fibril formation by a normally folded protein in the absence of denaturants and agitation, *Amyloid*, 20(4) (2013) 226–232.
- Shoval H., Lichtenberg D., Gazit E.: The molecular mechanisms of the anti-amyloid effects of phenols, *Amyloid*, 14(1) (2007) 73–87.
- Simon L.M., Kotormán M., Garab G., Laczkó I.: Structure and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280(5) (2001) 1367–1371.

- Simon L.M., Laczkó I., Demcsák A., Tóth D., Kotormán M., Fülöp L.: The formation of amyloid-like fibrils of  $\alpha$ -chymotrypsin in different aqueous organic solvents, *Protein Pept. Lett.*, 19(5) (2012) 544–550.
- Soldi G., Plakoutsi G., Taddei N., Chiti F.: Stabilization of a native protein mediated by ligand binding inhibits amyloid formation independently of the aggregation pathway, *J. Med. Chem.*, 49(20) (2006) 6057–6064.
- Spinney L.: Alzheimer's disease: The forgetting gene, *Nature*, 510(7503) (2014) 26–28.
- Stefani M.: Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world, *Biochim. Biophys. Acta*, 1739(1) (2004) 5–25.
- Stryer L.: *Biochemistry* (4<sup>th</sup> ed.). W. H. Freeman and Company, New York, (1995) 17–44.
- Thomas T., Nadackal T.G., Thomas K.: Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit amyloid-beta aggregation, *Neuroreport*. 12(15) (2001) 3263–3267.
- Wu J., Wang Z., Lin W., Chen S.: Investigation of the interaction between poly(ethylene glycol) and protein molecules using low field nuclear magnetic resonance, *Acta Biomater.*, 9(5) (2013) 6414–6420.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kotormán Márta adjunktusnak, a dolgozat megírása során nyújtott támogatását, kedvességét és rendkívüli segítőkészségét.

Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Boros Imre Miklós egyetemi tanárnak, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított dolgozatom megírásához.

## **Tételes szerzői hozzájárulás nyilatkozat**

Alulírott Szabó Kitti a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül

- a tripszin módosítását PMSF-al,
- az enzim aktivitásának mérését,
- a turbiditás méréseket,
- az aggregáció kinetikájának követését,
- és a kongóvörös kötődést

végeztem el.

.....

Szeged, 2014. november 10.