

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Nemanja D. Mijin

UTICAJ JONA Pb(II), Cd(II) I Pd(II) NA KONFORMACIONE PRELAZE OVALBUMINA

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Nemanja D. Mijin

**THE EFFECT OF Pb(II), Cd(II) AND Pd(II) IONS ON
THE CONFORMATIONAL CHANGES OF
OVALBUMIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

Mentor:

Prof. dr Natalija Polović, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u
Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Tamara Todorović, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u
Beogradu

Prof. dr Milica Popović, vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Sanja Stevanović, viši naučni saradnik

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

ZAHVALNICA

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, profesorki dr Nataliji Polović. Prvobitno na konstantnoj podršci tokom studija, kao i na poverenju i redovnoj pomoći uprkos mojim sopstvenim nesigurnostima i nedoumicama. Takođe sam zahvalan na svim pruženim prilikama, kao i na izuzetnom strpljenju tokom izrade ove disertacije. Hvala Vam na svim idejama, predlozima, i diskusijama tokom saradnje. Svoj naučni razvoj dugujem Vama, i za to sam beskrajno zahvalan.

Istovremeno bih želeo da se zahvalim kolegici, dr Jelici Milošević, na podršci, pomoći, i pozitivnom pristupu tokom laboratorijskog rada i obradi rezultata. Hvala puno na izuzetno prijatnoj saradnji i sugestijama, kao i na trpeljivosti pred stalnim pitanjima.

Takođe dugujem zahvalnost profesorki dr Tamari Todorović na odabiru kompleksnih jedinjenja, dr Sanji Stevanović na profesionalnošću, sugestijama, i pomoći pri izradi rezultata. Ujedno želim da se zahvalim i dr Milici Popović na konstruktivnim predlozima pri obradi ovog teksta.

Posebno bih želeo da se zahvalim kolegama i kolegicama sa Instituta za virusologiju, vakcine, i serume “Torlak“. Zahvaljujem se srdačno dr Rajni Minić, na strpljenju i izuzetnoj obuci tokom rada. Hvala Vam na ekstremno prijatnoj saradnji, kao i na konstantnoj motivaciji i poverenju. Istovremeno se zahvaljujem i dr Milanu Kojiću za sugestije, podršku, i pozitivnost. Takođe bih želeo da se zahvalim Milanu Prodanoviću, za poverenje i prijateljstvo uprkos izrazitih sumnji, kao i dr Ivani Prodić na redovnoj motivaciji i savetima. Hvala Vam svima za svaku dobrodošlicu i prijateljstvo.

Takođe bih želeo duboko da se zahvalim roditeljima na neprestalnoj podršci i ljubavlju kroz godine.

LISTA SKRAĆENICA

AFM	Mikroskopija atomskih sila (engl. Atomic Force Microscopy)
AL	Amiloidni laki lanci (engl. Amyloid Light chain)
ANS	8-anilino-1-naftalen sulfonat
APS	Amonijum-persulfat
ATR	Prigušena totalna refleksija (engl. Attenuated Total Reflectance)
ATTR	Amiloidoza izazvana mutiranim transtiretinom (engl. Amyloid Transthyretin)
BSA	Albumin goveđeg seruma (engl. Bovine Serum Albumin)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD	Cirkularni dihiroizam (engl. Circular Dichroism)
DLS	Dinamičko rasejavanje svetlosti (engl. Dynamic Light Scattering)
DMSO	dimetilsulfoksid
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Furijerovim transformacijama (engl. Fourier-Transform Infrared spectroscopy)
IR	Infracrvena spektroskopija (engl. Infrared Spectroscopy)
KB	Koordinacioni broj
MBC	Hemoterapeutik na bazi metala (engl. Metal-Based Chemotherapeutic)
MW	Molarna masa (engl. Molecular Weight)
NMR	Nuklearna magnetna rezonanca (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
OVA	Ovalbumin
PDB	Proteinska banka podataka (engl. Protein Data Bank)
RCSB	Istraživačka saradnja za strukturnu bioinformatiku (engl. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)
SDS	Natrijum-dodecil-sulfat (engl. Sodium dodecyl sulfate)
SDS PAGE	Natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
TEM	Transmisiona elektronska mikroskopija (engl. Transmission Electron Microscopy)
TEMED	tetrametiletildiamin
ThT	Tioflavin T (engl. Thioflavin T)
Tris	Tris(hidroksimetil)aminoetan

Uticaj jona Pb(II), Cd(II) i Pd(II) na konformacione prelaze ovalbumina

SAŽETAK

Proteinske strukture su prirodno dinamičke i fleksibilne. Ova univerzalna karakteristika je apsolutno neophodna za biološku funkciju i relativnu stabilnost nativnih proteina. U bilo kom trenutku, proteini zauzimaju odgovarajuću strukturu, odnosno konformaciju. Promene u ovoj strukturi su krajnje određene od strane faktora sredine u kojoj se dati proteini nalaze. Ove promene mogu biti minorne i funkcionalno neophodne, dok neke promene mogu biti drastične, krajnje izazivajući gubitak nativne strukture i prirodne funkcije polipeptida. Iako je gubitak nativne konformacije proteina u većini bioloških slučajeva nepogodan, sami konformacioni prelazi u termodinamički stabilniju formu predstavljaju potpuno prirodnu pojavu i osnovu za mnoge biohemijske procese.

Glavni cilj ove disertacije je dalje rasvetljenje uticaja faktora koji utiču na konformacione prelaze proteina, konkretno dejstva jona teških metala i organometalnih kompleksa primenom ovalbumina kao model sistema. Radi ostvarenja ovog cilja, izvedena je strukturna analiza ovalbumina primenom izvesnih metoda poput FTIR spektroskopije za praćenje promena sekundarnih struktura, uključujući DLS i AFM metode za analizu dimenzija i morfologije novonastalih struktura. Spektrofluorimetrijske probe su primenjene za analizu hidrofobnosti ovalbumina, kao i za praćenje formiranja amiloidnih struktura.

Rezultati analize su pokazali da je stepen formiranja amiloidnih fibrila srazmeran sa koncentracijom prisutnih jona teških metala, čije nespecifične interakcije su različito uticale na krajnju morfologiju fibrila. Dobijeni rezultati strukturne analize su takođe pokazali da ovalbumin predstavlja adekvatan model sistem za predviđanje dejstva univerzalnih protein-ligand interakcija sa potencijalno novim hemoterapeuticima na bazi metala.

Ključne reči: agregiranje, amiloidni fibrili, ovalbumin, teški metali, mikroskopija atomskih sila, FTIR spektroskopija, efekat DMSO, hidrofobnost liganada, dinamičko rasejavanje svetlosti.

The effect of Pb(II), Cd(II) and Pd(II) ions on the conformational changes of ovalbumin

SUMMARY

Protein structures are dynamic and flexible by nature. This universal characteristic is absolutely necessary for the proper biological function and relative stability of native proteins. Proteins, at any given moment, assume a certain structure, i.e. conformation. Changes in this structure are ultimately determined by the environmental factors by which a protein is affected. The changes induced by these factors may be minor, but functionally mandatory, while others might be drastic and ultimately result in the loss of the native fold and biological function of a polipeptide. Even though the loss of a protein's native conformation is generally viewed as a negative scenario, conformational changes towards more thermodynamically stable forms represent entirely natural phenomena and the basis for many biochemical processes.

The main goal of this dissertation is to further elucidate the effects of these factors on protein conformational changes, specifically the effects of heavy metal ions and organometallic complexes on ovalbumin as a model system. To this end, methods such as FTIR spectroscopy were used for secondary structure analysis, including DLS and AFM techniques for determining the protein's dimensions and morphology. Spectrofluorimetric dyes were also used to monitor protein hydrophobicity and amyloid formation.

The obtained results show that amyloid formation is directly proportional to the concentration of present heavy metal ions, the non-specific binding of which had differing effects on the fibrils' morphologies. Structural analyses results also showed that ovalbumin shows great promise as an adequate model system for the prediction of universal protein-ligand interactions with metal-based chemotherapeutic agents.

Keywords: aggregation, amyloid fibrils, ovalbumin, heavy metals, atomic force microscopy, FTIR spectroscopy, DMSO effect, ligand hydrophobicity, dynamic light scattering.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	3
2.1. NIVOI STRUKTURE POLIPEPTIDA	3
2.1.1. Primarna struktura	3
2.1.2. Sekundarna struktura.....	4
2.1.3. Tercijarna i kvaternarna struktura	6
2.2. KARAKTERISTIKE PROTEINSKIH KONFORMACIJA	7
2.2.1. Nativna struktura proteina.....	7
2.2.2. Priroda konformacionih prelaza proteina	10
2.2.3. Faktori koji utiču na konformaciju proteina.....	11
2.2.4. Teorija reljefa energetskih površina	13
2.3. AGREGACIJA PROTEINA I POLIPEPTIDA	15
2.3.1. Putevi i karakteristike proteinske agregacije	15
2.3.1.1. Agregacija između delimično razvijenih intermedijera	15
2.3.1.2. Prirodna asocijacija proteina	16
2.3.1.3. Agregacija formiranjem hemijskih veza i degradacije.....	17
2.3.2. Morfologije proteinskih agregata	17
2.3.2.1. Amiloidni fibrili	17
2.3.2.2. Amorfnii agregati i proteinski gelovi	24
2.4. METODE DETEKCIJE KONFORMACIONIH PRELAZA I AGREGACIJE	25
2.4.1. Infracrvena spektroskopija	26
2.4.2. Spektrofluorimetrijske metode	28
2.5. OVALBUMIN KAO MODEL SISTEM	29
3. CILJEVI.....	31
4. MATERIJALI I METODE	34
4.1. REAGENSI I RASTVORI	34
4.2. IZOLOVANJE OVALBUMINA.....	34
4.3. PRIPREMA UZORAKA OVALBUMINA	35
4.3.1. Podešavanje pH vrednosti ovalbumina	35
4.3.2. Adicija teških metala u kisele rastvore ovalbumina	35
4.3.3. Inkubiranje ovalbumina u različitim koncentracijama dimetilsulfoksida	36
4.3.4. Adicija kompleksa metala	36
4.3.5. Termalna destabilizacija ovalbumina.....	36
4.4. ANALITIČKE METODE ZA KARAKTERIZACIJU UZORAKA	37
4.4.1. Bredfordova metoda.....	37
4.4.2. Natrijum-dodecil-sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)	38
4.4.3. Spektrofluorimetrijske metode	40
4.4.3.1. ThT - Spektrofluorimetrija.....	40
4.4.3.2. ANS - Spektrofluorimetrija.....	40
4.4.4. ATR-FTIR spektroskopija	41

4.4.4.1.	Priprema uzoraka i snimanje spektara.....	41
4.4.4.2.	Kvalitativna analiza infracrvenih spektara.....	41
4.4.4.3.	Kvantitativna analiza sklonosti formiranja amiloidogenih β -pločica	42
4.4.5.	<i>Mikroskopija atomskih sila (AFM)</i>	42
4.4.6.	<i>Dinamičko rasejavanje svetlosti (DLS)</i>	42
4.4.7.	<i>Teorijska analiza potencijalnih vezujućih mesta za jone olova i kadmijuma</i>	43
4.5.	IN-SILICO PREDVIĐANJE KARAKTERISTIKA ORGANOMETALNIH KOMPLEKSA Pd(II)	43
5.	REZULTATI	44
5.1.	IZOLOVANJE OVALBUMINSKIH UZORAKA	44
5.2.	KARAKTERIZACIJA KONFORMACIONIH PRELAZA OVALBUMINA.....	45
5.2.1.	<i>Analiza uticaja slobodnih jona Pb(II) i Cd(II) na ovalbumin</i>	45
5.2.1.2.	Teorijsko određivanje vezivnih mesta Pb(II) i Cd(II) jona za ovalbumin	50
5.2.1.3.	Analiza hidrofobnosti ovalbuminskih agregata ANS spektrofotometrijom	53
5.2.1.4.	Kvalitativna FTIR analiza amiloidne konverzije ovalbumina	54
5.2.1.5.	Kvantitativna FTIR analiza tendencije formiranja amiloidnih struktura ovalbumina	57
5.2.1.6.	Analiza dimenzija i elektrokinetičkog potencijala rastvorljivih agregata ovalbumina DLS metodom.....	58
5.2.1.7.	Analiza dimenzija i morfologije amiloidnih fibrila ovalbumina AFM metodom.....	60
5.2.2.	<i>Analiza uticaja vezivanja organometalnih kompleksa za ovalbumin</i>	62
5.2.2.1.	Kvalitativna FTIR analiza uticaja različitih koncentracija DMSO na nativnu strukturu ovalbumina	62
5.2.2.2.	Kvantitativna FTIR analiza uticaja DMSO na sekundarne strukture ovalbumina	64
5.2.2.3.	Analiza potencijalne fibrilacije ovalbumina pod uticajem organometalnih kompleksa Cd(II)	65
5.2.2.4.	Analiza izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina u prisustvu organometalnih kompleksa Cd(II)	68
5.2.2.5.	In-silico određivanje fizičkih i hemijskih karakteristika primenjenih kompleksa Pd(II)	69
5.2.2.6.	FTIR analiza uticaja organometalnih kompleksa Pd(II) na konformaciju ovalbumina	72
5.2.2.7.	Analiza hidrofobnih interakcija kompleksa Pd(II) sa ovalbuminom ANS spektrofotometrijom	74
6.	DISKUSIJA	76
7.	ZAKLJUČCI	86
8.	LITERATURA	89
9.	PRILOZI	106

1. UVOD

Konformacioni prelazi proteina predstavljaju izuzetno čestu pojavu, čiji stepen varira u zavisnosti od uslova sredine u kojoj se dati proteini nalaze, kao i od prirodne stabilnosti nativne strukture proteina. Ovi prelazi mogu drastično varirati, od minornih promena koje su istovremeno neophodne za adekvatno ispunjavanje bioloških funkcija proteina poput enzima, do promena koje dovode do gubitka celokupne nativne strukture proteina ¹.

Shodno tome, bolje razumevanje konformacionih prelaza proteina je od fundamentalnog značaja koji se proseže kroz izvestan broj različitih industrija. Od posebnog značaja su konformacioni prelazi koji dovode do formiranja proteinskih agregata. U medicini je formiranje proteinskih agregata uveliko nepoželjan proces, i prisustvo izuzetno stabilnih proteinskih agregata, amiloidnih fibrila, je korelisano sa razvojem velikog broja patoloških stanja. Pored stanja sistemskih amiloidoza ²⁻⁴, formiranje amiloidnih fibrila je asocirano sa propagacijom neurodegenerativnih oboljenja poput Alchajmerove ⁵, Parkinsonove ⁶, i Hantingotove bolesti ⁷. Konverzija nativnih proteina u strukturu amiloidnih fibrila predstavlja osnovu za citotoksičnost i propagaciju ovih oboljenja, uključujući i razvoj prionskih bolesti ^{2,8}.

S druge strane, u prehrambenoj industriji, formiranje proteinskih agregata se generalno smatra kao pozitivna pojava, usled poboljšanja strukturne stabilnosti, teksture, i sposobnosti zadržavanja vode ⁹⁻¹¹. U ovu svrhu je formiranje amiloidnih struktura takođe proučavano, radi razvoja metoda za dodatno poboljšavanje tehno-funkcionalnih svojstava prehrambenih proizvoda ¹². Smatra se da fibrilacija ovalbumina može dodatno doprineti emulzifikaciji ¹², geliranju ¹³ i stabilnosti ovih proizvoda ¹⁴.

Međutim, iako je nastanak amiloidnih fibrila posmatran kao pozitivna pojava u ovim slučajevima, ekstenzivna fibrilacija proteina svakako predstavlja rizik ljudskom zdravlju ². Kako je objavljeno da je prisustvo jona metala, uključujući jone Pb(II) i Cd(II), u nervnim tkivima asocirano sa direktnim razvojem neurodegenerativnih oboljenja ¹⁵⁻¹⁷, od posebnog značaja je identifikacija i analiza konkretnih mehanizama i efekata vezivanja ovih jona na strukturu proteina. Ovo je ujedno glavni cilj ove disertacije, uključujući i analizu uticaja vezivanja odgovarajućih organometalnih kompleksa za strukturu ovalbumina kao model sistema za ispitivanje nespecifičnih protein-ligand interakcija.

Generalno, citotoksična dejstva organometalnih kompleksa, iako uveliko nepoželjna, mogu biti od značaja prilikom razvoja različitih tipova terapeutika. Konkretn slučaj jednog hemoterapeutika na bazi metala jeste *cis*-diammindihloroplatina(II), odnosno cisplatine, koja je našla primenu u tretiranju različitih tipova tumora sa visokom efikasnošću ¹⁸⁻²⁰. Pored ispoljene efikasnosti, cisplatina je ipak karakteristična po svojoj izraženoj nefrotoksičnosti ^{18,21,22}, usled čega je došlo do razvoja novih tipova hemoterapeutika na bazi Pd(II) ^{23,24}.

Prilikom testiranja vijabilnosti potencijalnih hemoterapeutika na bazi metala, veći broj fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih faktora je uzet u obzir. Od ovih faktora, lipofilnost jedinjenja je najčešće direktno povezana sa antiproliferativnom aktivnošću usled povećanog stepena apsorpcije jedinjenja od strane ćelija ²⁵. U ovoj disertaciji su konkretno izračunati opisani parametri tri različita organometalna kompleksa Pd(II), uključujući strukturnu analizu njihovih nespecifičnih protein-ligand interakcija za ovalbumin.

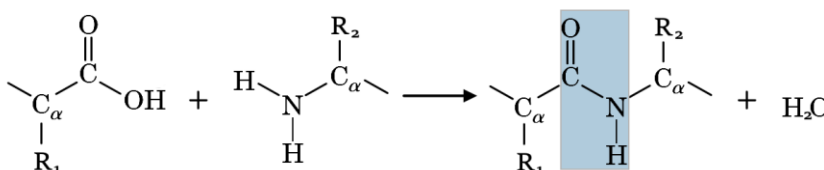
Kako ovalbumin ne poseduje poznate specifične ligande, predstavlja idealan model sistem koji istovremeno simulira ispunjeno ćelijsko okruženje ^{26,27}. Usled toga, analiza ovakvih interakcija primenom ovalbumina se može koristiti kao novi potencijalni parametar prilikom određivanja vijabilnosti novih terapeutika.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Nivoi strukture polipeptida

2.1.1. Primarna struktura

Osnova svake proteinske strukture leži u njenoj aminokiselinskoj sekvenci. Aminokiseline, kao mali organski molekuli za čiji centralni, alfa ugljenikov atom su vezana amino i karboksilna grupa, međusobno reaguju, formirajući amidne veze [Slika 1.1.]. Aminokiseline koje su međusobno kovalentno vezane preko amidnih, tj. peptidnih veza, ali i disulfidnih mostova između cisteinskih bočnih ostataka, predstavljaju samu primarnu strukturu svih proteina^{28,29}.



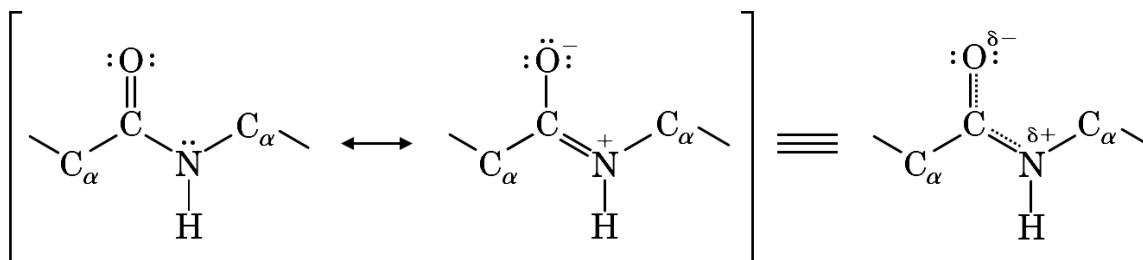
Slika 1.1. – Formiranje amidne, odnosno peptidne veze.

Primarna struktura polipeptida je jedan od glavnih faktora koji određuje krajnju trodimenzionalnu strukturu proteina, kao i njegovu biološku funkciju. Iako predstavlja značajan faktor u njihovoj biološkoj funkciji, celokupna aminokiselinska sekvenca nekog polipeptida nije apsolutno fiksirana. Polimorfizmi u nekim regionima sekvence ne utiču nužno na funkciju proteina³⁰. Svakako, određeni regioni aminokiselinskih sekvenci proteina, na primer u okviru enzimskih aktivnih centara, moraju ostati uveliko očuvani usled samog održavanja adekvatne funkcije datih proteina.

2.1.2. Sekundarna struktura

Iz primarne strukture polipeptida proističe sekundarna struktura. Sama sekundarna struktura predstavlja osnovnu, ali ipak lokalnu konformaciju u okviru određenog dela polipeptidne kičme. Ovaj nivo uređenja je omogućen dejstvom intramolekulskih interakcija aminokiselinskih ostataka unutar same polipeptidne kičme – formiranjem vodoničnih veza, ili elektrostatičkim interakcijama³¹. Tip i prisustvo postojeće sekundarne strukture zavisi predominantno od aminokiselinske sekvence polipeptida, kao i od faktora okoline u kojoj se dati polipeptid nalazi. Još jedan faktor koji utiče na zauzimanje različitih sekundarnih struktura jeste priroda same peptidne veze^{28,32}. Usled rezonancije u okviru peptidne veze koja joj daje karakter delimično-dvostruke veze, rotacija oko same peptidne veze nije moguća [Slika 1.2.].

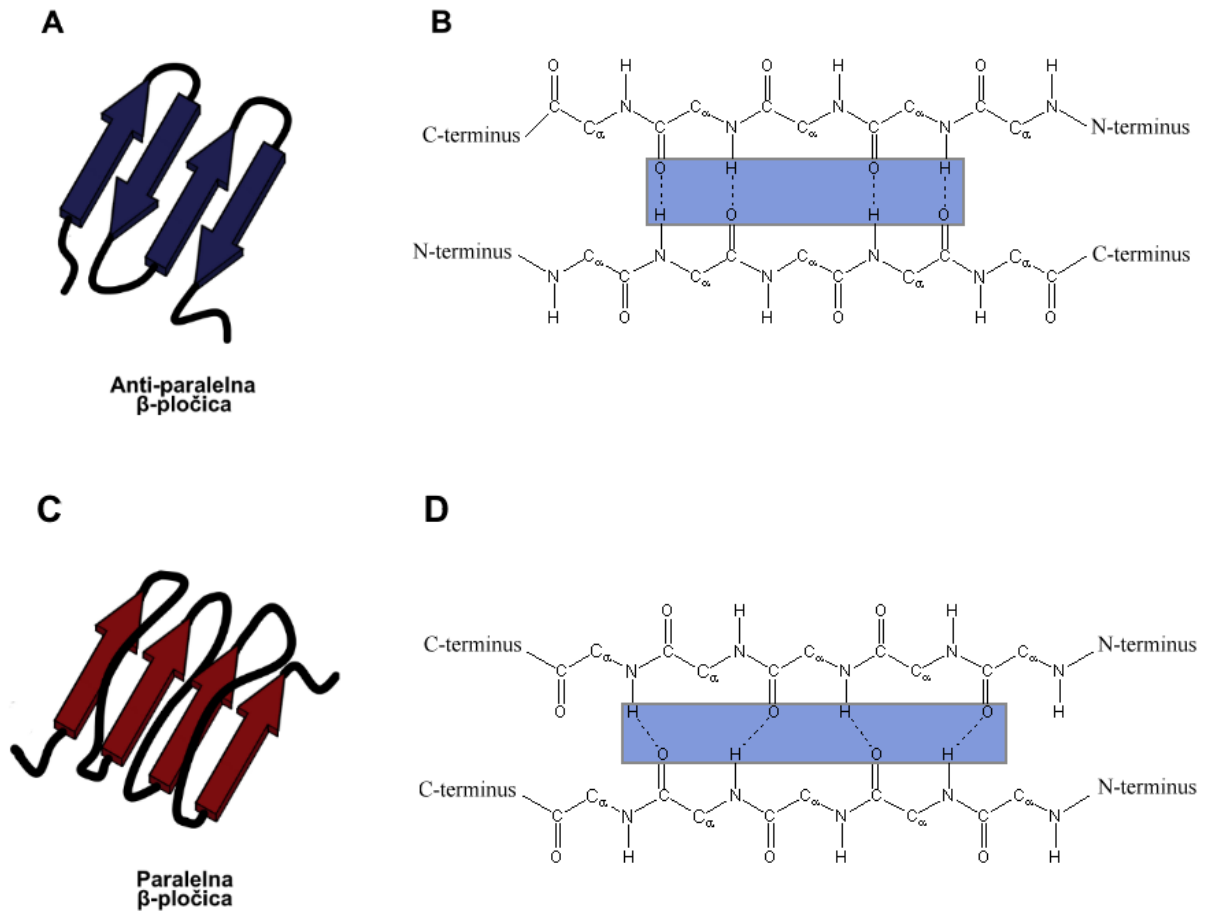
Iako ovo povećava rigidnost polipeptida, to ne znači da aminokiselinske sekvence same po sebi nisu fleksibilne. Glavna fleksibilnost proizilazi iz rotacija oko N-C_α i C_α-C veza, koje omogućavaju zauzimanje sekundarnih struktura u kojima su najmanje izražene sterne smetnje³³. Postoji veći broj okarakterisanih sekundarnih struktura, od kojih su najčešće α-heliksi i β-pločice. Pored ovih sekundarnih struktura, postoje različiti tipovi zavijutaka, od kojih je najčešći β-zavijutak. Mnogi tipovi drugačijih sekundarnih struktura postoje, poput poliprolinskih heliksa i α-pločica, ali su poprilično retki u standardnim konformacijama nativnih proteina i češće se pojavljaju u proteinskim intermedijerima³⁴.



Slika 1.2. – Rezonanciona stabilizacija usled koje peptidna veza poseduje delimičan karakter dvostruke veze.

Kako različite intramolekulske interakcije dovode do zauzimanja različitih sekundarnih struktura, prisustvo specifičnih aminokiselina je favorizovano u određenim sekundarnim strukturama. Na primer, α -heliksi su predominantno stabilizovani kumulativnim efektom velikog broja vodoničnih interakcija između peptidnih veza. Usled ovoga, prisustvo prolina u regionu α -heliksa je destabilišuće, ali ne samo zbog nedostatka dodatnih vodoničnih interakcija, već i zbog povećane rigidnosti koju slaba rotacija oko N-C $_{\alpha}$ veze prolina izaziva³⁵. Iako rezonancija u okviru peptidne veze povećava rigidnost polipeptida, ujedno doprinosi još jedan indirektan stabilišući faktor u vidu blagog električnog dipola. Ovi dipoli su produženi preko prisutnih vodoničnih veza, i dodatno stabilizuju strukturu α -heliksa preko elektrostatičkih interakcija na krajevima helikoidne strukture^{34,36}. Još jedan bitan faktor jesu direktne elektrostatičke interakcije između bočnih ostataka aminokiselina, i prisustvo aminokiselina sa ostacima istog naelektrisanja znatno destabilizuje strukturu α -heliksa. Usled ovoga, promene pH vrednosti sredine u kojima se proteini nalaze mogu značajno da utiču na stabilnost sekundarnih struktura, u zavisnosti od izloženosti istih sredini.

Drugi najčešći tip sekundarnih proteinskih struktura jeste β -pločica. Ove strukture su karakteristične po naborima formiranim od polipeptidne kičme. Vodonične veze se formiraju između susednih aminokiselina različitih nabora, što dodatno stabilizuje ove strukture. U zavisnosti od usmerenosti aminokiselinske sekvence od koje su konstruisane, razlikuju se anti-paralelne [Slika 1.3A] i paralelne β -pločice^{28,34} [Slika 1.3C]. Anti-paralelne β -pločice predstavljaju stabilniju konformaciju usled bliske prirode vodoničnih interakcija između nabora pločice [Slika 1.3B]. Sa suprotne strane, paralelne β -pločice su generalno manje stabilne kao rezultat geometrije aminokiselina u njihovoj strukturi [Slika 1.3D]. Ova geometrija izaziva formiranje vodoničnih interakcija koje su pod uglom, pri čemu su atomi vodoničnih veza dodatno udaljeni, smanjujući stabilnost. Krajevi nabora β -pločica su međusobno povezani serijom aminokiselina iste sekvence. Istovremeno, aminokiseline koje su van regiona nabora β -pločice su često slabije organizovane. U slučaju anti-paralelnih β -pločica, krajevi nabora su često povezani kratkim β -zavijucima, dok priroda paralelnih β -pločica zahteva znatno duže sekvence aminokiselina nižeg stepena uređenosti. Statistički, ovaj povećani udeo neuređenosti u okviru celokupne strukture paralelnih β -pločica dodatno doprinosi njihovoj nestabilnosti^{34,37}.



Slika 1.3. – Prikaz razlika između paralelnih i anti-paralelnih β-ploča u zavisnosti od orijentacije (A i C), i udaljenosti vodoničnih veza (B i D).

2.1.3. Tercijarna i kvaternarna struktura

Sekundarne strukture u okviru jednog polipeptidnog lanca dalje međusobno interaguju preko vodoničnih, elektrostatičkih, i hidrofobnih interakcija. Ovim intramolekulskim interakcijama i entropijskim efektima dolazi do formiranja sledećeg stepena u organizaciji polipeptidnog lanca - trodimenzionalne strukture koja se naziva tercijarna struktura. Konkretno, tercijarne strukture su sačinjenje od većeg broja supersekundarnih struktura varirajućih nivoa kompleksnosti. Pod supersekundarnim strukturama se podrazumevaju dalje organizovane jedinice većeg broja pojedinačnih sekundarnih struktura^{34,38}. Ove jedinice, poput β-α-β zavijutka ili β-burenceta, mogu biti prisutne u okviru tercijarne strukture u kombinaciji sa drugim, različitim supersekundarnima strukturama. Alternativno, protein može biti skoro u potpunosti sačinjen od većeg broja ponavljajućih supersekundarnih struktura, što je slučaj kod α-keratina³⁹.

Veći broj različitih supersekundarnih struktura može biti prisutan u okviru jednog polipeptidnog lanca. Ova dodatna kompleksnost omogućava izvođenje većeg broja različitih funkcija od strane jednog polipeptidnog lanca. Regioni polipeptida koji su sačinjeni od nekoliko stotina aminokiselina, na ovaj način, mogu se organizovati u međusobno stabilne, globularne jedinice koje se nazivaju domeni. Domeni mogu da variraju drastično po funkciji, ali takođe i po stabilnosti, i veći broj različitih domena može biti prisutan u jednom polipeptidnom lancu ⁴⁰. Ovo omogućava da jedan protein potencijalno izvodi veći broj različitih funkcija, od jednostavnih interakcija do raznovrsnih enzimskih aktivnosti ³⁴.

Iako je moguće izvođenje mnogobrojnih funkcija od strane jednog monomernog proteina, mnogi proteini sa većim brojem kompleksnih funkcija su svakako često sačinjeni od većeg broja polipeptidnih lanaca. Intermolekulskim interakcijama višebrojnih polipeptidnih lanaca dolazi do formiranja sledećeg nivoa proteinske konformacije - kvaternarne strukture. Pojedinačni polipeptidni lanci predstavljaju subjedinice same kvaternarne strukture. Multimerna priroda ovih proteina omogućava znatno širi opseg funkcija, ili i znatno povećanu efikasnost jedne konkretne funkcije, u poređenju sa funkcionalno-sličnim, monomernim proteinima ^{34,41}.

2.2. Karakteristike proteinskih konformacija

2.2.1. Nativna struktura proteina

Pod nativnom strukturom proteina se podrazumeva prirodna konformacija proteina sa konkretnom biološkom funkcijom. Ova struktura je jedinstvena, i bilo kakvo narušavanje iste, pri čemu dolazi do gubitka prvobitne fiziološke funkcije proteina, se naziva denaturacija. ⁴²

Nativna struktura proteina je okarakterisana relativno marginalnom stabilnošću. Bez obzira na datu stabilnost, sam prelaz polipeptidnog lanca u nativnu konformaciju u vodenoj sredini je potpuno spontan proces. Ovo označava da je nativna konformacija proteina svakako adekvatno stabilna. Takođe, ta marginalna stabilnost je od značaja za izvođenje prirodnih funkcija u biološkim sistemima, jer pruža proteinskim strukturama određeni nivo fleksibilnosti što pospešuje intermolekulske interakcije ⁴³. Stabilnost proteina je generalno opisana termodinamički Gibsovom slobodnom energijom [engl. Gibbs' free energy], koja zavisi od entalpije i entropije samog polipeptidnog lanca, ⁴⁴ kao i sistema u kom se polipeptidni lanac nalazi. Gibsova slobodna energija je definisana preko:

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

Gde ΔG predstavlja promenu Gibsove slobodne energije u sistemu. Gibsova slobodna energija izražava količinu energije koja je sposobna da izvrši rad tokom neke reakcije, pri

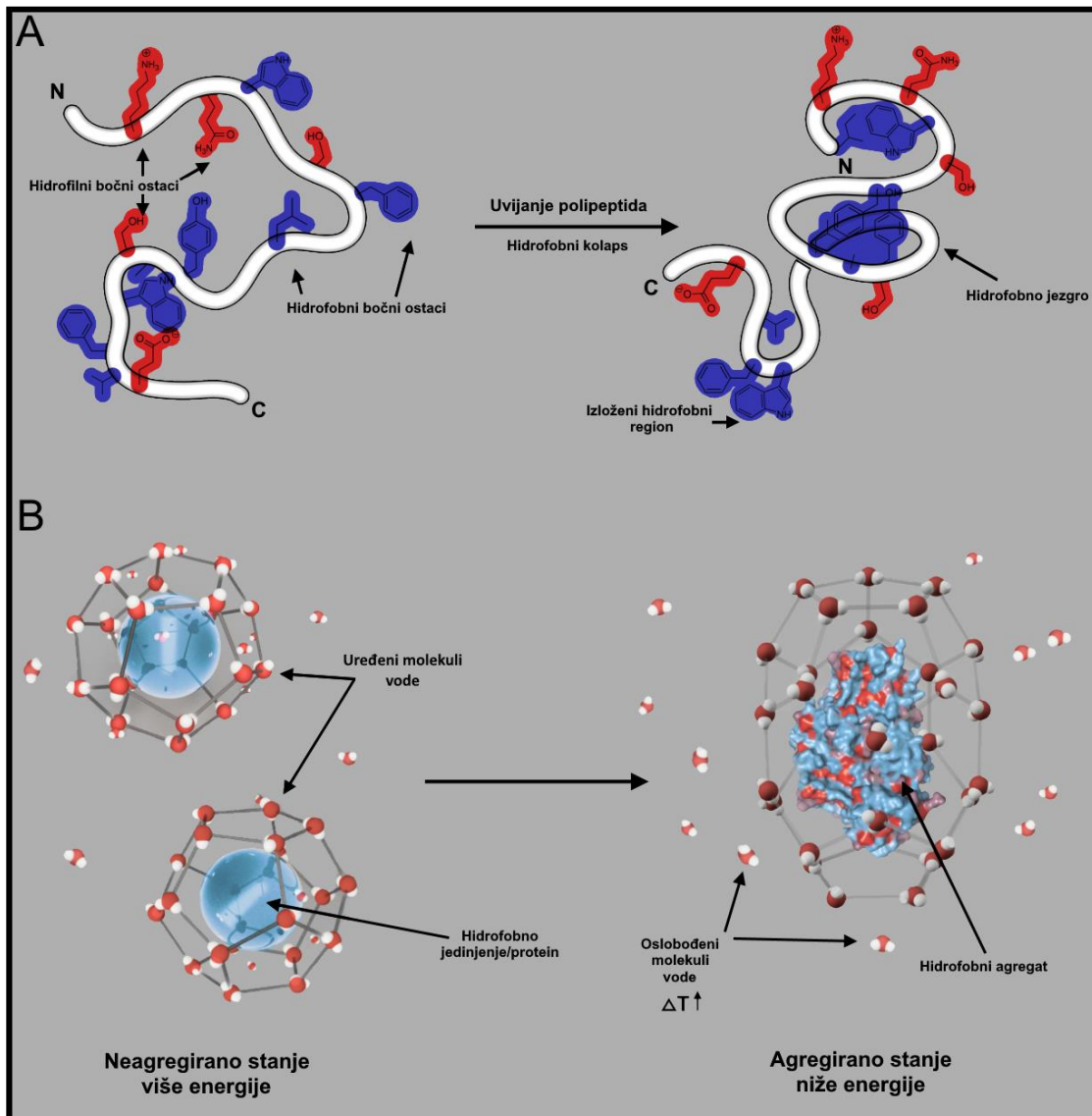
konstantnoj temperaturi i pritisku. U slučajevima reakcija ili interakcija pri kojima dolazi do oslobađanja slobodne energije, vrednost ΔG postaje negativna.

Ovo znači da je reakcioni proces spontan i da je reakcioni proizvod, pod datim uslovima u datom sistemu, stabilan. Promena entalpije, ΔH , predstavlja promenu količine toplote u reakcionom sistemu i opisuje broj i tipove formiranih hemijskih veza ili interakcija. U slučaju proteina, reakcioni sistem generalno predstavlja vodeni rastvor. Polipeptidni niz formira poprilično visok broj vodoničnih i elektrostatičkih interakcija sa rastvaračem, koje se neposredno narušavaju tokom spontanog procesa uvijanja proteina. U zavisnosti od dužine samog polipeptidnog niza, tipova prisutnih bočnih aminokiselinskih ostataka u lancu, kao i prisustva drugih molekula u rastvoru, broj i karakteristike ovih interakcija mogu drastično varirati^{44,45}.

Formiranje hemijskih veza i interakcija nije izolovan proces, i dešava se istovremeno sa promenom entropije, ΔS . Entropija predstavlja kvantitativan izraz neuređenosti u okviru sistema i njegovih komponenti. Generalno, entropija raste kada su krajnji proizvodi određene reakcije nižeg nivoa kompleksnosti ili veće neuređenosti od samih reaktanata. Tokom procesa uvijanja proteina, slučaj je obrnut – krajnji proizvod je kompleksna struktura višeg stepena uređenosti. Iako je entropija samog polipeptidnog niza, odnosno konformaciona entropija⁴⁶, niža, celokupna entropija sistema raste kao direktan rezultat uvijanja proteina. Razlog za ovo je raskidanje vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija između elemenata razvijenog polipeptidnog niza i vode, pri čemu dolazi do formiranja prethodno-opisanih intramolekulskih interakcija proteina.

Pad u konformacionoj entropiji je kompenzovan na ovaj način, direktnim narušavanjem kratkotrajnih interakcija između vode i razvijenog polipeptidnog niza, i povećanjem neuređenosti vode. Ova pojava je takođe dodatno izražena usled prisustva nepolarnih bočnih ostataka u razvijenom polipeptidnom lancu, između kojih je favorizovano formiranje intramolekulskih hidrofobnih interakcija [Slika 1.4A]^{44,47}.

Rezultujući hidrofobni kolaps je prirodna, hemijska pojava pri kojoj dolazi do smanjenja kontaktnih površina između polarnih i nepolarnih molekula određenog sistema, dodatno povećavajući entropiju rastvarača [Slika 1.4B]⁴⁸. Na ovaj način, celokupna entropija sistema raste, i Gibsova slobodna energija je krajnje niža.^{47,49}



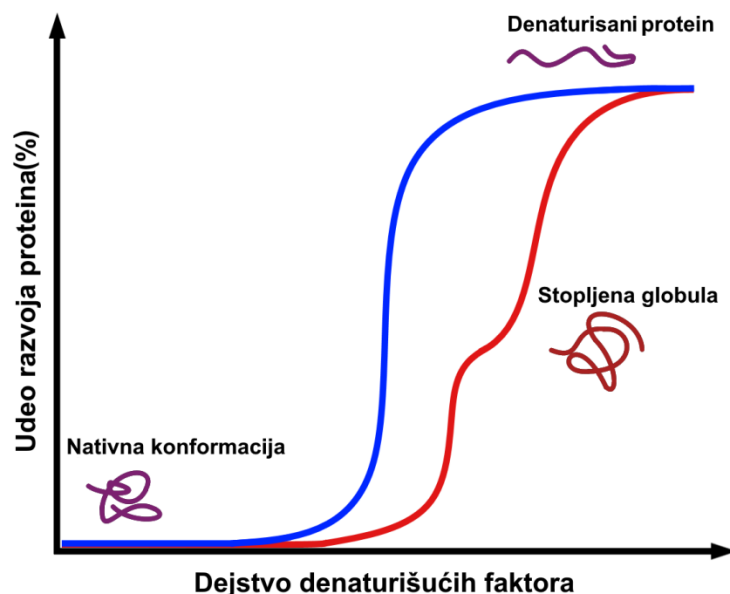
Slika 1.4. – Ilustracioni prikaz uticaja hidrofobnog efekta na uvijanje polipeptida (A), i uticaj hidrofobnog efekta na rastvarač prilikom hidrofobne agregacije (B).

2.2.2. Priroda konformacionih prelaza proteina

Uvijanje proteina je generalno kooperativan proces, odnosno proces direktnog prelaska polipeptidnog lanca u specifičnu konformaciju, bez intermedijera. Ova pojava je najčešća kod polipeptidnih lanaca manjih molarnih masa, bez kvaternarne strukture ili većeg broja domena. Usled prirodno marginalne stabilnosti uvijenih proteina, sam proces uvijanja je reverzibilan. Svakako, prisustvo različitih tipova intermedijera tokom konformacionih prelaza nije retka pojava. Najčešći, i najviše okarakterisan, tip intermedijera se naziva stopljenom globulom^{50,51}. Konformacija stopljene globule se ne razlikuje značajno od konformacije nativnog proteina. Glavna razlika između nativne konformacije proteina i stopljene globule je u nepotpunoj realizaciji hidrofobnog efekta, pri čemu dolazi do povećanja hidrodinamičkog radijusa proteina⁵². Usled ovoga, udeo sekundarnih struktura se ne razlikuje dramatično između nativne konformacije i konformacije stopljene globule, naročito u slučajevima monomernih ili manje-kompleksnih proteinskih struktura. Kao rezultat, primećeno je da je održavanje katalitičke aktivnosti nekih enzima moguće čak i u odsustvu prvobitnog nativnog stanja⁵³, i naročito u prisustvu odgovarajućih enzimskih supstrata^{43,54,55}.

Sam proces uvijanja proteina je ekstremno brza i spontana pojava. U ćelijskim sistemima, uvijanje proteina se izvodi u periodima od nekoliko sekundi. Ovo dodatno ukazuje da sam proces uvijanja nije nasumičan, već da je dirigovan od strane aminokiselinske sekvence, kao i različitih ćelijskih faktora poput šaperona^{56,57}.

Ova karakteristika je originalno dokazana 1961. godine od strane Kristijana Anfinsena, zahvaljujući njegovim eksperimentima sa ribonukleazom⁵⁸. U ovim eksperimentima su korišćeni denaturišući, haotropni agensi, urea i β -merkaptetanol. Hidrofobni efekat je narušen dejstvom uree^{59,60}, dok β -merkaptetanol redukuje disulfidne mostove između bočnih ostataka cisteina. Krajnji rezultat ovih efekata je potpuno, kooperativno razvijanje, odnosno denaturacija polipeptidnog lanca ribonukleaze i može se prikazati grafički sigmoidnom krivom [Slika 1.5.]. Dalje, postepenim odstranjivanjem ovih agenasa, primećeno je da se ribonukleaza reverzibilno renaturisala i da je originalna katalitička aktivnost obnovljena. Iako je kasnije dokazano da ovo nije univerzalna pojava, rezultati ovog eksperimenta su pokazali da je za određene proteine renaturacija pod određenim uslovima zaista moguća, ali i bitnije – da su informacije o uvijanju proteina već prisutne u samoj aminokiselinskoj sekvenci proteina^{45,58,61}.



Slika 1.5. – Grafički prikaz kooperativnog procesa denaturacija proteina (plava boja), kao i dvostepenog procesa denaturacije proteina sa stabilnim intermedijerom, odnosno stopljenom globulom (crvena boja).

Uvijanje proteina je nesumnjivo kompleksno i tokom vremena su konstruisani različiti teorijski modeli koji opisuju potencijalne mehanizme uvijanja proteina. Jedan model opisuje proces uvijanja proteina hijerarhijski, pri čemu dolazi do prvobitnog formiranja sekundarnih i supersekundarnih struktura, praćeno nastankom domena i krajnjim hidrofobnim kolapsom celokupne strukture proteina ⁶². Po alternativnom modelu, proces uvijanja započinje prvobitnim hidrofobnim kolapsom nepolarnih regiona polipeptidne kičme i podrazumeva formiranje stopljene globule pre krajnjeg uvijanja u nativno stanje. Rezultujuća struktura stopljene globule sadrži kompaktno hidrofobno jezgro, sa nepotpuno-fiksiranim, okolnim sekundarnim i supersekundarnim strukturama koje je čine voluminoznijom ⁶³. Ovi modeli se, redom, nazivaju model difuzije i sudara, i model nukleacije i kondenzacije. Sami po sebi su adekvatni za opis uvijanja proteina malih molarnih masa, ali ne za kompleksnije proteinske strukture. Proces uvijanja višedomenskih ili multimernih proteina najverovatnije obuhvata elemente oba modela, sa velikim brojem potencijalnih intermedijera koji služe kao tačke za usmeravanje procesa uvijanja do krajnje nativne konformacije ⁶⁴⁻⁶⁶.

2.2.3. Faktori koji utiču na konformaciju proteina

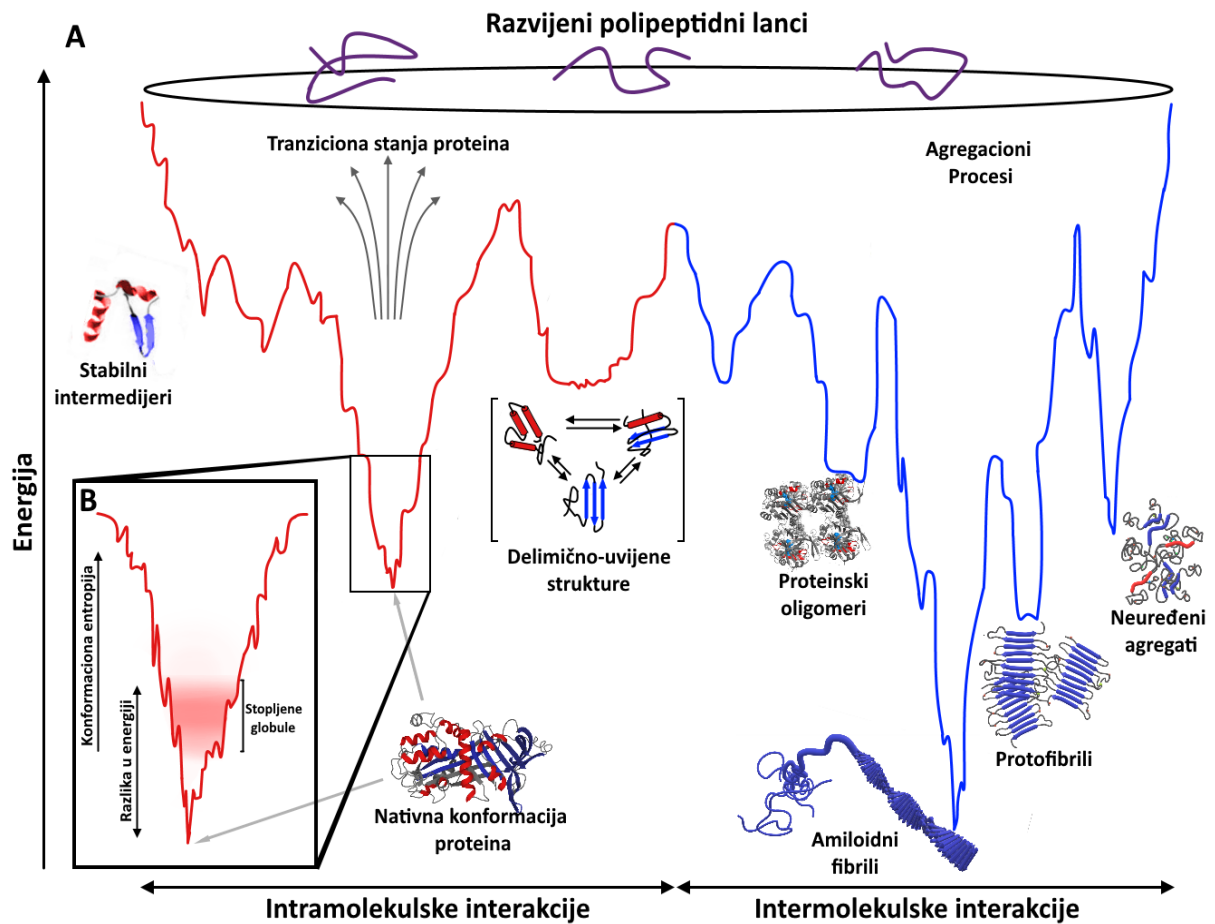
Konformacioni prelazi proteina su raznovrsni, dirigovani velikim brojem različitih faktora. Ovi faktori mogu direktno ili indirektno da utiču na intra-, ili intermolekulske interakcije u okviru proteina. Na primer, promene pH vrednosti rastvora u kojem se protein nalazi utiču na naelektrisanje bočnih ostataka samog polipeptidnog lanca i drastične promene u pH opsezima

potencijalno izazivaju elektrostatičko odbijanje između regiona proteina. Ovo može dovesti do destabilizacije i denaturacije proteina. Još jedan faktor je jonska sila rastvora, koja direktno zavisi od koncentracije jona u rastvoru. Dok slabija jonska sila može imati generalno stabilizujući efekat na strukturu proteina, povećanjem jonske sile dolazi do favorizovanja i ojačavanja hidrofobnih interakcija na uštrb elektrostatičkih⁶⁷. Kao rezultat, povećava se rizik da dođe do hidrofobne agregacije prisutnih proteina. Drugi uobičajeni faktori, poput promena u temperaturi, pritisku, ili mehaničkom stresu takođe značajno utiču na konformaciju proteina⁶⁸. Takođe, direktna asocijacija proteina u agregate, nastajući reverzibilno preko elektrostatičkih ili hidrofobnih interakcija. Slabije sile, poput van der Vals-ovih, mogu dodatno uticati na proces agregacije. Tendencija proteina da agregiraju na ovaj način zavisi od njihove aminokiselinske sekvence, i u nekim slučajevima visoka koncentracija istih proteina može doprineti njihovoj asocijaciji⁶⁹.

Denaturacija proteina koja je izazvana drastičnim promenama ovih faktora retko izaziva potpuno razvijanje polipeptidnog lanca. U ćelijskoj sredini, najčešći vid denaturacije dovodi do formiranja solubilnih agregata ili zauzimanja konformacija bez biološke funkcije. Kao rezultat formiranja stabilnijih agregata, denaturacija proteina je najčešće ireverzibilna^{70,71}.

2.2.4. Teorija reljefa energetskih površina

Konformacioni prelazi proteina se mogu dodatno adekvatno opisati preko teorije reljefa energetskih površina (engl. Energy landscape theory) [Slika 1.6A]^{51,72}. Ova teorija grafički prikazuje model uticaja termodinamičkih faktora na konformacije proteina, i bazirana je na osnovnom modelu uvijanja proteina u okviru levka (eng. folding funnel model) [Slika 1.6B]⁷³.



Slika 1.6 – Prikaz energetskog reljefa na osnovu teorije reljefa energetskih površina (A), uključujući prikaz levka opisanog u teoriji u modelu uvijanja proteina u okviru levka (B).

Pri sintezi proteina, nastaje razvijeni polipeptidni lanac koji, zahvaljujući informacijama sadržanim u svojoj aminokiselinskoj sekvenci i uz potencijalnu pomoć molekula poput šaperona^{57,74}, brzo i spontano zauzima nativnu konformaciju. Ova struktura, pod datim uslovima, predstavlja relativno-stabilno stanje niske energetske vrednosti. Sam model uvijanja proteina u okviru levka grafički prikazuje ovu strukturu na dnu “levka” koji predstavlja različita energetska stanja proteinskih struktura pod odgovarajućim uslovima, u zavisnosti od formiranih intra- ili intermolekulskih interakcija⁷⁵. Po originalnom modelu, nativna struktura proteina se nalazi na dnu levka i predstavlja najstabilniju proteinsku konformaciju pod tim uslovima⁷².

Međutim, ukoliko bi došlo do značajne promene u sistemu, poput naglog skoka u temperaturi ili promene pH vrednosti, prvobitno dolazi do narušavanja intramolekulskih interakcija nativne forme proteina. Ovo se odlikuje porastom energije polipeptidnog lanca, koji je direktan rezultat pozitivne promene u entalpiji usled raskidanja intramolekulskih interakcija i naknadnog skoka u neuređenosti proteina, što je prikazano porastom konformacione entropije⁴⁶. Polipeptidni lanac koji je prvobitno posedovao nativnu konformaciju i grafički se nalazio na dnu prikazanog levka [Slika 1.6B], zauzima termodinamički nestabilno stanje koje favorizuje momentalni prelazak u konformaciju koja je adekvatno stabilna pod odgovarajućim uslovima. Grafički, ova promena se može opisati energetskim prelaskom polipeptidnog lanca u jedan od mnogobrojnih, manjih “levaka”, odnosno jama sa sopstvenom energetskom stabilnošću. Ove takozvane “kinetičke zamke” predstavljaju energetsku barijeru za strukturne promene intermedijera. U zavisnosti od drastičnosti energetskih promena koje su izazvane od strane okolnih faktora, ovi konformacioni prelazi mogu varirati od relativno minornih, rezultujući u funkcionalno-neprimetnim promenama sekundarnih struktura ili formiranja stopljenih globula, do denaturacije i potpune agregacije proteina.

Ove drastičnije promene su dalje opisane teorijom reljefa energetskih površina^{72,76}, koja predstavlja prošireni model uvijanja proteina u okviru levka. Svakako, sa termodinamičkog smisla, logika ostaje ista. Dodatnim ulaganjem energije u polipeptidni lanac, omogućava se značajan prelaz tranzicionih stanja iz manjih kinetičkih zamki u veće [Slika 1.6A]. Kao rezultat, dolazi do izvesne kompeticije između formiranja intramolekulskih i intermolekulskih interakcija. Međutim, iako je prelazno stanje polipeptidnog lanca denaturisano, nastanak potpuno razvijenog polipeptida je ekstremno retka pojava *in vivo*, naročito u slučajevima nativno višedomenskih proteina. Glavni faktor ove činjenice je izloženost nepolarnih regiona polipeptidnog lanca vodi, što hidrofobni efekat momentalno sprečava, izazivajući hidrofobni kolaps i agregaciju. Usled ovoga, faktori neophodni za solubilizaciju razvijenih polipeptidnih lanaca su poprilično ekstremni – prisustvo visokih koncentracija haotropnih denaturišućih agenasa poput uree, prisustvo detergenata, ili visoke vrednosti pH koje izazivaju deprotonovanje i naknadno elektrostatičko odbijanje polipeptidne kičme^{59,77,78}. Kako su ovi faktori odsutni u fiziološkim sistemima, intermolekulska agregacija hidrofobnih regiona različitih prelaznih stanja proteina je najčešća pojava.

Kao rezultat, dolazi do konformacionih prelaza manje-stabilnih sekundarnih struktura u stabilnije, poput β -pločica. Ove strukture najčešće učestvuju u formiranju agregacionih nukleusa iz kojih mogu proizići različiti tipovi agregata, u zavisnosti od faktora koji će biti dodatno opisani. Novonastali agregati mogu varirati drastično u veličini, strukturi, i uređenosti – od proteinskih oligomera i neuređenih agregata, do izuzetno termodinamički-stabilnih struktura visoke uređenosti, amiloidnih fibrila^{79,80}.

2.3. Agregacija proteina i polipeptida

2.3.1. Putevi i karakteristike proteinske agregacije

Proteinska agregacija je dirigovana nizom faktora koji, na identičan način, takođe utiču na intramolekulske interakcije u okviru jednog polipeptidnog lanca i na njegove konformacione prelaze. Step en agregacije zavisi od izraženosti ovih faktora, koji dovode do kompeticije između formiranja intra- ili intermolekulskih interakcija. Nastali agregati, njihova morfologija, veličina, i stabilnost, direktno zavise od kombinovanog efekta ovih hemijskih faktora, kao i od istovremenog dejstva fizičkih faktora poput naglih promena u temperaturi, pritisku, ili indukovanom mehaničkom stresu.

Usled ovih varijabli, postoji izvestan broj puteva agregacije proteina⁸¹. Inicijalno stanje proteina koje funkcioniše kao prekursor agregaciji može da varira - od native⁸², delimično-uvijene^{83,84}, do hemijski-modifikovane ili degradovane strukture⁸¹.

2.3.1.1. Agregacija između delimično razvijenih intermedijera

Jedan od najčešćih tipova agregacije pod fiziološkim uslovima jeste agregacija između delimično razvijenih, odnosno nepotpuno-uvijenih proteinskih intermedijera. Usled relativno niske stabilnosti nativnog stanja, nastanak ovih intermedijera može biti izazvan veoma blagim promenama pH vrednosti, temperature, jonske sile, ili ponekad mehaničkim stresom. Alternativno, ovakve strukture mogu nastati kao rezultat pogrešnog uvijanja proteina (engl. protein misfolding)^{85,86}. Kao rezultat, privremeno se formiraju termodinamički-nestabilni intermedijeri koji su karakteristični po povećanoj izloženosti nepolarnih regiona polipeptida. Kako postojanje ovakvih struktura nije termodinamički favorizovano, hidrofobna agregacija predstavlja najjednostavniju alternativu za njihovu stabilizaciju. Ova agregacija je dodatno pospešena intermolekulskim interakcijama poput van der Valsovih interakcija, formiranjem vodoničnih veza, ili elektrostatičkih interakcija između neuređenih regiona intermedijera⁸⁷.

2.3.1.2. *Prirodna asocijacija proteina*

Određene proteinske strukture mogu direktno agregirati iz native konformacije, što je česta pojava pri sintezi multimernih proteina. Ovakav tip agregacije je često praćen blagim konformacionim promenama, koje potpomažu stabilnijoj agregaciji proteina preko slabijih interakcija. Kao rezultat, ovakav tip agregacije je često reverzibilan i može imati nekoliko funkcija u ćelijskim sistemima^{81,88,89}. Određeni proteini niske termalne stabilnosti imaju tendenciju da prirodno, reverzibilno agregiraju u inkluziona tela bez membrane pri naglim promenama temperature^{90,91}. Ovo je takođe česta pojava kod proteina sa visokim brojem prirodno-neuređenih domena, čija je fleksibilnost neophodna za adekvatno izvođenje određenih bioloških funkcija^{89,92}.

Još jedan značajan faktor koji doprinosi verovatnoći protein-protein asocijacije je celokupna koncentracija proteina. Određeni proteini poseduju visoku stopu izloženih hidrofobnih regiona na svojoj površini koji prirodno asosuju pri povišenim koncentracijama, naročito pri pH vrednostima koje snižavaju elektrostatičko odbijanje između bočnih ostataka na površini proteinske strukture⁹³. Povišena koncentracija proteina takođe može biti lokalizovani fenomen koji nastaje privremeno tokom zamrzavanja i odmrzavanja proteinskih rastvora⁹⁴. Generalno, agregacija izazvana visokim koncentracijama proteina je reverzibilna, ali nastali agregati mogu postati prekursori za ireverzibilnu agregaciju proteina, u zavisnosti od drugih prisutnih hemijskih i fizičkih faktora⁹⁵. Ovo predstavlja osnovni princip Lamri-Ejring modela ireverzibilne agregacije⁹⁶, koja je krajnje kontrolisana konformacionim i koloidnim mehanizmima⁹⁷.

2.3.1.3. Agregacija formiranjem hemijskih veza i degradacije

Proteinska agregacija može biti direktna posledica hemijskih modifikacija samog proteina. Pod ovim modifikacijama se generalno podrazumevaju reakcije poput hidrolize, oksidacije, izomerizacije, i deamidacije⁹⁸. Modifikacije bočnih ostataka aminokiselina u okviru polipeptidne kičme, poput deamidacije ili izomerizacije, izazivaju sterne smetnje i konformacione promene⁹⁹, što povećava rizik za agregaciju proteina. Prisustvo oksidacionih sredstava može izazvati formiranje intermolekulskih disulfidnih mostova između tiolnih grupa cisteina¹⁰⁰. Oksidativni stres takođe može izazvati uvođenje karbonilnih grupa preko direktne oksidacije bočnih ostataka aminokiselina. Prisustvo ovih grupa može izazvati konformacione promene i povećati izloženost hidrofobnih regiona proteina vodi, što dodatno povećava rizik od agregacije^{101,102}.

Degradacija proteina izazvana hidrolizom peptidne veze, generalno dejstvom visokih temperatura i niskih pH vrednosti, dovodi do formiranja peptidnih fragmenata koji mogu međusobno da asosuju^{103,104}. Novonastali polipeptidni oligomeri mogu da funkcionišu kao nukleusi za dalju agregaciju proteina, što je česta pojava pri formiranju amiloidnih struktura^{93,105}.

2.3.2. Morfologije proteinskih agregata

2.3.2.1. Amiloidni fibrili

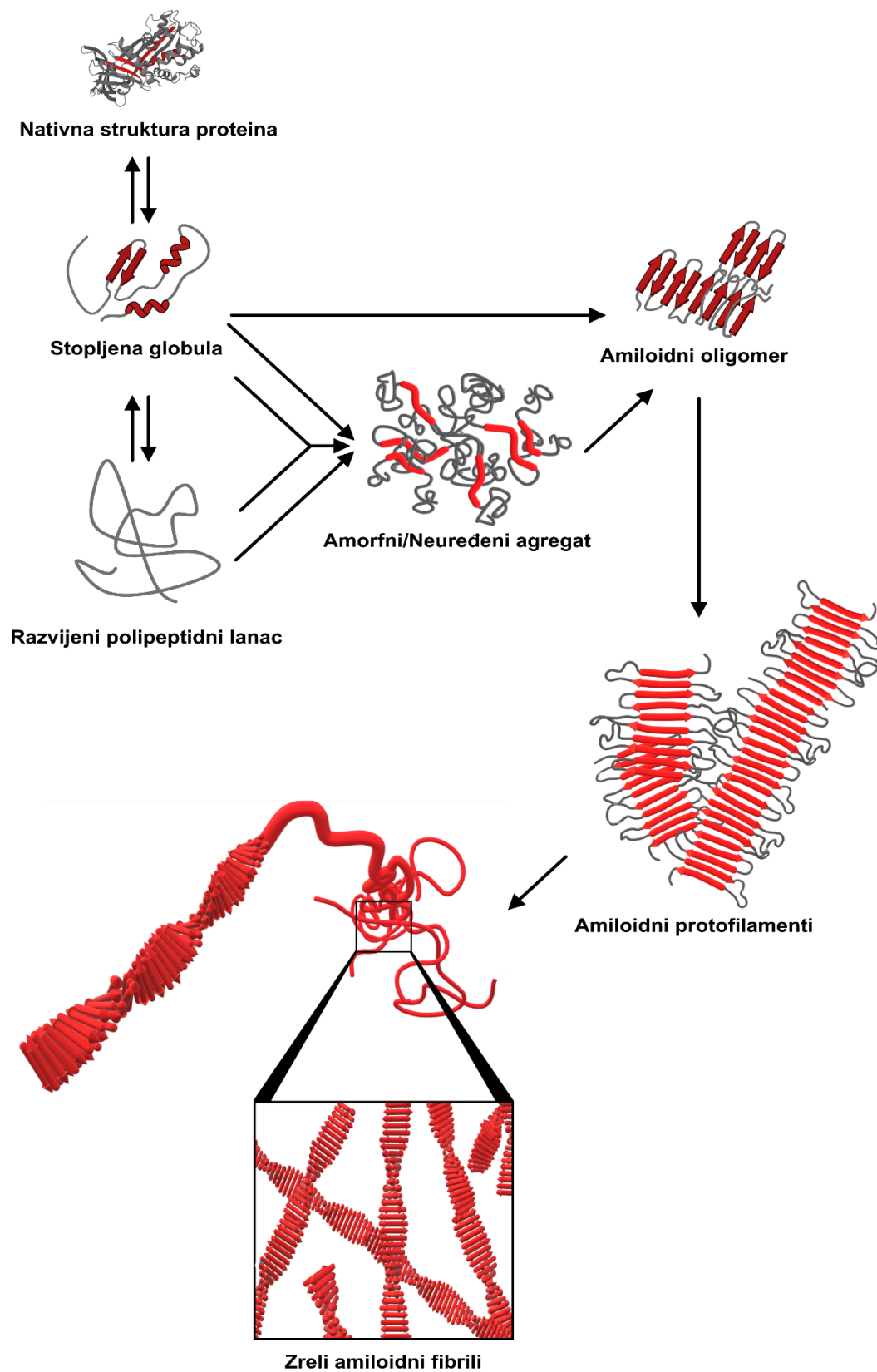
2.3.2.1.1. Karakteristike amiloidnih struktura

Amiloidni fibrili predstavljaju proteinske aggregate sa izuzetno visokim stepenom uredenosti. Amiloidi su strukturno okarakterisani visokim brojem ponavljajućih sekvenci ukrštenih paralelnih i/ili anti-paralelnih β -pločica koje međusobno uveliko interaguju preko vodoničnih, elektrostatičkih, i hidrofobnih interakcija^{106,107}. Usled prirode formiranja amiloidnih struktura, β -pločice u okviru fragmenata i protofilamenata koji krajnje konstruišu amiloidne fibrile se mogu reorijentisati u prostoru, što doprinosi stabilizaciji amiloidnih struktura preko π - π steking interakcija između aromatičnih bočnih ostataka β -pločica, uz dodatno dejstvo van der Vals-ovih sila^{106,108}. Celokupni efekat ovih interakcija, zajedno sa uređenom morfologijom amiloidnih fibrila, čini novonastale strukture termodinamički najstabilnijim oblikom proteina [Slika 1.6.]^{109–111}.

U prošlosti se verovalo da je polimerizacija polipeptidnih fragmenata u amiloidne agregate direktna posledica aminokiselinske sekvence specifičnih proteina, konkretno proteina koji su primećeni u različitim patološkim stanjima ¹¹². Ovo je, međutim, opovrgnuto krajem 20. veka serijom eksperimenata na različitim model sistemima. Rezultati mnogobrojnih metoda poput difrakcije X-zraka, infracrvene spektroskopije (engl. InfraRed spectroscopy, IR), cirkularnog dihoizma (engl. Circular Dichroism, CD), spektroskopije nuklearne magnetne rezonance (engl. Nuclear magnetic resonance, NMR) i elektronskih mikrofografija su pokazali da je amiloidna fibrilacija univerzalna mogućnost i u slučajevima ovalbumina^{113,114}, insulina ¹¹⁵, hemoglobina ¹¹⁶, lizozima ¹¹⁷. Ovo ukazuje na to da, iako postoje aminokiselinske sekvence sa većom tendencijom formiranja amiloidnih fibrila, odnosno većom stopom amiloidogenosti, generalna konverzija polipeptida i njihovih fragmenata u amiloidne strukture je univerzalna pojava koja nije apsolutno zavisna od aminokiselinske sekvence ^{111,118,119}.

2.3.2.1.2. Mehanizmi formiranja amiloidnih fibrila

Iako je konverzija proteinskih struktura u amiloidnu formu univerzalna karakteristika svih polipeptida, sam proces formiranja amiloidnih fibrila nije direktan ¹²⁰. Organizacija β -pločica u zrele amiloidne fibrile se sastoji od više nivoa, sa izvesnim brojem intermedijera [Slika 1.7.].



Slika 1.7. Shematski prikaz faza formiranja amiloidnih fibrila i njihovih intermedijera.

Prvobitni korak u formiranju amiloidnih struktura je denaturacija, odnosno narušavanje native konformacije na specifičan način. Prirodno prisutne β -pločice u okviru native strukture i strukture stopljene globule proteina mogu predstavljati početnu tačku za nastanak nukleusa amiloidne fibrilacije¹²¹. Alternativno, konformacione promene sekundarnih struktura u strukture paralelnih ili anti-paralelnih β -pločica mogu takođe biti indukovane od strane okolnih faktora^{122,123}. Faktori poput visoke temperature, nižih pH vrednosti, ili prisustva odgovarajućih jona i denaturišućih agenasa najviše doprinose začeću amiloidnih struktura. Hidroliza peptidne veze je značajan faktor koji omogućava olakšanu orijentaciju i intermolekularno slaganje nabora β -pločica između proteolitičkih fragmenata^{4,105}. Iako agregirajući proteolitički fragmenti koji sadrže amiloidogene sekvence pospešuju nastanak fibrilacionog nukleusa, prisustvo ovih sekvenci samo po sebi nije apsolutno neophodno za fibrilaciju¹¹¹. Novonastali kompleksi β -pločica predstavljaju prvi, odnosno osnovni nivo organizacije amiloidnih fibrila.

Drugi nivo amiloidne organizacije podrazumeva dodatne interakcije nabora različitih β -pločica i slobodnih, slabije-uređenih aminokiselinskih lanaca. Slobodni lanci se međusobno ukotvljavaju, formirajući takozvane sterne „patent zatvarače“ (engl. Sterric zipper)^{124,125} preko elektrostatičkih interakcija i van der Vals-ovih sila. Sterni „patent zatvarači“ predstavljaju fizičku barijeru za ulazak vode u region složenih β -pločica. Prisustvo rastvarača bi alternativno poremetilo vodonične interakcije između β -pločica i negativno uticalo na stabilnost osnovne gradivne jedinice amiloida. Na ovaj način nastaju heterogeni amiloidni oligomeri^{119,126,127}, čija stabilnost i konstrukcija zajedno diktiraju brzinu predstojećeg procesa elongacije, kao i krajnji stepen fibrilacije amiloidnih struktura¹²⁸.

Jedan od najvećih doprinosa amiloidnoj stabilizaciji potiče od velikog broja vodoničnih interakcija¹⁰⁷. Iako prisustvo amiloidogenih sekvenci nije nužno za formiranje zrelih amiloidnih fibrila, aminokiselinske sekvence koje potpomažu u formiranju dodatnih vodoničnih interakcija mogu značajno da ubrzaju rast i razvoj amiloida¹²⁹. Konkretno, β -pločice koje sadrže veliki broj glutamina i asparagina u svojoj sekvenci međusobno formiraju vodonične interakcije čija jačina raste ne-linearno sa brojem složenih, susednih β -pločica. Na ovaj način nastaju paralelni nizovi polarizovanih vodoničnih interakcija koje prate osu amiloidne strukture i sinergistički stabilizuju amiloidni oligomer^{130,131}.

Procesom elongacije sledi nastanak trećeg nivoa organizacije zrelih amiloidnih fibrila – protofilamenata, odnosno protofibrila. Ove strukture već poseduju izuzetan stepen termodinamičke stabilnosti. Visoka termodinamička stabilnost protofilamenata i njihovih oligomera može izazvati postepenu konverziju okolnih proteinskih struktura u amiloidni oblik^{122,126}, što omogućava njihovu buduću inkorporaciju u samu strukturu amiloidnog fibrila. Ova karakteristika predstavlja osnovu za amiloidnu citotoksičnost i propagaciju amiloidnih oboljenja^{5,132}.

Tokom procesa elongacije istovremeno dolazi do formiranja interakcija između većeg broja rastućih protofilamenata. Ovim interakcijama se protofilamenti međusobno uvijaju uz nastanak ukrštenih β -pločica^{112,113,124}.

Krajnji rezultat je kompaktna helikoidna struktura sa visokim sadržajem β -pločica čije je hidrofobno jezgro zaštićeno od rastvarača zahvaljujući prisustvu sternih „patent zatvarača“¹²⁵. Dimenzije novonastalog zrelog fibrila mogu drastično varirati u zavisnosti od stabilnosti originalnih oligomera, sa maksimalnim dijametrima od preko 30 nm i dužinama od nekoliko mikrona^{116,133}.

2.3.2.1.3. Značaj amiloidnih struktura

2.3.2.1.3.a) Amiloidi u patološkim stanjima

Jedan od glavnih razloga za prvobitno-predloženu neophodnost specifičnih proteinskih struktura u formiranju amiloidnih fibrila proističe od originalnog prepoznavanja ovih struktura u različitim amiloidnim oboljenjima tokom 20. veka. Iako je apsolutna neophodnost ovakvih struktura u amiloidnoj fibrilaciji danas opovrgnuta, originalno je primećeno da preko 20 različitih prirodnih proteina mogu funkcionisati kao aktivni agensi za razvoj amiloidnih oboljenja^{134,135}.

Patogenost amiloidnih struktura potiče od njihove izuzetne termodinamičke stabilnosti. Ova stabilnost omogućava amiloidima da, mehanizmom nukleacije, postepeno konvertuju okolne proteine u amiloidnu formu. Usled ovoga, prisustvo i razvoj amiloidnih fibrila dovodi do eventualno eksponencijalnog gubitka funkcije različitih organa i tkiva u kojima su amiloidne strukture deponovane. Kako je formiranje amiloidnih fibrila univerzalna karakteristika svih proteina, razvoj amiloidnih depoa nije izolovana pojava za samo jedan organski sistem i oboljenja izazvana ovom pojavom se celokupno nazivaju amiloidoze^{2,136}.

Postoji više različitih klasifikacija i tipova sistemskih amiloidoza, koje variraju u zavisnosti od patogeneze i amiloidnih prekursora¹³⁷. Najčešći tip sistemske amiloidoze je opisan kao primarna amiloidoza, čije amiloidne prekursore predstavljaju mutirani laki lanci imunoglobulina (engl. Amyloid Light chain, AL)¹³⁸. Primarna amiloidoza je često povezana sa razvojem multiplog mijeloma, pri čemu dolazi do povišene proizvodnje mutiranih monoklonskih antitela. Sekvence varijabilnih domena ovih lanaca su amiloidogene i njihova koncentracija u krvi i urinu pacijenata raste sa razvojem mijeloma¹³⁹. Prisustvo amiloidogenih sekvenci u krvi podrazumeva širok spektar afektovanih organa, od kojih su najčešći srce i bubrezi¹³⁶. Simptomi su često neprimetni tokom inicijalnog perioda depozicije i nukleacije amiloidnih struktura, nakon čega sledi ekstremno brza progresija bolesti, praćena povećanom rigidnošću i gubitkom funkcije organa^{140,141}. Tretmani za AL amiloidozu često podrazumevaju primenu citotoksične hemoterapije. Kako su simptomi prvobitno neprimetni i uveliko vezani za afektovane organe, verovatnoća pogrešnih dijagnoza je visoka. Zbog toga, najčešće su korišćene kuplovane transplantacije organa sa različitim tipovima hemoterapija, uz primenu imunomodulatornih lekova^{142,143}.

Amiloidoze mogu takođe biti lokalizovane. U ovu grupu amiloidoza spadaju familijalne amiloidoze, od kojih je najčešća amiloidoza izazvana mutiranim transtiretinom (engl. Amyloid Transthyretin, ATTR)^{3,144}. Transtiretin je transportni protein koje je uglavnom sintetisan u jetri, i strukturno je poprilično podležan mutacijama koje povećavaju njegovu amiloidogenost. Primećeno je da preko 50 različitih supstitucija samo jedne aminokiseline mogu rezultovati u nastanku amiloidnog prekursora¹³⁶. Međutim, kako je ovaj tip amiloidoze lokalizovan u jetri, transplantacija jetre je najčešći i najuspešniji tretman u potpunom odstranjivanju ovog oboljenja. Svakako, mutacije koje dovode do proizvodnje amiloidogenih prekursora i razvoja drugih familijalnih amiloidoza su takođe primećene kod lizozima¹⁴⁵, fibrinogena A α ¹⁴⁶, i apolipoproteina A-I¹⁴⁷.

Iako sistemske amiloidoze mogu da utiču na veći broj različitih organa, retko kada nastale amiloidne strukture proliferišu do centralnog nervnog sistema. Ipak, neurodegenerativna amiloidna oboljenja predstavljaju najčešći i najpoznatiji primer amiloidne patogenosti¹⁴⁸. Kroz godine su primećene česte pojave naslaga amiloidnih fibrila u nervnim tkivima pacijenata sa različitim neurodegenerativnim oboljenjima – Alchajmerove¹⁴⁹, Hantingtonove⁷, Parkinsonove⁶, i Krocjfeld-Jakobove bolesti¹⁵⁰. Prekursorski proteini koji su asocirani sa ovim oboljenjima su karakteristični po svojoj visokoj stopi neuređenosti. Ova prirodna neuređenost drastično povećava njihovu fleksibilnost i efikasnost u izvođenju signalnih i regulatornih funkcija, ali istovremeno povećava njihovu sklonost ka formiranju amiloidogenih sekvenci usled mutacija¹⁴⁹.

U slučaju Alchajmerove bolesti dolazi do akumulacije β -amiloidnog proteina u mozgu. Formiranje ovog proteina je direktan rezultat proteolitičke razgradnje β -amiloid-prekursorskog proteina. Mutacije samog β -amiloid-prekursorskog proteina mogu dovesti do formiranja amiloidogenih polipeptidnih fragmenata nakon regulisane proteolize¹⁵¹, pri čemu dolazi do olakšanog formiranja nukleusa za amiloidnu fibrilaciju. Pored standardne indukcije konformacionih prelaza okolnih proteina i konverzije u amiloidnu formu, primećeno je da β -amiloid takođe poseduje sposobnost heliranja jona prelaznih metala, poput Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , i Al^{3+} ¹⁵². Takođe je primećeno da β -amiloid poseduje oksidoredukciona svojstva¹⁵³, što je dodatno pospešeno *in vivo* helacijom jona bakra^{154,155}. Kao rezultat, β -amiloid može da interaguje sa različitim biomolekulima poput enzima, lipida, i lipoproteina¹⁵⁶, pri čemu ih efikasno oksiduje. Alternativno, usled helacije i redukcije jona metala dolazi do indirektnog formiranja slobodnih radikala, koji dodatno povećavaju oksidativni stres u nervnim tkivima^{153,157}.

Iako amiloidne strukture mogu na indirektno načine da izazovu dodatnu štetu nervnim tkivima, glavni oblik patogenosti je svakako nukleacija praćena amiloidnom konverzijom okolnih proteina. Jedan od značajnih primera ove pojave se može uočiti u Hantingtonovoj bolesti. Hantingtonova bolest predstavlja nasledno neurodegenerativno oboljenje koje je karakteristično po relativno ranom ispoljavanju simptoma^{7,158}. Prekursorski protein koji izaziva razvoj ove bolesti, hantingtina, je karakterističan po visokom broju poliglutaminskih sekvenci, konkretno na N-terminalnom regionu sekvence. Kao što je prethodno opisano, prisustvo velikog broja glutamina i asparagina u sekvenci proteina omogućava dodatnu stabilizaciju amiloidnih struktura. Ovo je direktan rezultat sinergističkog efekta polarizovanih vodoničnih interakcija između amidnih grupa bočnih ostataka glutamina¹³⁰.

U slučajevima pacijenata sa Huntingtonovom bolešću, broj ponavljajućih sekvenci glutamina može drastično varirati. Primećena je korelacija između brzine ispoljavanja simptoma Huntingtonove bolesti i broja ponovaka glutamina, što dodatno potkrepljuje njihov doprinos u formiranju stabilnih nukleusa za amiloidnu fibrilaciju i propagaciju bolesti ^{4,158,159}.

Većina neurodegenerativnih oboljenja ispoljava patogenost na sličan način: formiranjem mutiranih amiloidogenih prekursora, čiji je nastanak praćen postepenim konformacionim promenama i depozicijom nerastvornih amiloidnih fibrila. U slučaju Parkinsonove bolesti, glavni prekursorski protein je α -sinuklein. Amiloidni fibrili α -sinukleina se deponuju u inkluzionim telima u regionu srednjeg mozga koji je zaslužan za motoriku i održavanje sistema nagrade i kazne. Kao rezultat, dolazi do neadekvatnog prenosa signala i nevoljnih pokreta mišića pacijenata ^{6,160}.

Kada su u pitanju prionska oboljenja, patologija amiloidnih struktura je identična. Sami po sebi, nativni prionski proteini su benigni i već prisutni u nervnom tkivu. Međutim, poprilično su podležni amiloidnoj konverziji koja može biti izazvana usled mutacija, promena uslova okoline, ili prisustva jona metala ^{8,161}. Zbog ove karakteristike, prvobitni nastanak štetne forme prionskog proteina izaziva najpre sporu, ali i eventualno eksponencijalnu konverziju nativnih priona u amiloidni oblik ^{132,162}.

Opisane karakteristike konverzije i prirodne stabilnosti amiloidnih fibrila čine opcije za lečenje i tretmane relativno ograničenim. Generalni pristup obuhvata sprečavanje dalje propagacije amiloidnih struktura primenom lekova koji stabilizuju nativne proteinske forme, ili indirektno utiču na formiranje amiloida promenom okolnih faktora ¹⁶³.

2.3.2.1.3. b) Funkcionalna svojstva amiloidnih fibrila

Postoje pretpostavke da su amiloidne strukture bile znatno rasprostranjenije kod primitivnih organizama u prošlosti, ali da su, vremenom, proteinske strukture evoluirale, zamenjujući prirodnu stabilnost amiloidne forme za više nivoa fleksibilnosti i širi opseg bioloških funkcija ¹⁶⁴. Svakako, i danas postoji izvestan broj slučajeva u kojima amiloidi poseduju raznovrsne biološke funkcije.

Jedan od primera ovakvih funkcija je u slučaju Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* koja je karakteristična po tome što, tokom proizvodnje vanćelijskog matriksa, takođe proizvodi i sekretuje amiloidogene polipeptidne fragmente u okolinu ¹⁶⁵. Uloga ovih prekursorskih fragmenata jeste da se, preko interakcija sa drugim faktorima vanćelijskog matriksa poput malih proteina, lipida, i polisaharida, indukuje njihova transformacija, agregacija, i razvoj u amiloidne fibrile. Ovi novonastali fibrili učestvuju u formiranju biofilma u kom se nalazi bakterija ¹⁶⁵, pružajući još veću rigidnost datom biofilmu i fizički smanjujući permeabilnost vanćelijskog matriksa.

Na ovaj način se povećava rezistencija *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike ¹⁶⁶. Kao rezultat, infekcije izazvane ovom bakterijom su poprilično opasne, izazivajući pneumoniju sa značajnom stopom smrtnosti od oko 30% kod pacijenata koji već boluju od drugih tegoba ¹⁶⁵. Takođe, veruje se da prisustvo biofilma koje *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi izaziva formiranje priona iz antimikrobijalnih proteina plućnog endotelijuma, što je direktan rezultat prisustva sekretovanih amiloidnih struktura ¹⁶⁷. Amiloidne strukture koja učestvuju u formiranju ovakvih biofilma su klasifikovane pod nazivom kurli fibrili, i nisu isključive za samo jedan tip bakterija. *Escherichia coli* takođe sekretuje ove strukture, koje učestvuju u formiranju biofilma, kao i u ćelijskoj adheziji ^{168,169}.

Proizvodnja funkcionalnih amiloida nije isključiva samo za bakterije ¹⁷⁰. Fungalni prioni takođe poseduju izuzetne biološke funkcije, kao u slučaju priona „PSI⁺“ kod *Saccharomyces cerevisiae*, koji učestvuje u zaustavljanju translacije ¹⁷¹. Još jedan tip fungalnog priona „Hets“ je proizveden od strane *Podospora anserina*, koji direktno učestvuje u regulaciji antiviralnih procesa i zaštite od infekcija ¹⁷². Prisustvo funkcionalnih amiloida je takođe primećeno i u sisarima, gde amiloidi imaju ulogu u regulaciji biosinteze melanina ^{170,173,174}.

Usled širokog opsega različitih aminokiselinskih sekvenci koje mogu biti inkorporirane u strukture β -pločica amiloidnih fibrila, postoji značajan broj potencijalnih primena amiloidnih struktura u različitim industrijama. Prirodno visoka termodinamička stabilnost, kuplovana sa tendencijom fibrila da vezuje različite tipove jona metala, biomakromolekula, i malih organskih molekula, omogućava njihovu primenu u konstrukciji biomembrana i filtera ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Agregacija proteina u prehrambenim proizvodima je generalno posmatrana kao pozitivna pojava, usled uveliko pozitivnog efekta agregacije na strukturnu stabilnost i zadržavanje vode ⁹⁻¹¹. Usled ovoga, pojava fibrilacije proteina poput ovalbumina se istražuje radi potencijalnog poboljšavanja tehnofunkcionalnih svojstava hrane ¹². Prisustvo ovakvih struktura može doprineti boljoj emulzifikaciji ¹², stabilizaciji disperzija ¹⁴, i gelirajućim karakteristikama ¹³ prehrambenih proizvoda. Svakako, ovakve primene treba pažljivo razmatrati sa obzirom na potencijalni rizik ekstenzivne fibrilacije amiloidnih struktura, kao i stvaranja okolnih uslova koji su pogodni za njihovu dalju proliferaciju.

2.3.2.2. Amorfni agregati i proteinski gelovi

Amorfni agregati predstavljaju glomazne proteinske strukture niskog stepena uredenosti. Amorfna proteinska agregacija je uglavnom rezultat hidrofobnih interakcija između delimično-razvijenih polipeptida, i čini najčešći vid proteinske agregacije ⁸¹.

Glavni parametar koji određuje tip agregacije je pH vrednost okoline agregirajućih proteina. Dok povišeno naelektrisanje površinskih aminokiselinskih ostataka proteina favorizuje formiranje uredenijih agregata poput amiloidnih fibrila, uslovi pri kojima je neto naelektrisanje proteina nisko, dovodi do češćeg formiranja amorfni agregata.

Za razliku od amiloidne agregacije, pri amorfnoj agregaciji reorganizacija sekundarnih struktura je značajno ređa pojava^{81,178,179}. Ovo dodatno pokazuje da amorfni agregati generalno nastaju usled intermolekulskih interakcija delimično-uvijenih proteina i stabilnih intermedijera^{81,87,180}.

Formiranje proteinskih gelova je još jedan vid proteinske agregacije koje je takođe favorizovano pri pH vrednostima koje su blizu izoelektrične tačke proteina. Glavni faktor koji utiče na geliranje jeste koncentracija proteina prisutnih u rastvoru. Pri visokim koncentracijama proteina dolazi do povećanog stepena geliranja, dok je amorfna agregacija favorizovana pri nižim proteinskim koncentracijama. Jonska sila rastvora predstavlja drugi značajan faktor. Pri visokim koncentracijama jona u rastvoru dolazi do izraženijeg formiranja amorfnih agregata, što je direktan rezultat povećanog stepena hidrofobnih interakcija. Usled ovoga, niže jonske sile značajno pospešuju nastanak proteinskih gelova. Iako formiranje intermolekulskih disulfidnih veza nije striktno neophodno za geliranje, primećeno je da njihovo prisustvo može dodatno da stabilizuje matrikse proteinskih gelova^{81,181,182}.

2.4. Metode detekcije konformacionih prelaza i agregacije

Postoji značajan broj široko-primenjenih metoda za analizu konformacionih promena u okviru proteinskih struktura. Ove metode mogu dati uvid u različite strukturne promene i često se koriste u tandemu radi preciznije procene konkretnih konformacionih prelaza.

Spektroskopske metode poput Ramanove spektroskopije, CD spektroskopije, i IR spektroskopije se standardno koriste za analizu sekundarnih struktura proteina¹⁸³. Za praćenje morfoloških promena proteinskih struktura se često koriste metode poput dinamičkog rasejavanja svetlosti (engl. Dynamic Light Scattering, DLS), kao i mikroskopske metode poput transmisiona elektronske mikroskopije (engl. Transmission Electron Microscopy, TEM) i mikroskopije atomskih sila (engl. Atomic Force Microscopy, AFM)^{183,184}. Spektrofluorimetrijske metode su poprilično komplementarne, dodatno potkrepljujući rezultate koji su često dobijeni iz prethodno pomenutih metoda konkretnom primenom različitih, strukturno-specifičnih fluorescentnih proba.

2.4.1. Infracrvena spektroskopija

Jedna od najpogodnijih metoda za semikvantitativno određivanje konformacionih prelaza proteina je infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom (engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR). Principijalno, infracrveni zraci bivaju apsorbovani od strane različitih hemijskih veza sa specifičnim vibracionim frekvencijama koje su identične frekvenciji samog infracrvenog zračenja. Ovo omogućava identifikaciju specifičnih molekulskih grupa, kao i strukturnih faktora koji utiču na njihovu vibraciju. U slučaju proteina, najveći doprinos potiče od vibracija u okviru amidnih veza i, u manjoj meri, od komponenti bočnih ostataka aminokiselina¹⁸⁵. Pikovi koji nastaju apsorpcijom infracrvenog zračenja od strane komponenti amidne veze su kategorizovani u različite regione, od kojih su naznačajniji Amidni I, II, i III regioni [Tabela 1.1.].

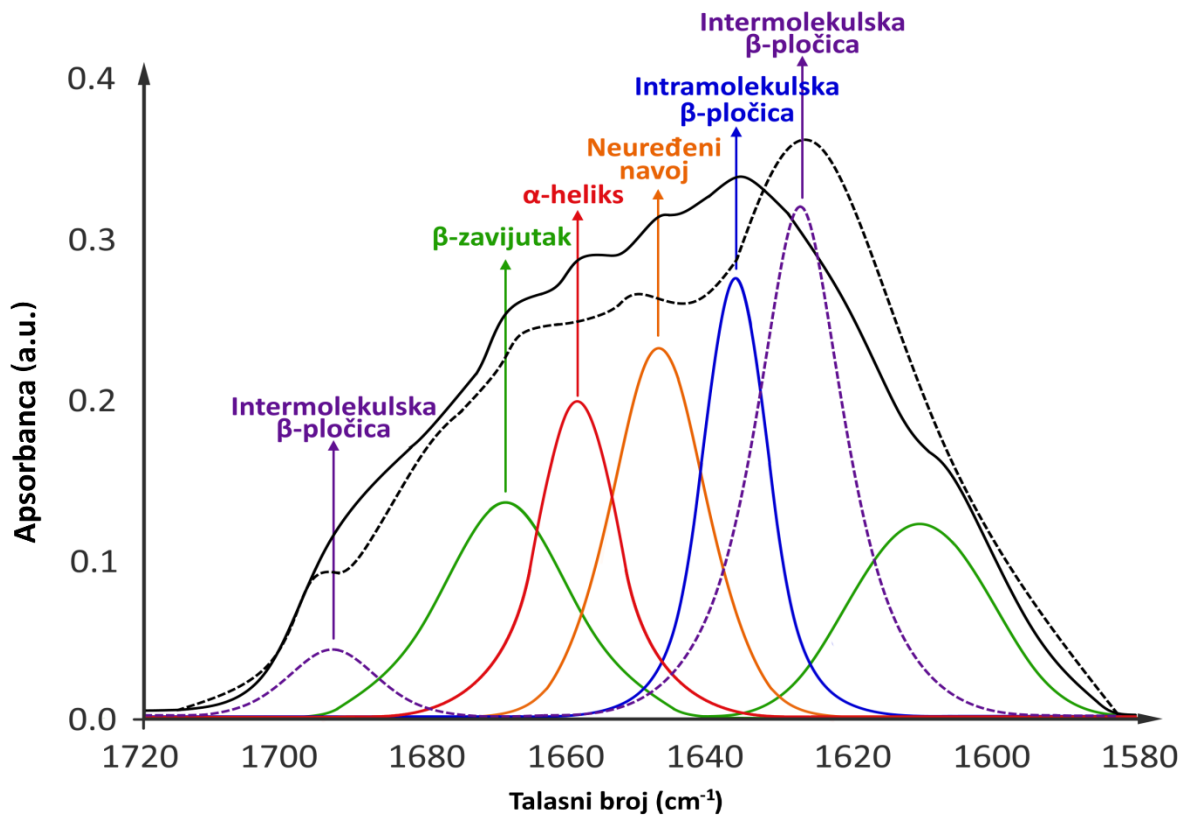
Tabela 1.1. – Karakteristični regioni IR spektara čiji pikovi potiču od apsorpcije

Region	Opseg (cm ⁻¹)	Dominantni vibracioni tipovi
Amidni I	1695-1610	C=O istezanje
Amidni II	1575-1480	C–N istezanje
Amidni III	1320-1220	N–H savijanje

Za praćenje konformacionih prelaza proteina u rastvoru se može primeniti transmisiona infracrvena spektroskopija. Međutim, usled H–O–H vibracija vodenih rastvora, dolazi do značajnog preklapanja pikova u okviru Amidnog I regiona. Ovo može znatno otežati analizu proteinskih rastvora, i neophodna je primena rastvora sa koncentracijama proteina iznad 10 mg/mL (~0.1–1 mM, u zavisnosti od veličine proteina), kako bi smetnja rastvarača bila minimizirana. Takođe, dodatne smetnje mogu biti izazvane u zavisnosti od primenjenog puferskog sistema, usled kojih je neophodno odvojeno snimanje rastvarača pod identičnim uslovima, kao i naknadno odstranjivanje odgovarajućih pikova od spektara proteinskih uzoraka. Smetnje izazvane rastvaračem mogu biti umanjene alternativnom primenom deuterijum-oksida (D₂O) umesto vode. Usled veće relativne atomske mase deuterijuma, promena u D–O–D vibracijama izaziva apsorpciju infracrvene svetlosti rastvarača u regionima nižih talasnih brojeva, smanjujući stepen preklopljenosti pikova. Vodonik-deuterijum izmena u okviru prisutnih proteinskih struktura dodatno umanjuje preklapanje pikova, što čini primenu ovakvih rastvarača izuzetnom za analizu konformacionih prelaza proteina u rastvorima¹⁸⁶.

Alternativa transmisionalnoj IR spektroskopiji je infracrvena spektroskopija sa prigušenom totalnom refleksijom (engl. Attenuated Total Reflectance – ATR). Osnova ove metode se zasniva na nanošenju uzorka proteina na površinu IR-transparentnog kristala, pri čemu je IR zračenje propušteno kroz primenjeni kristal. Na osnovu prirode datog kristala, IR zračenje prodire samo nekoliko mikrometara u sam uzorak i biva apsorbovano od strane čestica na direktnoj površini samog kristala. Ovo omogućava alternativnu analizu čvrstih uzoraka proteina, ali i dodatno smanjuje smetnju od strane rastvarača u proteinskim rastvorima.

Sama analiza proteinskih struktura se generalno izvodi praćenjem promena u Amidnom I regionu. Promene u položajima i intenzitetima pikova su najosetljivije u okviru ovog regiona, što omogućava efikasno praćenje promena sekundarnih struktura kao i njihovih uticaja na vibracionu frekvenciju karbonilne grupe peptidnih veza¹⁸⁶. Međutim, usled visoke kompleksnosti ispitivanih struktura, dolazi do izvesnog stepena preklapanja dobijenih signala, odnosno pikova spektara. Dobijeni pikovi se mogu lakše identifikovati digitalnom dekonvolucijom spektara [Slika 1.8.] primenom softverskih paketa¹⁸⁷. Ove karakteristike i prednosti čine infracrvenu spektroskopiju izuzetnom tehnikom za analizu konformacionih prelaza, protein-ligand interakcija, i amiloidne fibrilacije proteina^{187,188}.



Slika 1.8. – Prikaz Amidnog I regiona infracrvenog spektra, kao i standardnih pozicija pikova odgovarajućih sekundarnih struktura nativnog proteina (—) i sekundarnih struktura specifičnih za amiloidne fibrile (- - -).

2.4.2. Spektrofluorimetrijske metode

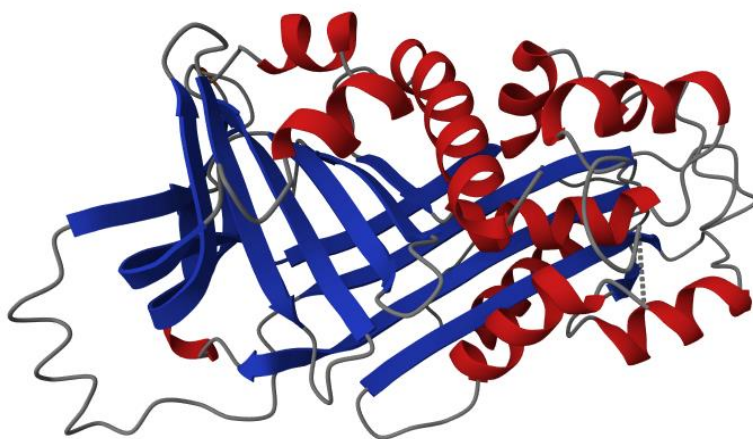
Spektrofluorimetrija predstavlja izuzetnu metodu za praćenje konformacionih prelaza proteinskih struktura. Kako većina proteina poseduje prirodne fluorofore, odnosno aminokiseline sa aromatičnim bočnim ostacima (Tyr, Trp, Phe), emisiona fluorescencija proteinskih struktura je veoma česta pojava. Transfer energije fluorofora je veoma osetljiv proces, i na njega direktno utiču mnogobrojni faktori. Konkretno, najveći uticaj potiče od intra- i intermolekulskih interakcija fluorofora, što direktno omogućava analizu konformacionih prelaza u zavisnosti od pozicije fluorofora u celokupnoj proteinskoj strukturi¹⁸⁹. Poznavanjem nativne strukture ispitivanog proteina, kao i praćenjem rezultujućih promena u poziciji maksimuma fluorescencije pri konformacionim prelazima, moguće je odrediti same tipove konformacionih prelaza. Nažalost, analiza konformacionih prelaza na ovaj način je značajno ograničena usled izuzetne osetljivosti i direktnog doprinosa svake pojedinačne fluorofore. Na osnovu ovoga, prirodna proteinska fluorescencija se može pouzdano primeniti samo u slučajevima proteina koji poseduju veoma nizak broj aromatičnih aminokiselinskih ostataka^{189,190}.

Za praćenje konformacionih prelaza proteina se sve češće koriste metode koje su zasnovane na specifičnim interakcijama pojedinačnih fluorescentnih proba sa određenim regionima proteina¹⁹¹. Jedna takva proba, 1-anilinonaftalen-8-sulfonska kiselina (ANS), je karakteristična po fluorescenciji čiji je intenzitet direktno zavisn od polarnosti njenog okruženja. ANS prirodno ne fluorescira u vodenim rastvaračima, ali postaje značajno fluorescentan u nepolarnim okruženjima. Usled ovoga, ANS predstavlja adekvatnu probu za spektrofluorimetrijsko praćenje izloženosti hidrofobnih regiona proteina¹⁹².

Još jedna fluorescentna proba koja je od izuzetnog značaja je Tioflavin T (ThT)¹⁹³. ThT je karakterističan po semi-specifičnom vezivanju za amiloidne fibrile, ali je sama analitička primena relativno ograničena u biološkim uzorcima usled prisustva interferirajućih supstanci poput nukleinskih kiselina¹⁹⁴. ThT se često primenjuje za *in vitro* detekciju prisustva zrelih amiloidnih fibrila, ali ima i ograničenu primenu *in vivo*. Konkretni mehanizam vezivanja ThT-a za amiloidne strukture nije u potpunosti razjašnjen, i pretpostavlja se da ThT formira micelle koje se jonskim interakcijama vezuju za brazde amiloidnih fibrila¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

2.5. Ovalbumin kao model sistem

Strukturno, ovalbumin predstavlja monomerni, rezervni glikoprotein belanceta, sa molarnom masom od ~45 kDa i pI vrednošću od 4,6¹⁹⁷. Posедуje sekvencu od 386 aminokiselina sa 6 cisteina, sa jednom disulfidnom vezom između Cys74 i Cys121^{197,198}. N-terminus ovalbumina je acetilovan i ne sadrži standardnu lidersku sekvencu, iako je ovalbumin sekretorni protein¹⁹⁹. Najzastupljeniji tipovi sekundarnih struktura ovalbumina predstavljaju β -pločice (~45%) i α -heliksi (~35%)²⁰⁰ [Slika 1.9.].



Slika 1.9. – Trodimenzionalni prikaz strukture ovalbumina (PDB Kod: 1OVA) sa naznačenim β -pločicama (plavo) i α -heliksima (crveno).

Funkcionalno, ovalbumin je rezervni protein i čini preko 50% ukupne koncentracije proteina u belancetu. Ova visoka rasprostranjenost omogućava relativno jednostavan proces ekstrakcije proteina sa visokim prinosom¹⁹⁷. Ovalbumin je klasifikovan u familiju inhibitora serin proteaza, odnosno serpina. Iako ovalbumin sam po sebi ne poseduje inhibitorsku aktivnost kao drugi članovi familije serpina, deli mnoge strukturne karakteristike serpina^{201,202}.

Aktivnost serpina kao proteaznih inhibitora drastično zavisi od njihove sposobnosti da podležu značajnim konformacionim promenama ²⁰³. Ova sposobnost je rezultat prisustva ekstremno fleksibilnog lanca u okviru serpina koji se naziva centralna reaktivna petlja. U funkcionalnim serpinima, centralna reaktivna petlja strukturno imitira supstrate za serin proteaze. Vezivanjem proteaze, indukuje se konformaciona promena serpina pri kojoj dolazi do istovremene inaktivacije proteaze, kao i značajne stabilizacije novonastale konformacije serpina ²⁰³. Iako ovalbumin ne ispoljava inhibitorsku aktivnost, još uvek poseduje veoma blagi stepen mobilnosti koja je karakteristična za serpine. Ova karakteristika dodatno doprinosi primenljivosti ovalbumina kao model sistema za analizu konformacionih prelaza proteina.

Opisane strukturne karakteristike čine ovaj model sistem značajno pogodnim za analizu konformacionih prelaza i procesa agregacije usled rezultujuće tendencije ovalbumina da formira stabilne intermedijere, odnosno stopljenu globulu, naročito pri uslovima nižih pH vrednosti ²⁰⁴. Formiranje stabilnih intermedijera generalno pospešuje proteinsku agregaciju, konkretno u amiloidne fibrile. Najefikasniji način konverzije nativnog ovalbumina u amiloidnu formu je istovremeno izlaganje proteina ekstremno niskim pH vrednostima, pri visokim temperaturama ^{113,200,205}. Ovo ukazuje na to da ovalbumin ima visoku tendenciju da formira amiloidne strukture, što je takođe primećeno pri neutralnim uslovima, uz duge periode zagrevanja ¹¹³.

Takođe, kako do sada nije prijavljeno postojanje prirodno-specifičnih liganada za ovalbumin, on predstavlja adekvatan model sistem za analizu ne-specifičnih interakcija sa različitim tipovima jona i malih organskih molekula.

3. CILJEVI

Kako postoji značajan broj faktora koji mogu uticati na proteine i njihove konformacione prelaze, neophodno je dodatno proučiti konkretne tipove promena koje su izazvane od strane datih, specifičnih faktora. Od popriličnog interesa u različitim industrijama su molekularni mehanizmi protein-ligand interakcija, konkretno pri njihovom uticaju na agregaciju proteina. Glavni cilj ove disertacije je *in vitro* ispitivanje uticaja jona metala i organometalnih kompleksa na konformacione prelaze ovalbumina kao model sistema za ne-specifične protein-ligand interakcije, uključujući njihov uticaj na proteinsku agregaciju, kao i strukturnu analizu i modelovanje dobijenih agregata. Radi adekvatnog razumevanja molekularnih mehanizama uticaja ispitivanih jona na amorfnu ili amiloidnu agregaciju, u okviru ove disertacije su postavljeni sledeći ciljevi:

1. Izolovanje ovalbumina i priprema uzoraka za proteinsku agregaciju

- a) Prvobitni cilj je izolovanje model sistema, ovalbumina, iz kokošnjih jaja (*G. gallus*) precipitacionim tehnikama.
- b) Naknadni cilj predstavlja podešavanje uslova za ispitivanje agregacionih procesa i pripremu uzoraka, poput podešavanja pH vrednosti rastvora ovalbumina i adicije odgovarajućih jona teških metala i organometalnih kompleksa.

2. Ispitivanje efekata jona na nativnu i/ili agregiranu strukturu proteina

Radi potvrđivanja inicijalne destabilizacije izazvane prvobitnim uspostavljanjem protein-ligand interakcija, kao i njihovog doprinosa u naknadnoj, potencijalnoj agregaciji proteina, bilo je neophodno izvesti strukturne analize uzoraka pre i nakon odgovarajućih perioda termalne inkubacije. U ovu svrhu su primenjene ATR-FTIR metode za kvalitativnu identifikaciju promena sekundarnih struktura ovalbumina u okviru Amidnog I regiona pod ispitivanim uslovima, kuplovane sa kvantitativnom procenom istih promena primenom spektralnih podataka iz Amidnog II regiona.

3. Utvrđivanje prirode proteinskih agregata

Nakon potvrđivanja nastanka proteinskih agregata prisustvom intermolekulskih β -pločica u okviru Amidnog I regiona odgovarajućih IR spektara ovalbumina, postavljeni su ciljevi identifikacije različitih karakteristika datih agregata:

- a) Identifikacije amornog ili amiloidnog tipa proteinske agregacije ovalbumina primenom spektrofluorimetrijskih ANS i ThT eseja.
- b) Ispitivanje uticaja vezivanja datih liganada na dimenzije nastalih agregata ovalbumina primenom DLS metode.

- c) Ispitivanje morfologije novonastalih strukturnih kompleksa proteina i jona teških metala korišćenjem AFM tehnike.

4. Određivanje preferencijalnih mesta vezivanja ispitivanih jona i liganada za ovalbumin

Kako je glavni cilj ove disertacije bolje razumevanje konformacionih prelaza proteina izazvanih nespecifičnim vezivanjem jona teških metala, kao cilj je postavljeno određivanje načina interakcije i vezivanja pojedinačnih jona teških metala za model sistem ovalbumina, uključujući i teorijsku procenu potencijalno-preferencijalnih mesta vezivanja datih jona. U ovu svrhu je korišćen domaći program koji je konstruisan u Pitonu (engl. Python), uz primenu literaturnih podataka i informacija iz dostupnih proteinskih baza podataka.

5. Diskriminacija uticaja metalnih jona i uticaja liganada kod organometalnih kompleksa na konformacione prelaze i potencijalnu agregaciju proteina

Radi određivanja potencijalnih razlika u uticajima teških metala, u vidu slobodnih jona kao i u okviru organometalnih kompleksa, kao cilj je postavljeno izvođenje komparativne analize konformacionih prelaza ovalbumina:

- a) prvobitnim određivanjem adekvatne, neometajuće koncentracije primenjenog ko-rastvarač,
- b) ispitivanjem stepena izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina u prisustvu različitih koncentracija jona metala i njihovih organometalnih kompleksa, pri različitim pH vrednostima, ANS esejom,
- c) ispitivanjem konformacionih prelaza izazvanih tokom inkubacionog perioda u prisustvu ispitivanih jedinjenja, pri različitim pH vrednostima, ANS i ThT esejima.

6. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika, lipofilnosti, i hidrofobnosti ispitivanih organometalnih kompleksa

Kako je, pri proceni vijabilnosti potencijalnih terapeutika, od velike koristi predviđanje niza faktora koji potencijalnu utiču na željenu aktivnost ispitivanih jedinjenja, kao dodatan cilj u ovoj disertaciji je postavljeno ispitivanje i predviđanje važnijih fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih karakteristika ispitivanih organometalnih kompleksa Pd(II). U ovu svrhu su procenjeni profili za apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje (engl. Absorption, distribution, metabolism and excretion profiles, ADME) ispitivanih kompleksa *in-silico* primenom SwissADME programa.

7. Unapređenje metoda za praćenje nespecifičnog uticaja potencijalnih terapeutika na ćelijske proteine

Radi potencijalnog razjašnjavanja generalnih nedoslednosti tokom određivanja antiproliferativnog dejstva hemoterapeutika na bazi metala, kao dodatan cilj je postavljeno ispitivanje ometajućih, nespecifičnih protein-ligand interakcija ispitivanih organometalnih kompleksa Pd(II) sa ovalbuminom. U ovu svrhu je postavljen niz manjih ciljeva:

- a) kvalitativno ispitivanje promena sekundarnih struktura izazvanih od strane interakcija terapeutika pri odgovarajućim IC_{50} vrednostima primenom ATR-FTIR metode.
- b) kvantitativna procena strukturnih promena izazvanih od strane nespecifičnih protein-ligand interakcija analizom raspodele sekundarnih struktura ovalbumina ATR-FTIR metodom.
- c) ispitivanje destabilizacije i potencijalne agregacije izazvane interakcijama analiziranih organometalnih kompleksa ANS esejom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Reagensi i rastvori

Za rad su primenjeni sledeći rastvori i reagensi: ovalbumin iz kokošijeg jajeta, albumin goveđeg seruma (engl. Bovine Serum Albumin, BSA), ThT i ANS probe, Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250), Coomassie brilliant blue R-250 (CBB R-250), dimetilsulfoksid (DMSO), proteinski markeri od proizvođača Thermo Scientific (Rokford, SAD). Preostale hemikalije su analitičke čistoće, dobijene komercijalno, i nisu dodatno prečišćene.

4.2. Izolovanje ovalbumina

Za izolovanje ovalbumina iz kokošijih jaja precipitacionim metodama, korišćeni su sledeći materijali:

- belanca kokošijih jaja,
- zasićeni rastvor amonijum-sulfata $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- miliQ voda,
- 2 M sirćetna kiselina.

Belanca is kokošijih jaja su prvobitno odvojena od žumanaca. Belance je mešano 20 minuta staklenim štapićem i zatim procedeno kroz troslojnu gazu. Dobijena zapremina je odmerena u menzuri, i potom preneti u veću posudu. Na ledu, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, postepeno je ukapavana jednaka zapremina zasićenog rastvora amonijum-sulfata. Pri dostignuću 50%-og zasićenja amonijum-sulfata, globulini u rastvoru su počeli da se talože. Nakon 60 minuta mešanja na magnetnoj mešalici, na ledu, precipitat globulina je odvojen centrifugiranjem 30 minuta na 5000 x g. Ovalbumin je naknadno precipitiran iz dobijenog supernatanta podešavanjem pH vrednosti do izoelektrične tačke proteina (pI = 4,6). Ovo je postignuto postepenim dodavanjem 2 M sirćetne kiseline u supernatant, uz konstantno mešanje, na ledu. Nakon postizanja pI vrednosti, rastvor je konstantno mešan 45 minuta na ledu. Ovalbumin je izdvojen centrifugiranjem 30 minuta na 5000 x g, a supernatant je odbačen. Dobijeni talog ovalbumina je resuspendovan u minimalnoj zapremini MiliQ vode. Radi efikasnijeg prečišćavanja ovalbumina, ponovljena je precipitacija na pI vrednosti, uz ponovni dodatak jednake zapremine zasićenog rastvora amonijum-sulfata. Dobijeni talog ovalbumina je ponovo centrifugiran 30 minuta na 5000 x g i zatim resuspendovan u minimalnoj zapremini MiliQ vode, a dobijeni supernatant je odbačen. Radi odstranjivanja viška amonijum-sulfata, dobijeni rastvor ovalbumina je dijalizovan tri puta po 6 h naspram MiliQ vode (100 puta veće zapremine) u crevima za dijalizu od acetata celuloze na +8°C (Sigma Aldrich, sa dijametrom od 5 cm, cut-off 14 kDa). Dobijeni rastvor ovalbumina je čuvan na -20°C.

Koncentracija rastvora ovalbumina je određena primenom Bredfordovog eseja, nakon čega su rastvori, po potrebi, diluirani.

4.3. Priprema uzoraka ovalbumina

4.3.1. Podešavanje pH vrednosti ovalbumina

Pre destabilizacije, u zavisnosti od analitičkih potreba, odvojeni rastvori prečišćenog ovalbumina su preneti u različita creva za dijalizu i dijalizovani ili naspram 0,01 M rastvora HCl (pH 2,0), ili 100 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 (100 puta veće zapremine), uz konstantno mešanje na +8°C. Dijaliza je trajala okvirno 16 h u oba slučaja, sa jednom izmenom 0,01 M rastvora HCl (pH 2,0) nakon 4 h, i dve izmene 100 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 nakon 4 i 14 h.

4.3.2. Adicija teških metala u kisele rastvore ovalbumina

Nakon dijalize naspram 0,01 M HCl pH, izdvojen je alikvot ovalbumina i neutralisan dodatkom 500 mM Tris-HCl pufera pH 7,4. Potom je ponovo određena koncentracija ovalbumina u datom alikvotu i primećeno da nije došlo do neželjenog razblaženja ovalbumina tokom dijalize.

Kiseli rastvor ovalbumina je potom razblažen do koncentracije od 10 mg/mL dodatkom 0,01 M rastvora HCl. Ovaj razblaženi rastvor ovalbumina je razdvojen u alikvote od 0,5 mL, nakon čega su ponovo razblaženi 0,01 M rastvorom HCl do 0,9 mL. Dobijeni rastvori su zatim pomešani sa 0,1 mL 10-puta koncentrovanim rastvorima soli teških metala. Korišćeni su rastvori olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata sa koncentracijama od 50, 250, i 500 mg/L, kao i kombinovani rastvor koji sadrži jednake koncentracije obe soli metala (25+25, 125+125, i 250+250 mg/mL).

Finalna koncentracija ovalbumina u rastvoru je bila 5,0 mg/mL (~100 µM), dok su finalne koncentracije teških metala, pojedinačno ili kombinovano, bile 5, 25, i 50 mg/L, što odgovara molarnim koncentracijama 20-200 µM u slučaju jona olova, 15-150 µM u slučaju jona kadmijuma, i 17,5-175 µM u slučaju rastvora kombinovanih jona metala.

4.3.3. Inkubiranje ovalbumina u različitim koncentracijama dimetilsulfoksida

U rastvore ovalbumina koncentracije 5,0 mg/mL, bez dodatih jona metala i liganada, su dodate različite količine DMSO, tako da su krajnje koncentracije DMSO bile 1, 2, i 4% (V/V). Pripremljeni rastvori su naknadno inkubirani 24h na sobnoj temperaturi.

4.3.4. Adicija kompleksa metala

Rastvori ovalbumina koji su dobijeni dijalizom naspram 0,01 M HCl i 100 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 su dodatno razblaženi do koncentracija od 10 mg/mL. Izdvojeni su alikvoti ovih rastvora od 0,5 mL i dodatno razblaženi do 0,9 mL sa odgovarajućim rastvorima. Čvrsti kompleksi metala su prvobitno rastvoreni u DMSO, zatim dodatno razblaženi sa 0,01 M HCl, ili 100 mM Tris-HCl puferom pH 7,4.

U 0,9 mL odgovarajućih rastvora ovalbumina su dodate zapremine od 0,1 mL različitih kompleksa metala sa različitim koncentracijama istih, tako da je finalna koncentracija DMSO u svim rastvorima 1%. Korišćena su tri različita kompleksa paladijuma, i dva kompleksa kadmijuma.

Finalna koncentracija ovalbumina u svim rastvorima je bila okvirno 100 μ M, dok su finalne koncentracije oba kompleksa kadmijuma varirale: 7,5 μ M, 37,5 μ M, 50 μ M, i 75 μ M. Takođe, ovalbumin je odvojeno pomešan sa tri kompleksa paladijuma u ekvimolarnim koncentracijama: kompleksa A – 50 μ M, kompleksa B – 100 μ M, kompleksa C – 50 i 100 μ M.

4.3.5. Termalna destabilizacija ovalbumina

Mikrotube od 1,5 mL koje su sadržale alikvote od 1 mL uzoraka ovalbumina ($\sim$ 100 μ M) sa različitim koncentracijama teških metala, olova i kadmijuma (15-200 μ M), kao i mikrotube koje su sadržale alikvote od 1 mL ovalbumina sa različitim koncentracijama kompleksa kadmijuma (7,5-75 μ M), su čvrsto prekrivene parafilmom i kontinualno inkubirane na 90 °C, u BioSan CH-100 termobloku (Riga, Letonija). Pripremljeni su alikvoti za inkubaciju od 24, 48, i 72 h, kao i alikvoti koji su inkubirani na sobnoj temperaturi.

Takođe, pripremljene su mikrotube od 1,5 mL sa alikvotima od 1 mL uzoraka ovalbumina ($\sim$ 100 μ M) i različitim koncentracijama tri različita organometalna kompleksa paladijuma (50-100 μ M), koje su takođe inkubirane na sobnoj temperaturi.

Pre analize uzoraka, alikvoti izdvojeni nakon termalne destabilizacije su prvobitno ohlađeni do sobne temperature i vorteksovani.

4.4. Analitičke metode za karakterizaciju uzoraka

4.4.1. Bredfordova metoda

Za određivanje koncentracije dobijenih uzoraka ovalbumina je korišćena Bredfordova metoda²⁰⁶. Za konstrukciju standardne prave su korišćeni standardni rastvori BSA.

Prvobitno je pripremljen petostruko koncentrovani, osnovni rastvor boje, tj. Bredfordov reagens (0,125% (m/V) CBB G-250, 19% (V/V) etanol, 42,5% fosforna kiselina). CBB G-250 je rastvoren u etanolu uz konstantno mešanje, nakon čega je dodata dejonizovana voda i koncentrovana fosforna kiselina do odgovarajuće zapremine. Pripremljen koncentrovani rastvor je prvobitno filtriran kroz standardni filter papir 3 puta. Iz ovog rastvora je uzeta neophodna zapremina i razblažena pet puta dejonizovanom vodom. Dobijeni rastvor je naknadno filtriran još jednom kroz standardni filter papir i korišćen kao radni rastvor.

Za pripremu standardnih rastvora BSA, prvobitno je 2 mg liofilizovanog BSA resuspendovano u 2 mL MilliQ vode. Od ovog rastvora (1 mg/mL) su pripremljena serijska razblaženja BSA koja su korišćena za konstrukciju standardne prave u opsegu 0,1–1,0 mg/mL. Za konstrukciju standardne prave, kao i za određivanje koncentracija ovalbumina u uzorcima, u mikrotitar pločama su pomešane zapremina uzoraka od 5 μ L sa 200 μ L Bredfordovog reagensa. Nakon perioda inkubiranja od 5 minuta, odmerena je apsorbancija na talasnoj dužini od 620 nm primenom uređaja LKB Micro-plate Reader 5060-006 (GDV, Rim, Italija). Kao slepa proba je korišćena MilliQ voda, i svako merenje je urađeno u triplikatu.

Pri određivanju koncentracije ovalbumina, bilo je neophodno prvobitno višestruko razblaživanje uzoraka kako bi dobijene vrednosti apsorbanci bile u opsegu konstruisane standardne prave.

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

Elektroforeze su izvedene na sistemu "Hoefer mighty small SE 245" (Hoefer, Holiston, SAD), primenom originalne Lemlijeve procedure²⁰⁷.

Za pripremu gelova za elektroforezu, uzoraka, kao i za izvođenje SDS PAGE, primenjeni su sledeći rastvori:

1. monomerni rastvor akrilamida (AA) i bisakrilamida (BAA) u odnosu 29:1, sa ukupnom koncentracijom od 30%, od kojih bisakrilamid čini 2,7% ukupne mase rastvora,
2. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 – pufer za gel za razdvajanje,
3. 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 – pufer za gel za koncentrovanje,
4. 10% (m/V) SDS - detergent,
5. 10% (m/V) amonijum-persulfat (APS) – inicijator polimerizacije,
6. tetrametil-etilendiamin (TEMED) – katalizator polimerizacije,
7. n-butanol zasićen vodom – rastvor za nadslojavanje gela za razdvajanje,
8. 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% (V/V) glicerol, 10% (m/V) SDS, 0,1% (m/V) brom fenol plavo, 25% (V/V) β-merkaptioetanol – koncentrovani redukujući pufer za pripremu uzoraka (5x),
9. 0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,1% SDS, 0,192 M glicin – radni pufer za elektroforezu,
10. 50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina – rastvor za fiksiranje,
11. 50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina, 0,25% (m/V) CBB R-250 – rastvor za bojenje,
12. 7% (V/V) sirćetna kiselina – rastvor za obezbojavanje gelova.

Pripremljeni su i primenjeni gelovi za razdvajanje sa krajnjim procentom akrilamida od 10% kao i gelovi za koncentrovanje sa krajnjim procentom akrilamida od 4%, na osnovu podataka koji su prikazani u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. – Sastav poliakrilamidnih gelova korišćenih u SDS PAGE metodi.

Komponente	Gel za razdvajanje (10%)	Gel za koncentrovanje (4%)
AA:BAA (30%, 29:1)	4,8 mL	0,8 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,5 mL
H ₂ O	4 mL	3,6 mL
TEMED	6 µL	3 µL
SDS (10%)	120 µL	60 µL
APS (10%)	60 µL	30 µL
Finalna Zapremina	11,986 mL	5,993 mL

Gelovi su pripremljeni tako što su prvobitno ne-polimerizovani gelovi za razdvajanje, odmah nakon dodatka rastvora APS-a i TEMED-a i vorteksovanja, naneti između fiksiranih staklenih ploča za elektroforezu. Korišćene su staklene ploče sa razdvajачkim staklom (engl. Spacer glass) debljine 0,75 mm. Nakon dodatka, gelovi za razdvajanje su nadslojeni rastvorom n-butanola koji je zasićen vodom. Nakon perioda polimerizacije od okvirno 30 minuta, n-butanol je dekantovan, i prostor iznad gela je ispran 3 puta dejonizovanom vodom. Višak preostale dejonizovane vode je naknadno odvojen kapilarno filter papirom.

Preko polimerizovanog gela za razdvajanje je nanet ne-polimerizovani gel za koncentrovanje nakon dodatka APS-a, TEMED-a, i vorteksovanja. U gel za koncentrovanje je potom uronjen “češalj” za formiranje bunara za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije od 30 minuta, češljevi su odvojeni, i bunari su isprani dejonizovanom vodom.

Staklene ploče sa polimerizovanim gelovima su prenete u nosač za ploče, koji je potom prebačen u kadu za elektroforezu. I kada i unutrašnja komora nosača su napunjeni puferom za elektroforezu do odgovarajuće zapremine.

Uzorci su pripremljeni prvobitnim mešanjem istih sa 5x koncentrovanim redukujućim puferom za uzorke u zapreminskom odnosu 4:1. Pripremljeni rastvori uzoraka su zatim inkubirani 5 minuta u BioSan termobloku na 95 °C. Zapremine uzoraka nanetih u bunare su varirale, 5-20 µL, u zavisnosti od prethodno-određenih koncentracija proteina. Svi uzorci su naneti mikrošpicem.

Elektroforeza je izvedena pri konstantnom naponu. Početni napon je bio 80 V, sve do ulaska uzoraka u donji gel za razdvajanje, pri čemu je konstantan napon povećan na 120 V. Postepeno, do kraja elektroforeze, napon je povećan do 200 V. Pri završetku, staklene ploče su preuzete iz komore, a pufer za elektroforezu je recikliran. Ploče su razdvojene, a gel je ispran dejonizovanom vodom i prenet u posudu od polimera.

Nakon što su gelovi prebačeni u odgovarajuće posude, prvobitno su isprani 3 puta dejonizovanom vodom. Potom je dejonizovana voda dekantovana, i proteini su fiksirani na gelu dodatkom rastvora za fiksiranje. Nakon 15 minuta fiksiranja, rastvor je dekantovan i u posudu je dodat rastvor za bojenje. Gelovi su inkubirani na sobnoj temperaturi, uz mešanje, u periodu od 15 minuta, nakon čega je rastvor za bojenje recikliran. Gelovi su još jednom isprani rastvorom za fiksiranje, nakon čega je u posudu prenet rastvor za obezbojavanje gelova.

4.4.3. Spektrofluorimetrijske metode

Prisustvo hidrofobnih regiona na površini proteina, kao i formiranje amiloidnih β -pločica je prvobitno praćeno primenom fluorescentnih boja, ANS i ThT. Merenja su izvedena na "FluoroMax-4 Jobin Yvon" spektrofluorimetru u kvarčnoj kivetu za spektrofluorimetriju, ili na "Tecan Infinite m200 PRO" spektrofluorimetru u Eppendorf mikrotitar pločama sa 96 bunara. Sva merenja su izvedena u triplikatu na sobnoj temperaturi.

Analizirani su ne-inkubirani i inkubirani (24-72 h) uzorci ovalbumina, sa ili bez odgovarajućih jona teških metala ili njihovih organometalnih kompleksa u rastvoru. Uzorci ovalbumina su, pre merenja, prvobitno razblaženi 100 puta dejonizovanom vodom.

4.4.3.1. *ThT - Spektrofluorimetrija*

Rastvor fluorescentne boje je prvobitno pripremljen rastvaranjem čvrstog ThT-a u 100 mM Tris-HCl puferu pH 8,5, pri čemu je finalna koncentracija boje bila 8 mM. Razblaženi uzorci ovalbumina su zatim korišćeni za pripremu rastvora za merenje fluorescencije.

Za merenja u kvarčnoj kivetu, korišćene su zapremine: 200 μ L rastvora ovalbumina, 200 μ L razblaženih rastvora ThT-a, i 1800 μ L 100 mM Tris-HCl pufera pH 8,5.

Za merenja u mikrotitar ploči sa 96 bunara, korišćene su zapremine: 20 μ L razblaženih rastvora ovalbumina, 20 μ L ThT-a, i 180 μ L 100 mM Tris-HCl pufera pH 8,5.

Za ekscitaciju je korišćena talasna dužina od 450 nm, dok je karakteristična emisija ThT-a praćena na 482 nm.

4.4.3.2. *ANS - Spektrofluorimetrija*

Pripremljena su dva rastvora ANS-a. U jednom je čvrsti ANS rastvoren u 0,01 M HCl do koncentracije od 8 mM, dok je u drugom čvrsti ANS rastvoren u 100 mM Tris-HCl puferom pH 7,4 do koncentracije od 8 mM.

Za merenja u kvarčnoj kivetu, korišćene su zapremine: 100 μ L razblaženih rastvora ovalbumina, 200 μ L rastvora ANS-a u 100 mM Tris-HCl puferu pH 7,4, i 1900 μ L 100 mM Tris-HCl pufera pH 7,4.

Za merenja u mikrotitar ploči sa 96 bunara, korišćene su zapremine: 10 μ L razblaženih rastvora ovalbumina, 20 μ L ANS-a u 0,01 M HCl, i 190 μ L rastvora 0,01 M HCl.

Za ekscitaciju je korišćena talasna dužina od 390 nm, dok je emisija ANS-a praćena na 440 nm.

4.4.4. ATR-FTIR spektroskopija

4.4.4.1. Priprema uzoraka i snimanje spektara

Uzorci ovalbumina, sa ili bez dodatih jona teških metala (olovo, kadmijum, kombinacija oba metala) u 0,01 M HCl, ili u rastvorima sa koncentracijama DMSO od 1 do 4%, ili u prisustvu različitih organometalnih kompleksa paladijuma u 100 mM Tris-HCl puferu pH 7,4 sa 1% DMSO, su analizirani korišćenjem “Thermo Fisher Scientific Nicolet Summit FTIR” spektrometrom u režimu prigušene totalne refleksije (engl. Attenuated total reflectance, ATR).

Analizirani su uzorci ovalbumina sa jonima metala pre i nakon perioda termalne destabilizacije od 72 h, kao i analizirani su uzorci čistog ovalbumina sa rastućim koncentracijom DMSO u rastvoru, od 0% do 4%.

Alikvoti uzoraka od 1 μ L su naneti na dijamantski kristal (Smart Orbit, Thermo Scientific, Valtam, SAD), i postepeno upareni blagim protokom argona. Nakon ovoga, spektri u srednjem IR regionu ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) su sakupljeni u 32 skena primenom deuterijum triglicin-sulfatnog (DTGS) kalijum-bromid (KBr) detektora, sa rezolucijom od 2 cm^{-2} . Dobijeni spektri apsorbanci su automatski korigovani naspram pozadinske apsorpcije (vazduh ili primenjeni rastvarači, sa ili bez odgovarajućih dodatih jona metala i organometalnih kompleksa).

4.4.4.2. Kvalitativna analiza infracrvenih spektara

Svi dobijeni FTIR spektri su identično obrađeni: prvobitno su izvedene korekcije za FTIR – automatska ATR korekcija za dijamantski kristal, automatska korekcija bazne linije, kao i naknadna spektralna analiza. Sve korekcije su izvedene primenom OMNIC32 softvera (v7.0, Thermo Scientific, SAD).

Za praćenje promena sekundarnih struktura ovalbumina, analizirani su Amidni I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) i Amidni II ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) regioni infracrvenih spektara. Radi preciznijeg određivanja pikova u infracrvenim spektrima, kao i adekvatnijem dodeljivanju sekundarnih struktura odgovarajućim pikovima, korišćen je drugi izvod dobijenih spektara u Amidnom I regionu. Precizniji pikovi spektara su određeni pomoću Savicki-Golej drugog izvoda u sedam tačaka trećeg polinomskog reda. Na osnovu prethodnih literaturnih podataka, kao i pozicija najizraženijih pikova, dodeljene su sekundarne strukture odgovarajućim trakama u Amidnom I regionu.

4.4.4.3. Kvantitativna analiza sklonosti formiranja amiloidogenih β -pločica

Radi normalizacije vrednosti promena u intenzitetima apsorbaneci u okviru Amidnog I regiona između različitih uzoraka, vrednosti apsorbaneci specifičnog pika u Amidnom II su korišćene kao interni spektralni standard.

Konkretno, korišćen je odnos zbira intenziteta između različitih pikova u Amidnom I regionu (zbir intenziteta pikova u okviru ~ 1628 - 1625 cm^{-1} i intenziteta pika na $\sim 1695\text{ cm}^{-1}$) i specifičnog pika u Amidnom II regionu (1540 cm^{-1}).

Kako se pozicija ove karakteristične trake u Amidnom II regionu ne menja pri denaturaciji i agregaciji proteina, omogućena je kvantitativna analiza tendencije nastanka amiloidogenih sekundarnih struktura između različitih uzoraka ovalbumina.

4.4.5. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Za morfološku analizu amiloidnih agregata, primenjena je AFM metoda. Mikroskopija je izvedena u tapkajućem režimu primenom "NanoScope" (Veeco Digital Instruments, SAD) uređaja, na sobnoj temperaturi i na vazduhu. Urezane silikonske sonde sa konstantom opruge od 20 do 80 Nm^{-1} su korišćene. Obrada i analiza dobijenih snimaka je urađena primenom "Nanoscope" softvera.

Pre pripreme i nanošenja uzoraka na atomski-ravan liskun supstrat, isti supstrat je prvobitno raslojen lepljivom trakom u cilju dobijanja čiste atomski-ravne površine. Naknadno su alikvoti ovalbumina razblaženi 500x u dejonizovanoj vodi. Razblaženi uzorci su potom naneti na Mica supstratnu pločicu u zapremini od 10 μL i osušeni na vazduhu.

Snimljene su standardne dvo-dimenzionalne (2D) slike uzoraka ovalbumina, sa i bez jona teških metala. Odabrana je perspektiva pod uglom od 90° , a visina je prikazana obojenim grafikonom.

4.4.6. Dinamičko rasejavanje svetlosti (DLS)

Radi određivanja veličina agregata ovalbumina, u i bez prisustva jona teških metala, korišćena je metoda dinamičkog rasejavanja svetlosti.

Uzorci ovalbumina su prvobitno razblaženi 20x sa 100 mM Tris-HCl puferom pH 8,5. Veličine i distribucije zeta potencijala agregata ovalbumina su merene na „Malvern Nano-ZS Zetasizer” (Malvern, UK) uređaju, u kivetama od 2 mL, na sobnoj temperaturi. Sve merenja su izvedena u triplikatima.

4.4.7. Teorijska analiza potencijalnih vezujućih mesta za jone olova i kadmijuma

Kristalna struktura ovalbumina je preuzeta iz proteinske baze podataka sajta za istraživačku saradnju za strukturnu bioinformatiku (engl. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics protein database (RCSB PDB)). Mali molekuli, kao i molekuli vode, su prvobitno odstranjeni primenom PyMol softvera.

Dobijena struktura je zatim analizirana domaćim programom koji je konstruisan u pitonu (engl. Python). Pomoću ovog programa su određene pozicije vezivnih mesta za jone kadmijuma i olova koji su u relativno bliske u okviru strukture agregirajućih molekula ovalbumina.

Histidini sadrže atom azota u bočnom ostatku koji funkcioniše kao potencijalni donor elektrona u formiranju kovalentno-koordinativnih hemijskih veza pri neutralnim pH vrednostima. Usled ovoga, histidini su isključeni iz analize zbog protonovanja pri niskim pH vrednostima i njihove naknadne nemogućnosti vezivanja jona teških metala u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

4.5. *In-silico* predviđanje karakteristika organometalnih kompleksa Pd(II)

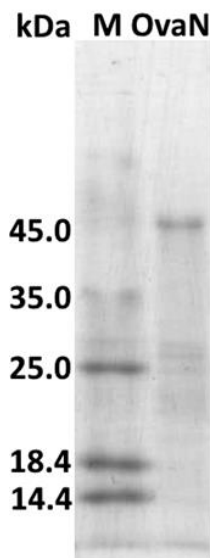
Fizičko-hemijske osobine, lipofilnost, rastvorljivost u vodi, farmakokinetika, kao i medicinsko-hemijski parametri su određeni primenom besplatnog SwissADME programa koji je dostupan na sajtu Švajcarskog instituta za bioinformatiku (<http://www.swissadme.ch/>)²⁰⁸. Strukture kompleksa koje su dobijene difrakcijom X-zraka su konvertovane u Sybyl Mol2 format primenom Mercury 2022.1.0 programa²⁰⁹, dok su SMILES formati kompleksa konstruisani korišćenjem programa Open Babel Package v3.1.1²¹⁰.

5. REZULTATI

5.1. Izolovanje ovalbuminskih uzoraka

Ovalbumin koji je primenjen za analizu konformacionih prelaza je prvobitno izolovan iz belanceta kokošijih jaja prethodno-opisanim precipitacionim metodama ²¹¹. Kako je ovalbumin najzastupljeniji protein u belancetu, moguća je njegova pravolinijska ekstrakcija kombinacijom taloženja dodatkom amonijum-sulfata i naknadnim podešavanjem pH vrednosti rastvora do pI vrednosti ovalbumina. Nakon prvobitnog taloženja ovoglobulina iz ekstrakta belanceta pri 50% zasićenju amonijum-sulfata, postizanjem pI vrednosti ovalbumina se izaziva nativna precipitacija ovalbumina. Precipitacija ovalbumina je izvedena dva puta radi povećavanja čistoće, nakon čega su precipitati ovalbumina resuspendovani i naknadno dijalizovani naspram vode radi uklanjanja soli čije prisustvo bi povećalo rizik od gelacije proteina.

Čistoća dobijenog izolata je praćena SDS-PAGE metodom [Slika 5.1], dok je koncentracija ovalbumina određena na osnovu standardne prave konstruisane za Bredfordov esej [Prilog 1],



Slika 5.1 – Elektroforegram dobijen nakon prečišćavanja ovalbumina: M – molekulski markeri, OvaN – Izolat ovalbumina.

Dobijeni elektroforegram prikazuje prisustvo dominantne trake u razblaženom izolatu ovalbumina, na poziciji od 45 kDa, što odgovara molarnoj masi ovalbumina. Određena koncentracija ovalbumina u izolatima dobijenih ovom metodom ²¹¹ je, pre razblaženja, bila iznad 30 mg/mL, sa prinosom od okvirno 100 mg proteina iz jednog jajeta i čistoćom od iznad 80%.

5.2. Karakterizacija konformacionih prelaza ovalbumina

Radi ekstenzivnije analize konformacionih prelaza izazvanih dejstvom različitih faktora, uzorci ovalbumina koncentracije 5 mg/mL su inkubirani pod različitim uslovima.

Uticaj jona teških metala, Pb(II) i Cd(II), pri fibrilaciji ovalbumina je analiziran nakon inkubacionog perioda od 72 h, pri konstantnoj temperaturi od 90 °C, pH 2,0.

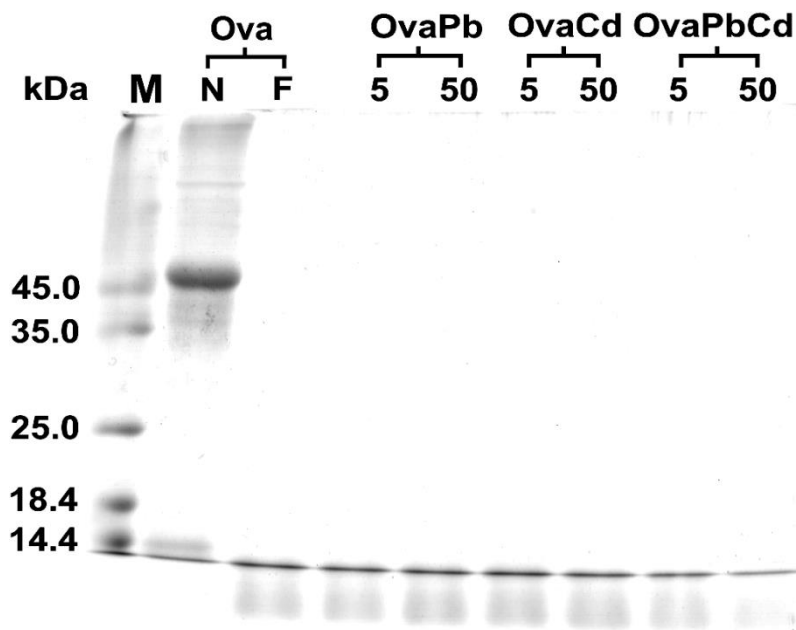
Uticaj organometalnih kompleksa Cd(II) i Pd(II) kao liganada na konformacione prelaze ovalbumina je okarakterisan nakon inkubacionog perioda od 24h na sobnoj temperaturi, u 0,1 M Tris puferu pH 7,4 u 1% (V/V) DMSO.

5.2.1. Analiza uticaja slobodnih jona Pb(II) i Cd(II) na ovalbumin

5.2.1.1. *Fragmentacija ovalbumina pri fibrilišućim uslovima u prisustvu jona teških metala*

Nakon dijalize uzoraka ovalbumina naspram vode, ovalbumin je ponovo dijalizovan naspram 0,01 M rastvora HCl (pH 2,0). Dobijeni rastvori ovalbumina su razblaženi do koncentracije 5,0 mg/mL, i pomešani sa odgovarajućim rastvorima teških metala do krajnjih koncentracija jona metala od 5 do 50 mg/L.

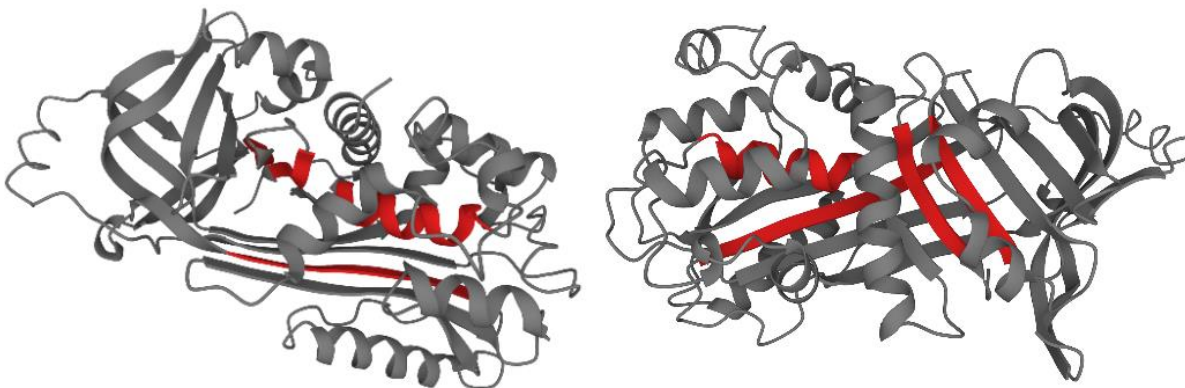
Uzorci ovalbumina sa i bez dodatnih jona metala su naknadno destabilizovani inkubacijom na 90 °C tokom 72 h i potom analizirani SDS-PAGE metodom. Dobijeni elektroforegram uzoraka ovalbumina [Slika 5.2.] prikazuje da dominantna traka monomernog ovalbumina u nativnom uzorku (~45 kDa) u potpunosti nestaje nakon perioda inkubiranja, bez obzira na prisustvo jona teških metala. Istovremeno, može se uočiti pojava traka niskih molarnih masa od 3 do 10 kDa u svim inkubiranim uzorcima.



Slika 5.2. – Elektroforegram uzoraka ovalbumina: Ova – uzorci ovalbumina bez prisutnih jona teških metala (N – nativni ovalbumin; F – ovalbumin nakon termalne degradacije na 90 °C, pH 2,0); OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; OvaPbCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5 i 25 mg/mL (ukupno 5 i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata; M – molekularni markeri.

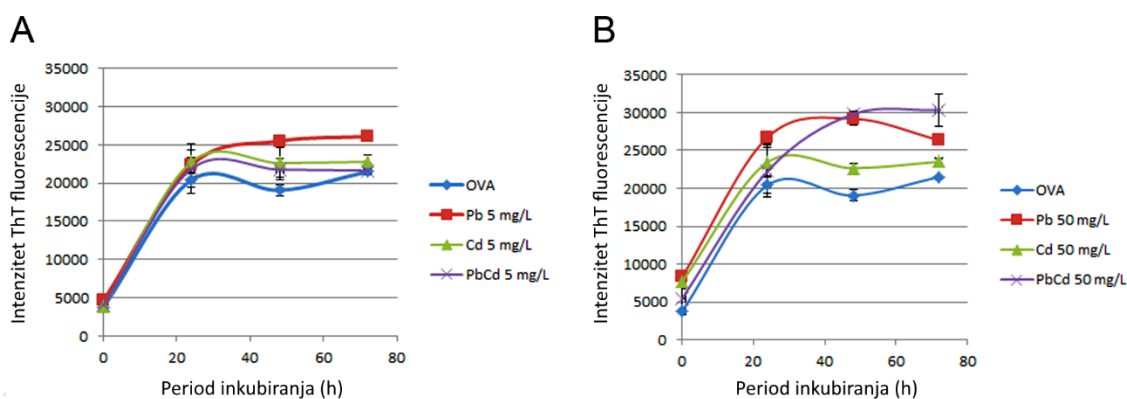
Pojava pomenutih nisko-molekulskih traka je česta pri amiloidnoj agregaciji ovalbumina^{113,211}. Pod odgovarajućim uslovima, dolazi do hidrolize peptidne veze i degradacije ovalbumina. Prethodno je prijavljeno da je ovalbumin karakterističan po izvesnom broju amiloidogenih peptida koji su prisutni u njegovoj sekvenci [Slika 5.3.], od kojih je najizraženija sekvenca “SQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKD”¹¹³. Fragmentacija izazvana niskim pH vrednostima i visokim temperaturama izaziva oslobađanje amiloidogenih peptida iz sekvence ovalbumina, koji su poprilično podležni samo-agregaciji i naknadnom formiranju amiloidnog nukleusa. Kao rezultat, glomazni agregati ovalbumina nisu vidljivi u datom elektroforegramu, dok vidljive trake ispod 10 kDa predstavljaju preostale, ne-agregirane fragmente ovalbumina na čije formiranje nije primetno uticalo prisustvo jona teških metala [Slika 5.2.].

Amiloidna agregacija koja nastaje kao rezultat prvobitne fragmentacije proteina nije pojava koja je specifična za ovalbumin. Primećeno je da u slučajevima drugih proteina, poput β -laktoglobulina, dolazi do značajne fibrilacije nakon dugotrajne termalne degradacije proteina²¹².



Slika 5.3. – Trodimenzionalni prikaz dve perspektive molekula ovalbumina (PDB Kod: 1OVA), sa označenim amiloidogenim sekvencama (crvena boja)

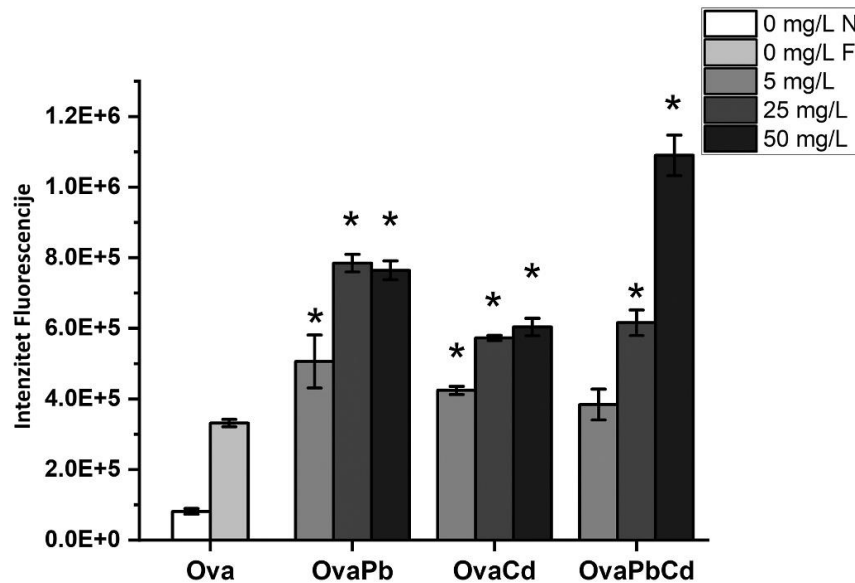
Kinetika formiranja amiloidnih fibrila ovalbumina je praćena Th T fluorescencijom [Slika 5.4.]. Može se uočiti karakterističan nedostatak lag faze koja je česta pojava tokom formiranja amiloidnih fibrila. Međutim, ova pojava nije neuobičajena u slučaju amiloidne agregacije ovalbumina. Pretpostavlja se da amiloidogeni peptidi koji su oslobođeni fragmentacijom ovalbumina drastično pospešuju brzo formiranje amiloidnog nukleusa, ukazujući na to da je, pod datim uslovima, neophodno samo nekoliko časova za formiranje zrelih amiloidnih fibrila^{211,213}.



Slika 5.4. – Kinetika ThT fluorescencije uzoraka ovalbumina koji su inkubirani 0-72 h, na 90 °C, pH 2,0, sa i bez dodatih jona teških metala različitih koncentracija (A – 5 mg/L, B – 50 mg/L); OVA – Uzorak ovalbumina koji je inkubiran bez prisutnih jona metala; Pb 5-50 mg/L – uzorci ovalbumina inkubirani u prisustvu 5 ili 50 mg/L olovo(II)-nitrata; Cd 5-50 mg/L – uzorci ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu 5 ili 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; PbCd 5-50 mg/L uzorci ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu jednakih koncentracija oba jona metala (ukupno 5 i 50 mg/L).

Na osnovu dijagrama ThT fluorescencije se može uočiti da intenzitet fluorescencije, u slučajevima svih inkubiranih uzoraka, dostiže plato nakon 24-48 h inkubiranja pod datim uslovima, ukazujući na to da je proces amiloidne fibrilacije završen. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima iz literature gde je prikazano da se kompletna fibrilacija ovalbumina postiže već nakon 24 h inkubiranja pri povišenim temperaturama ^{211,213}.

Međutim, porasti u intenzitetu fluorescencije ThT-a nisu apsolutno specifični indikatori za prisustvo amiloidnih fibrila. Sam intenzitet ThT fluorescencije zavisi od svih prisutnih fibrilnih struktura u rastvoru od kojih, pored amiloidnih fibrila, primetan doprinos intenzitetu može biti rezultat prisustva drugih biomakromolekula, poput nukleinskih kiselina ¹⁹⁴. Usled ovoga, i kako je već dokazano da ovalbumin formira amiloidne fibrile nakon 24 h inkubiranja pod datim uslovima, odabran je inkubacioni period od 72 h radi omogućavanja precizne, kvantitativne analize vezivanja ThT-a za formirane amiloidne fibrile, pri svim ispitivanim koncentracijama jona teških metala [Slika 5.5.].



Slika 5.5. – Histogram intenziteta ThT fluorescencije uzoraka ovalbumina sa, i bez, prisutnih jona metala različitih koncentracija (5-50 mg/L); Ova – uzorci ovalbumina bez prisutnih jona teških metala (N – nativni ovalbumin; F – ovalbumin nakon termalne degradacije na 90 °C, pH 2,0); OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5, 25, i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5, 25, i 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; OvaPbCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5, 12,5, i 25 mg/mL (ukupno 5, 25, i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata; Period inkubacije uzoraka je 72 h; “*” – uzorci sa p vrednošću ispod 0,05.

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 5.4. i 5.5., može se primetiti da ovalbumin, pod datim uslovima, formira amiloidne fibrile i bez prisustva jona teških metala, što je u skladu sa podacima iz literature ^{113,211}. Može se, međutim, uočiti primetan skok u intenzitetu ThT fluorescencije u skoro svim uzorcima ovalbumina koji sadrže jone teških metala, ukazujući na to da prisustvo ispitivanih jona teških metala ima potencijalno pozitivan efekat na formiranje amiloidnih fibrila.

U slučaju uzoraka ovalbumina sa ukupnom koncentracijom pojedinačnih jona metala od 5 mg/mL, intenzitet fluorescencije pokazuje blagi, ali statistički značajan porast ($p < 0,05$), osim u uzorku ovalbumina koji sadrži jednake koncentracije oba jona teških metala ($p > 0,05$). Međutim, u uzorcima sa višim koncentracijama jona metala se može uočiti značajan skok u intenzitetu fluorescencije ThT-a, što je karakteristična pojava za sve uzorke ovalbumina koji su inkubirani sa višim koncentracijama metala, u odnosu na uzorak ovalbumina koji je inkubiran bez dodatih jona Pb(II) i Cd(II) ($p < 0,05$) [Slika 5.5.].

Dobijeni rezultati pokazuju da je krajnji stepen pozitivnog efekta pojedinačnih jona metala postignut već pri koncentraciji jona metala od 25 mg/L, i da nije došlo do značajnog porasta u intenzitetu ThT fluorescencije, odnosno fibrilacije ovalbumina, sa daljim povećanjem koncentracije jona teških metala. Ovo se može uočiti i u slučaju uzoraka ovalbumina sa pojedinačnim jonima Pb(II) i Cd(II), čije vrednosti intenziteta fluorescencije spadaju u opseg standardnih devijacija prethodećih uzoraka. Uzorak koji odstupa od ovog trenda je rastvor ovalbumina koji je inkubiran sa jednakim koncentracijama Pb(II) i Cd(II) jona od 25 mg/L (ukupno 50 mg/L). U slučaju opisanog uzorka se može uočiti drastičan skok u intenzitetu ThT fluorescencije, koji je skoro duplo veći u odnosu na porast intenziteta između uzoraka bez i uzoraka sa 50 mg/L pojedinačnih jona metala.

Na osnovu ovih rezultata se spekulise da se joni Pb(II) i joni Cd(II) vezuju za različite regione u okviru ovalbumina. Potencijalni razlog za postizanje platoa intenziteta ThT fluorescencije pri koncentraciji jona metala od 25 mg/L je rezultat zasićenja njihovih odgovarajućih, pojedinačnih vezivnih mesta¹⁹³. Nasuprot tome, u slučaju uzorka ovalbumina u kome su prisutna oba jona metala, omogućeno je vezivanje ukupno većeg broja jona metala za ovalbumin usled njihovih relativno-specifičnih, različitih vezivnih mesta. Kao rezultat, prisustvo viših koncentracija različitih jona metala ima singergistički, pozitivan efekat na formiranje amiloidnih fibrila.

Radi ispitivanja mogućnosti vezivanja jona teških metala za različita mesta u okviru ovalbumina, izvedena je analiza rasprostranjenosti amiloidogenih peptida u sekvenci ovalbumina, kao i teorijska analiza koordinativnih vezujućih mesta ispitivanih jona za ovalbumin.

5.2.1.2. Teorijsko određivanje vezivnih mesta Pb(II) i Cd(II) jona za ovalbumin

Na osnovu rezultata prijavljenih od strane Jesu Jaya Sudan & Sudandiradoss ²¹⁴, koji su dobijeni analizom 466 kristalografskih proteinskih struktura sa vezanim jonima kadmijuma primenom difrakcije X-zraka, primećeno je da se joni Cd(II) uglavnom vezuju za aminokiselinske ostatke glutamata i aspartata, uz slabije vezivanje za ostatke histidina i cisteina. Joni Cd(II) se koordinuju za parove aminokiselinskih ostataka koji funkcionišu kao donori elektrona, od kojih je primećeno da su najčešći parovi Asp-Asp, Asp-Glu, Glu-Glu, Asp-His, His-His, i Asp-His ²¹⁴. Kako su ovi donorski parovi prisutni u sekvenci ovalbumina [Slika 5.6.], mogu predstavljati adekvatna vezivna mesta za jone Cd(II) i amiloidnu propagaciju, naročito pri rearanžmanu fragmenata ovalbumina i inicijalnom formiranju amiloidnog nukleusa. Glavni izuzetak predstavljaju potencijalni parovi koji poseduju ostatke histidina, usled njihovog gubitka slobodnih elektronskih parova što je direktan rezultat protonacije pri niskim pH vrednostima.

Iako je pokazano da joni Pb(II) mogu da se potencijalno vezuju za ista mesta kao i joni Cd(II), njihov afinitet prema tim mestima je značajno niži i, pored toga, primećeno je da se joni Pb(II) preferencijalno vezuju za ostatke cisteina, pri čemu je koordinacioni broj (KB) jona Pb(II) tri (KB = 3). ^{215,216}. Vezivanje jona Pb(II) na ovaj način je moguća pojava u okviru ovalbumina usled prisustva šest cisteinskih ostataka u sekvenci proteina. Iako ovalbumin poseduje jednu disulfidnu vezu između Cys74 i Cys121 koja bi potencijalno ometala vezivanje jona Pb(II), sami ostaci cisteina koji učestvuju u formiranju ove veze su poprilično udaljeni u sekvenci od amiloidogenih peptida koji su opisani u literaturi [Slika 5.6.] ^{113,217}.

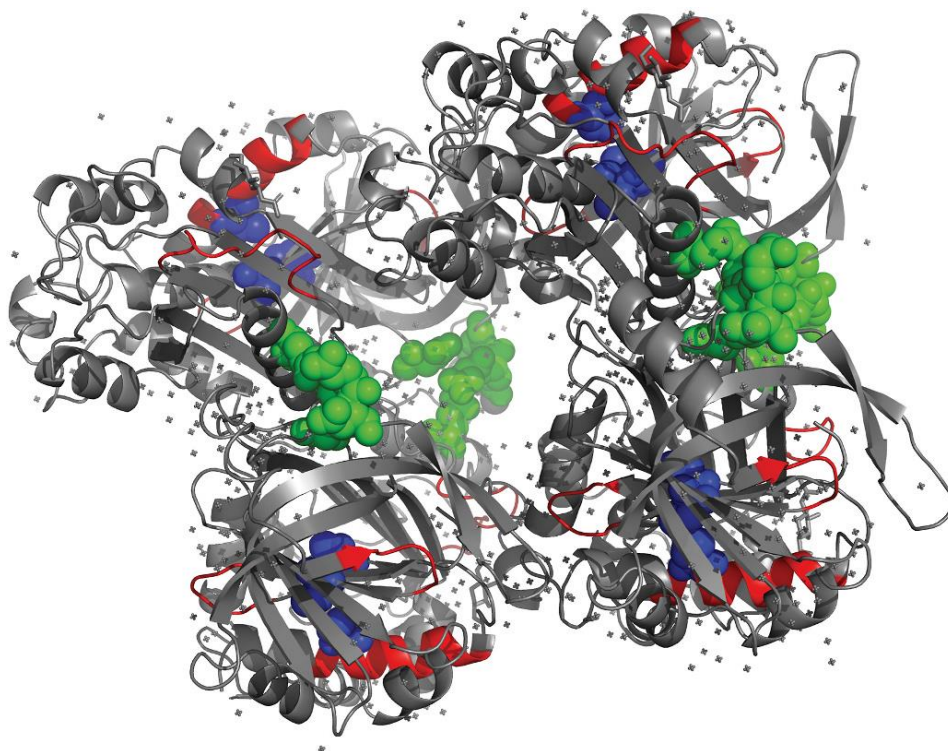
Tanaka i saradnici su prethodno odredili prisustvo četiri kratka, amiloidogena peptida u sekvenci ovalbumina ²¹⁷, dok su Lara i saradnici detektovali prisustvo dužeg amiloidogenog peptida koji obuhvata sekvencu jednog od amiloidogenih peptida opisanih od strane Tanake i ko-autora ^{113,217}. Kako ove opisane sekvence amiloidogenih peptida uveliko ne poseduju karakteristične parove aminokiselina koje funkcionišu kao elektronski donori, kao ni većinu cisteinskih ostataka u ovalbuminu, spekulise se da su vezivna mesta za jone Pb(II) i Cd(II) predominantno prisutna u neuređenim aminokiselinskim lancima koji ne učestvuju direktno u formiranju ponavljajućih sekvenci β -pločica tokom amiloidne agregacije.

GSIGAASMEF **C**FDVFKELKV HHANENIFY**C** P**IAIMSALAM** **V**YLGAKDSTR
TQINKVVRFD KLPFGGDSIE AQCGTSNVH SSLRDILNQI TKPNDVYSFS
LASRLYAEER YPILPEYLQC VKELYRGGLE PINFQTAADQ **A**RELINSWVE
SQTNGIIRNV LQPSSVDSQT **AMVLVNAIVE** **K**GLWEKAFK**D** **E**DTQAMPFRV
TEQESKPVQM MYQIGLFRVA SMASEKMKIL ELPFASGTMS MLVLLPDEVS
GLEQLESIIN FEKLTEWTSS NVMEERKIKV YLPRMKMEEK YNLTSVLMAM
GITDVFSSSA NLSGISSAES LKISQAVHAA HAEIN**E**AGRE VVGSAEAGVD
AASVSEEFRA DHP**F**LE**C**IKH IATNAV**L**FFG **R**CVSP

Slika 5.6. – Aminokiselinska sekvenca 1OVA sa označenim aminokiselinama koje su predviđene da učestvuju u vezivanju jona olova (plava boja) i kadmijuma (zelena boja), uključujući amiloidogene peptide koji su predviđeni od strane Tanake i ko-autora (slova crvena boje), kao i amiloidogenog peptida predviđenog od strane Lare i ko-autora (podvučene aminokiseline).

Usled ovoga, softverskom analizom su određena rastojanja koja su neophodna za adekvatnu koordinaciju jona Pb(II) i Cd(II) u okviru native forme ovalbumina, pre perioda termalne inkubacije. Rezultat analize je pokazao prisustvo tri atoma sumpora u ostacima Cys34, Cys54, i Cys373 koji su međusobno adekvatno udaljeni i predstavljaju validno mesto za koordinaciju jona Pb(II) uz formiranje tri veze ili potencijalno uz formiranje šest veza ($KB = 6$) kada su uključena dva molekula ovalbumina, što je takođe u skladu sa rezultatima opisanim u literaturi ^{215,216}. Sama rastojanja između atoma sumpora u ovim cisteinskim ostacima su 9,6, 6,6, i 11,0 Å, i omogućavaju adekvatno vezivanje jona Pb(II) čiji je dijametar okvirno 2,7 Å.

Joni Cd(II) preferencijalno formiraju koordinativne veze sa atomima kiseonika u okviru aminokiselinskih ostataka aspartata i glutamata. Kako atomi kiseonika poseduju slobodne elektronske parove, protonovanje samih bočnih ostataka aspartata i glutamata usled nižih pH vrednosti rastvora ne bi trebalo dramatično da utiče na samo vezivanje jona Cd(II). Na osnovu ovoga je softverskom analizom određeno prisustvo regiona sa bliskim atomima kiseonika u bočnim ostacima aminokiselina dva monomerna lanca ovalbumina, na pozicijama 200, 201, 202, i 342 za A lanac ovalbumina, kao i u bočnom ostatku aminokiseline u poziciji 155 u okviru B lanca ovalbumina (PDB kod: 1OVA). Rastojanja između svih pomenutih atoma kiseonika su manja od 6,0 Å, i omogućavaju validnu koordinaciju jona Cd(II) čiji je dijametar oko 2,3 Å [Slika 5.7.].



Slika 5.7. – Prikaz određenih vezivnih mesta jona teških metala u okviru trodimenzionalnih struktura većeg broja molekula ovalbumina (PDB Kod: 1OVA), sa Cys-Pb(II) vezivnim mestima (plava boja) i Asp/Glu-Cd(II) vezivnih mesta (zelena boja), uključujući amiloidogene sekvence u okviru ovalbumina (crvena boja).

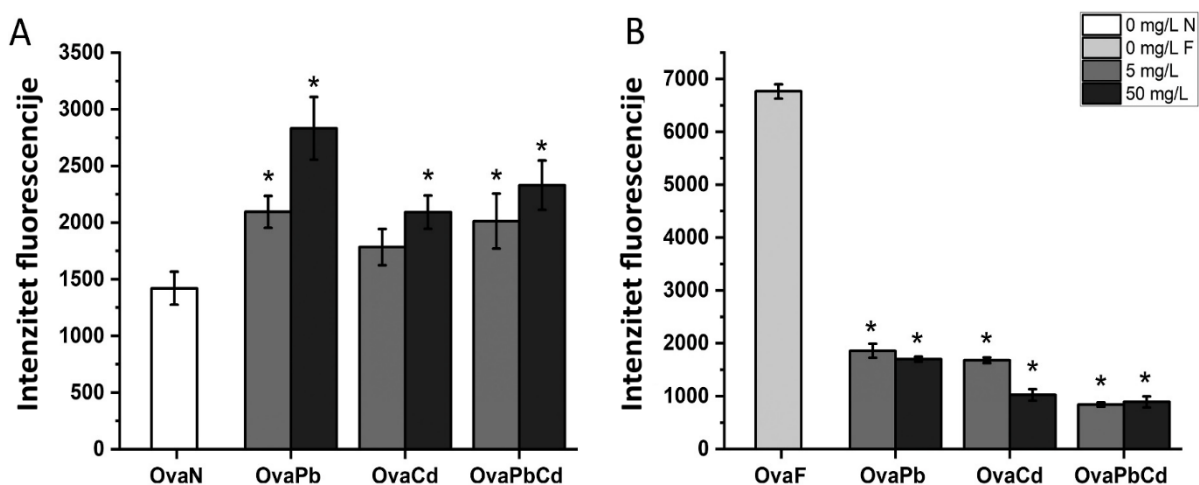
Pozicije vezivnih mesta jona Pb(II) i Cd(II), na osnovu prikazanih rezultata, se primetno razlikuju u okviru celokupne, trodimenzionalne strukture molekula ovalbumina. Vezivna mesta Pb(II) jona su bliža amiloidogenim peptidima, i nalaze se uveliko u hidrofobnim regionima ovalbumina. Ovo sugeriše da vezivanje jona Pb(II) za tri dodatna atoma sumpora iz susednog polipeptidnog lanca ovalbumina ($KB = 6$) dovodi do konformacionih promena usled destabilizacije native strukture ovalbumina i formiranja koordinativno-vezanih oligomera ovalbumina. Nasuprot tome, vezivna mesta za jone Cd(II) se predominantno nalaze u okviru izloženih, hidrofilnih regiona ovalbumina, što sugeriše potencijalnu koordinaciju ovalbumina bez istog stepena destabilizacije koji je izazvan vezivanjem jona Pb(II).

Radi diferencijacije različitih efekata vezivanja jona Pb(II) i Cd(II) za opisana vezivna mesta u okviru ovalbumina, kao i njihov konkretan uticaj na njegovu destabilizaciju, izvedena je analiza izloženosti hidrofobnih regiona pre i nakon perioda termalne inkubacije uzoraka ovalbumina u prisustvu pomenutih jona teških metala.

5.2.1.3. Analiza hidrofobnosti ovalbuminskih agregata ANS spektrofotometrijom

Stepen izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina, pre i nakon perioda termalne inkubacije, je praćen spektrofotometrijski, vezivanjem ANS za hidrofobne regione ovalbumina.

Na osnovu dobijenih rezultata, primećeno je da izloženost hidrofobnih regiona ovalbumina bez prisutnih jona teških metala, nakon inkubacionog perioda od 72 h na 90 °C, drastično raste [Slika 5.8.]. Skoro četvostruki porast u intenzitetu ANS fluorescencije u odnosu na neinkubirani uzorak ovalbumina bez jona teških metala je u skladu sa literaturnim podacima^{200,211}, ali je u direktnom kontrastu sa padom intenziteta ANS fluorescencije u slučajevima uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu jona teških metala [Slika 5.8B].



Slika 5.8. – Fluorescencija ANS probe nakon vezivanja za hidrofobne regione uzoraka ovalbumina pre (A) i posle (B) inkubacionog perioda od 72 h sa, i bez, dodatnih jona olova i kadmijuma različiti koncentracija (5-50 mg/L) u 0,01 M rastvoru HCl: Ova – uzorci ovalbumina bez prisutnih jona teških metala (N – nativni ovalbumin; F – ovalbumin nakon termalne degradacije na 90 °C, pH 2,0); OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L kadmijum(II)- nitrata; OvaPbCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5 i 25 mg/mL (ukupno 5 i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata; “*” – p vrednost < 0,05.

Pre inkubacionog perioda od 72 h na 90 °C, može se uočiti statistički značajan ($p < 0,05$) porast intenziteta ANS fluorescencije u uzorcima koji poseduju jone teških metala, u odnosu na uzorak nativnog ovalbumina koji ne sadrži jone teških metala [Slika 5.8A]. Ovo ukazuje na to da dolazi do destabilizacije native forme ovalbumina tokom koordinacije jona metala, što je neizmenjajuća pojava. Jedini, minoran izuzetak predstavlja uzorak ovalbumina koji sadrži 5 mg/L Cd(II) jona. Iako joni Cd(II) primetno destabilizuju strukturu ovalbumina tokom njihove inicijalne koordinacije, stepen narušavanja native strukture pri nižim koncentracijama ovih jona je blaži u odnosu na ostale uzorke ovalbumina pre perioda inkubiranja.

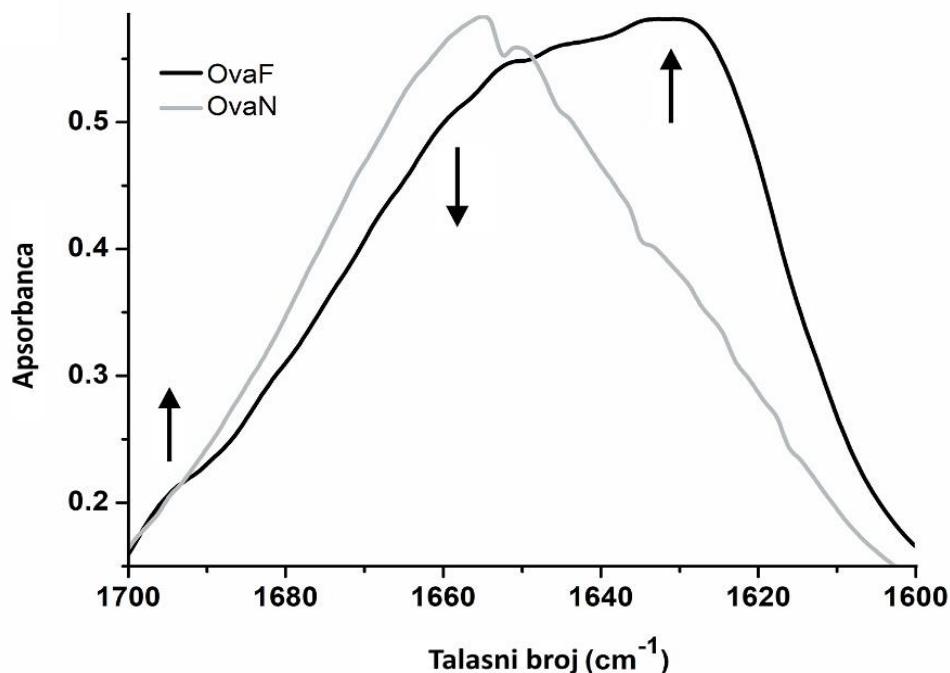
Ovo je najverovatniji rezultat koordinacije jona Cd(II) za vezivna mesta koja se nalaze na samoj, hidrofilnoj površini ovalbumina, za razliku od jona Pb(II) čija koordinativna mesta se nalaze u okviru hidrofobnog jezgra ovalbumina [Slika 5.7].

Nakon inkubacionog perioda, može se uočiti drastičan pad ($p < 0,05$) u intenzitetu ANS fluorescencije svih uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu jona teških metala, u odnosu na ovalbumin bez dodatnih jona Pb(II) i Cd(II) [Slika 5.8B]. Ovaj pad je objašnjen potencijalnim formiranjem koordinativno-vezanih ovalbuminskih klastera, čiji nastanak je pospešen inicijalnom koordinacijom jona metala. Nasuprot ovim rezultatima, prethodno-opisan intenzitet ThT fluorescencije značajno raste u svim uzorcima koji su inkubirani u prisustvu jona metala [Slika 5.5.], ukazujući prelazak ovalbumina u amiloidnu formu.

5.2.1.4. Kvalitativna FTIR analiza amiloidne konverzije ovalbumina

Radi daljeg potvrđivanja amiloidne konverzije i potencijalno pozitivnog efekta na amiloidnu fibrilaciju koje je omogućeno koordinacijom jona Pb(II) i Cd(II), izvedena je ATR - FTIR analiza za praćenje promena sekundarnih struktura ovalbumina.

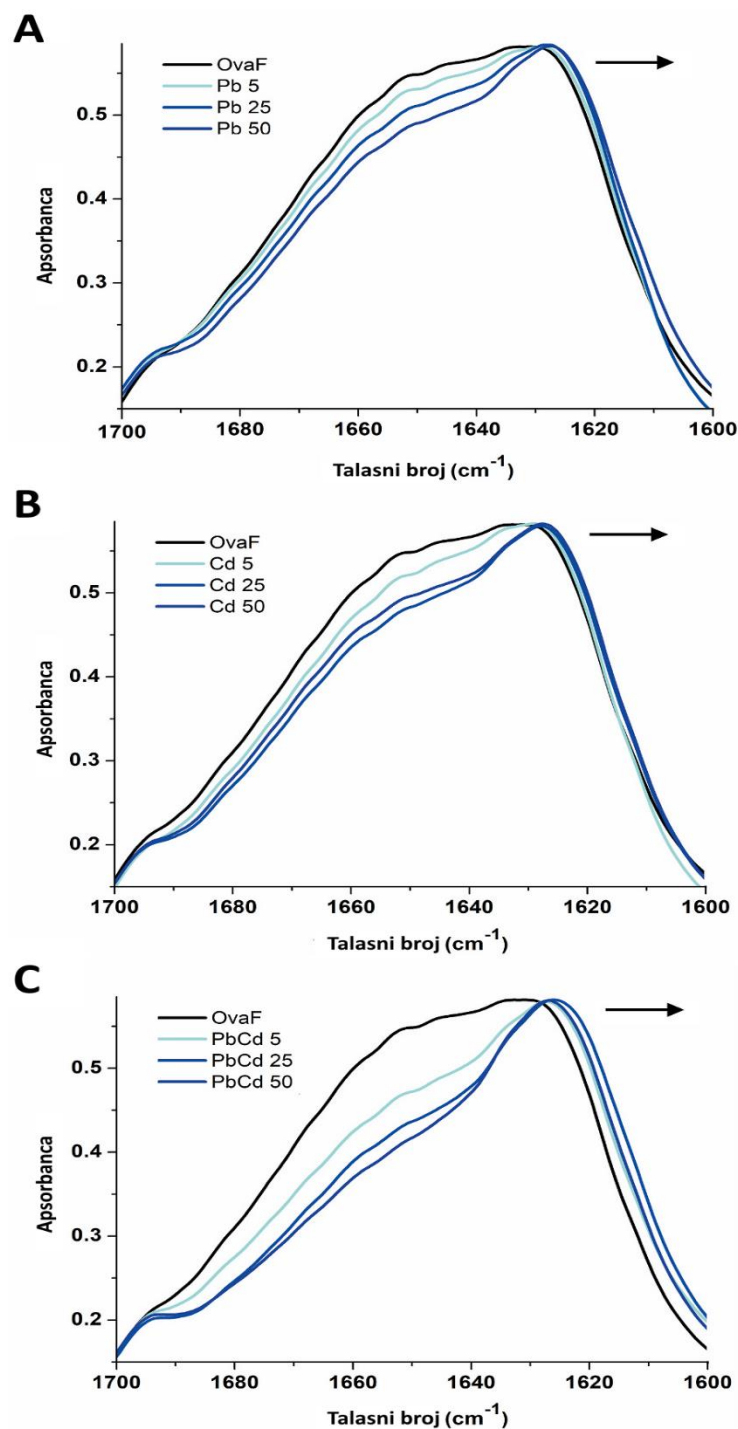
Nativna forma ovalbumina je karakteristična po raspodeli sekundarnih struktura od ~35% α -heliksa, i ~45% β -pločica²⁰⁰. IR spektar Amidnog I regiona nativnog ovalbumina [Slika 5.9.] prikazuje pikove koji su karakteristični za ove sekundarne strukture. Konkretno, pik na ~1653 cm^{-1} , nastaje kao rezultat vibracije istezanja karbonilnih grupa u okviru struktura α -heliksa^{185,218}. Apsorpcioni pik koji je karakterističan za strukture β -pločica se takođe može uočiti na nižem talasnom broju od ~1635 cm^{-1} , uključujući i pikove koji odgovaraju strukturama neuređenog niza (~1647 cm^{-1}), i generalno neuređenih proteinskih struktura u opsegu od 1662 cm^{-1} do 1675 cm^{-1} ^{185,218-220}.



Slika 5.9. – IR spektri Amidnog I regiona koji prikazuju konverziju ovalbumina iz nativne u amiloidnu formu u uzorku koji ne sadrži jone metala: OvaN – uzorak ovalbumina pre inkubacionog perioda na 90 °C, pH 2; OvaF – uzorak ovalbumina nakon 72 h inkubiranja na 90 °C, pH 2.

Nakon perioda inkubacije od 72 h na 90 °C, pH 2, u slučaju uzorka ovalbumina koji ne sadrži jone teških metala, može se uočiti primetan pad u intenzitetu apsorpcije za pik koji odgovara strukturi α -heliksa na $\sim 1653\text{ cm}^{-1}$, uključujući i istovremeni porast u apsorpciji za pikove koji su karakteristični za intermolekulske β -pločice na 1695 cm^{-1} i $\sim 1628\text{ cm}^{-1}$ [Slika 5.9.]. Ovo ukazuje na to da dolazi do konverzije manje termodinamički stabilnih α -heliksa u znatno stabilnije amiloidne, intermolekulske β -pločice^{113,183,211}.

Opisani, karakterističan pad apsorbanca za pikove koji odgovaraju sekundarnim strukturama nativne forme ovalbumina je dodatno izražen dodatkom rastućih koncentracija jona teških metala [Slika 5.10.A-C].



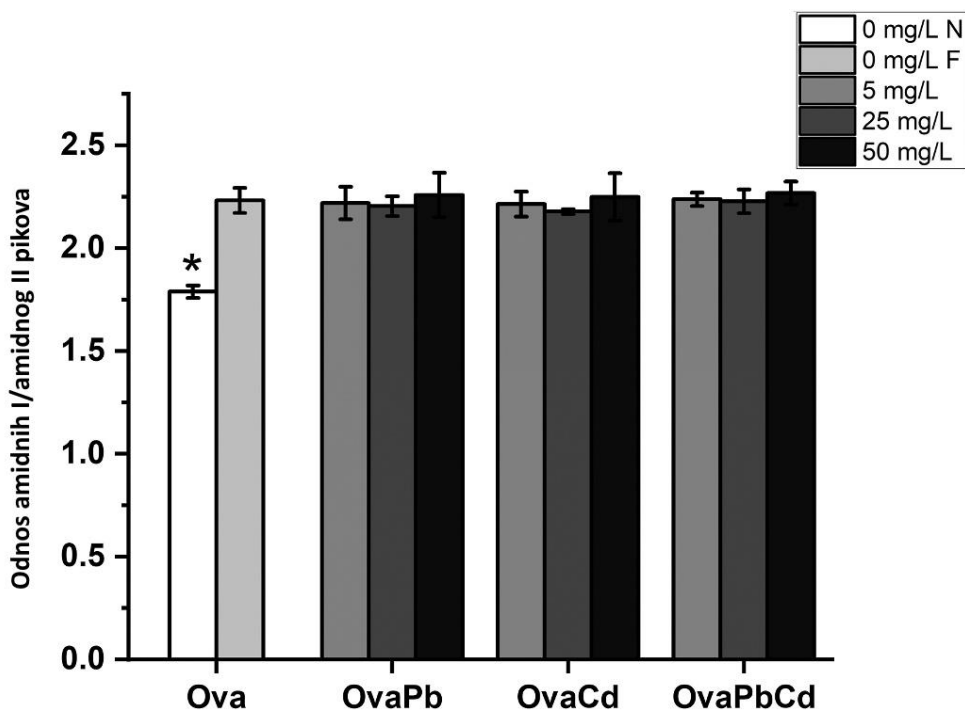
Slika 5.10. – FTIR spektri Amidnog I regiona uzoraka ovalbumina koji su inkubirani sa i bez dodatnih jona teških metala; OvaF – fibrilni uzorak ovalbumina koji je inkubiran bez jona metala na 90 °C, pH 2,0; OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5, 25, i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5, 25, i 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; OvaPbCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5, 12,5, i 25 mg/mL (ukupno 5, 25, i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata.

Pored značajnog pada u intenzitetu pikova karakterističnih za sekundarne strukture poput α -heliksa ($\sim 1653\text{ cm}^{-1}$), može se uočiti postepena promena u poziciji pika intermolekulske β -pločice sa $\sim 1628\text{ cm}^{-1}$ ka nižim vrednostima talasnog broja. Ovaj fenomen se može primetiti u svim spektrima uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu jona metala [Slika 5.10.], i direktno je srazmeran ukupnoj koncentraciji prisutnih jona teških metala. Identičan fenomen je opisan u literaturi u slučaju fibrilacije ovalbumina²²¹, kao i tokom fibrilacije lizozima iz belanceta¹²⁷, pri čemu je naznačeno da je sam stepen promene pozicije opisanog pika ka nižim talasnim brojevima indikator formiranja kompleksnijih amiloidnih struktura. Ovo se takođe može primetiti u slučaju uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu oba jona teških metala [Slika 5.10C], gde je opisana promena u poziciji pika intermolekulske β -pločice izraženija u poređenju sa uzorcima koji su inkubirani u prisustvu pojedinačnih jona teških metala [Slika 5.10A-B]. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ThT esaja [Slika 5.5.], dalje ukazujući na to da prisustvo jona teških metala potpomaže u formiranju amiloidnih fibrila, i da prisustvo oba jona metala ima pozitivan, sinergistički efekat na rast i razvoj amiloidnih struktura ovalbumina.

5.2.1.5. Kvantitativna FTIR analiza tendencije formiranja amiloidnih struktura ovalbumina

Radi detaljnijeg razumevanja potencijalnog uticaja inicijalne koordinacije jona metala za strukturu ovalbumina na konkretno formiranje i propagaciju amiloidnih struktura, izvedena je kvantitativna analiza formiranja amiloidnih β -pločica.

Kvantitativna analiza je izvedena preračunom odnosa zbira intenziteta amiloidnih pikova u okviru Amidnog I regiona ($\sim 1695\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1628\text{--}1625\text{ cm}^{-1}$) i intenziteta pika u okviru Amidnog II regiona ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) [Slika 5.11.]. Kako je opisani pik u Amidnom II regionu manje osetljiv na strukturne promene, predstavlja adekvatan interni standard za određivanje tendencije proteinskih struktura da se konvertuju u amiloidni oblik, bez obzira na dimenzije i samu morfologiju istih^{211,219}.



Slika 5.11. – Odnosi karakterističnih amiloidnih pikova u Amidnom I regionu ($\sim 1628\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1695\text{ cm}^{-1}$) i Amidnom II regionu (1540 cm^{-1}); Ova – uzorci ovalbumina bez prisutnih jona teških metala (N – nativni ovalbumin; F – ovalbumin nakon termalne degradacije na $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 2,0); OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5, 25, i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5, 25, i 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; OvaPbCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5, 12,5, i 25 mg/mL (ukupno 5, 25, i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata; “*” – uzorci sa p vrednošću ispod 0,05.

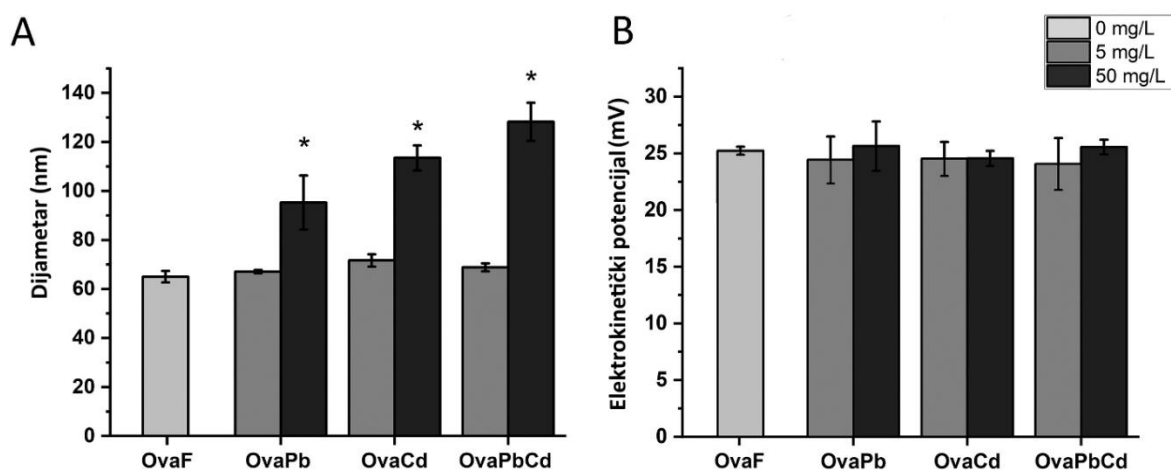
Dobijeni rezultati kvantitativne procene formiranja amiloidnih β -pločica dodatno ukazuju na to da dolazi do formiranja amiloidnih struktura nakon inkubacionog perioda od 72 h na $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 2,0 ($p < 0,05$), ali i da inicijalna destabilizacija izazvana koordinacijom jona teških metala za ovalbumin nije značajno uticala na amiloidnu konverziju ($p > 0,05$). Ovo znači da se pozitivan efekat prisutnih jona metala na razvoj amiloidnih fibrila ispoljava tokom procesa elongacije i rearanžmana polipeptidnih fragmenata ovalbumina u amiloidne strukture, i da nastanak inicijalnih, koordinativno-vezanih klastera ovalbumina nije primetno uticao na fibrilaciju.

5.2.1.6. Analiza dimenzija i elektrokinetičkog potencijala rastvorljivih agregata ovalbumina DLS metodom

Hidrodinamički dijometri uzoraka ovalbumina koji su inkubirani sa i bez prisustva jona teških metala različitih koncentracija su određeni primenom DLS metode.

Na osnovu dobijenih rezultata [Slika 5.12A], hidrodinamički dijametri ovalbuminskih agregata u uzorcima ovalbumina koji su inkubirani bez, kao i u uzorcima sa ukupno 5 mg/L jona teških metala, variraju u opsegu od 60 do 70 nm. Ovo znači da, pod primenjenim uslovima, dolazi do formiranja agregata koji su sačinjeni od fragmenata ovalbumina. Hidrodinamički dijametar ovih agregata je preko deset puta veći od nativnog molekula ovalbumina, čiji je opisani hidrodinamički dijametar okvirno $\sim 5,7$ nm²²².

Iako prisustvo nižih koncentracija jona teških metala (5 mg/L) nije značajno uticalo na veličinu formiranih, rastvorljivih amiloidnih agregata ovalbumina, više koncentracije jona metala (50 mg/L) su značajno uticale na dalju agregaciju fragmenata ovalbumina [Slika 5.12A]. Hidrodinamički dijametri ovako formiranih agregata su bili izrazito veći u odnosu na agregate ovalbumina koji su formirani bez prisutnih jona metala ($p < 0,05$), što je dodatno izraženo u uzorcima ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu jednakih koncentracija Pb(II) i Cd(II) jona [Slika 5.12A]. Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa rezultatima ThT esaja, dalje potkrepljujući predloženi sinergistički efekat ovih jona na fibrilaciju ovalbumina.



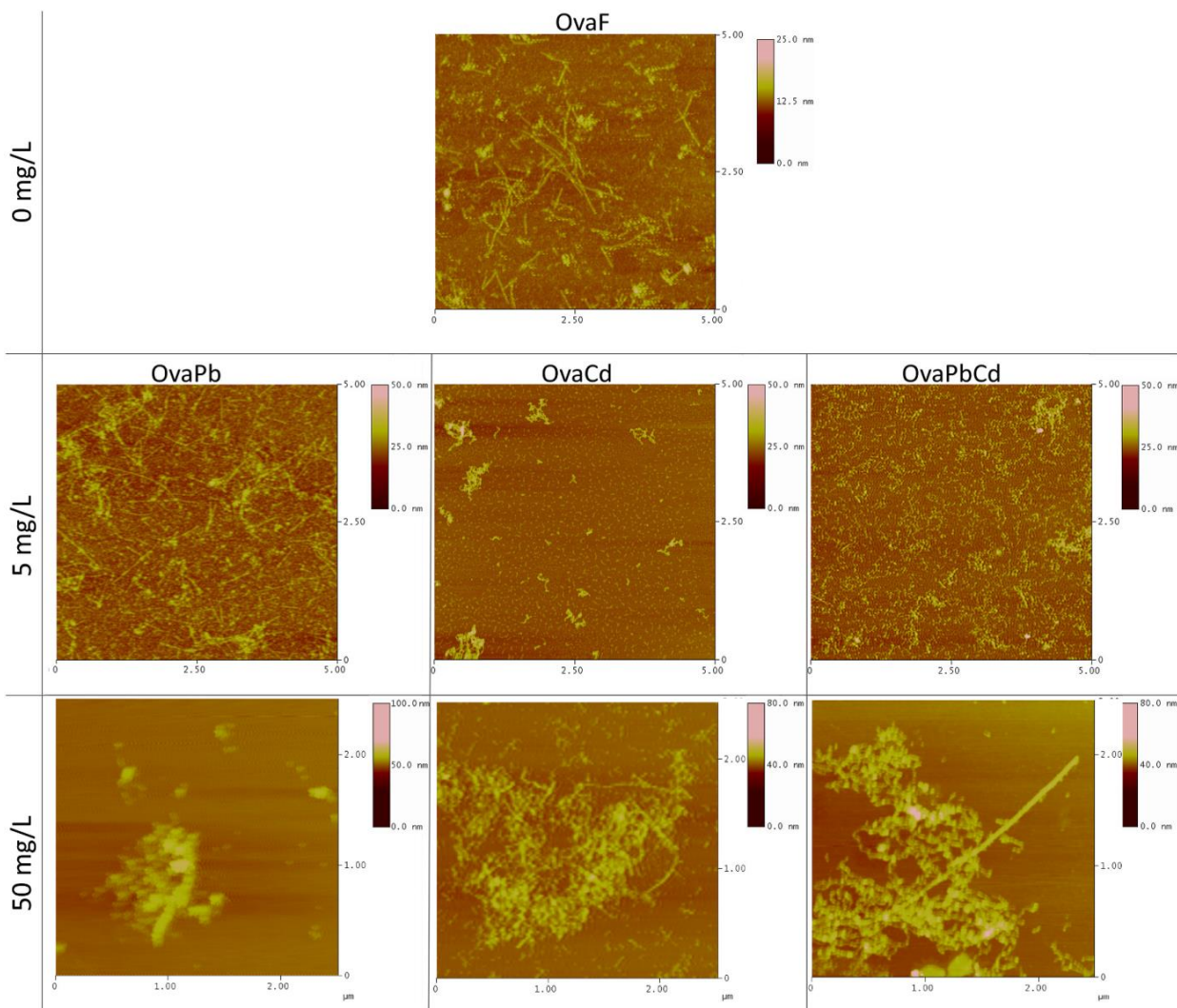
Slika 5.12. Histogramski prikaz hidrodinamičkog dijametra (A) i elektrokinetičkog potencijala (B) amiloidnih agregata koji su formirani inkubacijom uzoraka ovalbumina sa i bez jona teških metala; Ova – uzorci ovalbumina bez prisutnih jona teških metala (N – nativni ovalbumin; F – ovalbumin nakon termalne degradacije na 90 °C, pH 2,0); OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; OvaPbCd - uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5 i 25 mg/mL (ukupno 5 i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata; “*” – p vrednost $< 0,05$.

Nasuprot ovim rezultati, primećeno je da prisustvo jona teških metala nije imalo značajan uticaj na elektrokinetički potencijal prisutnih agregata ($p > 0,05$) [Slika 5.12B].

5.2.1.7. *Analiza dimenzija i morfologije amiloidnih fibrila ovalbumina AFM metodom*

Radi konkretnog određivanja morfologije amiloidnih fibrila ovalbumina koji su nastali nakon termalne denaturacije sa i bez dodatih jona Pb(II) i Cd(II), primenjena je AFM tehnika. Dobijeni AFM snimci [Slika 5.13.] su korišćeni za komparativnu procenu efekta različitih koncentracija prisutnih jona metala na dimenzije i fibrilaciju amiloidnih struktura ovalbumina.

Na osnovu prikazanih rezultata [Slika 5.13.], može se uočiti uticaj inicijalne destabilizacije i formiranja klastera na morfologiju amiloidnih fibrila. Konkretno, stepen agregacije zavisi od tipa prisutnih jona teških metala u rastovu ovalbumina tokom perioda inkubacije, kao i od koncentracije primenjenih jona metala. U slučaju uzorka ovalbumina koji je inkubiran bez dodatka jona teških metala, prisutne su fibrilne strukture sa dužinom od preko 100 nm, kao i dijametrom od okvirno 14 nm, što je u skladu sa literaturnim podacima²¹³. Međutim, u slučajevima uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu 5 mg/L jona Pb(II), može se uočiti izražena promena u morfologiji amiloidnih agregata, uključujući razgranate fibrilne strukture sa varirajućim nivoima klasterovanja. Ovi razgranati amiloidni fibrili vidljivo agregiraju u prethodno opisane amiloidne klastere. S druge strane, amiloidni fibrili formirani u prisustvu jona Cd(II) koncentracije 5 mg/L su slabije razgranati i znatno kraći, sa vidljivim, gusto pakovanim depoima fibrila. U slučaju uzorka ovalbumina koji je inkubiran u prisustvu jednakih koncentracija jona Pb(II) i Cd(II), može se uočiti kombinacija opisanih efekata pojedinačnih metala. Glavna razlika predstavlja prisustvo kratkih amiloidnih fibrila koji, za razliku od uzorka koji je inkubiran u prisustvu 5 mg/L Pb(II), ne agregiraju dalje u odgovarajuće amiloidne klastere.



Slika 5.13. – Prikaz AFM snimaka uzoraka ovalbumina koji su inkubirani 72 h na 90°C, pH 2,0, bez (0 mg/L) i sa (5, 50 mg/L) adicijom jona teških metala. OvaF – Uzorak ovalbumina koji je inkubiran bez dodatka jona teških metala; OvaPb – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L olovo(II)-nitrata; OvaCd – uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu 5 i 50 mg/L kadmijum(II)-nitrata; OvaPbCd - uzorci ovalbumina nakon inkubacije u prisustvu oba jona metala jednakih koncentracija od 2,5 i 25 mg/mL (ukupno 5 i 50 mg/L) olovo(II)-nitrata i kadmijum(II)-nitrata.

AFM snimci uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu jona teških metala viših koncentracija (50 mg/L) pokazuju značajno izraženiji efekat jona metala na morfološke promene amiloidnih fibrila. Uzorci ovalbumina koji sadrže jone Cd(II) prikazuju primetno viši stepen agregacije, odnosno klasterovanja amiloidnih fibrila, dok u uzorku ovalbumina koji sadrži samo jone Pb(II) se može uočiti kombinacija amiloidnih morfolologija, kao i glomaznih, amorfnih agregata ovalbumina. Prisustvo ovakvih agregata je neiznenađujuće²²¹, i dobijeni rezultati su u potpunom skladu sa rezultatima ANS esaja [Slika 5.8A], gde je najveći stepen inicijalne destabilizacije ovalbumina pre inkubacionog perioda izazvan od strane Pb(II) jona.

Prisustvo ovakvih amorfnih agregata je takođe u skladu sa rezultatima ANS eseja dobijenih nakon 72 h inkubacije uzoraka, usled višeg stepena izloženosti hidrofobnih regiona [Slika 5.8B], što je verovatan rezultat slabijeg stepena uređenosti amorfnih proteinskih agregata.

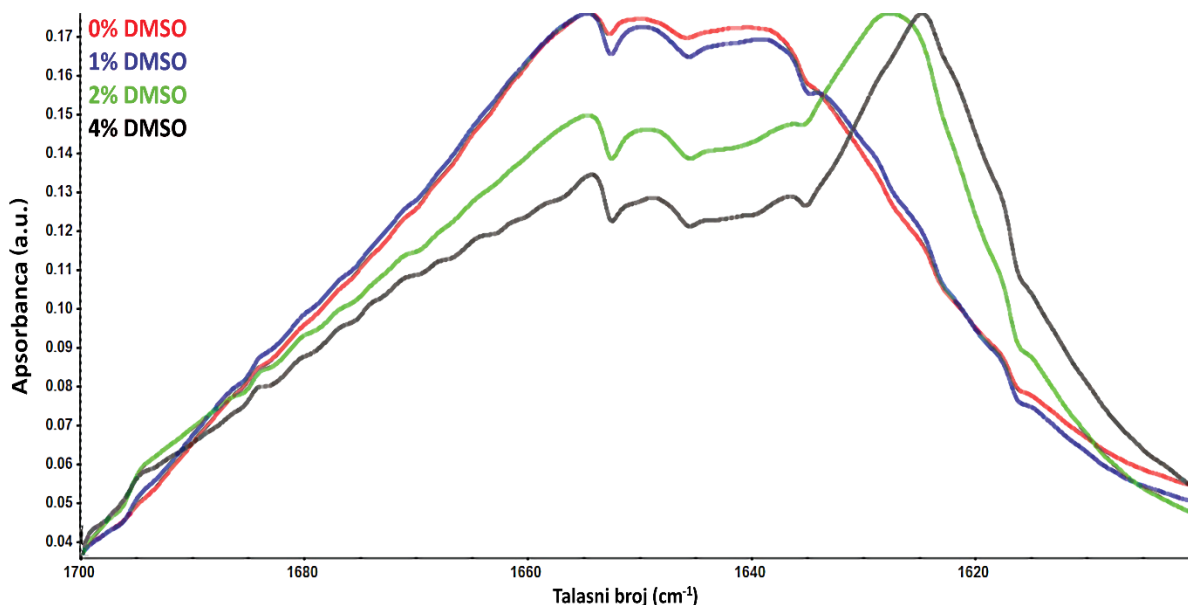
5.2.2. Analiza uticaja vezivanja organometalnih kompleksa za ovalbumin

5.2.2.1. *Kvalitativna FTIR analiza uticaja različitih koncentracija DMSO na nativnu strukturu ovalbumina*

Kako je, pri medicinskim ispitivanjima uticaja mnogobrojnih lipofilnih terapeutika i liganada na različite biološke sisteme, generalno neophodno prisustvo organskih rastvarača mešljivih sa vodom koji omogućavaju potpuno rastvaranje analiziranih jedinjenja, potrebno je prvobitno analizirati potencijalno denaturišuće dejstvo primenjenih ko-rastvarača. Konkretno, pre analize uticaja organometalnih kompleksa na konformacione prelaze ovalbumina, prvobitno je analiziran uticaj različitih koncentracija DMSO na konformaciju nativnog oblika ovalbumina kao model sistema.

U literaturi je opisana generalna primena rastvora DMSO za analizu terapeutika^{223,224}, uključujući čestu primenu rastvora koji sadrže do 5% DMSO za farmakološku analizu organometalnih kompleksa²²⁵.

Radi analize ne-specifičnog dejstva različitih koncentracija DMSO na konformaciju ovalbumina, primenjena je ATR-FTIR spektroskopija Amidnog I regiona uzoraka ovalbumina koji sadrže 0, 1, 2, i 4% DMSO [Slika 5.14.].



Slika 5.14. – ATR-FTIR spektri uticaja različitih koncentracija DMSO (0-4%) na konformaciju ovalbumina, u Amidnom I regionu.

Dobijeni ATR-FTIR spektri [Slika 5.14.] prikazuju nativnu strukturu ovalbumina bez prisutnog DMSO, uključujući spektar ovalbumina sa prikazanim, minornim efektom 1% DMSO na sekundarne strukture ovalbumina na pozicijama 1636 cm^{-1} za nativnu β -pločicu^{211,218}, 1646 cm^{-1} za neuređene nizove, 1653 cm^{-1} za α -helikse²¹¹, kao i za pikove koji odgovaraju neuređenim strukturama (1646 cm^{-1})^{211,220} i β -zavijucima (1683 cm^{-1})^{211,226}.

Daljim povećanjem koncentracija DMSO (2% i 4%) se mogu uočiti značajne konformacione promene ovalbumina [Slika 5.14.]. Konkretno, dolazi do pada u intenzitetima apsorbanici pikova koji su karakteristični za sekundarne strukture nativnog ovalbumina, koji je direktno srazmeran sa koncentracijom prisutnog DMSO. Istovremeno, formiraju se pikovi koji su karakteristični za intermolekulske β -pločice pri talasnim brojevima u opsegu $1622\text{--}1625\text{ cm}^{-1}$. Ova konverzija je takođe praćena promenom položaja pika koji odgovara strukturi intermolekulskih β -pločica, ukazujući da je stepen agregacije novonastalih struktura direktno srazmeran sa koncentracijom DMSO.

5.2.2.2. *Kvantitativna FTIR analiza uticaja DMSO na sekundarne strukture ovalbumina*

Radi kvantitativne procene konkretnog stepena konverzije sekundarnih struktura ovalbumina tokom denaturacije i agregacije u prisustvu viših koncentracija DMSO, izvedena je dekonvolucija pikova i korišćeni su drugi izvodi dobijenih IR spektara u okviru Amidnog I regiona. Rezultati dobijeni metodom dekonvolucije koji prikazuju raspodelu sekundarnih struktura su prikazani u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. – Uticaj različitih koncentracija DMSO na raspodelu sekundarnih struktura u okviru ovalbumina (udeo u ukupnoj strukturi polipeptidnog lanca, prikazan u procentima).

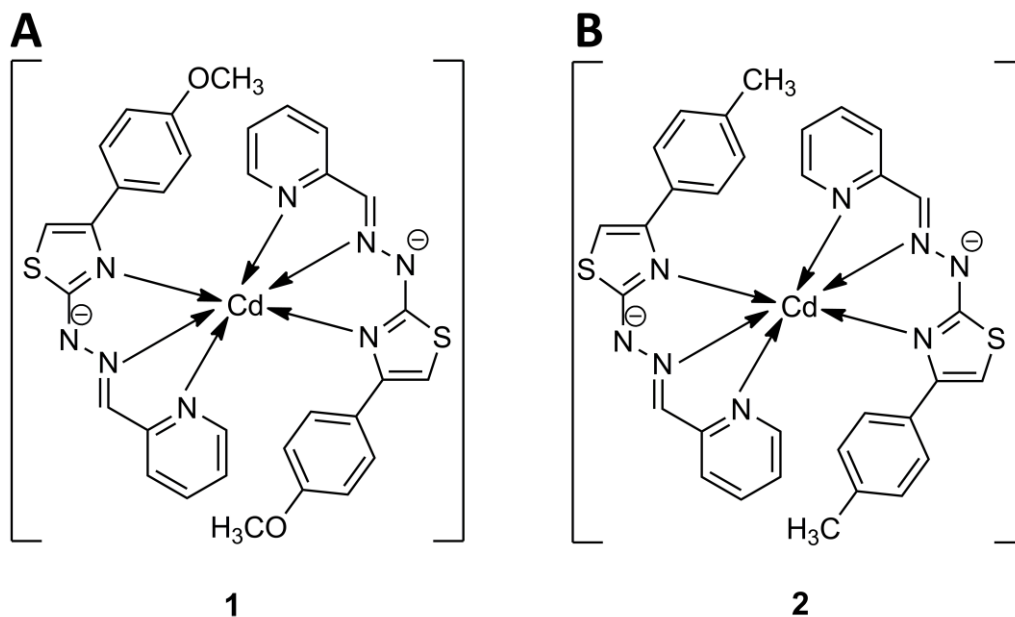
Ovalbumin	Udeo sekundarnih struktura (%)				
	β -pločice	Neuređene	α -heliksi	β -zavijuci	Greška
0% DMSO	37,2	29,5	25,5	7,8	1,0
1% DMSO	36,7	30,3	25,0	8,0	1,2
2% DMSO	41,7	27,3	23,6	7,4	0,9
4% DMSO	50,3	21,2	19,4	9,1	0,7
Difrakcija X-zraka	37,9	28,1	26,3	7,7	-

Na osnovu prikazanih raspodela sekundarnih struktura [Tabela 5.2.] se može primetiti da nije došlo do izrazitih promena u udelu sekundarnih struktura ovalbumina u uzorcima sa koncentracijama DMSO od 0% i 1%, u odnosu na kristalnu strukturu proteina. Međutim, u slučajevima uzoraka sa koncentracijama DMSO od 2% i 4%, može se uočiti značajan stepen konformacionih prelaza ovalbumina. Konkretno, na uštrb sadržaja sekundarnih struktura poput α -heliksa i neuređenih struktura, sadržaj β -pločica u okviru ovalbumina raste. Ovaj porast je direktno srazmeran sa koncentracijom DMSO, i dostiže okvirno 13% pri koncentraciji DMSO od 4%.

Slični fenomeni konverzije sekundarnih struktura izazvani od strane DMSO su takođe opisani u literaturi. Prikazano je u različitim studijama da, pri višim koncentracijama DMSO kao i u zavisnosti od prisutnih proteinskih struktura^{227–230}, DMSO može uticati na biohemijske karakteristike proteina i njihovih interakcija preko indirektnog narušavanja samih interakcija između proteina i prisutnog rastvarača. Takođe, pri višim koncentracijama, favorizovane su interakcije između nepolarnih regiona proteina i DMSO²³¹. Kao rezultat ovih uticaja, povećava se rizik potencijalne denaturacije prisutnih proteina^{227,229,232}. Ovaj uticaj, međutim, se može ispoljiti i pri nižim koncentracijama DMSO, u zavisnosti od stabilnosti native strukture prisutnog proteina²³².

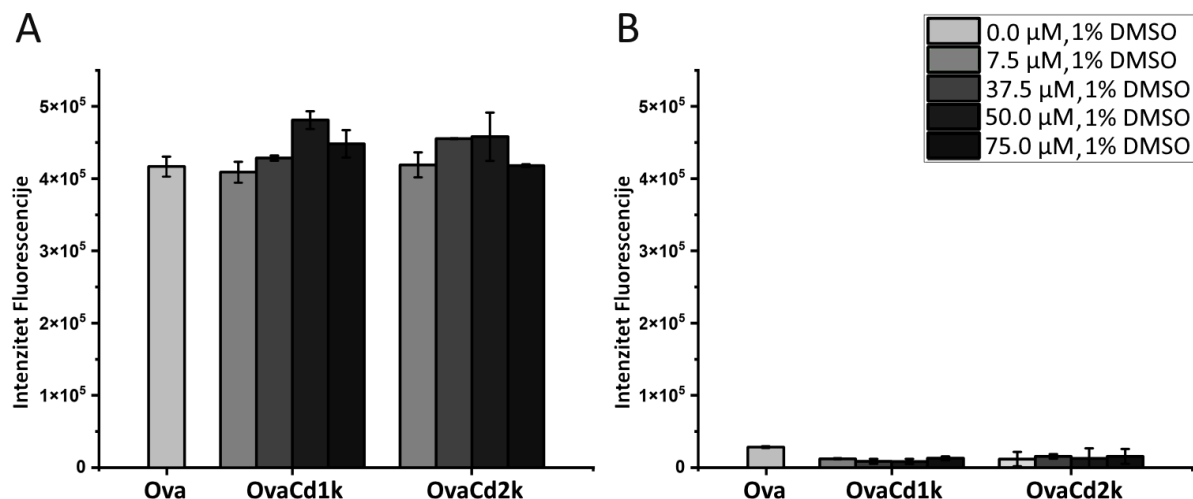
5.2.2.3. Analiza potencijalne fibrilacije ovalbumina pod uticajem organometalnih kompleksa Cd(II)

Radi adekvatne diskriminacije između uticaja slobodnih jona teških metala i jona metala u okviru organometalnih kompleksa na konformacione prelaze ovalbumina i potencijalnu agregaciju, izvedena je komparativna spektrofotometrijska ThT analiza uzoraka ovalbumina u prisustvu varirajućih koncentracija dva različita kompleksa Cd(II), označena kao kompleksi **1** i **2** [Slika 5.15.] u opsegu koncentracija od 7,5 do 75 μM u 1% DMSO. Analiza je izvedena pre i nakon perioda inkubacije od 48 h na 90 °C, kao i pri različitim vrednostima pH – 2 i 7,4.



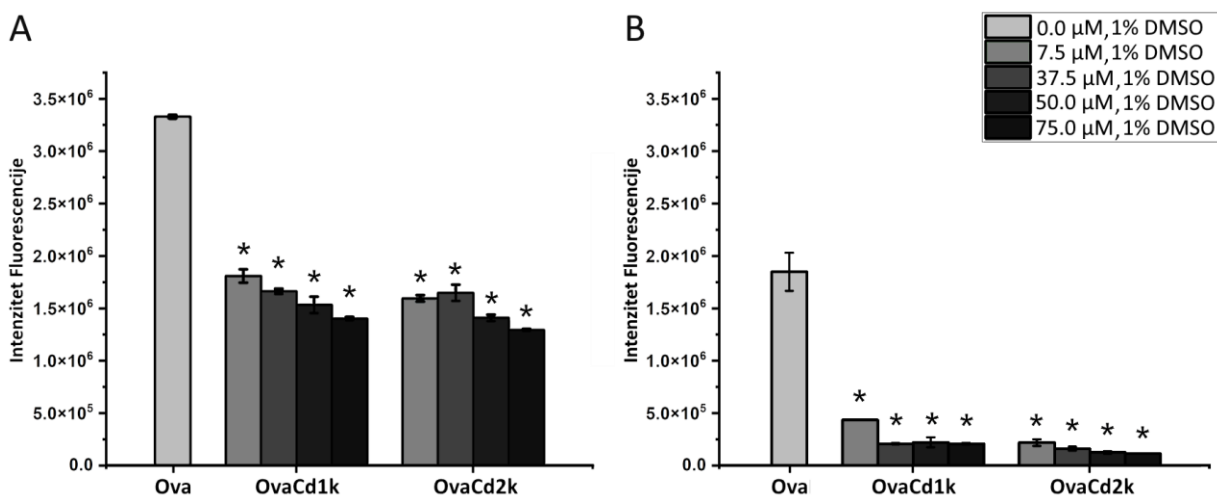
Slika 5.15. – Hemijske strukture analiziranih organometalnih kompleksa Cd(II) **1** (A) i **2** (B).

Neposredno nakon pripreme uzoraka, praćen je intenzitet ThT fluorescencije radi potvrde inicijalne destabilizacije native strukture ovalbumina od strane vezanih organometalnih kompleksa Cd(II). Dobijeni rezultati ThT eseja su prikazani na slici 5.16.



Slika 5.16. – Histogramski prikaz intenziteta ThT fluorescencije neinkubiranih uzoraka ovalbumina u prisustvu 1% DMSO, sa ili bez organometalnih kompleksa Cd(II) različitih koncentracija (7,5-75 μM) u rastvoru pH 2 (A) ili 100 mM Tris puferu pH 7,4 (B); Ova – uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, bez organometalnih kompleksa Cd(II); OvaCd1k - uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, u prisustvu varirajućih koncentracija organometalnog kompleksa 1 Cd(II); OvaCd2k - uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, u prisustvu varirajućih koncentracija organometalnog kompleksa 2 Cd(II).

Rezultati ThT eseja neinkubiranih uzoraka pokazuju izvestan stepen inicijalne destabilizacije u uzorcima ovalbumina pri pH vrednosti 2,0 [Slika 5.16A] u odnosu na uzorke ovalbumina koji su pripremljeni u rastvorima pH 7,4 [Slika 5.16B], pokazujući da i pre perioda termalne inkubacije na 90 °C dolazi do narušavanja native konformacije ovalbumina pri pH 2,0 u prisustvu 1% DMSO, dok uzorci ovalbumina ostaju stabilni pri pH vrednosti od 7,4. Istovremeno, bez obzira na pH vrednost rastvora, prisutni organometalni kompleksi nisu značajno uticali na nivo inicijalne destabilizacije ovalbumina. ThT esej je ponovljen nakon inkubacionog perioda od 48 h na 90 °C, i rezultati eseja su prikazani na slici 5.17..



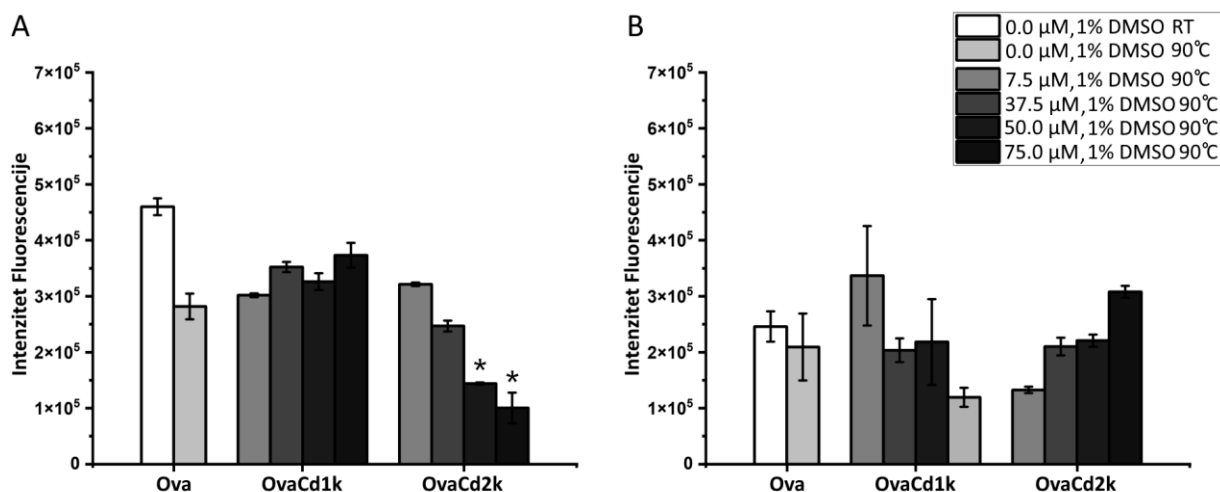
Slika 5.17. – Histogramski prikaz intenziteta ThT fluorescencije uzoraka ovalbumina u prisustvu 1% DMSO, sa ili bez organometalnih kompleksa Cd(II) različitih koncentracija (7,5-75 μ M) u 0,01 M rastvoru hlorovodonične kiseline (A) ili u 100 mM Tris puferu pH 7,4 (B), nakon 48 h perioda inkubiranja na 90 °C; Ova – uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, bez organometalnih kompleksa Cd(II); OvaCd1k - uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, u prisustvu varirajućih koncentracija organometalnog kompleksa 1 Cd(II); OvaCd2k - uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, u prisustvu varirajućih koncentracija organometalnog kompleksa 2 Cd(II); “*” – p vrednost < 0,05.

Dobijeni rezultati ThT esaja inkubiranih uzoraka ovalbumina pokazuju drastičan skok u intenzitetu ThT fluorescencije kod svih uzoraka. Međutim, skok u intenzitetu fluorescencije je najizraženiji u uzorcima ovalbumina koji ne sadrže organometalne komplekse Cd(II) [Slika 5.17.]. Nasuprot tome, intenziteti ThT fluorescencije uzoraka ovalbumina koji sadrže organometalne komplekse su značajno niži ($p < 0,05$), bez obzira na pH vrednost rastvora. Istovremeno, može se uočiti negativna korelacija između koncentracije prisutnih organometalnih kompleksa i fibrilacije ovalbumina, u odnosu na kontrolni uzorak koji sadrži samo 1% DMSO.

Ovo sugerise da glavni faktor koji favorizuje fibrilaciju ovalbumina je destabilišuće dejstvo 1% DMSO pri povišenim temperaturama, dok niže vrednosti intenziteta fluorescencije u ostalim uzorcima sugerisu da prisustvo organometalnih kompleksa Cd(II) favorizuje formiranje amorfnih agregata. Ova favorizacija je direktno srazmerna koncentraciji prisutnih kompleksa i može se uočiti i u uzorcima inkubiranim na pH 7,4 [Slika 5.17B]. Opisani efekat je dodatno izražen pri nižim pH vrednostima [Slika 5.17A], što je neiznenađujuća pojava imajući u obzir da je formiranje amiloidnih struktura dodatno favorizovano u kiselim sredinama^{113,211}.

5.2.2.4. Analiza izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina u prisustvu organometalnih kompleksa Cd(II)

Stepen izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina, pre i nakon perioda inkubiranja od 48 h na 90 °C, sa i bez prisutnih organometalnih kompleksa Cd(II) je praćeno primenom ANS spektrofлуorimetrije. Analizirani su uzorci ovalbumina različitih pH vrednosti – 2 i 7,4, sa i bez različitih koncentracija dva različita organometalna kompleksa Cd(II) u opsegu koncentracija od 7,5 do 75 μ M, u 1% DMSO. Dobijeni rezultati ANS esaja su prikazani na slici 5.18.



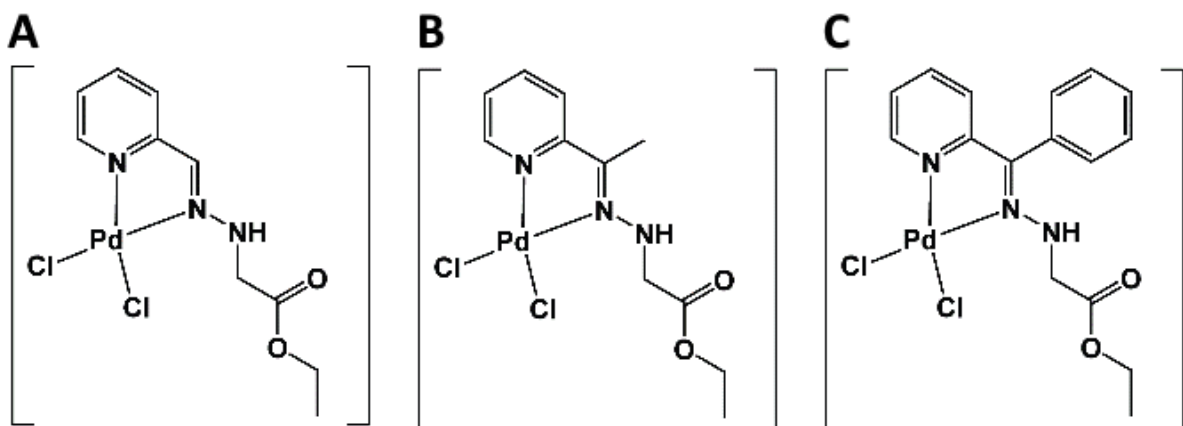
Slika 5.18. – Fluorescencija ANS probe nakon vezivanja za hidrofobne regione uzoraka ovalbumina u rastvoru 0,01 M HCl, sa 1% DMSO, pH 2 (A) i 100 mM Tris puferu, sa 1% DMSO, pH 7,4 (B), nakon inkubacionog perioda od 48 h sa, i bez organometalnih kompleksa kadmijuma različitih koncentracija u opsegu 7,5-75 μ M: Ova – uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, bez prisutnih organometalnih kompleksa Cd(II); OvaCd1k - uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, u prisustvu organometalnog kompleksa 1 Cd(II) različitih koncentracija; OvaCd2k - uzorak ovalbumina u odgovarajućem rastvoru, u prisustvu organometalnog kompleksa 2 Cd(II) različitih koncentracija; “*” – p vrednost < 0,05.

Na osnovu dobijenih rezultata [Slika 5.18.], može se uočiti da je intenzitet ANS fluorescencije primetno viši u uzorku neinkubiranog ovalbumina u 0,01 M rastvoru HCl (pH 2,0) [Slika 5.18A] u odnosu na neinkubirani uzorak ovalbumina u 100 mM Tris puferu pH 7,4 [Slika 5.18B]. Ovo dodatno pokazuje inicijalno destabilišući efekat 1% DMSO na nativnu strukturu ovalbumina u kiseljoj sredini, usled povišenog stepena izloženosti nepolarnih regiona ovalbumina i neposrednog vezivanja ANS probe za iste.

Nakon perioda inkubiranja od 48 h na 90 °C može se uočiti blagi pad u intenzitetu ANS fluorescencije, koji je izraženiji pri nižoj pH vrednosti u slučaju uzorka ovalbumina koji sadrži samo 1% DMSO, ukazujuću da dolazi do formiranja agregata koji su nastali hidrofobnim interakcijama denaturisanih polipeptidnih fragmenata ovalbumina. Step en opisane agregacije nije značajno promenjen prisustvom rastućih koncentracija organometalnog kompleksa 1 Cd(II) pri primenjenim pH vrednostima ($p > 0,05$) [Slika 5.18.]. Nasuprot tome, može se uočiti pozitivan uticaj organometalnog kompleksa 2 Cd(II) na agregaciju ovalbumina pri pH 2,0, koji je direktno srazmeran sa koncentracijom prisutnog kompleksa, dostižući statistički značaj pri koncentracijama od 50 i 75 μM ($p < 0,05$) [Slika 5.18A]. Obrnuti trend se može uočiti u slučaju istog kompleksa pri pH vrednosti od 7,4 [Slika 5.18B], ukazujući da dati kompleks i dalje ispoljava destabilišuće dejstvo na ovalbumin, ali bez značajno izraženog formiranja hidrofobnih agregata ($p > 0,05$).

5.2.2.5. *In-silico određivanje fizičkih i hemijskih karakteristika primenjenih kompleksa Pd(II)*

In-silico ADME profili organometalnih kompleksa Pd(II) A, B, i C [Slika 5.19.] su procenjeni primenom SwissADME programa i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 5.1. Sva analizirana jedinjenja pokazuju zadovoljavajuće karakteristike po Lipinskijevim pravilima^{233,234} poput $\text{MW} \leq 500$ Da, dok brojevi atoma koji funkcionišu kao akceptori vodoničnih veza (≤ 10) i brojevi atoma koji funkcionišu kao donori vodoničnih vezama (≤ 5) su takođe adekvatni. Vrednosti molarne refraktivnosti su spadale u opseg od 40 do 130 i topološke polarne površine jedinjenja su takođe bile ispod $140 \text{ \AA}^2$ [Tabela 5.1.].



Slika 5.19. – Hemijske strukture analiziranih organometalnih kompleksa Pd(II).

Tabela 5.1. – Farmakološki profili, karakteristike medicinske hemije i sličnosti vodećim jedinjenjima organometalnih kompleksa Pd(II) A, B, i C; ++: visoka aktivnost, +: aktivnost; -: bez aktivnosti.

Parametar	Organometalni kompleks Pd(II)		
	A	B	C
Fizičko-hemijske karakteristike			
Molarna masa (g/mol; Da)	384,56	398,58	460,56
Broj teških atoma	18	19	24
Broj aromatičnih teških atoma	6	6	12
Csp ³ frakcija	0,30	0,36	0,19
Broj rotirajućih veza	5	5	6
Broj akceptora vodoničnih veza	2	2	2
Broj donora u vodoničnim vezama	1	1	1
Molarna refraktivnost	71,23	76,04	95,72
Topološka polarna površina (TPSA), Å ²	55,62	55,62	55,62
Log P _{o/w}	0,69	0,98	1,94
Farmakokinetika			
GI apsorpcija	++	++	++
BBB permeant	+	+	+
P-gp supstrat	-	-	-
CYP1A2 inhibitor	-	-	+
CYP2C19 inhibitor	+	+	+
CYP2C9 inhibitor	-	-	-
CYP2D6 inhibitor	-	-	+
CYP3A4 inhibitor	-	-	+
log (K _p / cm s ⁻¹)	-6,41	-6,27	-5,47
Sličnost lekovima			
Broj „Lipinski“ prekršaja	0	0	0
Broj „Ghose“ prekršaja	0	0	0
Broj „Veber“ prekršaja	0	0	0
Broj „Egan“ prekršaja	0	0	0
Broj „Muegge“ prekršaja	0	0	0
Biološka dostupnost	0,55	0,55	0,55
Medicinska hemija			
Broj PAINS upozorenja	0	0	0
Sličnost vodećim jedinjenjima (1 prekršaj: MW > 350)	Ne	Ne	Ne
Sintetička dostupnost	3,64	3,69	3,92

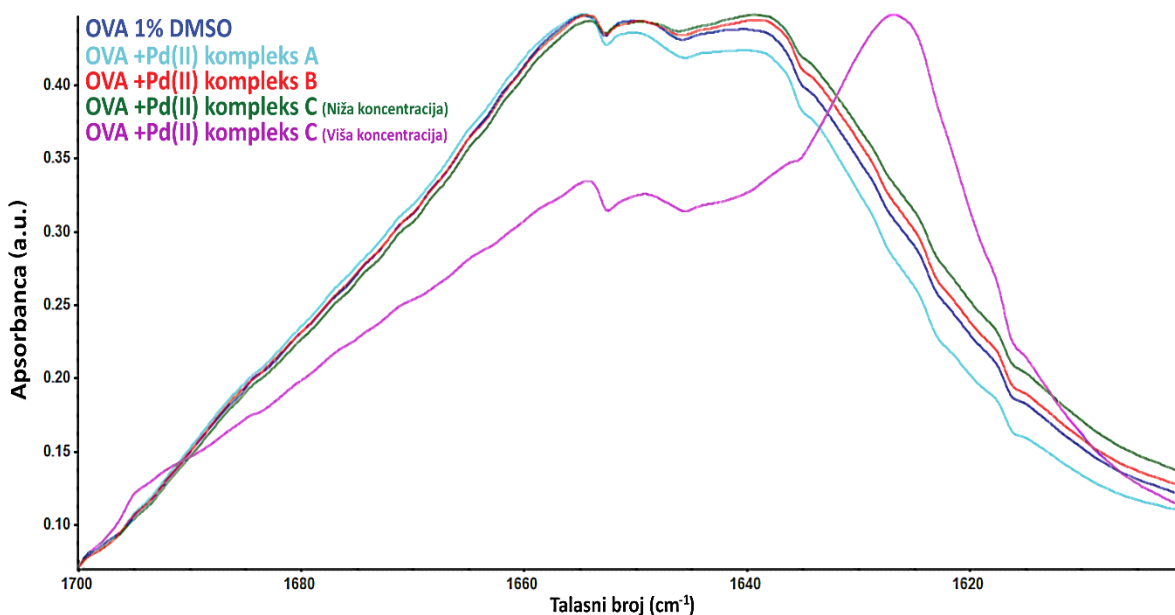
Sva analizirana jedinjenja su predviđeno lako apsorbovana u gastrointestinalnom (GI) sistemu, i određena jedinjenja ispoljavaju inhibitoru aktivnost prema izoformama citohrom P450 gena [Tabela 5.1.]. Takođe, relevantne strategije koje su primenjene za selekciju zadovoljavajućih profila za sličnosti lekovima korišćenjem SwissADME programa pokazuju da svi analizirani kompleksi poseduju odgovarajuće funkcionalne grupe i biološku dostupnost, čineći ih adekvatnim kandidatima za potencijalnu medicinsku primenu. Radi potvrđivanja prisustva željene aktivnosti, jedinjenja su analizirana ZINC PAINS identifikatorom i primenjeni algoritmi nisu registrovali analizirana jedinjenja kao potencijalne PAINS ili kovalentne inhibitore^{235,236}. Usled MW vrednosti preko 350 Da, analizirani kompleksi ne predstavljaju potencijalna vodeća jedinjenja, što je česta pojava u slučajevima ne-standardnih hemoterapeutika na bazi metala (engl. Metal-based chemotherapeutic, MBC).

Jedan od najznačajnijih faktora u proceni vijabilnosti određenih jedinjenja prilikom razvoja lekova predstavlja lipofilni karakter datih struktura. Ova karakteristika je često određena kao particioni koeficijent 1-oktanol/vode ($\log P_{o/w}$)²³⁷. Izračunata $\log P_{o/w}$ vrednost analiziranih kompleksa [Tabela 5.1.] predstavlja srednju vrednost pet računarskih modela²³⁸⁻²⁴¹. Od opisanih jedinjenja, organometalni kompleks Pd(II) C poseduje najveći lipofilni karakter, dok kompleks A poseduje najslabiji. Međutim, citotoksične aktivnosti ovih jedinjenja nisu ipak srazmerne sa njihovim lipofilnim karakterom. Kompleks A se prethodno pokazao kao snažniji izazivač apoptoze u odnosu na cisplatinu na ćelijskim linijama akutne monocitne leukemije (THP-1) i kancera dojke (MCF-7), dok kompleksi B i C nisu pokazali značajnu aktivnost, iako su posedovali izraženiji lipofilni karakter^{225,242}.

Pored lipofilnosti kao faktora za vijabilnost ispitivanih jedinjenja, ne-specifične protein-ligand interakcije takođe imaju značajnu ulogu prilikom razvoja terapeutika. Zbog toga, neophodno je razumeti stepen ovih interakcija, kao i njihov uticaj na konformaciju proteina za koje se vezuju. Ovalbumin simulira ispunjeno ćelijsko okruženje i ne uspostavlja specifične interakcije sa poznatim ligandima^{26,27}, usled čega predstavlja adekvatan model sistem za analizu nespecifičnih protein-ligand interakcija opisanih organometalnih kompleksa Pd(II).

5.2.2.6. FTIR analiza uticaja organometalnih kompleksa Pd(II) na konformaciju ovalbumina

Radi procene dejstva nespecifičnog vezivanja organometalnih kompleksa Pd(II) A-C na sekundarne strukture ovalbumina, izvedena je ATR-FTIR analiza uzoraka ovalbumina u 100 mM Tris puferu pH 7,4, sa 1% DMSO i različitim kompleksima Pd(II) u ekvimolarnim koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} vrednosti (organometalni kompleks: A – 50 μ M, B - 100 μ M, C – 100 μ M). Istovremeno, analiziran je uzorak ovalbumina sa organometalnim kompleksom C pri nižoj ekvimolarnoj koncentraciji od 50 μ M. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 5.20.



Slika 5.20. ATR-FTIR spektri Amidnog I regiona ovalbumina u prisustvu različitih organometalnih Pd(II) kompleksa u odnosu na kontrolu koja sadrži samo 1% DMSO.

Rezultati kvalitativne ATR-FTIR analize pokazuju da vezivanje Pd(II) kompleksa A i B za ovalbumin nije dramatično uticalo na konformaciju ovalbumina u odnosu na kontrolni uzorak [Slika 5.20.], što je dodatno potkrepljeno rezultatima kvantitativne analize raspodele sekundarnih struktura ovalbumina [Tabela 5.3.].

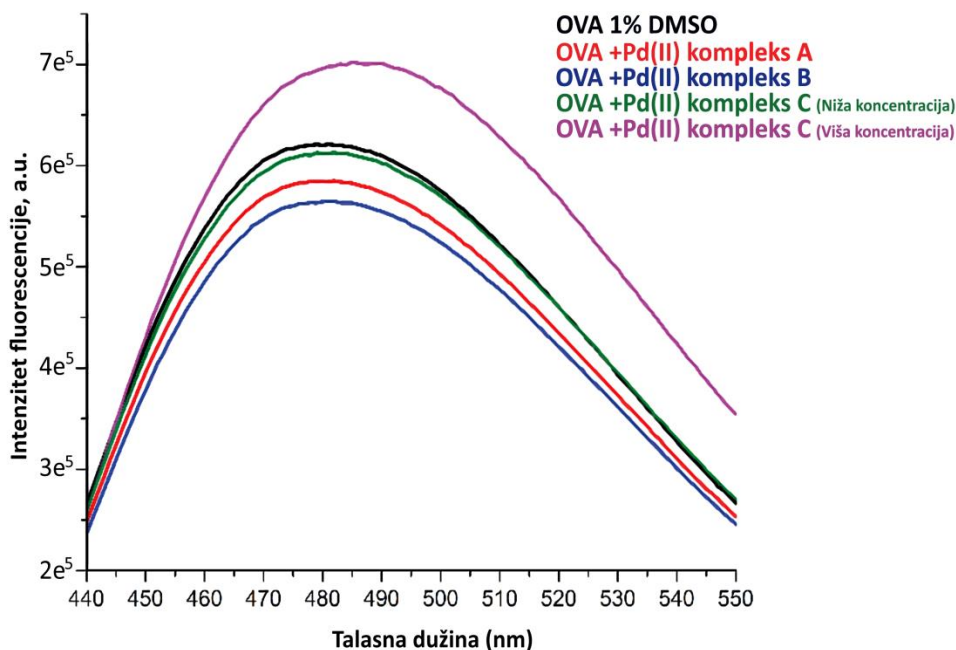
Tabela 5.3. Raspodela sekundarnih struktura u okviru ovalbumina u prisustvu ekvimolarnih koncentracija Pd(II) kompleksa, uz kontrolni rastvor ovalbumina sa 1% DMSO (udeo u ukupnoj strukturi polipeptidnog lanca, prikazan u procentima)

Ovalbumin	Udeo sekundarnih struktura (%)				
	β -pločice	Neuređene	α -heliksi	β -zavijuci	Greška
1% DMSO	36,7	30,3	25,0	8,0	1,2
+ Pd(II) kompleks A	34,8	31,5	25,3	8,4	1,5
+ Pd(II) kompleks B	34,2	30,2	27,0	8,6	1,4
+ Pd(II) kompleks C (niža koncentracija)	37,5	29,5	24,1	8,9	0,9
+ Pd(II) kompleks C (viša koncentracija)	51,8	19,9	20,1	8,2	1,7

Za razliku od uzoraka ovalbumina koji sadrže komplekse A i B, u slučaju uzoraka ovalbumina sa kompleksom C se može uočiti favorizovana konverzija sekundarnih struktura u β -pločice. Step konverzije je zanemarljiv u slučaju uzorka ovalbumina sa nižim ekvimolarnim koncentracijama kompleksa C od 50 μ M [Tabela 5.3.]. Međutim, dvostrukim povećanjem koncentracije i ovalbumina i Pd(II) kompleksa (100 μ M), dolazi do značajnog skoka u stepenu konverzije sekundarnih struktura u oblik intermolekulskih β -pločica (1625 i 1695 cm^{-1}) [Slika 5.20.], na uštrb sekundarnih struktura koje su karakteristične za nativnu konformaciju ovalbumina^{211,218,220}. Opisana pojava pikova karakterističnih za intermolekulske β -pločice ukazuje da povećanje koncentracije Pd(II) kompleksa indukuje denaturaciju i naknadnu agregaciju ovalbumina^{211,219}. Dobijeni rezultati su neiznenađujući, uzimajući u obzir znatno slabiji lipofilni karakter kompleksa A i B u odnosu na kompleks C [Tabela 5.1.].

5.2.2.7. Analiza hidrofobnih interakcija kompleksa Pd(II) sa ovalbuminom ANS spektrofotometrijom

Kako je vezivanje organometalnih kompleksa Pd(II) imalo izvestan broj varirajućih efekata na nativnu strukturu ovalbumina, bilo je neophodno odrediti stepen izloženosti nepolarnih regiona ovalbumina u njihovom prisustvu. Radi određivanja stepena hidrofobnih interakcija između organometalnih kompleksa Pd(II) i izloženih, nepolarnih regiona ovalbumina, izvedena je spektrofotometrijska analiza uzoraka primenom ANS probe. Rezultati analize su prikazani na slici 5.21.



Slika 5.21. – Uticaj nespecifičnog vezivanja prisutnih organometalnih kompleksa Pd(II) za ovalbumin na ANS fluorescenciju.

Na osnovu dobijenih rezultata [Slika 5.21.] se može uočiti blagi pad u intenzitetu ANS fluorescencije u slučajevima uzoraka ovalbumina koji sadrže ekvimolarne koncentracije organometalnih kompleksa Pd(II) A i B. Kako prethodni rezultati ATR-FTIR analize nisu pokazali nastanak agregata ovalbumina u prisustvu ovih kompleksa [Slika 5.20.], opisani pad u intenzitetu fluorescencije sugerise nespecifično, reverzibilno vezivanje kompleksa A i B za izložene, hidrofobne regione na površini ovalbumina. Usled ovih slabih hidrofobnih interakcija, dolazi do nemogućnosti vezivanja ANS probe za površinske, hidrofobne regione ovalbumina. Direktni rezultat ovih protein-ligand interakcija jeste niži intenzitet ANS fluorescencije u odnosu na uzorak ovalbumina koji ne sadrži organometalne komplekse Pd(II), što nije neuobičajena pojava^{243,244}. Opisani pad u intenzitetu ANS fluorescencije dodatno potkrepljuje rezultate ATR-FTIR analize [Tabela 3], ukazujući na to da ne dolazi do narušavanja native konformacije ovalbumina.

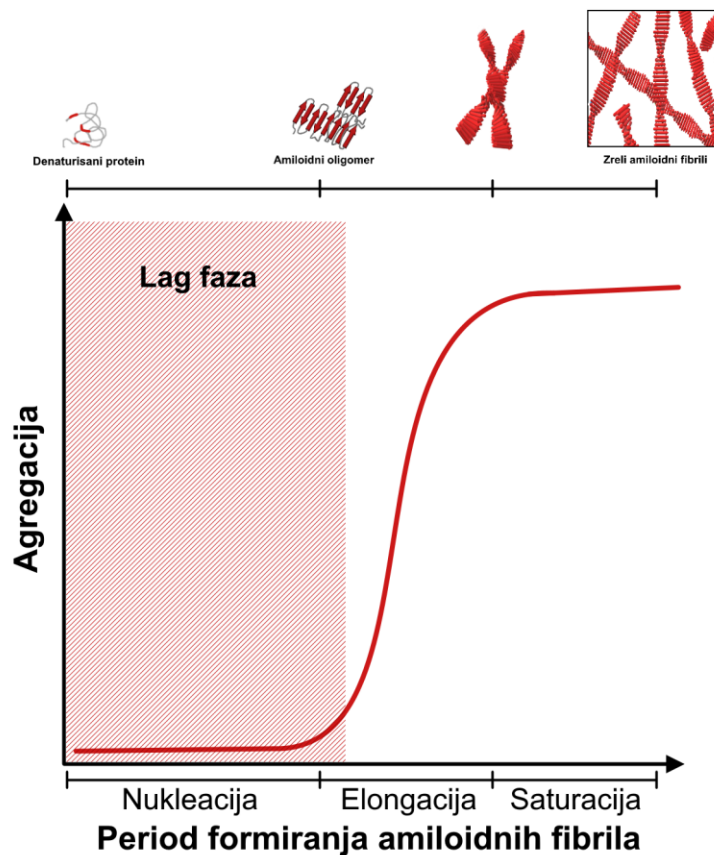
Nasuprot tome, vezivanje organometalnog kompleksa Pd(II) C je značajno uticalo na stepen izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina [Slika 5.21.]. U slučaju uzorka ovalbumina i kompleksa C niže ekvimolarne koncentracije nije došlo do primetnog pada u intenzitetu ANS fluorescencije u odnosu na kontrolni uzorak, što ukazuje na to da ne dolazi do formiranja interferirajućih, slabih hidrofobnih interakcija između datog kompleksa i izloženih, nepolarnih regiona ovalbumina. Međutim, u uzorku ovalbumina i kompleksa C sa dvostruko većom koncentracijom se može uočiti drastičan skok u intenzitetu fluorescenije. Ovaj značajan porast u intenzitetu fluorescencije sugerise izraženi stepen konformacionih prelaza i denaturacije ovalbumina koja je indukovana od strane direktnog vezivanja kompleksa C za hidrofobno jezgro, što je u skladu sa prethodno-opisanim rezultatima dobijenim ATR-FTIR analizom [Slika 5.20.].

6. DISKUSIJA

Ovalbumin, kao proteinski model sistem, je izabran usled niza pozitivnih karakteristika. Prvobitno, izražena zastupljenost ovalbumina u svom prirodnom izvoru, belancetu kokošnjih jaja (*Gallus gallus*), omogućava brzo i jednostavno prečišćavanje proteina primenom precipitacionih tehnika. Ovalbumin je izolovan primenom prethodno publikovane taložne metode²¹¹, sa krajnjim stepenom homogenosti od okvirno 80% i relativno visokim prinosom. Pored visoke raspoloživosti ovog proteinskog model sistema, ovalbumin predstavlja adekvatan model sistem za analizu nespecifičnih protein-ligand interakcija, imajući u obzir da ovalbumin ne poseduje poznate prirodne ligande. Istovremeno, sa ovog aspekta, ovalbumin simulira ispunjeno ćelijsko okruženje^{26,27}. Usled toga, efekti ispoljeni na konformaciju ovalbumina od strane nespecifično-vezanih liganada predstavljaju skoro univerzalne fenomene za bilo koju proteinsku strukturu.

Glavni cilj ove disertacije je konkretno razjašnjenje efekata liganada na konformacione prelaze izabranog model sistema, sa fokusom na uticaj jona teških metala Pb(II) i Cd(II), kao i odgovarajućih organometalnih kompleksa Cd(II) i Pd(II) na agregacione procese ovalbumina. U ovu svrhu su izvedene komparativne analize uticaja datih liganada na inicijalnu destabilizaciju native konformacije ovalbumina, kao i tokom perioda termalne inkubacije.

Kako je dokazano u izvesnom broju studija^{113,217,245} da ovalbumin redovno formira amiloidne fibrile, kao i da sadrži izvestan broj amiloidogenih peptida u svojoj strukturi od strane Tanake i ko-autora²¹⁷ i Lare i ko-autora¹¹³ [Slika 5.6.], ovalbumin predstavlja adekvatan model sistem za analizu faktora koji utiču na fibrilacione procese proteina. Iako je amiloidna konverzija univerzalna karakteristika svih polipeptida^{86,118,175,246}, kao model sistem za analizu fibrilacionih procesa je izabran ovalbumin usled nekoliko značajnih faktora. Prvobitno, sam proces fibrilacije ovalbumina je adekvatno proučen u literaturi^{113,205,217}, što omogućava primenu optimizovanih protokola za formiranje amiloidnih fibrila ovalbumina. Drugo, uslovi koji favorizuju formiranje amiloidnih fibrila, poput niskih pH vrednosti, izazivaju inicijalnu destabilizaciju ovalbumina i nastanak stabilnih intermedijera, odnosno stopljene globule^{204,226,247}. Konformacioni prelazi izazvani ovom destabilizacijom dodatno pospešuju konverziju ovalbumina u amiloidni oblik, usled olakšanog formiranja fibrilacionog nukleusa [Slika 1.7.]. Proces formiranja ovog nukleusa je drastično ubrzan zagrevanjem na 90 °C, pri čemu dolazi do degradacije ovalbumina i oslobađanja polipeptidnih fragmenata, uključujući oslobađanje opisanih amiloidogenih peptida sa visokom tendencijom formiranja intermolekulskih β -pločica^{113,217}. Kombinacija faktora nastanka stopljene globule u kiseloj sredini zajedno sa fragmentacijom ovalbumina izazvanom naknadnim zagrevanjem na 90 °C dovodi do nestanka standardne lag faze koja je karakteristična tokom formiranja amiloidnih fibrila, čiji je direktan rezultat izuzetno brz proces fibrilacije [Slika 6.1.]^{114,213,248}. Ovaj fenomen je dodatno demonstriran kinetičkim ThT esejom ovalbumina tokom inkubacionog perioda od 72 h [Slika 5.4.], čineći ga idealnim model sistemom za svrsishodno proučavanje faktora koji utiču na same procese fibrilacije proteina.



Slika 6.1. – Standardna sigmoidna kriva koja prikazuje celokupan proces formiranja amiloidnih fibrila, uz karakterističnu lag fazu tokom perioda nukleacije koja izostaje prilikom izuzetno brze fibrilacije ovalbumina.

Konkretno, jedan od glavnih faktora koji su proučavani u ovoj studiji je uticaj prisustva jona teških metala, Pb(II) i Cd(II), na formiranje i elongaciju amiloidnih fibrila. Već je pokazano u različitim studijama da amiloidni fibrili predstavljaju osnovu za razvoj i propagaciju prionskih oboljenja^{8,86,132} i da čine jedne od mnogih faktora koji su često asocirani sa razvojem različitih neurodegenerativnih oboljenja poput Alchajmerove⁵, Parkinsonove⁶, i Hantingtonove bolesti⁷, uključujući različite tipove sistemskih amiloidoza². Kako su joni Pb(II) i Cd(II) često prisutni u depoima amiloidnih fibrila u okviru nervnih tkiva^{15–17}, neophodno je bolje razumevanje njihovog doprinosa tokom procesa fibrilacije, kao i njihovog generalnog uticaja na konformacione prelaze proteina.

Ovalbumin, kao brzo-fibrilišući model sistem^{114,213}, nakon odgovarajućeg perioda termalne inkubacije na 90 °C, je degradovan na odgovarajuće polipeptidne fragmente različitih molarnih masa koji se mogu uočiti na SDS PAG elektroforegramu u vidu nedefinisanih traka ispod ~10 kDa [Slika 5.2.]. Istovremeno, potpuni nestanak trake koja je karakteristična za nativnu formu ovalbumina (~45 kDa) sugerise da je, pored opisane fragmentacije, došlo do nastanka glomaznih agregata čije dimenzije su onemogućile prolazak kroz gel za koncentrovanje uzoraka. Prisustvo jona teških metala nije primetno uticalo na fragmentaciju ovalbumina, na osnovu rezultata prikazanih u SDS PAG elektroforegramu [Slika 5.2.].

Iako je poznato da je pod datim uslovima proces fibrilacije ovalbumina izuzetno brz^{114,213,248,249}, sami porasti u intenzitetu fluorescencije ThT nakon 24 h ne predstavljaju apsolutni indikator razvoja amiloidnih fibrila usled potencijalnih smetnji izazvanih od strane prisustva fibrilnih biomakromolekula poput DNK^{183,194,250}, ali i usled potencijalne promene kinetike fibrilacije u prisustvu liganada. Shodno tome, ThT esej je izveden nakon inkubacionog perioda od 72 h radi adekvatne kvantitativne estimacije nastanka amiloidnih struktura. Rezultati eseja su pokazali izuzetno pozitivan efekat prisustva jona teških metala na krajnji stepen fibrilacije ovalbumina [Slika 5.4.]. Konkretno, pozitivni efekat se može uočiti i u uzorcima ovalbumina koji sadrže najnižu koncentraciju pojedinačnih jona metala Pb(II) i Cd(II) (5 mg/L), prevazilazeći intenzitet fluorescencije koji je karakterističan za amiloidne fibrile koji su formirani bez prisustva jona teških metala. Ovaj efekat dostiže primetan plato u oba slučaja rastvora ovalbumina koji sadrže pojedinačne jone teških metala u koncentracijama od 25 mg/L jona Pb(II) ili Cd(II), bez značajnog daljeg porasta u uzorcima sa duplo većom koncentracijom ispitivanih jona (50 mg/L). Nasuprot tome, u slučaju rastvora ovalbumina koji je inkubiran u prisustvu jednakih koncentracija oba jona metala, plato nije dostignut. Ovo sugerise da dolazi do preferencijalnog vezivanja jona teških metala za različite regione ovalbumina^{193,214-216}. Dok dolazi do zasićenja ovih vezivnih mesta u uzorcima ovalbumina sa višim koncentracijama pojedinačnih jona metala, istovremeno vezivanje oba jona metala za ovalbumin je pokazalo sinergistički efekat na proces fibrilacije pri ukupnoj koncentraciji od 50 mg/L oba jona metala, dostižući skoro duplo veći intenzitet ThT fluorescencije [Slika 5.4.].

Teorijska analiza potencijalnih vezivnih mesta je potvrdila razlike u preferencijalnom vezivanju ovih jona. Konkretno, studije Jesu Jaya Sudan i ko-autora²¹⁴ su pokazale preferencijalnu koordinaciju Cd(II) za aminokiselinske ostatke glutamata i aspartata, uz slabiju koordinaciju za ostatke histidina i cisteina. Međutim, kako su ostaci histidina pod ispitivanim uslovima protonovani, usled niskih pH vrednosti, ne učestvuju u koordinaciji Cd(II). Samim tim, najčešći koordinacioni parovi predstavljaju Asp-Asp, Asp-Glu, Glu-Glu, Asp-His, His-His, i Asp-His²¹⁴ koji učestvuju kao donori elektrona. Kako ove aminokiseline poseduju atome kiseonika sa slobodnim elektronskim parovima u okviru svojih aminokiselinskih ostataka, protonovanje aminokiselinskih ostataka ne bi trebalo da dramatično utiče na njihovu sposobnost da koordinuju jone Cd(II) [Slika 5.6.]. Softverska analiza za određivanje vijabilnosti vezivanja jona Cd(II) za ovalbumin je predvidela region za koordinaciju između aminokiselinskih ostataka na pozicijama 200, 201, 202, i 342 jednog lanca, zajedno sa ostatkom na poziciji 155 drugog, pokazujući da vezivanje Cd(II) favorizuje formiranje oligomera ovalbumina [Slika 5.7.].

S druge strane, u literaturi je opisano preferencijalno vezivanje Pb(II) za trigonalno raspoređene ostatke cisteina, uz potencijalno proširenje koordinacione sfere oko jona Pb(II) (KB = 6), u zavisnosti od dostupnosti cisteinskih ostataka susednih polipeptidnih lanaca^{215,216}. Kako ovalbumin poseduje šest ostataka cisteina, od kojih dva učestvuju u formiranju jednog disulfidnog mosta između pozicija 74 i 121, postoji izvestan broj slobodnih pozicija za koordinaciju Pb(II) jona. Softverska analiza vijabilnosti vezivanja Pb(II) za ovalbumin je takođe pokazala adekvatnu poziciju za koordinaciju sa trigonalnim rasporedom tri atoma sumpora u okviru cisteina na pozicijama 34, 54, i 373 u okviru jednog polipeptidnog lanca. Rezultati softverske analize su pokazali da je proširenje koordinacione sfere (KB = 6) istovremeno moguće, a uključuje vezivanje Pb(II) za ostatke cisteina dva susedna

polipeptidna lanca ovalbumina. Na ovaj način takođe dolazi do oligomerizacije ovalbumina [Slika 5.7.].

Iako je prisutan izvestan broj vezivnih mesta za jone Pb(II) i Cd(II) u okviru ovalbumina, regioni vezivanja se uveliko ne nalaze u okviru amiloidogenih peptida koji su predviđeni od strane Tanake i ko-autora²¹⁷ i Lare i ko-autora¹¹³. Ovo sugerise da se ispitivani joni uveliko koordinuju za neuređene aminokiselinske lance koji ne učestvuju u direktnom formiranju amiloidnog nukleusa pri fragmentaciji ovalbumina, već da je njihov potencijalni doprinos fibrilacionom procesu ovalbumina rezultat pospešene reorijentacije fragmenata prilikom elongacije amiloidnih fibrila.

Istovremeno, pokazano je da, na osnovu opisanih pozicija vezujućih aminokiselinskih ostataka, same pozicije vezivnih mesta ovih jona se razlikuju u okviru celokupne, trodimenzionalne strukture ovalbumina. Konkretno, koordinativna mesta za Pb(II) jone su bliža amiloidogenim peptidima [Slika 5.6.]^{113,217}, i nalaze se delimično u hidrofobnom jezgru ovalbumina, dok se koordinativna mesta Cd(II) nalaze uglavnom na površini ovalbumina. Ovo sugerise da koordinacija ovih jona, naročito Pb(II), ima destabilišući efekat na nativnu konformaciju ovalbumina prilikom formiranja koordinativno-vezanih oligomera, što je dokazano ANS esejom [Slika 5.8]. Kako intenzitet fluorescencije ANS kao probe raste sa njenim prelaskom u nepolarnije okruženje, ANS se favorizovano vezuje za izložene, hidrofobne regione proteina, pri čemu značajno fluorescira^{192,219}. Samim tim, konformacioni prelazi koji dovode do izlaganja nepolarnih regiona proteina će izazvati porast u intenzitetu ANS fluorescencije, poput prelaza u stanje stopljene globule^{204,251}. Ovo se može konkretno uočiti u slučaju neinkubiranih uzoraka ovalbumina sa rastućim koncentracijama jona teških metala, u odnosu na uzorak ovalbumina koji ne sadrži jone metala [Slika 5.8A]. Iako pri datim uslovima dolazi do prelaza ovalbumina iz nativne forme u stanje stopljene globule²⁰⁴, opisani rezultati pokazuju da prisustvo jona teških metala izaziva dodatnu destabilizaciju koja je statistički srazmerna koncentraciji prisutnih jona metala. Kako su koordinacioni regioni Pb(II) uveliko u okviru hidrofobnog jezgra ovalbumina, samo vezivanje ovih jona neiznenađujuće narušava nativnu formu proteina, što objašnjava izraženiji intenzitet ANS fluorescencije u uzorcima sa višom koncentracijom metala²⁵². Međutim, nakon perioda inkubiranja od 72 h, može se uočiti obrnuta pojava [Slika 5.8B]. Konkretna pad u intenzitetu ANS fluorescencije uzoraka ovalbumina koji sadrže jone teških metala u odnosu na ovalbumin koji je inkubiran bez prisutnih jona sugerise da dolazi do formiranja koordinativno-vezanih klastera ovalbumina koji nastaju pomoću hidrofobnih interakcija, time sprečavajući vezivanje ANS probe. Slična zapažanja su izneta od strane Khan-a i saradnika tokom strukturne analize interakcija jona teških metala sa cistatinom²⁵³, takođe pokazujući da vezivanje ovih jona indukuje formiranje visoko-uređenih agregata sa niskim stepenom izloženosti hidrofobnih regiona. Iako je prethodno objavljeno da, prilikom fibrilacije ovalbumina, dolazi do izrazitog skoka u intenzitetu ANS fluorescencije²⁴⁵, sam pad u intenzitetu fluorescencije nije apsolutno iznenađujuć fenomen. Generalno, tokom procesa fibrilacije pod ispitivanim uslovima, dolazi do postepenog pada u intenzitetu ANS fluorescencije tokom perioda termalne inkubacije^{254,255}. Ovo ukazuje da vremenom dolazi do prirodne, hidrofobne stabilizacije zrelih fibrila, koja je prividno pospešena prisustvom rastućih koncentracija jona Pb(II) i Cd(II) [Slika 5.8B]. Istovremeno, sam stepen fibrilacije ovalbumina je drastično favorizovan u prisustvu jona teških metala, imajući u obzir pozitivan efekat rastućih koncentracija istih koji je prikazan ThT esejom [Slika 5.5.].

Konformacioni prelazi ovalbumina u prisustvu jona teških metala su takođe analizirani infracrvenom spektroskopijom. Konkretno, izvedene su kvalitativne i kvantitativne analize Amidnog I regiona [Slike 5.9., 5.10., i 5.11.] koji predstavlja deo srednjeg IR regiona od 1600-1700 cm^{-1} . Kako su promene u okviru ovog regiona najosetljivije na promene sekundarnih struktura proteina, on predstavlja idealan opseg za praćenje samih konformacionih prelaza ovalbumina^{185,186}. Intenziteti i položaji traka koji se mogu primetiti u okviru Amidnog I regiona su predominantno određeni promenama istežućih vibracija C=O veza u okviru polipeptidne kičme, uz slabije doprinose od strane N-H uvijanja i vibracija C-CN veza¹⁸⁵. Kako su već ustanovljene pozicije pikova koje odgovaraju specifičnim sekundarnim strukturama u okviru proteina¹⁸⁷, analiza Amidnog I regiona IR spektara omogućava detaljniju procenu samih konformacionih prelaza izazvanih od strane jona Pb(II) i Cd(II).

Značajne promene u sadržaju sekundarnih struktura se mogu uočiti upoređivanjem IR spektara Amidnog I regiona nativnog ovalbumina sa spektrom ovalbumina koji je inkubiran 72 h u kiselj sredini na povišenoj temperaturi [Slika 5.9.]. Dobijeni spektri pokazuju karakterističan skok u intenzitetima apsorpcije pikova na talasnim brojevima od 1695 cm^{-1} i ~1628 cm^{-1} koji odgovaraju strukturi intermolekulske, odnosno agregacione β -pločice^{113,183}. Pojava i porast u intenzitetu ovih pikova se dešava na uštrb intenziteta apsorpcije pikova koji odgovaraju sekundarnim strukturama karakterističnih za nativnu konformaciju proteina. Konkretno, pikovi karakteristični za strukture α -heliksa^{185,218} (~1653 cm^{-1}), nativne β -pločice (~1635 cm^{-1})^{185,187}, kao i neuređenog niza (~1647 cm^{-1}) i generalno neuređenih proteinskih struktura (1662-1675 cm^{-1})^{185,187,218-220} istovremeno opadaju u intenzitetu. Ova pojava se može uočiti u svim uzorcima ovalbumina koji su inkubirani 72 h na 90 °C u kiselj sredini [Slika 5.10], naročito u slučajevima uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustu rastućih koncentracija Pb(II) i Cd(II). Prethodno opisani stepen koverzije nativnih sekundarnih struktura u strukturu intermolekulske β -pločice postaje znatno izraženiji sa porastom koncentracije prisutnih jona metala u svim uzorcima, sa prividno najvećim efektom ispoljenim od strane kombinovanih jona Pb(II) i Cd(II) [Slika 5.10C]. Prikazani stepen konverzije je u direktnom skladu sa dobijenim rezultatima ThT eseja, i dodatno nagoveštava postojanje sinergističkog efekta ispoljenog od strane kombinovanog vezivanja Pb(II) i Cd(II) jona [Slika 5.5.]. Istovremeno, pored pada u intenzitetu traka koje su karakteristične za sekundarne strukture nativnog ovalbumina, može se uočiti pomeranje pika intermolekulske β -pločice na ~1625 cm^{-1} ka nižim vrednostima talasnog broja. Ovo pomeranje je srazmerno sa koncentracijom prisutnih jona metala, i najizraženije je u slučaju uzorka ovalbumina koji sadrži jednake koncentracije i Pb(II) i Cd(II) jona [Slika 5.10C]. Identičan fenomen je opisan u literaturi u slučaju fibrilacije ovalbumina²²¹, kao i tokom fibrilacije lizozima iz belanceta¹²⁷, pri čemu je naznačeno da sam stepen promene pozicije opisanog pika ka nižim vrednostima je indikator formiranja kompleksnijih amiloidnih struktura i agregata. Ovo objašnjenje je isto u skladu sa rezultatima dobijenim ANS esejom [Slika 5.8B], koji je pokazao da stepen hidrofobne agregacije nastalih struktura dodatno raste sa povećanjem koncentracije jona teških metala i najizraženiji je u slučaju uzoraka ovalbumina koji sadrže oba tipa jona teških metala.

Radi adekvatnog određivanja doprinosa inicijalne destabilizacije ovalbumina od strane vezanih jona metala na formiranje amiloidnih struktura, bilo je neophodno precizno određivanje pozicija ispitivanih pikova pomoću drugog izvoda dobijenih IR spektara. Pomoću dobijenih vrednosti intenziteta apsorpcije specifičnih pikova Amidnog I regiona, koji su normalizovani u odnosu na intenzitet pika ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) u okviru Amidnog II regiona kao internog standarda, omogućeno je kvantitativno određivanje tendencije ispitivanih struktura da se konvertuju u amiloidni oblik ^{211,219}. Kvantitativna procena formiranja intermolekulskih β -pločica je takođe pokazala da inicijalna destabilizacija ovalbumina izazvana vezivanjem jona metala i nije imala značajan efekat na fibrilaciju ovalbumina [Slika 5.11.]. Ovi rezultati dodatno sugerišu da se pozitivni efekat prisutnih jona ispoljava tokom procesa elongacije amiloidnih fibrila, potencijalno u vidu reorijentacije polipeptidnih fragmenata ovalbumina nastalih tokom perioda termalne inkubacije ^{213,256}.

Pozitivan efekat prisutnih jona teških metala na agregaciju se dodatno može primetiti na osnovu rezultata DLS metode [Slika 5.12A]. Hidrodinamički dijometri formiranih agregata su varirali u opsegu od 60-70 nm u uzorcima koji su inkubirani bez prisutnih jona metala, kao i u svim uzorcima sa 5 mg/L jona teških metala. Ovaj skoro desetostruki porast, u poređenju sa hidrodinamičkim dijametrom nativnog ovalbumina od $\sim 5,7\text{ nm}$ ²²², dodatno raste sa daljem povećanjem koncentracije prisutnih jona teških metala. Ovaj porast, iako značajan, je relativno najslabije izražen u slučaju uzorka ovalbumina koji sadrži samo 50 mg/L Pb(II) jona [Slika 5.12A], što je u skladu sa stepenom agregacije koji je prethodno opisan padom u intenzitetu ANS fluorescencije [Slika 5.8B]. Nasuprot tome, agregati koji su formirani u prisustvu jednakih koncentracija Pb(II) i Cd(II) su dostigli hidrodinamičke dijetre od preko 120 nm [Slika 5.12A]. Opisani, dvostruki porast u dimenziji nastalih agregata, u odnosu na standardne fibrile koji su formirani u uzorcima ovalbumina bez prisutnih jona metala, dodatno ukazuje na postojanje pozitivnog, sinergističkog efekta ispoljenog kombinovanom koordinacijom Pb(II) i Cd(II) za ovalbumin, i u direktnom je skladu sa svim do sada prikazanim rezultatima u ovoj disertaciji [Slike 5.10C, 5.8B, i 5.5.].

Pored izrazitog uticaja koordinovanih jona teških metala na fibrilaciju i dimenzije naknadno formiranih amiloidnih agregata, vezivanje ovih jona je takođe značajno uticalo na morfologiju istih. Snimci dobijeni AFM metodom pokazuju konkretan uticaj koordinacije datih jona u odnosu na amiloidne fibrile koji su formirani u uzorku ovalbumina bez prisutnih jona metala [Slika 5.13.]. Prvobitno, u konkretnom slučaju uzorka ovalbumina koji je inkubiran bez dodatka jona teških metala, prisutne su fibrilne strukture sa dužinom od preko 100 nm i dijametrom od okvirno 14 nm, bez izrazitog stepena razgranatosti. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima ²¹³ i, nasuprot tome, u slučajevima uzoraka ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu niskih koncentracija Pb(II) jona se može uočiti pojava amiloidnih fibrila sa razgranatom morfologijom. Ove razgranate strukture međusobno konvergiraju, formirajući vidljive klastere amiloidnih fibrila. Pojava ovih razgranatih fibrilnih struktura je potencijalni rezultat koordinacije jona Pb(II) za cisteinske ostatke dva polipeptidna lanca, ili peptidna fragmenta ^{215,216}. Kako se pozicije za vezivanje Pb(II) nalaze blizu tri različita amiloidogena peptida u okviru sekvence ovalbumina [Slika 5.6.] ^{113,217}, formiranjem kompleksa na ovaj način se direktno omogućava agregacija peptidnih fragmenata u većem broju pravaca. Međutim, pored razvoja opisane razgranate morfologije, dodatna posledica ovakvog načina koordinacije Pb(II) je istovremeno formiranje amorfnih agregata pri povišenim koncentracijama jona Pb(II), što se takođe može uočiti na AFM snimku uzorka

inkubiranog u prisustvu 50 mg/L Pb(II) jona [Slika 5.13.]. Formiranje amorfnih agregata je potencijalna posledica inicijalne destabilizacije ovalbumina izazvane koordinacijom Pb(II), koja je prethodno opisana ANS esejom [Slika 5.8A]. Nastanak amorfnih agregata takođe objašnjava blago slabiji pad u intenzitetu ANS fluorescencije u slučaju uzoraka ovalbumina inkubiranih u prisustvu jona Pb(II), koji se može uočiti nakon inkubacionog perioda od 72 h [Slika 5.8B]. Ovo je potencijalni rezultat vezivanja ANS probe za izloženije hidrofobne regione amorfnih agregata koji nisu zaklonjeni prilikom formiranja gustih, visoko-uređenih amiloidnih klastera, što se može alternativno primetiti u slučajevima uzoraka koji sadrže jone Cd(II) [Slika 5.13.].

Za razliku od amiloidnih fibrila formiranih u prisustvu Pb(II), amiloidni fibrili koji su nastali pod uticajem jona Cd(II) su приметно kraći i bez izraženo razgranate morfologije, što je prikazano na AFM snimku uzorka ovalbumina koji sadrži 5 mg/L Cd(II) jona [Slika 5.13.]. Kako se vezivna mesta za jone Cd(II) nalaze predominantno na hidrofilnoj površini ovalbumina [Slike 5.6. i 5.7.] i u blizini samo jednog amiloidogenog peptida u samoj sekvenci, njihovom koordinacijom je prividno omogućena neporemećena hidrofobna asocijacija formiranih amiloidnih fibrila. Kao rezultat, dolazi do formiranja gusto-pakovanih depoa, odnosno klastera, amiloidnih fibrila koji se mogu uočiti u svim uzorcima ovalbumina koji su inkubirani u prisustvu Cd(II) [Slika 5.13]. Dimenzije formiranih klastera su takođe direktno srazmerne sa koncentracijom prisutnih jona, i najizraženije su u uzorku ovalbumina sa 50 mg/L Cd(II) jona kao i u uzorku sa ukupno 50 mg/L kombinovanih jona Pb(II) i Cd(II), što je u skladu sa rezultatima DLS analize [Slika 5.12.].

Iako inicijalna destabilizacija ovalbumina koja je pospešena vezivanjem jona Pb(II) i Cd(II) nije direktno uticala na strukturnu konverziju ovalbumina u amiloidnu formu [Slike 5.10 i 5.11], fragmentaciju [Slika 5.2.], i naknadnu fibrilaciju [Slika 5.5.] pri povišenim temperaturama, postoji mogućnost da je samo formiranje koordinativno-vezanih klastera potencijalno izazvalo povećanje u koncentraciji amiloidogenih peptida na lokalnom nivou. Ovi peptidi su naknadno oslobođeni fragmentacijom ovalbumina izazvanim periodom termalne inkubacije u kiselim uslovima [Slika 6.2.]. U literaturi je takođe pokazano da ovakvo povećanje koncentracije proteina do 12,8 mg/mL istovremeno povećava verovatnoću formiranja amiloidnih fibrila²¹³. Slični efekti dejstva jona teških metala su takođe primećeni prilikom amiloidne agregacije sinukleina²⁵⁷ i tau proteina¹²³.

U poređenju sa efektom koordinacije slobodnih jona Cd(II), vezivanje organometalnih kompleksa Cd(II) je imalo приметно različito dejstvo na konformaciju ovalbumina. Za razliku od uticaja različitih koncentracija slobodnih jona teških metala [Slika 5.8.], prisustvo rastućih koncentracija organometalnih kompleksa 1 i 2 nije pokazalo izraženi, inicijalno-destabilizujući efekat na nativnu konformaciju ovalbumina pod sličnim uslovima [Slika 5.16A]. Međutim, upoređivanjem rezultata inicijalne destabilizacije ovalbumina pri neutralnom pH [Slika 5.16B] sa rezultatima destabilizacije pri pH 2 [Slika 5.16A] može uočiti se drastičan porast u destabilizaciji ovalbumina, čak i pre samog perioda termalne inkubacije. Mogući razlog je povećanje destabilizujućeg dejstva od strane 1% DMSO pod uslovima koji favorizuju formiranje stopljene globule^{204,226,247}, u odnosu na uslove neutralnih pH vrednosti, pri kojima je nativna konformacija ovalbumina stabilna u prisustvu 1% DMSO^{227,229,232}.

Termalnom inkubacijom uzoraka ovalbumina, opisani efekat postaje znatno izraženiji [Slika 5.17], naročito u slučajevima uzoraka koji su inkubirani pri pH 2. Međutim, relativan pad u intenzitetu ThT fluorescencije u uzorcima sa rastućim koncentracijama oba organometalna kompleksa Cd(II), u odnosu na uzorke ovalbumina koji su inkubirani samo u prisustvu 1% DMSO, pokazuje da prisutni kompleksi negativno utiču na fibrilaciju ovalbumina bez obzira na pH vrednost sredine. Ovaj negativan efekat je direktno srazmeran sa koncentracijom prisutnih organometalnih kompleksa, ukazujući da vezivanje ispitivanih kompleksa favorizuje formiranje amorfnih agregata, dok je inicijalni, izraženi porast u intenzitetu ThT fluorescencije prividno rezultat pojačanog destabilizujućeg dejstva 1% DMSO prilikom zagrevanja [Prilog 1]^{231,232}. Ovaj dramatičan skok u ThT fluorescenciji ukazuje na formiranje ponavljajućih sekvenci intermolekulskih β -pločica¹⁹⁴, što se takođe može uočiti u rezultatima FTIR analize sekundarnih struktura ovalbumina pri rastućim koncentracijama DMSO [Slika 5.14. i tabela 5.2.] Slični fenomeni konverzije sekundarnih struktura izazvani od strane DMSO su takođe opisani u literaturi. Konkretno, prikazano je u različitim studijama da rastuće koncentracije DMSO, u zavisnosti od stabilnosti prisutnih proteinskih struktura^{227-230,232}, mogu uticati na biohemijske karakteristike proteina i njihovih interakcija. Prisustvo DMSO ima sposobnost narušavanja samih interakcija između proteina i vode, smanjujući celokupnu solubilnost proteinskih struktura [Prilog 2]²³¹. Opisani trendovi konverzije α -heliksa u intermolekulske β -pločice [Slika 5.14.] su takođe objavljeni u različitim studijama, u kojima je pretpostavljeno da DMSO funkcioniše kao ligand za hidrofobne regione proteina i čije vezivanje pri višim koncentracijama indukuje opisane konformacione prelaze^{223,232,258}.

Rezultati ANS esaja ovih uzoraka takođe pokazuju izraženiji stepen inicijalne destabilizacije neinkubiranih uzoraka pri prelasku iz neutralne sredine u kiselu [Slika 5.18]. Ova pojava je neiznenađujuća usled očekivanog formiranja stopljene globule pri nižim pH vrednostima^{204,226,247}. Međutim, daljim zagrevanjem uzoraka se može uočiti izraženiji efekat vezivanja kompleksa 2 Cd(II) za ovalbumin u kiseljoj sredini, pri čemu dolazi do pada u intenzitetu ANS fluorescencije koji je srazmeran sa koncentracijom prisutnog kompleksa [Slika 5.18A]. Sprečavanje vezivanja ANS probe ukazuje na izrazitu hidrofobnu asocijaciju polipeptidnih fragmenata u kiseljoj sredini koja je prividno pospešena vezivanjem ovog kompleksa u prisustvu 1% DMSO [Prilog 2]. Nasuprot tome, ovakav tip asocijacije nije приметan pri neutralnim pH vrednostima u slučaju uzorka ovalbumina sa prisutnim organometalnim kompleksom 2 [Slika 5.18B], gde se može uočiti destabilizujući efekat ispitivanog kompleksa izražen povećanjem izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina.

Svakako, u slučaju ovalbumina u primenjenom *in vitro* sistemu, dobijeni rezultati pokazuju da koncentracija DMSO od 1%, pri neutralnim pH vrednostima na sobnoj temperaturi, ne utiče negativno na nativnu konformaciju ovalbumina [Slike 5.14 i 5.16B], i stoga predstavlja adekvatnu koncentraciju za analizu uticaja organometalnih kompleksa na strukturne promene ovalbumina.

Prethodno-prikazani rezultati [Slike 5.16, 5.17 i 5.18.] adekvatno ilustruju potencijalno citotoksično dejstvo organometalnih kompleksa u vidu destabilišućih protein-ligand interakcija. Generalno, citotoksična dejstva organometalnih kompleksa, iako uveliko nepoželjna, mogu biti od značaja prilikom razvoja različitih tipova terapeutika. Konkretnan slučaj jednog hemoterapeutika na bazi metala jeste cis-diamindihlorplatina(II), odnosno cisplatine, koja je našla primenu u tretiranju različitih tipova tumora sa visokom efikasnošću¹⁸⁻²⁰. Pored ispoljene efikasnosti, cisplatina je ipak karakteristična po svojoj izraženoj nefrotoksičnosti^{18,21,22}, usled čega je došlo do razvoja novih tipova hemoterapeutika na bazi Pd(II)^{23,24}. Prilikom testiranja vijabilnosti potencijalnih hemoterapeutika na bazi metala, veći broj fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih faktora je uzet u obzir. Od ovih faktora, lipofilnost jedinjenja je najčešće direktno povezana sa antiproliferativnom aktivnošću usled povećanog stepena apsorpcije jedinjenja od strane ćelija²⁵.

U ovoj disertaciji je izvedena analiza protein-ligand interakcija tri organometalna kompleksa Pd(II) čija antiproliferativna aktivnost, međutim, nije bila u direktnoj korelaciji sa njihovom hidrofobnošću²²⁵. Konkretno, kompleks C Pd(II), koji je pokazao najviši stepen lipofilnosti [Tabela 5.1.] je istovremeno izrazio najslabiju antiproliferativnu aktivnost²²⁵. Nasuprot tome, Pd(II) kompleks A sa najslabijim lipofilnim karakterom se pokazao kao snažniji izazivač apoptoze u ispitivanim ćelijskim linijama^{225,242}. Usled ovih neočekivanih rezultata, sledi spekulacija da je gubitak u antiproliferativnoj aktivnosti ispitivanih organometalnih kompleksa rezultat ometajućih, nespecifičnih protein-ligand interakcija u ispunjenom ćelijskom okruženju. Ove konkretne interakcije su analizirane, kao i konformacioni prelazi koje indukuju. Dobijeni rezultati kvalitativne FTIR [Slika 5.20.] su pokazali da vezivanje kompleksa A i B, u ekvimolarnim koncentracijama koje odgovaraju njihovim IC₅₀ vrednostima, nisu značajno uticale na nativnu konformaciju ovalbumina. Međutim, vezivanje kompleksa C pri odgovarajućoj IC₅₀ vrednosti od 100 µM je imalo drastičan uticaj na sekundarne strukture ovalbumina, ukazujući na formiranje intermolekulskih, odnosno agregacionih β-pločica. Stepem prikazane β-konverzije prividno zavisi od koncentracije prisutnog organometalnog kompleksa C Pd(II), uzimajući u obzir izrazito slabije promene izazvane vezivanjem ovog kompleksa pri nižoj koncentraciji od 50 µM, na osnovu rezultata kvantitativne FTIR analize [Tabela 5.3.].

Svakako, povećanjem koncentracije ovalbumina i Pd(II) C kompleksa (100 µM) dolazi do značajnog skoka u stepenu konverzije sekundarnih struktura u oblik intermolekulskih β-pločica (1625 i 1695 cm⁻¹) [Slika 5.20.], na uštrb sekundarnih struktura koje su karakteristične za nativnu konformaciju ovalbumina^{211,218,220}. Opisana pojava pikova karakterističnih za intermolekulske β-pločice ukazuje da povećanje koncentracije Pd(II) kompleksa indukuje denaturaciju i naknadnu agregaciju ovalbumina^{211,219}. Kako je organometalni kompleks C karakteristično lipofilniji u odnosu na komplekse A i B [Tabela 5.1.], mogući razlog denaturacije ovalbumina je prodiranje kompleksa C u hidrofobno jezgro proteina, što je omogućeno pri povišenim koncentracijama (100 µM).

Istovremeno, zanemarljive promene u raspodeli sekundarnih struktura u slučaju uzoraka ovalbumina koji sadrže ekvimolarne koncentracije organometalnih kompleksa Pd(II) A i B [Tabela 5.3.] sugerišu da nije došlo do uspostavljanja hidrofobnih interakcija koje bi narušile hidrofobno jezgro i nativnu strukturu ovalbumina.

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ANS eseja istih uzoraka [Slika 5.21.]. Konkretno, blagi pad u intenzitetu ANS fluorescencije u slučajevima uzoraka ovalbumina koji sadrže ekvimolarne koncentracije organometalnih kompleksa Pd(II) A i B, zajedno sa rezultatima FTIR analize [Slika 5.20.], sugerise reverzibilno i nespecifično vezivanje ovih kompleksa za površinske, hidrofobne regione ovalbumine. Shodno tome, vezivanjem ovih kompleksa se prividno sprečava istovremeno vezivanje ANS probe, što izaziva primećeni pad u intenzitetu ANS fluorescencije u odnosu na uzorak ovalbumina koji ne sadrži organometalne komplekse Pd(II) [Slika 5.21.]^{243,244}. Ovaj pad u intenzitetu je takođe direktno srazmeran sa lipofilnim karakterom organometalnih kompleksa A i B [Tabela 5.1.], što ukazuje da veći stepen hidrofobnosti kompleksa potpomaže u formiranju slabih hidrofobnih interakcija sa izloženim, nepolarnim regionima ovalbumina. Kako su ove hidrofobne interakcije slabije, opisani kompleksi nisu u mogućnosti da prodru u hidrofobno jezgro ovalbumina, za razliku od organometalnog kompleksa C [Slika Tabela 5.1. i Slika 5.21.]. Istovremeno, rezultati raspodela sekundarnih struktura kvantitativne FTIR analize [Tabela 5.3] sugerišu da interakcijom ovih kompleksa sa ovalbuminom ne dolazi do destabilizacije i primetnog gubitka native konformacije.

S druge strane, vezivanje organometalnog kompleksa C Pd(II) je izazvalo značajan skok u intenzitetu ANS fluorescencije, u poređenju sa ostalim uzorcima ovalbumina [Slika 5.21.]. Porast u intenzitetu fluorescencije ukazuje da, pri koncentraciji od 100 μ M, organometalni kompleks C indukuje konformacione prelaze pri kojima dolazi do izlaganja nepolarnih regiona hidrofobnog jezgra ovalbumina. Kako ovaj organometalni kompleks poseduje najveći lipofilni karakter u poređenju sa ostalim ispitivanim kompleksima [Tabela 5.1.], dobijeni rezultati su neiznenađujući. Međutim, opisana koncentraciona zavisnost ovih konformacionih prelaza i povećane izloženosti hidrofobnih regiona ukazuje da dolazi do formiranja ovalbuminskih agregata usled interakcija sa kompleksom C [Slike 5.20. i 5.21.]. Ovakvo izlaganje nepolarnih regiona hidrofobnog jezgra je dobro dokumentovano kao dodatan indikator konformacionih prelaza i agregacije denaturisanih proteinskih struktura^{211,219,259}.

Dobijeni rezultati dobro pokazuju potencijalnu primenu ovalbumina kao model sistema za praćenje nespecifičnih protein-ligand interakcija potencijalnih terapeutika. Zajedno sa preračunom ADME parametara, eksperimentalno praćenje nespecifičnih protein-ligand interakcija ispitivanih terapeutika pri odgovarajućim IC₅₀ vrednostima predstavlja novi potencijalni parametar pri određivanju vijabilnosti novih medicinskih preparata i terapeutika, i može značajno pomoći u selekciji novih vodećih terapeutika.

7. ZAKLJUČCI

Glavni zaključak ove disertacije je da prisustvo slobodnih jona teških metala značajno favorizuje amiloidnu konverziju i depoziciju proteina, dok prisustvo organometalnih kompleksa favorizuje formiranje amorfnih agregata preko nespecifičnih, hidrofobnih interakcija. Opisani zaključak je izveden iz rezultata strukturnih studija ovalbumina izazvanih od strane vezivanja ispitivanih jedinjenja pod različitim uslovima.

1. Izolovanje ovalbumina i priprema uzoraka za proteinsku agregaciju

- a) Ovalbumin je uspešno prečišćen iz belanceta kokošjeg jajeta precipitacionom tehnikom, sa relativno visokim prinosom i čistoćom od okviro 80%.
- b) Uzorci ovalbumina su uspešno pripremljeni podešavanjem eksperimentalnih uslova poput pH vrednosti, prisustva odgovarajućeg ko-rastvarača, i adicijom odgovarajućih koncentracija jona Pb(II) i Cd(II) kao i organometalnih kompleksa Cd(II) i Pd(II).

2. Ispitivanje efekata jona na nativnu i/ili agregiranu strukturu proteina

Inicijalno destabilišući efekat prisustva različitih koncentracija jona teških metala, Pb(II) i Cd(II), je potvrđen ANS esejom. Stepent destabilizacije je konkretno kolerisan sa porastom u stepenu izloženosti hidrofobnih regiona ovalbumina prilikom prvobitnog vezivanja ispitivanih koncentracija jona teških metala, pre perioda termalne inkubacije. Rezultati ANS esej, nakon perioda termalne inkubacije, su pokazali izvestan pad u intenzitetu ANS fluorescencije, ukazujući na stepen hidrofobne agregacije koji je koncentraciono zavisao od prisutnih jona Pb(II) i Cd(II), ili odvojeno ili u kombinaciji. Agregacija je potvrđena prisustvom traka karakterističnih za intermolekulske, odnosno agregacione, β -pločice u okviru Amidnog I regiona IR spektara dobijenih strukturnom ATR-FTIR analizom.

3. Utvrđivanje prirode proteinskih agregata

Amiloidna priroda ovalbuminskih agregata formiranih u prisustvu jona Cd(II) i Pb(II) je potvrđena nizom eksperimentalnih rezultata:

- a) Porastom u intenzitetu ThT fluorescencije koji je direktno srazmeran sa koncentracijom prisutnih jona teških metala. Stepent fibrilacije prikazan ThT esejom je pokazao da je kombinacija jona teških metala jednakih koncentracija imala sinergistički, pozitivan efekat na formiranje amiloidnih fibrila, u odnosu na uzorke ovalbumina koji sadrže samo pojedinačne jone Pb(II) ili Cd(II).
- b) Strukturnom konverzijom nativnih sekundarnih struktura ovalbumina u strukture intermolekulskih β -pločica, dokazana ATR-FTIR metodom. Opisana konverzija je direktno srazmerna koncentraciji prisutnih jona teških metala. Stepent fibrilacije

je takođe korelisan sa pomerajem položaja pika intermolekulske β -pločice ($\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$) ka nižim vrednostima talasnog broja, dodatno pokazujući sinergistički efekat kombinovanih jona Pb(II) i Cd(II) na fibrilaciju ovalbumina.

- c) Prikazom prisutnih fibrilnih struktura različitih morfologija u AFM snimcima uzoraka ovalbumina. Prisustvo jona Pb(II) je izazvalo formiranje amiloidnih fibrila sa razgranatom morfologijom, dok je prisustvo jona Cd(II) izazvalo formiranje kratkih, nerazgranatih fibrila koji učestvuju u formiranju gusto pakovanih amiloidnih depoa.

Amorfna priroda ovalbuminskih agregata formiranih u prisustvu organometalnih kompleksa Cd(II) i Pd(II) je potvrđena:

- a) Padom u intenzitetu ThT fluorescencije u uzorcima ovalbumina inkubiranih u prisustvu organometalnih kompleksa Cd(II) u odnosu na kontrolni uzorak ovalbumina koji sadrži samo 1% DMSO.
- b) Prisustvom intermolekulskih β -pločica u infracrvenom spektru uzorka ovalbumina sa višom koncentracijom organometalnih kompleksa C Pd(II) i detekcijom hidrofobnih interakcija sa ovalbumin ANS esejom.

4. Određivanje preferencijalnih mesta vezivanja ispitivanih jona i liganada za ovalbumin

Uspešno su određene pozicije za preferencijalnu koordinaciju jona teških metala, Pb(II) i Cd(II), primenom domaćeg Piton softvera i teorijske analize na osnovu aminokiselinske sekvence ovalbumina:

- a) Pokazano je da se joni Pb(II) preferencijalno koordinuju za atome sumpora u okviru trigonalno raspoređenih cisteinskih bočnih ostataka jednog polipeptidnog lanca ovalbumina, formirajući komplekse. Potencijalno proširenje koordinacione sfere oko jona Pb(II) ($KB = 6$) uz učešće dva lanca ovalbumina je takođe potvrđeno i predstavlja mogući razlog za razgranatu morfologiju amiloidnih fibrila formiranih u prisustvu jona Pb(II).
- b) Pokazano je, na osnovu pozicija cisteinskih ostataka u sekvenci ovalbumina i rezultata *in-silico* analize, da se preferencijalna mesta vezivanja jona Pb(II) nalaze u okviru hidrofobnog regiona ovalbumina, u neposrednoj blizini teorijski određenih amiloidogenih peptida. Ovo objašnjava inicijalno destabilišući efekat vezivanja jona Pb(II), kao i prisustvo amornih agregata u AFM snimcima uzoraka ovalbumina koji sadrže jone Pb(II) usled parcijalno ometajućeg efekta vezivanja datih jona na formiranje stabilnog amiloidnog nukleusa.

- c) Pokazano je da se joni Cd(II) preferencijalno vezuju za aminokiselinske parove aspartata i glutamata. Vezivanje Cd(II) je omogućeno bez obzira na protonaciju bočnih ostataka usled prisustva slobodnih elektronskih parova u okviru atoma kiseonika samih aminokiselinskih ostataka aspartata i glutamata.
- d) Pokazano je, na osnovu rezultata *in-silico* analize, da se preferencijalna mesta za vezivanje jona Cd(II) nalaze uveliko na hidrofilnoj površini ovalbumina, omogućavajući formiranje gusto pakovanih amiloidnih agregata.

5. Diskriminacija uticaja metalnih jona i uticaja liganada kod organometalnih kompleksa na konformacione prelaze i potencijalnu agregaciju proteina

Komparativna analiza rezultata ANS i ThT eseja je pokazala da koordinacija jona teških metala Cd(II) drastično favorizuje formiranje amiloidnih fibrila, na osnovu koncentraciono zavisnog skoka u intenzitetu ThT fluorescencije, dok su rastuće koncentracije organometalnog kompleksa Cd(II) imale srazmerno negativan efekat na fibrilaciju ovalbumina. Pad u intenzitetu ANS fluorescencije u slučaju uzoraka ovalbumina sa višim koncentracijom Cd(II) jona ukazuje na formiranje gusto pakovanih agregata čija asocijacija sprečava vezivanje ANS proba, dok je jedino organometalni kompleks 2 Cd(II) izazvao statistički značajan pad u intenzitetu ANS fluorescencije. Opisani pad može biti rezultat hidrofobnih interakcija organometalnog kompleksa Cd(II) za izložene, nepolarne regione ovalbumina.

6. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika, lipofilnosti, i hidrofobnosti ispitivanih organometalnih kompleksa

Fizičko-hemijski i farmakokinetički parametri su uspešno određeni za organometalne komplekse Pd(II) A, B, i C primenom SwissADME programa. Određeni parametri su u skladu sa Lipinskijevim pravilima, izuzev viših vrednosti molarnih masa ispitivanih kompleksa.

7. Unapređenje metoda za praćenje nespecifičnog uticaja potencijalnih terapeutika na ćelijske proteine

Ovalbumin je uspešno primenjen kao model sistem za detekciju i analizu nespecifičnih protein-ligand interakcija organometalnih kompleksa Pd(II). Nedosledno niska antiproliferativna aktivnost izuzetno hidrofobnog organometalnog kompleksa C Pd(II) je objašnjena detekcijom hidrofobnih interakcija ispitivanog kompleksa pri odgovarajućoj IC₅₀ vrednosti sa ovalbuminom. Dobijeni rezultati pokazuju da praćenje nespecifičnih protein-ligand interakcija ispitivanih terapeutika za ovalbumin predstavlja pogodnu metodu i parametar za predviđanje novih, obećavajućih jedinjenja.

8. LITERATURA

1. Lumry, R. & Eyring, H. Conformation changes of proteins. *J. Phys. Chem.* **58**, 110–120 (1954).
2. Merlini, G. & Bellotti, V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* **349**, 583–596 (2003).
3. Gonzalez-Duarte, A. & Ulloa-Aguirre, A. A Brief Journey through Protein Misfolding in Transthyretin Amyloidosis (ATTR Amyloidosis). *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 at <https://doi.org/10.3390/ijms222313158> (2021).
4. Uversky, V. N., Talapatra, A., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Part I. Systemic amyloidoses. *Med. Sci. Monit.* **5**, 1001–1012 (1999).
5. Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annual Review of Biochemistry* vol. 66 385–407 at <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.385> (1997).
6. Petrou, M. *et al.* Amyloid deposition in Parkinson's disease and cognitive impairment: A systematic review. *Mov. Disord.* **30**, 928–935 (2015).
7. McGowan, D. P. *et al.* Amyloid-like inclusions in Huntington's disease. *Neuroscience* **100**, 677–680 (2000).
8. Collinge, J. Prion Diseases of Humans and Animals: Their Causes and Molecular Basis. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519–550 (2001).
9. Foegeding, E. A. & Davis, J. P. Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocoll.* **25**, 1853–1864 (2011).
10. Nicolai, T. & Durand, D. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* vol. 18 249–256 at <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.001> (2013).
11. Ramírez, J. A., Uresti, R. M., Velazquez, G. & Vazquez, M. Food hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products: A review. *Food Hydrocoll.* **25**, 1842–1852 (2011).
12. Huyst, A. M. R. *et al.* Influence of hydrophobic interfaces and shear on ovalbumin amyloid-like fibril formation in oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* **111**, 106327 (2021).
13. Jansens, K. J. A. *et al.* Rational Design of Amyloid-Like Fibrillary Structures for Tailoring Food Protein Techno-Functionality and Their Potential Health Implications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **18**, 84–105 (2019).

14. Martin, A. H., Grolle, K., Bos, M. A., Cohen Stuart, M. A. & Van Vliet, T. Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *J. Colloid Interface Sci.* **254**, 175–183 (2002).
15. Owen, M. C. *et al.* Effects of in vivo conditions on amyloid aggregation. *Chemical Society Reviews* vol. 48 3946–3996 at <https://doi.org/10.1039/c8cs00034d> (2019).
16. Notarachille, G., Arnesano, F., Calò, V. & Meleleo, D. Heavy metals toxicity: Effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1–42. Possible implications for Alzheimer's disease. *BioMetals* **27**, 371–388 (2014).
17. Syme, C. D. & Viles, J. H. Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (A β) of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1764**, 246–256 (2006).
18. Cheff, D. M. & Hall, M. D. A Drug of Such Damned Nature.1 Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research. *J. Med. Chem.* **60**, 4517–4532 (2017).
19. Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014).
20. Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E. & Oun, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalt. Trans.* **39**, 8113–8127 (2010).
21. Medici, S. *et al.* Noble metals in medicine: Latest advances. *Coord. Chem. Rev.* **284**, 329–350 (2015).
22. Johnstone, T. C., Suntharalingam, K. & Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **116**, 3436–3486 (2016).
23. Alam, M. N. & Huq, F. Comprehensive review on tumour active palladium compounds and structure–activity relationships. *Coord. Chem. Rev.* **316**, 36–67 (2016).
24. Kapdi, A. R. & Fairlamb, I. J. S. Anti-cancer palladium complexes: a focus on PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4751–4777 (2014).
25. Mendoza-Ferri, M. G. *et al.* Transferring the Concept of Multinuclearity to Ruthenium Complexes for Improvement of Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **52**, 916–925 (2009).
26. Li, J., Zhang, S. & Wang, C. Effects of Macromolecular Crowding on the Refolding of Glucose- 6-phosphate Dehydrogenase and Protein Disulfide Isomerase *. *J. Biol. Chem.* **276**, 34396–34401 (2001).
27. van den Berg, B., Ellis, R. J. & Dobson, C. M. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* **18**, 6927–6933 (1999).
28. Stryer, L. Protein structure and function. *Biochemistry* **3**, 15–42 (1995).
29. Branden, C. I. & Tooze, J. *Introduction to protein structure*. (Garland Science, 2012).

30. Sharp, P. A. & Eisenberg, D. The evolution of catalytic function. *Science* (80-.). **238**, 729–807 (1987).
31. Creighton, T. E. *Proteins: structures and molecular properties*. (Macmillan, 1993).
32. Srinivasan, R. & Rose, G. D. A physical basis for protein secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 14258–14263 (1999).
33. Gunasekaran, K., Ramakrishnan, C. & Balaram, P. Disallowed Ramachandran conformations of amino acid residues in protein structures. *J. Mol. Biol.* **264**, 191–198 (1996).
34. Cox, M. & Nelson, D. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Wh Freeman vol. 5 (2000).
35. Chakrabartty, A. & Baldwin, R. L. Stability of α -helices. *Adv. Protein Chem.* **46**, 141–176 (1995).
36. Scholtz, J. M. & Baldwin, R. L. The mechanism of alpha-helix formation by peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 95–118 (1992).
37. Kobayashi, K., Granja, J. R. & Ghadiri, M. R. β -Sheet peptide architecture: Measuring the relative stability of parallel vs. antiparallel β -sheets. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **34**, 95–98 (1995).
38. Efimov, A. V. Super-secondary structures and modeling of protein folds. *Protein Supersecondary Struct.* 177–189 (2013).
39. Fraser, R. D. B., MacRae, T. P. & Suzuki, E. Structure of the α -keratin microfibril. *J. Mol. Biol.* **108**, 435–452 (1976).
40. Ponting, C. P. & Russell, R. R. The natural history of protein domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 45–71 (2002).
41. Janin, J., Bahadur, R. P. & Chakrabarti, P. Protein–protein interaction and quaternary structure. *Q. Rev. Biophys.* **41**, 133–180 (2008).
42. Stirling, P. C., Lundin, V. F. & Leroux, M. R. Getting a grip on non-native proteins. *EMBO Rep.* **4**, 565–570 (2003).
43. Lee, C., Park, S.-H., Lee, M.-Y. & Yu, M.-H. Regulation of protein function by native metastability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 7727–7731 (2000).
44. Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M. & Gajiwala, K. Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* **10**, 75–83 (1996).
45. Anfinsen, C. B. & Scheraga, H. A. Experimental and Theoretical Aspects of Protein Folding. in (eds. Anfinsen, C. B., Edsall, J. T. & Richards, F. M. B. T.-A. in P. C.) vol. 29 205–300 (Academic Press, 1975).
46. Doig, A. J. & Sternberg, M. J. E. Side-chain conformational entropy in protein folding. *Protein Sci.* **4**, 2247–2251 (1995).

47. Baldwin, R. L. Weak interactions in protein folding: hydrophobic free energy, van der Waals interactions, peptide hydrogen bonds, and peptide solvation. *Protein Fold. Handb.* 127–162 (2005).
48. Spolar, R. S., Ha, J.-H. & Record Jr, M. T. Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8382–8385 (1989).
49. de Jesus, A. J. & Yin, H. 5.14 - Supramolecular Membrane Chemistry. in (ed. Atwood, J. L. B. T.-C. S. C. I. I.) 311–328 (Elsevier, 2017). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12572-7>.
50. Malhotra, P. & Udgaonkar, J. B. How cooperative are protein folding and unfolding transitions? *Protein Sci.* **25**, 1924–1941 (2016).
51. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. & Weikl, T. R. The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 289–316 (2008).
52. Rami, B. R. & Udgaonkar, J. B. Mechanism of formation of a productive molten globule form of barstar. *Biochemistry* **41**, 1710–1716 (2002).
53. Bemporad, F. *et al.* Biological function in a non-native partially folded state of a protein. *EMBO J.* **27**, 1525–1535 (2008).
54. Pervushin, K., Vamvaca, K., Vögeli, B. & Hilvert, D. Structure and dynamics of a molten globular enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1202–1206 (2007).
55. Vamvaca, K., Vögeli, B., Kast, P., Pervushin, K. & Hilvert, D. An enzymatic molten globule: efficient coupling of folding and catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 12860–12864 (2004).
56. Baldwin, R. L. Matching speed and stability. *Nature* **369**, (1994).
57. Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. & Craig, E. A. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119–122 (2000).
58. Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White Jr, F. H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **47**, 1309–1314 (1961).
59. Hatefi, Y. & Hanstein, W. G. Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**, 1129–1136 (1969).
60. Salvi, G., De Los Rios, P. & Vendruscolo, M. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **61**, 492–499 (2005).
61. Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science (80-.)*. **181**, 223–230 (1973).
62. Karplus, M. & Weaver, D. L. Protein folding dynamics: The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci.* **3**, 650–668 (1994).

63. Nölting, B. & Agard, D. A. How general is the nucleation–condensation mechanism? *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **73**, 754–764 (2008).
64. Fersht, A. R. Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 3–9 (1997).
65. Creighton, T. E., Darby, N. J. & Kemmink, J. The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J.* **10**, 110–118 (1996).
66. Dill, K. A. *et al.* Principles of protein folding—a perspective from simple exact models. *Protein Sci.* **4**, 561–602 (1995).
67. Yang, A.-S. & Honig, B. Structural origins of pH and ionic strength effects on protein stability: acid denaturation of sperm whale apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **237**, 602–614 (1994).
68. Devi, S., Chaturvedi, M., Fatima, S. & Priya, S. Environmental factors modulating protein conformations and their role in protein aggregation diseases. *Toxicology* **465**, 153049 (2022).
69. Wang, W., Nema, S. & Teagarden, D. Protein aggregation-Pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 390 89–99 at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.025> (2010).
70. McKenzie, H. A. & Ralston, G. B. The denaturation of proteins: Two state? Reversible or irreversible? *Experientia* **27**, 617–624 (1971).
71. Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* **20**, 1325–1336 (2003).
72. Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P. G. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 545–600 (1997).
73. Dill, K. A. & Chan, H. S. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10–19 (1997).
74. Johnson, J. L. & Craig, E. A. Protein folding in vivo: unraveling complex pathways. *Cell* **90**, 201–204 (1997).
75. Leopold, P. E., Montal, M. & Onuchic, J. N. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8721–8725 (1992).
76. Onuchic, J. N., Nymeyer, H., García, A. E., Chahine, J. & Socci, N. D. The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios. *Adv. Protein Chem.* **53**, 87–152 (2000).
77. Kumar, D. Protein Refolding/Renaturation. in *Comprehensive Biotechnology* 765–784 (2011). doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00136-7.
78. Duquesne, K., Prima, V. & Sturgis, J. N. Membrane protein solubilization and

- composition of protein detergent complexes. *Heterologous Expr. Membr. Proteins Methods Protoc.* 243–260 (2016).
79. Massi, F. & Straub, J. E. Energy landscape theory for Alzheimer's amyloid β -peptide fibril elongation. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **42**, 217–229 (2001).
 80. Fink, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* **3**, R9–R23 (1998).
 81. Wang, W., Nema, S. & Teagarden, D. Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* **390**, 89–99 (2010).
 82. Kiese, S., Pappenberg, A., Friess, W. & Mahler, H.-C. Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody. *J. Pharm. Sci.* **97**, 4347–4366 (2008).
 83. Liu, D. *et al.* Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry* **47**, 5088–5100 (2008).
 84. Roberts, C. J. Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 927–938 (2007).
 85. Ajmal, M. R. Protein misfolding and aggregation in proteinopathies: causes, mechanism and cellular response. *Diseases* **11**, 30 (2023).
 86. Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. (2017) doi:10.1146/annurev-biochem.
 87. Zhang, L., Lu, D. & Liu, Z. How native proteins aggregate in solution: A dynamic Monte Carlo simulation. *Biophys. Chem.* **133**, 71–80 (2008).
 88. Kanai, S., Liu, J. U. N., Patapoff, T. W. & Shire, S. J. Reversible self-association of a concentrated monoclonal antibody solution mediated by Fab–Fab interaction that impacts solution viscosity. *J. Pharm. Sci.* **97**, 4219–4227 (2008).
 89. Gallardo, P., Salas-Pino, S. & Daga, R. R. Reversible protein aggregation as cytoprotective mechanism against heat stress. *Curr. Genet.* **67**, 849–855 (2021).
 90. Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* **11**, 777–788 (2010).
 91. van Leeuwen, W. & Rabouille, C. Cellular stress leads to the formation of membraneless stress assemblies in eukaryotic cells. *Traffic* **20**, 623–638 (2019).
 92. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208 (2005).
 93. Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U. & Kiese, S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.* **98**, 2909–2934 (2009).
 94. Lashmar, U.T., Vanderburgh, M. and Little, S. J. Bulk freeze-thawing of macromolecules: effects of cryoconcentration on their formulation and stability. *Bioprocess Int.* **5**, 44

- (2007).
95. Weiss, W. F., Young, T. M. & Roberts, C. J. Principles, approaches, and challenges for predicting protein aggregation rates and shelf life. *J. Pharm. Sci.* **98**, 1246–1277 (2009).
 96. Andrews, J. M. & Roberts, C. J. A Lumry–Eyring Nucleated Polymerization Model of Protein Aggregation Kinetics: 1. Aggregation with Pre-Equilibrated Unfolding. *J. Phys. Chem. B* **111**, 7897–7913 (2007).
 97. Chi, E. Y. *et al.* Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Sci.* **12**, 903–913 (2003).
 98. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **185**, 129–188 (1999).
 99. Zhang, W., Czupryn, M. J., Boyle, P. T. & Amari, J. Characterization of Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization in Recombinant Human Interleukin-11. *Pharm. Res.* **19**, 1223–1231 (2002).
 100. Visschers, R. W. & de Jongh, H. H. J. Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnol. Adv.* **23**, 75–80 (2005).
 101. Mirzaei, H. & Regnier, F. Protein:protein aggregation induced by protein oxidation. *J. Chromatogr. B* **873**, 8–14 (2008).
 102. Stadtman, E. R. & Levine, R. L. Protein Oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 191–208 (2000).
 103. Li, B., Xie, Y. & Guo, Q. Thermal acid hydrolysis modulates the solubility of quinoa protein: The formation of different types of protein aggregates. *Food Hydrocoll.* **151**, 109825 (2024).
 104. Fischer, M. *et al.* Aggregation of Peptides during Hydrolysis as a Cause of Reduced Enzymatic Extractability of Soybean Meal Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4512–4519 (2002).
 105. Ye, X., Hedenqvist, M. S., Langton, M. & Lendel, C. On the role of peptide hydrolysis for fibrillation kinetics and amyloid fibril morphology. *RSC Adv.* **8**, 6915–6924 (2018).
 106. Marshall, K. E. *et al.* Hydrophobic, Aromatic, and Electrostatic Interactions Play a Central Role in Amyloid Fibril Formation and Stability. *Biochemistry* **50**, 2061–2071 (2011).
 107. Pazos, I. M., Ma, J., Mukherjee, D. & Gai, F. Ultrafast Hydrogen-Bonding Dynamics in Amyloid Fibrils. *J. Phys. Chem. B* **122**, 11023–11029 (2018).
 108. Gazit, E. A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J.* **16**, 77–83 (2002).
 109. Wetzel, R. Kinetics and Thermodynamics of Amyloid Fibril Assembly. *Acc. Chem. Res.* **39**, 671–679 (2006).

110. Morel, B., Varela, L. & Conejero-Lara, F. The Thermodynamic Stability of Amyloid Fibrils Studied by Differential Scanning Calorimetry. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4010–4019 (2010).
111. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A. & Radford, S. E. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 755–773 (2018).
112. Sipe, J. D. & Cohen, A. S. Review: History of the Amyloid Fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000).
113. Lara, C., Gourdin-Bertin, S., Adamcik, J., Bolisetty, S. & Mezzenga, R. Self-Assembly of Ovalbumin into Amyloid and Non-Amyloid Fibrils. *Biomacromolecules* **13**, 4213–4221 (2012).
114. Pearce, F. G., Mackintosh, S. H. & Gerrard, J. A. Formation of Amyloid-like Fibrils by Ovalbumin and Related Proteins under Conditions Relevant to Food Processing. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 318–322 (2007).
115. BOUCHARD, M., ZURDO, J., NETTLETON, E. J., DOBSON, C. M. & ROBINSON, C. V. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* **9**, 1960–1967 (2000).
116. Jayawardena, N. *et al.* Amyloid Fibrils from Hemoglobin. *Biomolecules* vol. 7 at <https://doi.org/10.3390/biom7020037> (2017).
117. Frare, E., Polverino de Laureto, P., Zurdo, J., Dobson, C. M. & Fontana, A. A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. *J. Mol. Biol.* **340**, 1153–1165 (2004).
118. Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D. & Dobson, C. M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4224–4228 (1998).
119. Litvinovich, S. V *et al.* Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module11Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.* **280**, 245–258 (1998).
120. Buell, A. K., Dobson, C. M. & Knowles, T. P. J. The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays Biochem.* **56**, 11–39 (2014).
121. Skora, L., Becker, S. & Zweckstetter, M. Molten Globule Precursor States Are Conformationally Correlated to Amyloid Fibrils of Human β -2-Microglobulin. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9223–9225 (2010).
122. Eichner, T., Kalverda, A. P., Thompson, G. S., Homans, S. W. & Radford, S. E. Conformational Conversion during Amyloid Formation at Atomic Resolution. *Mol. Cell* **41**, 161–172 (2011).
123. Yang, D. J., Shi, S., Yao, T. M. & Ji, L. N. Cooperative folding of tau peptide by coordination of group IIB metal cations during heparin-induced aggregation. *BioMetals*

- 25, 361–372 (2012).
124. Nelson, R. *et al.* Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773–778 (2005).
 125. Sawaya, M. R. *et al.* Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453–457 (2007).
 126. Chatani, E. & Yamamoto, N. Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophys. Rev.* **10**, 527–534 (2018).
 127. Zou, Y., Li, Y., Hao, W., Hu, X. & Ma, G. Parallel β -Sheet Fibril and Antiparallel β -Sheet Oligomer: New Insights into Amyloid Formation of Hen Egg White Lysozyme under Heat and Acidic Condition from FTIR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **117**, 4003–4013 (2013).
 128. Buell, A. K. The growth of amyloid fibrils: rates and mechanisms. *Biochem. J.* **476**, 2677–2703 (2019).
 129. López De La Paz, M. & Serrano, L. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 87–92 (2004).
 130. Tsemekhman, K., Goldschmidt, L., Eisenberg, D. & Baker, D. Cooperative hydrogen bonding in amyloid formation. *Protein Sci.* **16**, 761–764 (2007).
 131. Rambaran, R. N. & Serpell, L. C. Amyloid fibrils: Abnormal Protein Assembly. *Prion* **2**, 112–117 (2008).
 132. Sabate, R. When amyloids become prions. *Prion* vol. 8 233–239 at <https://doi.org/10.4161/19336896.2014.968464> (2014).
 133. Domigan, L. J., Healy, J. P., Meade, S. J., Blaikie, R. J. & Gerrard, J. A. Controlling the dimensions of amyloid fibrils: Toward homogenous components for bionanotechnology. *Biopolymers* **97**, 123–133 (2012).
 134. Westermark, P. *et al.* Amyloid fibril protein nomenclature -- 2002. *Amyloid* **9**, 197–200 (2002).
 135. SUNDE, M. & BLAKE, C. C. F. From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Q. Rev. Biophys.* **31**, 1–39 (1998).
 136. H., F. R., L., C. R. & Martha, S. The Systemic Amyloidoses. *N. Engl. J. Med.* **337**, 898–909 (2024).
 137. Nomenclature of amyloid and amyloidosis. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. *Bull. World Health Organ.* **71**, 105–112 (1993).
 138. Glenner, G. G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C. & Page, D. Amyloid Fibril Proteins: Proof of Homology with Immunoglobulin Light Chains by Sequence Analyses. *Science* (80-.). **172**, 1150–1151 (1971).
 139. Solomon, A., Frangione, B. & Franklin, E. C. Bence Jones proteins and light chains of

- immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda). *J. Clin. Invest.* **70**, 453–460 (1982).
140. Jarrett, J. T., Berger, E. P. & Lansbury, P. T. J. The carboxy terminus of the .beta. amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693–4697 (1993).
 141. Siragusa, S. *et al.* Asymptomatic immunoglobulin light chain amyloidosis (AL) at the time of diagnostic bone marrow biopsy in newly diagnosed patients with multiple myeloma and smoldering myeloma. A series of 144 cases and a review of the literature. *Ann. Hematol.* **90**, 101–106 (2011).
 142. Gertz, M. A. & Rajkumar, S. V. Primary systemic amyloidosis. *Curr. Treat. Options Oncol.* **3**, 261–271 (2002).
 143. Gertz, M. A. How to manage primary amyloidosis. *Leukemia* **26**, 191–198 (2012).
 144. Sekijima, Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry* **86**, 1036 LP – 1043 (2015).
 145. Pepys, M. B. *et al.* Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* **362**, 553–557 (1993).
 146. MD, B. Hereditary renal amyloidosis associated with a mutant fibrinogen α -chain. *Nat. Genet* **3**, 325 (1993).
 147. Nichols, W. C., Dwulet, F. E., Liepnieks, J. & Benson, M. D. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 762–768 (1988).
 148. Koo, E. H., Lansbury, P. T. & Kelly, J. W. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9989–9990 (1999).
 149. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–396 (2014).
 150. Sikorska, B., Knight, R., Ironside, J. W. & Liberski, P. P. Creutzfeldt-Jakob Disease BT - Neurodegenerative Diseases. in (ed. Ahmad, S. I.) 76–90 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-0653-2_6.
 151. Shoji, M. *et al.* Production of the Alzheimer Amyloid β Protein by Normal Proteolytic Processing. *Science (80-.)*. **258**, 126–129 (1992).
 152. Atwood, C. S. *et al.* Dramatic Aggregation of Alzheimer A β ; by Cu(II) Is Induced by Conditions Representing Physiological Acidosis *. *J. Biol. Chem.* **273**, 12817–12826 (1998).
 153. Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M. & Butterfield, D. A. Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. *J. Struct.*

- Biol.* **130**, 184–208 (2000).
154. Atwood, C. S. *et al.* Characterization of Copper Interactions with Alzheimer Amyloid β Peptides. *J. Neurochem.* **75**, 1219–1233 (2000).
 155. Kontush, A. Amyloid- β : an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1120–1131 (2001).
 156. Mark, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K. & Mattson, M. P. Amyloid β -Peptide Impairs Glucose Transport in Hippocampal and Cortical Neurons: Involvement of Membrane Lipid Peroxidation. *J. Neurosci.* **17**, 1046 LP – 1054 (1997).
 157. Huang, X. *et al.* The A β Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. *Biochemistry* **38**, 7609–7616 (1999).
 158. Bates, G. P. *et al.* Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15005 (2015).
 159. Chen, S., Ferrone, F. A. & Wetzel, R. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11884–11889 (2002).
 160. Gomperts, S. N. *et al.* Amyloid is linked to cognitive decline in patients with Parkinson disease without dementia. *Neurology* **80**, 85–91 (2013).
 161. Rana, A., Gnaneswari, D., Bansal, S. & Kundu, B. Prion metal interaction: Is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal imbalance? *Chem. Biol. Interact.* **181**, 282–291 (2009).
 162. Stöhr, J. *et al.* Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2409–2414 (2008).
 163. Ankarcrona, M. *et al.* Current and future treatment of amyloid diseases. *J. Intern. Med.* **280**, 177–202 (2016).
 164. Greenwald, J. & Riek, R. On the possible amyloid origin of protein folds. *J. Mol. Biol.* **421**, 417–426 (2012).
 165. Bleem, A. *et al.* Protein Engineering Reveals Mechanisms of Functional Amyloid Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Mol. Biol.* **430**, 3751–3763 (2018).
 166. Weiner, L. M. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **37**, 1288–1301 (2016).
 167. Voth, S. *et al.* Virulent *Pseudomonas aeruginosa* infection converts antimicrobial amyloids into cytotoxic prions. *FASEB J.* **34**, 9156 (2020).
 168. Cherny, I. *et al.* The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *J. Mol. Biol.* **352**, 245–252 (2005).
 169. Smith, D. *et al.* The Production of Curli Amyloid Fibers Is Deeply Integrated into the

- Biology of *Escherichia coli*. *Biomolecules* **7**, 75 (2017).
170. Maury, C. P. J. The emerging concept of functional amyloid. *J. Intern. Med.* **265**, 329–334 (2009).
 171. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Shewmaker, F. & Nakayashiki, T. Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 611–618 (2007).
 172. Balguerie, A. *et al.* Domain organization and structure–function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *EMBO J.* (2003).
 173. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E. & Kelly, J. W. Functional amyloid - from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 32 217–224 at <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003> (2007).
 174. Berson, J. F. *et al.* Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **161**, 521 (2003).
 175. Bolisetty, S. & Mezzenga, R. Amyloid–carbon hybrid membranes for universal water purification. *Nat. Nanotechnol.* **11**, 365–371 (2016).
 176. Bolisetty, S., Coray, N. M., Palika, A., Prenosil, G. A. & Mezzenga, R. Amyloid hybrid membranes for removal of clinical and nuclear radioactive wastewater. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **6**, 3249–3254 (2020).
 177. Li, C. & Mezzenga, R. The interplay between carbon nanomaterials and amyloid fibrils in bio-nanotechnology. *Nanoscale* **5**, 6207–6218 (2013).
 178. Krebs, M. R. H., Devlin, G. L. & Donald, A. M. Protein Particulates: Another Generic Form of Protein Aggregation? *Biophys. J.* **92**, 1336–1342 (2007).
 179. Nelson, R. & Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 260–265 (2006).
 180. Krebs, M. R. H., Domike, K. R. & Donald, A. M. Protein aggregation: more than just fibrils. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 682–686 (2009).
 181. Ziegler, G. R. & Foegeding, E. A. The gelation of proteins. in *Advances in food and nutrition research* vol. 34 203–298 (Elsevier, 1990).
 182. Boye, J. I., Alli, I., Ismail, A. A., Gibbs, B. F. & Konishi, Y. Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. *Int. Dairy J.* **5**, 337–353 (1995).
 183. Cristóvão, J. S., Henriques, B. J. & Gomes, C. M. Biophysical and spectroscopic methods for monitoring protein misfolding and amyloid aggregation. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1873 3–18 (Humana Press Inc., 2019).
 184. Pleshakova, T. O., Bukharina, N. S., Archakov, A. I. & Ivanov, Y. D. Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1142 (2018).

185. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1767**, 1073–1101 (2007).
186. Fabian, H. & Mäntele, W. Infrared spectroscopy of proteins. *Handb. Vib. Spectrosc.* **5**, 3399–3425 (2002).
187. Sadat, A. & Joye, I. Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Proteins. (2020) doi:10.3390/app10175918.
188. Shivu, B. *et al.* Distinct β -sheet structure in protein aggregates determined by ATR–FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **52**, 5176–5183 (2013).
189. Dos Santos Rodrigues, F. H., Delgado, G. G., Santana da Costa, T. & Tasic, L. Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA Adv.* **3**, 100091 (2023).
190. Zhou, M., Li, Q. & Wang, R. Current experimental methods for characterizing protein–protein interactions. *ChemMedChem* **11**, 738–756 (2016).
191. Hawe, A., Sutter, M. & Jiskoot, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.* **25**, 1487–1499 (2008).
192. Cardamone, M. & Puri, Nk. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* **282**, 589–593 (1992).
193. Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D. & Guo, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R. Soc. open Sci.* **4**, 160696 (2017).
194. Gade Malmos, K. *et al.* ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid* **24**, 1–16 (2017).
195. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1405–1412 (2010).
196. Khurana, R. *et al.* Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **151**, 229–238 (2005).
197. Huntington, J. A. & Stein, P. E. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **756**, 189–198 (2001).
198. Thompson, E. O. P. & Fisher, W. K. Amino acid sequences containing half-cystine residues in ovalbumin. *Aust. J. Biol. Sci.* **31**, 433–442 (1978).
199. Narita, K. & Ishii, J. N-terminal sequence in ovalbumin. *J. Biochem.* **52**, 367–373 (1962).
200. Hu, H. Y. & Du, H. N. α -to- β Structural Transformation of Ovalbumin: Heat and pH Effects. *J. Protein Chem.* **19**, 177–183 (2000).
201. Hunt, L. T. & Dayhoff, M. O. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha1-proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res.*

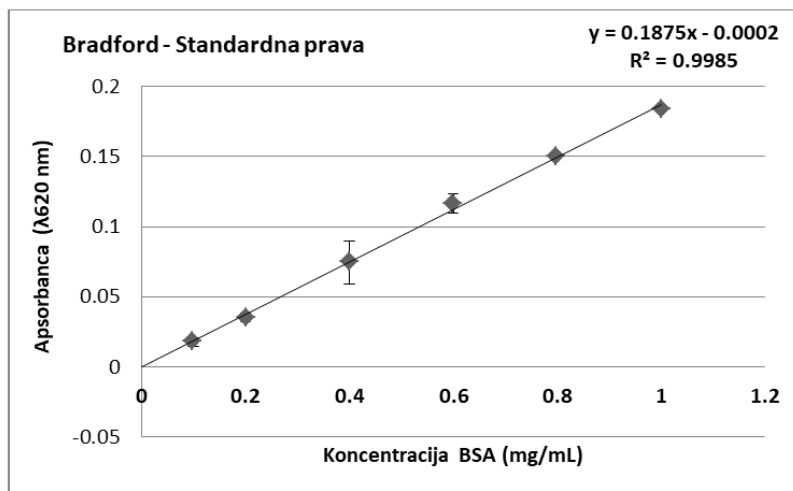
- Commun.* **95**, 864–871 (1980).
202. Stein, P. E. *et al.* Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature* **347**, 99–102 (1990).
 203. Wright, H. T. & Scarsdale, J. N. Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **22**, 210–225 (1995).
 204. Bhattacharya, M. & Mukhopadhyay, S. Structural and dynamical insights into the molten-globule form of ovalbumin. *J. Phys. Chem. B* **116**, 520–531 (2012).
 205. Sugimoto, Y. *et al.* Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. *Biochem. Cell Biol.* **89**, 533–544 (2011).
 206. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
 207. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 208. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **7**, 42717 (2017).
 209. Macrae, C. F. *et al.* Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. *J. Appl. Crystallogr.* **53**, 226–235 (2020).
 210. O’Boyle, N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **3**, 1–14 (2011).
 211. Milošević, J., Petrić, J., Jovčić, B., Janković, B. & Polović, N. Exploring the potential of infrared spectroscopy in qualitative and quantitative monitoring of ovalbumin amyloid fibrillation. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **229**, (2020).
 212. Akkermans, C. *et al.* Peptides are Building Blocks of Heat-Induced Fibrillar Protein Aggregates of β -Lactoglobulin Formed at pH 2. *Biomacromolecules* **9**, 1474–1479 (2008).
 213. Kalapothakis, J. M. D. *et al.* A Kinetic Study of Ovalbumin Fibril Formation: The Importance of Fragmentation and End-Joining. *Biophys. J.* **108**, 2300–2311 (2015).
 214. Jesu Jaya Sudan, R. & Sudandiradoss, C. Pattern prediction and coordination geometry analysis from cadmium-binding proteins: A computational approach. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **68**, 1346–1358 (2012).
 215. Chen, P. R. *et al.* Spectroscopic insights into lead(II) coordination by the selective lead(II)-binding protein PbrR691. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12350–12351 (2007).
 216. Magyar, J. S. *et al.* Reexamination of lead(II) coordination preferences in sulfur-rich sites: Implications for a critical mechanism of lead poisoning. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9495–9505 (2005).

217. Tanaka, N. *et al.* The mechanism of fibril formation of a non-inhibitory serpin ovalbumin revealed by the identification of amyloidogenic core regions. *J. Biol. Chem.* **286**, 5884–5894 (2011).
218. Dong, A., Meyer, J. D., Brown, J. L., Manning, M. C. & Carpenter, J. F. Comparative fourier transform infrared and circular dichroism spectroscopic analysis of α 1-proteinase inhibitor and ovalbumin in aqueous solution. *Arch. Biochem. Biophys.* **383**, 148–155 (2000).
219. Milošević, J., Prodanović, R. & Polović, N. On the protein fibrillation pathway: Oligomer intermediates detection using ATR-FTIR spectroscopy. *Molecules* **26**, (2021).
220. Vedantham, G., Sparks, H. G., Sane, S. U., Tzannis, S. & Przybycien, T. M. A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H₂O solutions. *Anal. Biochem.* **285**, 33–49 (2000).
221. Monge-Morera, M. *et al.* Processing Induced Changes in Food Proteins: Amyloid Formation during Boiling of Hen Egg White. *Biomacromolecules* **21**, 2218–2228 (2020).
222. Takeuchi, K., Nakatani, Y. & Hisatomi, O. Accuracy of Protein Size Estimates Based on Light Scattering Measurements. *Open J. Biophys.* **04**, 83–91 (2014).
223. Galvao, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* **28**, 1317–1330 (2014).
224. Jacob, S. W. & Herschler, R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* **23**, 14–27 (1986).
225. Bjelogrić, S. K. *et al.* Pd(II) complexes with N-heteroaromatic hydrazone ligands: Anticancer activity, in silico and experimental target identification. *J. Inorg. Biochem.* **199**, 110758 (2019).
226. Smith, D., Galazka, V. B., Wellner, N. & Sumner, I. G. High pressure unfolding of ovalbumin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**, 361–370 (2000).
227. Greve, T. M., Andersen, K. B. & Nielsen, O. F. Penetration mechanism of dimethyl sulfoxide in human and pig ear skin: An ATR–FTIR and near-FT Raman spectroscopic in vivo and in vitro study. *J. Spectrosc.* **22**, 109782 (2008).
228. Batista, A. N. L., Batista Jr, J. M., Bolzani, V. S., Furlan, M. & Blanch, E. W. Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 20147–20152 (2013).
229. Huang, P., Caughey, W. S. & Dong, A. Effects of Dimethyl Sulfoxide, Glycerol, and Ethylene Glycol on Secondary Structures of Cytochrome c and Lysozyme As Observed by Infrared Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **84**, 387–392 (1995).
230. Roy, S., Jana, B. & Bagchi, B. Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme. *J. Chem. Phys.* **136**, 115103 (2012).

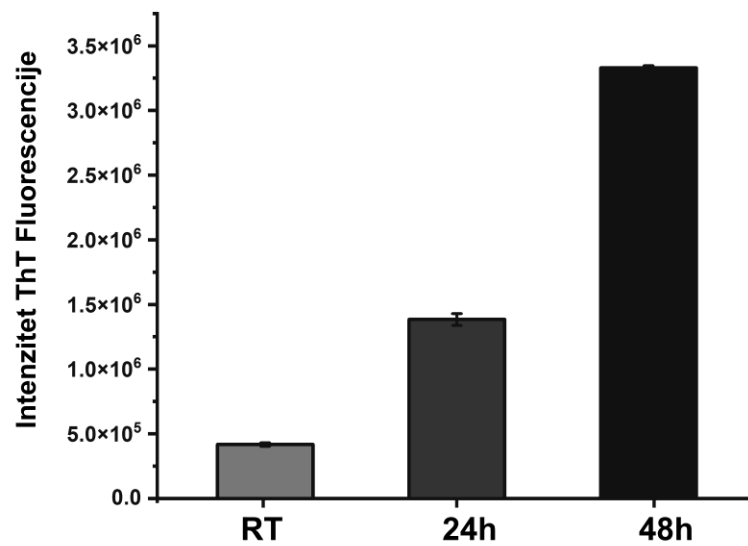
231. Arakawa, T., Kita, Y. & Timasheff, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys. Chem.* **131**, 62–70 (2007).
232. Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W. J. & Hallén, D. DMSO-related effects in protein characterization. *SLAS Discov.* **11**, 131–137 (2006).
233. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 4–17 (2012).
234. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 337–341 (2004).
235. The Ecstasy and Agony of Assay Interference Compounds. *ACS Cent. Sci.* **3**, 143–147 (2017).
236. Sterling, T. & Irwin, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 2324–2337 (2015).
237. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 3284–3301 (2014).
238. Wang, R., Fu, Y. & Lai, L. A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **37**, 615–621 (1997).
239. MORIGUCHI, I., HIRONO, S., LIU, Q., NAKAGOME, I. & MATSUSHITA, Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **40**, 127–130 (1992).
240. Wildman, S. A. & Crippen, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **39**, 868–873 (1999).
241. MORIGUCHI, I., HIRONO, S., NAKAGOME, I. & HIRANO, H. Comparison of Reliability of log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **42**, 976–978 (1994).
242. Filipović, N. *et al.* Palladium(II) Complexes with N-Heteroaromatic Bidentate Hydrazone Ligands: The Effect of the Chelate Ring Size and Lipophilicity on in vitro Cytotoxic Activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **84**, 333–341 (2014).
243. Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Luger, K., Kabsch, W. & Amrhein, N. Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6345–6349 (2000).
244. Wang, C.-X., Yan, F.-F., Zhang, Y.-X. & Ye, L. Spectroscopic investigation of the interaction between rifabutin and bovine serum albumin. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **192**, 23–28 (2007).
245. Jansens, K. J. A., Brijs, K., Delcour, J. A. & Scanlon, M. G. Amyloid-like aggregation of

- ovalbumin: Effect of disulfide reduction and other egg white proteins. *Food Hydrocoll.* **61**, 914–922 (2016).
246. Dobson, C. M. & Karplus, M. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 92–101 (1999).
 247. Sogami, M., Era, S., Koseki, T. & Nagai, N. Structural characterization of the molten globule and native states of ovalbumin: AH NMR study. *J. Pept. Res.* **50**, 465–474 (1997).
 248. Tani, F. *et al.* Temperature control for kinetic refolding of heat-denatured ovalbumin. *Protein Sci.* **6**, 1491–1502 (1997).
 249. Lara, C., Gourdin-Bertin, S., Adamcik, J., Bolisetty, S. & Mezzenga, R. Self-assembly of ovalbumin into amyloid and non-amyloid fibrils. *Biomacromolecules* **13**, 4213–4221 (2012).
 250. Liu, D. *et al.* New features of DNA damage by acid hydrolysis in MALDI-TOF mass spectrum. *Int. J. Mass Spectrom.* **374**, 20–25 (2014).
 251. Semisotnov, G. V *et al.* Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119–128 (1991).
 252. Tamás, M. J., Sharma, S. K., Ibstedt, S., Jacobson, T. & Christen, P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules* **4**, 252–267 (2014).
 253. Khan, S., Khan, N. A. & Bano, B. In-sights into the effect of heavy metal stress on the endogenous mustard cystatin. *Int. J. Biol. Macromol.* **105**, 1138–1147 (2017).
 254. Iram, A. & Naeem, A. Existence of different structural intermediates and aggregates on the folding pathway of ovalbumin. *J. Fluoresc.* **22**, 47–57 (2012).
 255. Naeem, A. & Amani, S. Deciphering structural intermediates and genotoxic fibrillar aggregates of albumins: a molecular mechanism underlying for degenerative diseases. *PLoS One* **8**, e54061 (2013).
 256. Ratnaswamy, G., Koepf, E., Bekele, H., Yin, H. & Kelly, J. W. The amyloidogenicity of gelsolin is controlled by proteolysis and pH. *Chem. Biol.* **6**, 293–304 (1999).
 257. Lorentzon, E. *et al.* Effects of the Toxic Metals Arsenite and Cadmium on α -Synuclein Aggregation In Vitro and in Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 258. Tunçer, S. *et al.* Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci. Rep.* **8**, 14828 (2018).
 259. Rašković, B., Babic, N., Korać, J. & Polović, N. Evidence of beta-sheet structure induced kinetic stability of papain upon thermal and sodium dodecyl sulfate denaturation. *J. Serbian Chem. Soc.* **80**, 613–625 (2015).

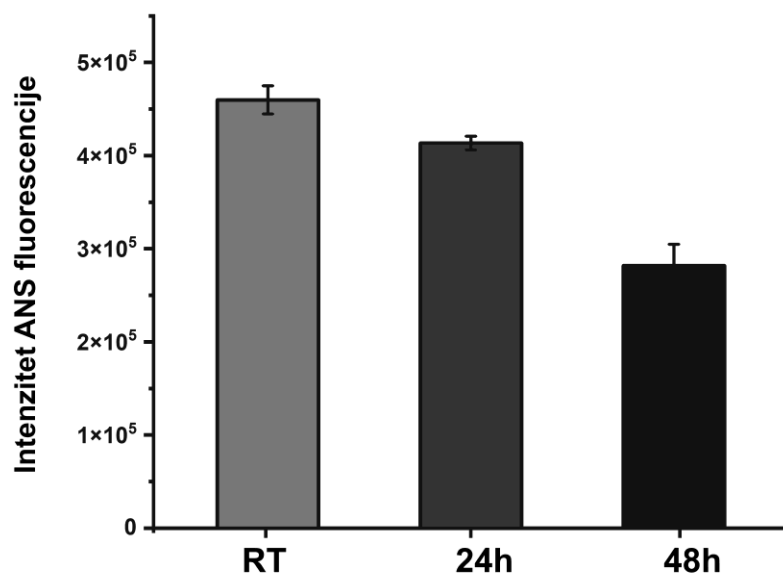
9. PRILOZI



Prilog 1 – Standardna prava primenjena za određivanje koncentracije proteina Bredfordovim esejom.



Prilog 2 – Intenzitet ThT fluorescencije u uzorcima ovalbumina u 0,01 M hlorovodoničnoj kiselini i 1% DMSO, pre i nakon perioda termalne inkubacije na 90 °C, bez prisutnih liganada.



Prilog 3 – Intenzitet ANS fluorescencije u uzorcima ovalbumina u 0,01 M hlorovodoničnoj kiselinu i 1% DMSO, pre i nakon perioda termalne inkubacije na 90 °C, bez prisutnih liganada.

BIOGRAFIJA

Nemanja D. Mijin je rođen 16. 4. 1995. godine u Beogradu. Osnovnu školu, Janko Veselinović u Beogradu, je pohađao od 2002. do 2010. godine, a srednju školu, Osmu beogradsku gimnaziju, od 2010. do 2014. godine. Osnovne akademske studije je upisao školske 2014/15. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemija. Osnovne akademske studije je završio 2019. godine sa prosečnom ocenom 8,44 (osam i 44/100), odbranivši završni rad pod naslovom „Uticaj prisustva jona metala na formiranje amiloidnih fibrila” sa ocenom 10 (deset). Master akademske studije je upisao školske 2019/2020. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija. Master akademske studije je završio 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,60 (devet i 60/100), odbranivši master rad pod naslovom „Uticaj prisustva amiloidnih struktura na hidrolizu azokazeina” sa ocenom 10 (deset) i stekao zvanje master biohemičar.

Doktorske akademske studije je upisao 2020. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija, i položio sve ispite (šest od šest) predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija sa prosekom 10 (deset), sa ukupnom prosečnom ocenom na svim nivoima studija 8,70 (osam i 70/100).

U periodu od 2020. do 2023. godine je bio angažovan kao saradnik u nastavi i držanju laboratorijskih i teorijskih vežbi iz predmeta osnovnih studija “Biohemija (409H2)” i “Biohemija proteina i nukleinskih kiselina (401B1)”, kao i predmeta master studija “Biohemija i biofizika makromolekula (453B2)”.

Od 2024. godine, Nemanja Mijin je zaposlen na institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak” kao naučni radnik u odseku za proteinski inženjering i bavi se analizom rekombinantno-proizvedenih proteinskih struktura.

Naučni radovi

- **Mijin, N.**, Milošević, J., Stevanović, S., Petrović, P., Lolić, A., Urbic, T. and Polović, N. Amyloid-like aggregation influenced by lead (II) and cadmium (II) ions in hen egg white ovalbumin. Food Hydrocoll. 2023; 136, 108292.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108292>
- **Mijin, N.D.**, Milošević, J., Filipović, N.R., Mitić, D., Anđelković, K., Polović, N.D. and Todorović, T. The effect of non-specific binding of Pd (II) complexes with N-heteroaromatic hydrazone ligands on the protein structure. J Serb Chem Soc. 2022; 87 (10), 1143.
<https://doi.org/10.2298/JSC220518050M>

Saopštenja

1. **Mijin N. D.**, Milošević J., Lolić A., Polović N., In vitro analiza amiloidogeneze pod uticajem teških metala primenom biofizičkih metoda/ An in vitro analysis of heavy metal-influenced amyloidogenesis using biophysical methods, 58. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kratki izvodi radova Knjiga radova, str. 61, Beograd 9. i 10. jun 2022.
2. **Mijin N.**, Petrić J., Jovčić B., Lolić A., Polović N., Milošević J., Amyloid fibril formation of ovalbumin in the presence of heavy metal ions, lead and cadmium, Serbian Biochemical Society Tenth Conference with international participation “Biochemical Insights into Molecular Mechanisms”, str. 95, 24. 9. 2021. Kragujevac, Serbia
3. Milošević J., **Mijin N.**, Maleš L. , Milovanović A., Jovčić B., Polović N., Kinetics of amyloid fibril formation in the presence of metal ions and low-molecular-weight compounds, Serbian Biochemical Society Ninth Conference with international participation “Diversity in Biochemistry” str. 133, 14-16. 11. 2019. Belgrade, Serbia

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora **Nemanja Mijin**

Broj indeksa **DB08/2020**

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom:

Uticaj jona Pb(II), Cd(II) i Pd(II) na konformacione prelaze ovalbumina

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 25.2.2025.

Potpis autora

Nemanja Mijin

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora	Nemanja Mijin
Broj indeksa	DB08/2020
Studijski program	Biohemija
Naslov rada	Uticaj jona Pb(II), Cd(II) i Pd(II) na konformacione prelaze ovalbumina
Mentor	Prof. Dr Natalija Polović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 25.2.2025.

Potpis autora

Nemanja Mijin

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticaj jona Pb(II), Cd(II) i Pd(II) na konformacione prelaze ovalbumina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.