



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

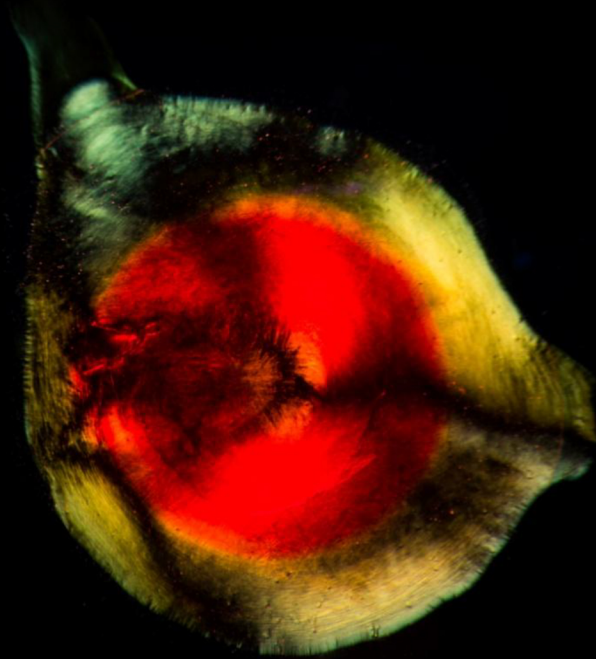
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗΣ
ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΓΟΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
Ή ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ
ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΕΙΣ



Παρασκευή Α. Τσιολάκη

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, *M. Sc.*

ΑΘΗΝΑ 2018



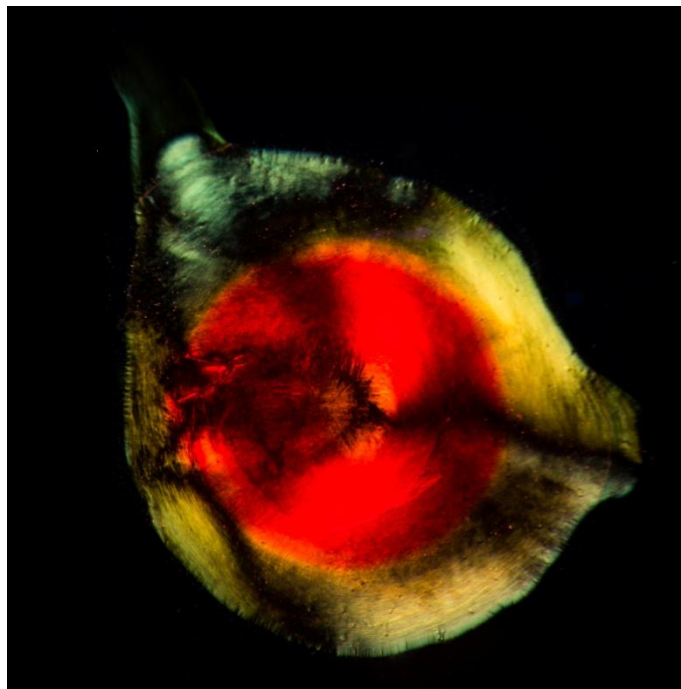
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗΣ
ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΓΟΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Ή ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥΣ ΠΟΥ
ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΩΣΕΙΣ



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ Λ.ΤΣΙΟΛΑΚΗ

Βιολόγος, *M.Sc.*

Αθήνα 2018



HELLENIC REPUBLIC
**National and Kapodistrian
University of Athens**
————— EST. 1837 —————

SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
SECTION OF CELL BIOLOGY & BIOPHYSICS

Ph.D Thesis

**STUDIES OF STRUCTURE AND SELF-ASSEMBLY OF
AMYLOIDOGENIC PROTEINS OR AMYLOIDOGENIC
PEPTIDE-ANALOGUES, IMPLICATED WITH AMYLOIDOSES**

PARASKEVI L. TSIOLAKI
Biologist, *M.Sc.*

Athens 2018

Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Η Παρασκευή Α. Τσιολάκη υπήρξε Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών, στα πλαίσια του Ερευνητικού Προγράμματος Αριστείας ΙΚΥ - Siemens από το Σεπτέμβριο του 2015 έως και τον Αύγουστο του 2017.

Εικόνα εξωφύλλου: *Φωτομικρογραφία υμενίου αμυλοειδών ινιδίων της ανθρώπινης αμυλίνης έπειτα από χρώση με Congo red, με εμφανή την κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα.*

Λήψη: Π.Α. Τσιολάκη, Σεπτέμβριος 2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- | | |
|--|---|
| 1. Επίκουρη Καθηγήτρια Β. Α. Οικονομίδου
(Επιβλέπουσα Διατριβής) | Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 2. Καθηγητής Κ. Ε. Βοργιάς | Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 3. Ομότιμος Καθηγητής Σ. Ι. Χαμόδρακας | Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- | | |
|--|---|
| 1. Καθηγητής Κ. Ε. Βοργιάς | Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 2. Καθηγητής Σ. Ευθυμιόπουλος | Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 3. Αναπληρωτής Καθηγητής Ι. Τρουγκάκος | Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 4. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π. Κόλλια | Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα
Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 5. Επίκουρη Καθηγήτρια Β. Α. Οικονομίδου
(Επιβλέπουσα Διατριβής) | Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 6. Επίκουρος Καθηγητής Δ. Στραβοπόδης | Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών |
| 7. Ερευνήτρια Β' Δρ. Ε. Χρυσίνα* | Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας
και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών |

*Η Ερευνήτρια Β' Δρ. Ε. Χρυσίνα αντικαθιστά τον Ομότιμο Καθηγητή Σ.Ι. Χαμόδρακα με βάση την απόφαση της Συνέλευσης του Τμήματος Βιολογίας (συνεδρίαση 24-01-2018, Αριθμ. Πρωτ. 1491), σύμφωνα με τις διατάξεις του Ν. 4485/2017 (παρ. 3, άρθρο 39).

Περίληψη

Κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες, σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες αδυνατούν να αποκτήσουν τη φυσιολογική τους στερεοδιάταξη και οδηγούνται σε ένα εναλλακτικό – μη-κανονικό – δίπλωμα της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας στο χώρο. Ως συνέπεια αυτού του γεγονότος, τα μη-φυσιολογικά διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια αυτοσυγκροτούνται είτε σε άμορφα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, είτε σε οργανωμένα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, που εμφανίζουν ορισμένες εξειδικευμένες ιδιότητες και χαρακτηρίζονται ως **αμυλοειδή ινίδια**. Οι πρωτεΐνες με **‘τάση να δημιουργούν αμυλοειδή ινίδια’** ή **‘αμυλοειδογόνες’ πρωτεΐνες**, είτε στη φυσιολογική είτε στη μεταλλαγμένη τους μορφή, προσβάλλουν όργανα ή/και ιστούς και εναποτίθενται, σχηματίζοντας είτε εξωκυτταρικές συναθροίσεις (αμυλοειδείς πλάκες) είτε ενδοκυτταρικά έγκλειστα. Σε κάθε περίπτωση, η εναπόθεση των αμυλοειδών ινιδίων οδηγεί στην εμφάνιση μίας ευρείας ομάδας ασθενειών, οι **οποίες ονομάζονται αμυλοειδώσεις**. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αμυλοειδώσεων αποτελούν οι νευροεκφυλιστικές νόσοι Alzheimer’s και Parkinson’s, οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες και άλλες ασθένειες, όπως ο διαβήτης τύπου II ή διάφοροι τύποι καρκίνου. Συνολικά, οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες είναι ένα ‘ιδιότυπο’ σύνολο μορίων, που διαφέρουν μεταξύ τους σε επίπεδο ακολουθίας, δομής, αλλά και λειτουργίας. Τουλάχιστον **35 διαφορετικές ανθρώπινες πρωτεΐνες** έχει βρεθεί να εναποτίθενται με τη μορφή αμυλοειδών ινιδίων σε ιστούς, ενώ εξελικτικά η δημιουργία τους έχει συσχετιστεί με γενετικές τροποποιήσεις ή/και αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος, που επιδρούν στη φυσιολογική διαδικασία διπλώματος των πρωτεϊνών. Το σύνολο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών **εμπλουτίζεται συνεχώς**, καθώς όλο και περισσότερες πρωτεΐνες, που προηγουμένως δεν είχαν συσχετιστεί με κάποια αμυλοείδωση, εμφανίζουν την τάση **να δημιουργούν αμυλοειδή ινίδια *in vitro***.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε **A) ‘μακροσκοπική’ – υπολογιστική μελέτη** στο ετερόκλητο σύνολο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, αλλά και **B) ‘μικροσκοπική’ – πειραματική μελέτη** σε επιλεγμένα πρωτεϊνικά συστήματα, στα πλαίσια της αποκρυπτογράφησης των ιδιοτήτων, των μηχανισμών, καθώς και των ιδιαιτεροτήτων των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων.

A) Πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα μαρτυρούν την **συν-εναπόθεση δύο ή και περισσότερων πρωτεϊνών** στις συναθροίσεις αμυλοειδών ινιδίων ασθενών, με άγνωστη

όμως μέχρι σήμερα τη συμμετοχή τους στην εξέλιξη των αμυλοειδώσεων. Στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής το βιολογικό ερώτημα της ‘συνεύρεσης των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών’ σε ασθενείς μελετήθηκε **μακροσκοπικά με εφαρμογή της θεωρίας γράφων**, προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι ιδιότητες των πρωτεϊνών, που σχετίζονται με τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων σε παθολογικές καταστάσεις, ως σύνολο. Το **δίκτυο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Amyloid Interactome)** που κατασκευάστηκε και οπτικοποιήθηκε υπολογιστικά 1) συσχέτισε ένα σύνολο από λειτουργικά μη-συσχετιζόμενες πρωτεΐνες σε ένα κοινό δίκτυο, 2) αποκάλυψε σημαντικές άμεσες και έμμεσες ‘διασυνδέσεις’ μεταξύ των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και 3) ανέδειξε ελκυστικούς υποψηφίους για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών τακτικών στη μελέτη των αμυλοειδώσεων. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, η προσέγγιση αυτή αποκαλύπτει νέες οδούς επικοινωνίας στην πρωτεϊνική συσσωμάτωση και είναι **η πρώτη προσπάθεια μελέτης των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών ως ένα ενοποιημένο σύστημα**. Αναμένεται ότι τα αποτελέσματα της υπολογιστικής αυτής ανάλυσης θα αξιοποιηθούν σε στοχευμένες πειραματικές προσεγγίσεις στο μέλλον.

B) Στον αντίποδα της συστηματικής ανάλυσης των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, η πειραματική προσέγγιση της παρούσας διατριβής εστιάστηκε σε επιλεγμένα ανθρώπινα πρωτεϊνικά μόρια, τόσο **επιβεβαιωμένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**, όσο και **πρωτεϊνών με ανεξερεύνητες**, μέχρι σήμερα, **αμυλοειδογόνες ιδιότητες**. Τομή στη μελέτη των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών υπήρξε η πρόταση ότι ο σχηματισμός αμυλοειδών ινιδίων είναι μία εγγενής ιδιότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Έτσι, οι ιδιότητες των αμυλοειδών ινιδίων, οι οποίες αποκαλύπτονται με κατάλληλες μεθοδολογίες, αποτελούν διαγνωστικά κριτήρια για την καταγραφή των κοινών μορφολογικών και δομικών χαρακτηριστικών (cross-β αρχιτεκτονική) των ινιδιακών δομών, που είτε εντοπίζονται σε ασθενείς είτε εμφανίζονται σε μελέτες συσσωμάτωσης *in vitro*.

Η ιδέα ότι μικρές, ‘επιρρεπείς προς συσσωμάτωση’, περιοχές των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, συμμετέχουν ενεργά στον πολυμερισμό τους σε ινίδια και κατ’ επέκταση στην εμφάνιση της αμυλοείδωσης, έστρεψε το ενδιαφέρον μας στη μελέτη **τμημάτων των πεπτιδικών αλυσίδων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**, τα οποία πιθανά φέρουν συμπυκνωμένη την πληροφορία της αμυλοειδογονικότητας. Τα μικρά αμυλοειδογόνα τμήματα, που **ονομάζονται αμυλοειδογόνοι καθοριστές**, εντοπίστηκαν με υπολογιστικές μεθόδους, ενώ η πειραματική επιβεβαίωση των ιδιοτήτων τους πραγματοποιήθηκε με τη

χρήση ενός συνόλου βιοφυσικών μεθόδων (ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης, περίθλαση ακτίνων-Χ, πολωτική μικροσκοπία, φασματοσκοπία υπερερυθρού), σε μεγάλο εύρος συνθηκών. Τέλος, η μελέτη των ιδιοτήτων πολυμερισμού και αυτοσυγκρότησης των αμυλοειδογόνων καθοριστών επέτρεψε **την πρόταση πιθανών τρισδιάστατων μοντέλων πολυμερισμού**, των υπό μελέτη πρωτεϊνικών συστημάτων.

Οι πειραματικές μελέτες σε επιβεβαιωμένες αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες:

✓ Η κυστατίνη C, η πρώτη αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη που μελετήθηκε πειραματικά στα πλαίσια της διατριβής, είναι υπεύθυνη για μία σπάνια μορφή αμυλοείδωσης, που ονομάζεται εγκεφαλική αγγειοπάθεια Ισλανδικού τύπου, ενώ αποδεικνύεται ότι αυτοσυγκροτείται σε ολιγομερή, ακολουθώντας ένα πολύπλοκο μηχανισμό πολυμερισμού. Προκειμένου να εντοπίσουμε τμήματα της πρωτεΐνης με υψηλό αμυλοειδογόνο δυναμικό, τρεις πιθανοί αμυλοειδογόνοι καθοριστές της κυστατίνης C μελετήθηκαν πειραματικά και αξιολογήθηκε ο ρόλος τους στην αυτοσυγκρότηση της πρωτεΐνης. Η επιβεβαίωση της εγγενούς αμυλοειδογονικότητας των καθοριστών της κυστατίνης C μας οδήγησε στην πρόταση **δύο πιθανών μοντέλων πολυμερισμού και αυτοσυγκρότησης**, τα οποία **εμπλέκουν τα μικρά αμυλοειδογόνα τμήματα** και προτείνουν την **ενεργή συμμετοχή τους στον cross-β πυρήνα των ινιδίων της ανθρώπινης κυστατίνης C**.

✓ Η ραγδαία αυτοσυγκρότηση της αμυλίνης που ευθύνεται για την πρόκληση του διαβήτη τύπου II, υπήρξε το δεύτερο πεδίο πειραματικής μελέτης της διατριβής. Παρότι, η πεπτιδική αλυσίδα της αμυλίνης φέρει υψηλή αμυλοειδογονικότητα, η εκτενής ανάλυση των βιβλιογραφικών δεδομένων απέδειξε ότι το αμινοτελικό (N-terminal) και καρβοξυτελικό (C-terminal) τμήμα της, είναι δύο περιοχές στις οποίες δεν έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη και συστηματική μελέτη. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής εντοπίστηκαν αμυλοειδογόνοι καθοριστές στα ελλιπώς μελετημένα ακραία τμήματα της ορμόνης, ενώ παράλληλα σχεδιάστηκαν ομάδες μεταλλαγμένων αμυλοειδογόνων καθοριστών, των τμημάτων αυτών. Οι βιοφυσικές μέθοδοι κατέγραψαν τις ιδιότητες όλων των πεπτιδίων και τέλος, οι μελέτες συνδυαστικής επώασης με της αμυλίνης με τα υπό μελέτη πεπτίδια συνέβαλαν καθοριστικά στη **μελέτη της συνεισφοράς του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού τμήματος στην αυτοσυγκρότηση της αμυλίνης**. Συνολικά, η πειραματική προσέγγιση στην αμυλοειδογόνο ορμόνη αμυλίνη συνετέλεσε στην εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων που σχετίζονται **με τον πολυμερισμό της ορμόνης** και μπορεί

να επιτρέψουν στο μέλλον τη στοχευμένη σχεδίαση πεπτιδίων-αναστολέων της αμυλοειδογονικότητας της.

Οι πειραματικές μελέτες σε πρωτεΐνες με ανεξερεύνητες αμυλοειδογόνες ιδιότητες:

✓ Το C-πεπτίδιο της προΐνσουλίνης ή C-πεπτίδιο, ένα μόριο 31 αμινοξικών καταλοίπων, ήταν για πολλά χρόνια μία ξεχασμένη παράμετρος στις μελέτες που αφορούσαν την ινσουλίνη. Η εμπλοκή του C-πεπτιδίου στο διαβήτη υπήρξε το έναυσμα για τη σε βάθος μελέτη των ανεξερεύνητων ιδιοτήτων αυτοσυγκρότησης του πεπτιδίου. Ωστόσο, το εξαιρετικά ασθενές αμυλοειδογόνο προφίλ του δεν επέτρεψε τον εντοπισμό μικρών αμυλοειδογόνων τμημάτων κατά μήκος της αλληλουχίας του και έτσι, στο συγκεκριμένο σύστημα μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα αυτοσυγκρότησης στην πλήρη ακολουθία του C-πεπτιδίου. Οι βιοφυσικές μελέτες, στα πλαίσια της διατριβής, αποκάλυψαν για πρώτη φορά την **ικανότητά του C-πεπτιδίου να οργανώνεται σε ινδιακές δομές**, που πληρούν τα κριτήρια των αμυλοειδών ινιδίων, ενώ ταυτόχρονα, τμήματα του πεπτιδίου που αποτελούν αλληλουχίες-χαιμαλέοντες επέτρεψαν **την πρόταση ενός πιθανού μοντέλου** που καταγράφει το μονοπάτι της τρισδιάστασης αυτοσυγκρότησής του.

✓ Η κλαστερίνη, μία σημαντική ετεροδιμερής πρωτεΐνη-συνοδός, που συνεντοπίζεται σε αμυλοειδείς εναποθέσεις ασθενών με νευροεκφυλιστικές νόσους, αποτελεί ένα ακόμα σύστημα μελέτης με ανεξερεύνητες αμυλοειδογόνες ιδιότητες. Η εγγενής μη-δομημένη φύση της κλαστερίνης, σε συνδυασμό με την ικανότητά της να αλληλεπιδρά ειδικά με ένα μεγάλο εύρος αμυλοειδογόνων μορίων μας ώθησε στη διεξοδική μελέτη της αμυλοειδογονικότητάς της. Η α-αλυσίδα της κλαστερίνης, η οποία φέρει σημαντικούς επιτόπους αλληλεπίδρασης με αμυλοειδογόνα μόρια, αναλύθηκε υπολογιστικά και τα πέντε πιθανά αμυλοειδογόνα τμήματα που εντοπίστηκαν σε αυτή, επιβεβαιώθηκαν πειραματικά με βιοφυσικές μεθόδους, ως αμυλοειδογόνοι καθοριστές. Η αναγνώριση των καθοριστών στην α-αλυσίδα της κλαστερίνης **ανέδειξε δυνητικούς αναστολείς στις νευροεκφυλιστικές νόσους**, καθώς αναμένεται ότι με τον κατάλληλο σχεδιασμό πεπτιδίων-αναστολέων που αλληλεπιδρούν ειδικά με την κλαστερίνη, μπορεί κανείς να ανακόψει την εξέλιξη του πολυμερισμού **άλλων αμυλοειδογόνων μορίων** που αλληλεπιδρούν με αυτή.

✓ Τέλος, η στεφίνη A, ένα συγγενικό μόριο της αμυλοειδογόνου κυστατίνης C, ακολουθεί παρόμοιο μονοπάτι πολυμερισμού, ωστόσο, δεν έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα ως αμυλοειδογόνο πρωτεϊνικό μόριο. Η στεφίνη A δρα φυσιολογικά ως ενδοκυτταρικός

αναστολέας πρωτεασών, ενώ τα ενδοκυτταρικά μη-φυσιολογικά ολιγομερή της παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε διάφορους τύπους καρκίνων. Στα πλαίσια διερεύνησης του αμυλοειδογόνου δυναμικού της πρωτεΐνης αναγνωρίστηκαν τέσσερις μικροί αμυλοειδογόνοι καθοριστές, οι οποίοι μελετήθηκαν πειραματικά. Ο εντοπισμός τμημάτων με αμυλοειδογόνα χαρακτηριστικά στη στεφίνη A μπορεί να εξυπηρετήσει **στη μελλοντική διερεύνηση ενός πιθανού μηχανισμού συσσωμάτωσης ολόκληρης της πρωτεΐνης σε αμυλοειδή ινίδια**, με μηχανισμούς που ομοιάζουν σε εκείνους της αμυλοειδογόνου κυστατίνης C.

Abstract

Under pathological conditions, a large number of otherwise soluble proteins may fail to maintain their normal three-dimensional structure and thus, may undergo general or partial refolding of their polypeptide chains. Misfolded protein molecules may subsequently self-assemble into either amorphous or ordered protein aggregates, which **share distinctive structural and tinctorial properties** and **are commonly called amyloid fibrils**. Wild type or mutated **amyloidogenic proteins**, are transferred and deposited in different organs and/or tissues, either as extracellular accumulations (amyloid plaques) or as insoluble inclusion bodies. In any case, amyloid fibrils have been linked to the development of a broad class of diseases, called **amyloidoses**. Striking examples of this class are the neurodegenerative Alzheimer's and Parkinson's disease, prion diseases and other disorders, such as diabetes type II or a broad number of carcinomas. Overall, amyloidogenic proteins belong to a diverse group of macromolecules, displaying significant sequence and structural differences. At least, **35 human proteins** are found to form pathological amyloid deposits in tissues, while this feature was associated with several mutations and/or microenvironment changes that lead to protein misfolding. The group of amyloidogenic proteins is **constantly enriched** with proteins that are found to **form amyloid fibrils *in vitro*** and surprisingly, have never been previously related with amyloidoses.

Aiming at deciphering the molecular mechanisms, underlying amyloid fibril formation, in this thesis, **A)** we carried out **a systematic /computational analysis** on the diverse set of amyloidogenic proteins and also **B)** we performed **targeted aggregation experiments** on individual proteins, testing their amyloidogenic profile.

A) The implication of more than one proteins in the progression of different aggregation disorders, together with the **synergistic co-deposition of different amyloidogenic proteins** in amyloid plaques of patients, highlights the necessity for a more universal approach, during the study of these proteins. In an attempt to address this pivotal need we constructed and analyzed a protein-protein interaction network of amyloidogenic proteins and their experimentally verified interactors, based on the complex **network theory analysis**. The **Amyloid Interactome** 1) gathers a group of heterogeneous proteins into a common biological interaction network, 2) assembles all known interconnections between well-

characterized amyloidogenic proteins and proteins related to amyloid fibril formation and 3) unravels functional roles of all its constituent elements. To our knowledge, this integrated approach points to a new picture on protein aggregation and introduces **for the first time a comprehensive protein map of amyloidogenicity**. Eventually, Amyloid Interactome is expected to assist the development of novel therapeutic strategies in protein aggregation diseases.

B) In this thesis, **targeted aggregation experiments** were focused on individual human proteins with a known or unexplored, until now, amyloidogenic profile. A key milestone in the history of amyloid research was the idea that amyloid formation may be an inherent ability of proteins, under specific conditions. Appropriate biophysical methodologies are commonly used to record all distinct morphological and structural features of fibrillar structures that are either in *in vivo* or in *in vitro* aggregation assays.

Under the right conditions, many proteins expose fibril-forming segments, which may be sufficient to cause aggregation and fibril formation. Following this idea, we turned our interest into **small ‘aggregation-prone’ regions**, which are considered responsible for the polymerization of proteins, associated with amyloidoses. In this thesis, short sequence stretches, named amyloidogenic determinants, were computationally identified and experimentally evaluated, utilizing several biophysical techniques (transmission electron microscopy, X-ray diffraction, polarizing microscopy, IR spectroscopy), whereas experimental results were combined in order to let us propose plausible polymerization models of each protein system.

Experimental studies on known amyloidogenic proteins:

✓ The oligomerization of human cystatin C is involved in the pathophysiology of a rare form of amyloidosis namely Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy. Amyloidogenic proteins like cystatin C have been shown to form dimers and oligomers by exchange of subdomains of the monomeric proteins. In this work, in order to find the shortest stretch responsible to drive the fibril formation of cystatin C, we revealed that three ‘aggregation-prone’ segments of the protein self-assemble into typical amyloid fibrils and might be active ingredients of cystatin C aggregation. Based on these results, we also demonstrated **two plausible self-aggregation pathways**, which prove the fundamental

contribution of all three peptides in **forming the ‘aggregation-prone’ core of human cystatin C.**

✓ The rapid aggregation of amylin is implicated in the pathology of diabetes type II. Although the entire sequence of human amylin has been denoted as amyloidogenic, literature data reveal that both the N- and C-terminal of amylin were excluded from any aggregation study. Incomplete knowledge on the aggregation potency of the terminal regions of amylin allowed us to design 3 distinct groups of amyloidogenic determinants, corresponding to N- and C- terminals of amylin. The aggregation properties of each peptide were confirmed by several biophysical techniques, whereas in addition to the self-interactions, cross-amyloid interactions between amylin and separate amyloidogenic determinants were evaluated. Overall, our results offer **a novel molecular basis for understanding the contribution of the terminal regions of amylin in the self-assembly of the protein** that may prove to be powerful new directions for future therapies to combat the devastating consequences of diabetes.

Experimental studies on proteins with unexplored amyloidogenic properties:

✓ Proinsulin C-peptide or C-peptide, a 31 amino acid long molecule, was for several years a forgotten parameter in insulin studies. Much time and effort has been spent in exploring all functional features of C-peptide, only a few studies, though, have addressed C-peptide oligomerization and link this procedure with Diabetes. Early studies of C-peptide self-aggregation stated clearly that C-peptide on its own does not give rise to amyloid fibrils, a finding consistent with the extremely weak amyloidogenic profile of C-peptide. Taking all the above studies into consideration, in the present thesis, we decided to test the propensity of full length C-peptide to self-assemble into amyloid fibrils, *in vitro*. Our experimental work clearly shows that **C-peptide self-assembles into amyloid-like fibrils** and therefore, the aggregation propensity of C-peptide **is a characteristic novel feature** that should be related to physiological and also pathological conditions. **A model for amyloid fibril formation for C-peptide**, based on the chameleon properties of its sequence, is also provided.

✓ Clusterin is an extracellular, heterodimeric chaperone, which is present in all disease-associated extracellular amyloid deposits. To date, clusterin’s contribution in amyloid formation and protein deposition *in vivo* is poorly understood. The intrinsically disordered

nature of clusterin, together with its ability to specifically interact with a wide range of amyloidogenic molecules has prompted us to thoroughly study its amyloidogenic profile. Computational analysis led us to synthesize and experimentally study five potent amyloidogenic determinants, derived from the clusterin α -chain sequence. Our experimental results revealed that all five peptides self-assemble into amyloid-like fibrils *in vitro*, fulfilling all amyloid criteria. This fact provides a potent indication that at least the clusterin α -chain intrinsically exhibits amyloidogenicity and may also form amyloid-like fibrils *in vitro*. This finding also raises the possibility that, at least in some circumstances, **amyloidogenic determinants derived from clusterin *in vivo* could be a therapeutic tool** in the fight against protein aggregation disorders.

✓ Stefin A, a molecule evolutionary related to the amyloidogenic cystatin C, follows the same polymerization pathway, even though its role in amyloidosis pathology is still unknown. Stefin A provides an important protective function as an intracellular inhibitor of cysteine proteases. However, it has been suggested that oligomers of stefin A have been detected in several carcinomas. In order to determine the hidden amyloidogenic profile of stefin A, four computationally predicted amyloidogenic determinants were experimentally tested. From this work it is clear that **stefin A consists of amyloidogenic regions**, which render the polypeptide chain prone to protein aggregation, probably following a polymerization mechanism analogous to cystatin C.

Αφιερωμένο στους γονείς μου

Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της **Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Βασιλικής Οικονομίδου** με μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής τον **Ομότιμο Καθηγητή κ. Σταύρο Ι. Χαμόδρακα** και τον **Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά**.

Η Διατριβή υποστηρίχθηκε από το **Επιχειρησιακό Πρόγραμμα "Ανταγωνιστικότητα & Επιχειρηματικότητα" του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ)** με τίτλο «*Ανάπτυξη και Έλεγχος Νέων, 'Λογικά' Σχεδιασμένων, Πεπτιδίων-Αναλόγων ή Παραλλαγών της Αμυλίνης (IAPP), ως Πιθανών Φαρμάκων για τον Διαβήτη Τύπου ΙΙ' (Κωδικός Έργου ΙΙΣΥΝ-Ι-1230)*» και επιστημονικό υπεύθυνο τον **Ομότιμο Καθηγητή κ. Σ. Ι. Χαμόδρακα**, καθώς και το **Ερευνητικό Πρόγραμμα Αριστείας IKY - Siemens** με τίτλο «*Ανάλυση Δικτύου Αλληλεπιδράσεων Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών για τον εντοπισμό φαρμακευτικών – στόχων για την θεραπεία στερεοδιαταξικών ασθενειών*» και επιστημονική υπεύθυνη την **Επικ. Καθ. κ. Β. Οικονομίδου**.

Αρχικά, τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου οφείλω στην επιβλέπουσα **Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Βασιλική Οικονομίδου**. Αισθάνομαι την ανάγκη να την ευχαριστήσω πρωτίστως για τη δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω δίπλα σε μία νέα, δραστήρια και ενθουσιώδη επιστήμονα και να μοιραστώ μαζί της όλες τις συγκινήσεις και τις δυσκολίες που συνοδεύουν το ερευνητικό έργο. Ευχαριστώ θερμά για την προσωπική της συμβολή στη Διατριβή, τον χρόνο που μου προσέφερε αφειδώς, την υπομονή, την κατανόηση, την άμεση ανταπόκριση, αλλά και το ακούραστο καθημερινό ενδιαφέρον της σε πάσης φύσεως ζητήματα. Της είμαι ευγνώμων για την μετάδοση της πολύτιμης εμπειρίας της στον εργαστηριακό «πάγκο», την ηθική και υλικοτεχνική υποστήριξη της ερευνητικής μου δουλειάς, καθώς και για τη διαρκή ενθάρρυνσή της να αναπτύξω ερευνητικές πρωτοβουλίες. Κλείνοντας, θα ήθελα να αναφέρω την ειλικρινή αγωνία της για την πρόοδό μου, η οποία συνέβαλε καθοριστικά στην αρτιότητα της Διατριβής αυτής και προσωπικά με συγκινεί ιδιαίτερα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στον συνεπιβλέποντα της Διατριβής **Ομότιμο Καθηγητή κ. Σταύρο Ι. Χαμόδρακα**, η προσωπική συμμετοχή του οποίου υπήρξε καθοριστική για την πραγμάτωσή της. Τον ευχαριστώ για την ιδιαίτερη τιμή να με εντάξει στην ερευνητική του ομάδα και να επιβλέψει τόσο την προπτυχιακή εργασία μου στο Τμήμα Βιολογίας του ΕΚΠΑ, όσο και τη μεταπτυχιακή εργασία μου στο Π.Μ.Σ. «Βιοπληροφορική». Από τις προπτυχιακές έως τις μεταπτυχιακές μου σπουδές, μου δίδαξε τον αδιάκοπο ενθουσιασμό και την περιέργεια που θα πρέπει να συνοδεύει κάθε μελέτη στη έρευνα και αφιέρωσε μεγάλο μέρος του χρόνου του για την εκπαίδευση και την επίλυση όλων των ερευνητικών μου ερωτημάτων. Δεν θα ήταν υπερβολή να πω πως η βαθιά επιστημονσύνη του υπήρξε πηγή έμπνευσης σε όλα τα στάδια της ακαδημαϊκής μου εκπαίδευσης. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ για την επιμέλεια και την εποικοδομητική αξιολόγηση του κειμένου της Διατριβής, καθώς και για την ευκαιρία που μου προσέφερε να συνδυάσω το ερευνητικό έργο της διατριβής με τον παραγωγικό/επαγγελματικό τομέα, συμμετέχοντας σε ερευνητικά προγράμματα με επιστημονικό υπεύθυνο τον ίδιο.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στον **Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά** για την ουσιαστική συνεισφορά του σε όλα τα στάδια της παρούσας Διατριβής, την επιστημονική καθοδήγησή του, καθώς και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπαιδευτώ στο εργαστήριό του σε μεθόδους μοριακής βιολογίας και βιοχημείας, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος 11ΣΥΝ-1-1230. Θα ήθελα ακόμα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για την ευκαιρία που μου έδωσε, στα πλαίσια του «Προγράμματος Συνεργασίας Ελλάδας – Γερμανίας IKYDA 2016» με επιστημονικό υπεύθυνο τον ίδιο, να ταξιδέψω στη Γερμανία και να γνωρίσω αξιόλογους επιστήμονες στον κλάδο της Δομικής Βιολογίας και της Ιατρικής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής στον **Καθηγητή κ. Σ. Ευθυμιόπουλο**, στον **Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ι. Τρουγκάκο**, στην **Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Π. Κόλλια**, στον **Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Στραβοπόδη** και τέλος, στην **Ερευνήτρια Β' Δρ. Ε. Χρυσίνα** για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή.

Ευχαριστώ από καρδιάς την **Ερευνήτρια Β' Δρ. Ε. Χρυσίνα** για την πολυετή εποικοδομητική συνεργασία μας, την εκπαίδευσή μου σε θέματα Περίθλασης Ακτίνων-Χ και Κρυσταλλογραφίας και ακόμα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στη χρήση του οργάνου Περίθλασης Ακτίνων-Χ, που βρίσκεται στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ιδιαίτερος, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον **Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ι. Τρουγκάκο** για τις

γόνιμες συζητήσεις μας κατά το σχεδιασμό πειραμάτων κυτταροτοξικότητας, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος 11ΣΥΝ-1-1230. Ακόμα, επιθυμώ να ευχαριστήσω προσωπικά τον **Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Στραβοπόδη** για το ειλικρινές ενδιαφέρον του και τη βοήθειά του, σε όλα τα στάδια της προπτυχιακής και μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στον **Καθηγητή κ. Ε. Πατσούρη** και το συνεργάτη του **Δρ. κ. Γ. Μπαλτατζή**, για την πολύτιμη βοήθεια τους με τη διάθεση των εγκαταστάσεων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Επιθυμώ ακόμα να ευχαριστήσω την **Καθηγήτρια κ. Ι. Παπασιδέρη**, την **Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μ. Αντωνέλλου**, καθώς και όλο το προσωπικό του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, τα μέλη **Ε.ΔΙ.Π.**, το **διοικητικό προσωπικό**, τους **Μεταδιδακτορικούς Φοιτητές** και τους **Υποψ. Διδάκτορες** για το πνεύμα συνεργασίας και κατανόησης, το οποίο διευκόλυνε κατά πολύ τη διεξαγωγή της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ θερμά την **Υποψ. Διδάκτορα Χ. Χειμωνίδη** για την πολύτιμη συνεργασία μας στα πειράματα κυτταροτοξικότητας, καθώς και την **Υποψ. Διδάκτορα Α. Παπαγεωργίου** για τη συνεργασία μας σε θέματα μοριακής βιολογίας και βιοχημείας. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην **κ. Μ. Αρχοντάκη** για την γραμματειακή υποστήριξη κατά τη διεξαγωγή της Διατριβής.

Υπήρξε μεγάλη χαρά και τύχη για εμένα να βρεθώ σε μία ομάδα που αποτελείται από δυναμικούς επιστήμονες με αυθόρμητη διάθεση για συνεργασία, γι' αυτό και ο ακαδημαϊκός κύκλος των ευχαριστιών μου δεν μπορεί παρά να κλείσει με τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην **ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Βιοφυσικής & Βιοπληροφορικής του ΕΚΠΑ**. Ξεκινώντας, ευχαριστώ από καρδιάς τους **Δρ. Ζ. Αίτου** και **Δρ. Ν. Παπανδρέου** για την πάσης φύσεως βοήθεια που μου παρείχαν. Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τα παρελθόντα μέλη του εργαστηρίου **Δρ. Μ. Θεοδοροπούλου** και **Δρ. Γ. Τσαούση** για την καθοδήγηση στα πρώτα βήματα της Διατριβής μου και για την άσογη συνεργασία μας. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον στενό μου συνεργάτη **Δρ. Ν. Λούρο**, με τον οποίο μοιραστήκαμε για πολλά χρόνια τον ίδιο εργαστηριακό πάγκο, εκπαιδευτήκαμε παρέα βήμα προς βήμα και συνεργαστήκαμε υποδειγματικά. Ευχαριστίες επιθυμώ να απευθύνω στους **Υποψ. Διδάκτορες Κ. Νάστου** και **Φ. Μπαλτούμα** για την καθημερινή συνεργασία και αλληλεπίδραση μας. Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, παρόντες ή παρελθόντες, με τους οποίους συνεργάστηκα και ήρθα σε επαφή όλα

αυτά τα χρόνια, συγκεκριμένα τους *Γ. Νάση, Π. Σπαθάρα, Α. Γιουλάτου, Φ. Ακτύπη, Ε. Δημοπούλου, Χ. Μαστρόκαλου, Κ. Μπίζα, Ε. Καραταράκη, Γ. Μπόλα, Ι. Αποστολάκου, Κ. Κατσαφάνα, Φ. Καρδαρά, Α. Ρούσου, Β. Γριμανέλλη, Χ. Γιαννακούρα, Δ. Κουτσούρη, Ν. Λάππα, Χ. Δουλάμη, Μ. Καραμολέγκου, Π. Γιαννέλου, Α. Λεοντή*. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην *Υποψ. Διδάκτορα Κ. Νάστου* και στις προπτυχιακές φοιτήτριες *Κ. Μπίζα* και *Χ. Μαστρόκαλου* για τη συνεργασία μας κατά την κατασκευή του «Amyloid Interactome».

Κλείνοντας, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους ανθρώπους εκείνους που δίνουν χρώμα και οξυγόνο στη ζωή μου. Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στους *αγαπημένους μου φίλους*, μία δεύτερη μεγάλη οικογένεια από ξεχωριστούς ανθρώπους που μου συμπαραστάθηκαν, συνειδητά ή ασυνείδητα, όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον *Κωστή* για το ταξίδι που διανύουμε παρέα, για την κατανόηση του, καθώς και για την ακούραστη υποστήριξη του από την πρώτη λέξη μέχρι και την τελευταία πρόταση αυτής της Διατριβής. Τέλος, και πάνω από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους *αγαπημένους μου γονείς* για την επιμονή να επενδύουν ολόκληρο το «είναι» τους στα όνειρά μου και να εμψυχώνουν κάθε μικρό ή μεγάλο βήμα μου. Ο κόπος και οι προσπάθειές μου, μπορούν μόνο στο ελάχιστο να ανταμείψουν την αγάπη και την αφοσίωσή τους, γι' αυτό και τους αφιερώνω από καρδιάς την παρούσα Διατριβή.

Με εκτίμηση,

Εβίτα

Περιεχόμενα

Περίληψη	I
Abstract.....	VII
Πρόλογος.....	XV
Περιεχόμενα.....	XXI
Ευρετήριο Πινάκων	XXV
Ευρετήριο Εικόνων.....	XXVII
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Βασικές Αρχές Πρωτεϊνικού Διπλώματος	1
1.2. Σύντομη Ιστορική Αναδρομή.....	5
1.3. Αμυλοειδή Ινίδια.....	9
1.3.1. Μορφολογία των αμυλοειδών ινιδίων	11
1.3.2. Cross-β αρχιτεκτονική των αμυλοειδών ινιδίων.....	18
1.3.3. Δέσμευση της χρωστικής Congo Red.....	25
1.4. Αμυλοειδογένεση.....	28
1.4.1. Μηχανισμοί αμυλοειδογένεσης	28
1.4.2. Αυτοσυγκρότηση αμυλοειδών ινιδίων σε ατομικό επίπεδο.....	33
1.4.3. Διασταυρωτή πυρήνωση μεταξύ αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.....	40
1.5. Αμυλοειδώσεις – Στερεοδιαταξικές Ασθένειες	43
1.6. Αμυλοειδογόνες Πρωτεΐνες	48
1.6.1. Αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες in vivo	48
1.6.2. Αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες in vitro.....	53
1.6.3. Αμυλοειδογόνοι καθοριστές	55
1.6.4. Ανασκόπηση των βάσεων πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης.....	58
1.7. Στόχοι της Διδακτορικής Διατριβής	68

2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	71
2.1.	Συστηματική Μελέτη Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών	71
2.1.1.	Εξόρυξη του συνόλου δεδομένων της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης	72
2.1.2.	Συλλογή συνόλου δεδομένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών	80
2.1.3.	Οπτικοποίηση και κατασκευή του δικτύου.....	81
2.1.4.	Ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων μέσω της θεωρίας γράφων	83
2.2.	Συστήματα Μελέτης Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών	89
2.2.1.	Υπεροικογένεια κυστατινών	89
2.2.2.	Αμυλίνη.....	102
2.2.3.	Κλαστερίνη	108
2.2.4.	C-πεπτιδίο της προΐνσουλίνης.....	112
2.3.	Δομικές Μελέτες σε Αμυλοειδογόνες Πρωτεΐνες του Ανθρώπου	119
2.3.1.	Σύνθεση πεπτιδίων-αναλόγων	119
2.3.2.	Δομικές μελέτες πεπτιδίων.....	122
2.3.3.	Ανάλυση της ακολουθίας και τη δομής	144
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	153
3.1.	Δίκτυο Αλληλεπιδράσεων των Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών.....	154
3.1.1.	Κατασκευή του δικτύου αλληλεπιδράσεων	157
3.1.2.	Ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων με τη θεωρία γράφων	160
3.1.3.	Συσχετίσεις μεταξύ των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών	167
3.2.	Κυστατίνη C	175
3.2.1.	Ανάλυση της ακολουθίας και της δομής της κυστατίνης C.....	175
3.2.2.	Δομικές μελέτες της ανθρώπινης κυστατίνης C	178
3.2.3.	Συνεισφορά των πεπτιδίων-αναλόγων στον πολυμερισμό της κυστατίνης C	197
3.2.4.	Ο αμυλοειδογόνος πυρήνας της ανθρώπινης κυστατίνης C	201
3.2.5.	Αλληλεπιδράσεις των πεπτιδίων-αναλόγων της κυστατίνης C	204
3.2.6.	Η δυναμική της αλληλεπίδρασης στην κυστατίνη C	210
3.3.	Αμυλίνη	216
3.3.1.	Δομικές μελέτες της ανθρώπινης αμυλίνης φυσικού τύπου	217
3.3.2.	Δομικές μελέτες της αμινοτελική περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης	221
3.3.3.	Δομικές μελέτες της καρβοξυτελικής περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης.....	234
3.3.4.	Δομικές μελέτες συνεπώασης στην αμυλίνη	240
3.4.	C-πεπτιδίο της προΐνσουλίνης	248

3.4.1. Ανάλυση της Ακολουθίας του C-πεπτιδίου της προΐνσουλίνης	248
3.4.2. Δομικές μελέτες του C-πεπτιδίου της προΐνσουλίνης.....	251
3.4.3. Πειράματα συνεπάωσης C-πεπτιδίου της προΐνσουλίνης & Αμυλίνης	261
3.5. Κλαστερίνη	263
3.5.1. Ανάλυση της Ακολουθίας της κλαστερίνης.....	263
3.5.2. Δομικές μελέτες της α-αλυσίδας της κλαστερίνης	266
3.6. Στεφίνη Α.....	277
3.6.1. Ανάλυση της ακολουθίας και της δομής της ανθρώπινης στεφίνης Α	277
3.6.2. Δομικές μελέτες της ανθρώπινης στεφίνης Α.....	280
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	289
4.1. Μακροσκοπική Ανάλυση Συσχετίσεων Μεταξύ Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών.....	290
4.2. Μικροσκοπική Ανάλυση Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών	291
4.3. Γενικά Συμπεράσματα – Μελλοντικές κατευθύνσεις	296
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	299
6. ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ.....	331
6.1. Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά με Σύστημα Κριτών.....	331
6.2. Κεφάλαια σε Βιβλία.....	333
6.3. Εξώφυλλα σε Επιστημονικά Περιοδικά με Σύστημα Κριτών.....	333

Ευρετήριο

Πινάκων

Πίνακας 1. Λίστα συχνά απαντώμενων συστημικών αμυλοειδώσεων που προκύπτουν από εξωκυτταρική εναπόθεση ινιδίων.....	45
Πίνακας 2. Λίστα συχνά απαντώμενων οργανοεξαρτώμενων αμυλοειδώσεων που προκύπτουν από εξωκυτταρική εναπόθεση ινιδίων.....	46
Πίνακας 3. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες στον άνθρωπο, όπως παρουσιάστηκαν από την International Society of Amyloidosis (ISA) το 2005, 2010, 2012, 2014 και 2016. Με μπλε σημειώνονται οι νέες εγγραφές της λίστας για την εκάστοτε χρονολογία.....	49
Πίνακας 4. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες και το όργανο ή ο ιστός στο οποίο εναποτίθενται.....	51
Πίνακας 5. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που δημιουργούν ενδοκυτταρικά έγκλειστα.....	52
Πίνακας 6. Σύνολα δεδομένων αμυλοειδογονικότητας. Δίνεται σύντομη περιγραφή των περιεχομένων κάθε συνόλου δεδομένων, καθώς και η δημοσιευμένη εργασία από την οποία προέκυψαν.....	60
Πίνακας 7. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.....	62
Πίνακας 8. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων.....	64
Πίνακας 9. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδώσεων... 66	
Πίνακας 10. Συγκεντρωτικός πίνακας των 145 μοναδικών εγγραφών των προδρόμων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (<i>non-redundant amyloidogenic protein precursors</i>). Σημειώνεται το σύνολο δεδομένων από το οποίο έχει εξαχθεί η κάθε πρωτεΐνη (με +), καθώς και η ύπαρξη ή μη πεπτιδικού αμυλοειδογόνου τμήματος της πρωτεΐνης.....	74
Πίνακας 11. Συγκεντρωτική καταγραφή των αλορίθμων πρόγνωσης περιοχών με 'τάση προς συσσωμάτωση'. Καταγράφεται η προσέγγιση κάθε αλγορίθμου, ο ιστότοπος διαθεσιμότητας του εξηγητητή του (<i>server link</i>), καθώς και η πρώτη του αναφορά στη βιβλιογραφία.....	146
Πίνακας 12. Το σύνολο δεδομένων καλά χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με	

την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων όπως περιγράφονται στη λίστα πρωτεϊνών της Διεθνούς Ένωσης Αμυλοειδώσεων, που δημοσιεύθηκε το 2014 (Sipe *et al.*, 2014).....

158

Πίνακας 13. Το σύνολο των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την *in vitro* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων που εντοπίστηκαν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.....

159

Πίνακας 14. Οι 20 πρωτεΐνες με τον υψηλότερο βαθμό κόμβου (πρωτεΐνες κεντρικοί κόμβοι) του δικτύου των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.....

165

Πίνακας 15. Οι 20 πρωτεΐνες με την υψηλότερη ενδιάμεση κεντρικότητα (πρωτεΐνες στενωποί) του δικτύου των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.....

166

Πίνακας 16. Ταινίες όπως καταγράφονται στο ATR FT-IR (1100-1800 cm^{-1}) φάσμα ενυδατωμένου υμενίου του αμυλοειδογόνου πεπτιδίου-αναλόγου ⁴⁷LQVVR⁵¹ της κυστατίνης C, μετά την αυτοσυγκρότησή του σε αμυλοειδή ινίδια (Εικόνα 98). Δίνονται οι επικρατέστερες αποδόσεις τους.....

184

Πίνακας 17. Ανακλάσεις (d_{obs}) που έχουν καταγραφεί από περιθλασιγράμματα ίνας προσανατολισμένων ινιδίων του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵.....

189

Πίνακας 18. Ταινίες όπως καταγράφονται στο ATR FT-IR (1100-1800 cm^{-1}) φάσμα ενυδατωμένου υμενίου του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, μετά την αυτοσυγκρότησή του σε μικροκρυστάλλους (Εικόνα 104). Δίνονται οι επικρατέστερες αποδόσεις τους.....

193

Πίνακας 19. Ανακλάσεις (d_{obs}) που έχουν καταγραφεί από περιθλασιγράμματα ίνας προσανατολισμένων ινιδίων του C-πεπτιδίου....

257

Πίνακας 20. Ταινίες όπως καταγράφονται στο ATR FT-IR (1100-1800 cm^{-1}) φάσμα ενυδατωμένου υμενίου του αμυλοειδογόνου C-πεπτιδίου, μετά την αυτοσυγκρότησή του σε χαρακτηριστικά ινίδια (Εικόνα 161). Δίνονται οι επικρατέστερες αποδόσεις τους.....

259

Πίνακας 21. Κορυφές και αποδόσεις των φασμάτων ATR FT-IR των ¹²NFHAMFQ¹⁸, ³⁰AMDIHF³⁵, ⁸¹ILSVD⁸⁴, ¹⁵⁵YYLRVT¹⁶¹ και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³ πεπτιδίων-αναλόγων, έπειτα από την αυτοσυγκρότησή τους σε ινίδια.....

274

Πίνακας 22. Κορυφές και αποδόσεις των φασμάτων ATR FT-IR των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A.....

287

Ευρετήριο

Εικόνων

Εικόνα 1. Τα μονοπάτια των πιθανών στερεοδιαταξικών καταστάσεων στις οποίες μπορεί να βρεθεί μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. 4

Εικόνα 2. Αμυλοειδείς εναποθέσεις σε ιστούς από πρώιμες μελέτες ασθενών. Προσαρμογή από Frerichs, 1862 (Sipe and Cohen, 2000). 6

Εικόνα 3. Οι πρώτες ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης αμυλοειδών εναποθέσεων, με αρνητική χρώση (Προσαρμογή από (Cohen and Calkins, 1959)).... 7

Εικόνα 4. Ηλεκτρονιογραφίες αμυλοειδών ινιδίων. (α) Αμυλοειδή ινίδια, που απομονώθηκαν από σπλήνα ασθενούς με αμυλοείδωση (σκίαση – x 37,000) (Προσαρμογή από (Sipe and Cohen, 2000)) (β) Αμυλοειδή ινίδια τρανσθυρετίνης, που απομονώθηκαν από ασθενείς με οικογενή αμυλοειδή πολυνευροπάθεια (FAP) (αρνητική χρώση – Ράβδος 100 nm) (Προσαρμογή από (Serpell et al., 1995)). 10

Εικόνα 5. *In situ* εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων σε ασθενείς με (α) την νόσο του Alzheimer και (β) με αμυλοείδωση που ακολουθεί τη χρόνια αιμοκάθαρση. Ο αστερίσκος υποδεικνύει περιοχή με πυκνές εναποθέσεις ινιδίων. Παρατηρείται συσσώρευση αμυλοειδών ινιδίων (βέλος) ανάμεσα στα ινίδια του κολλαγόνου (Col). (Μεγέθυνση x 186,700 ((α) Προσαρμογή από (Inoue et al., 1997), (β) Προσαρμογή από (Inoue, 2008)) 12

Εικόνα 6. Αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης καλσιτονίνης σε υδατικά διαλύματα *in vitro* (Προσαρμογή από (Bauer et al., 1995)). 14

Εικόνα 7. Πολυμορφισμός των αμυλοειδών ινιδίων της ανθρώπινης αμυλίνης σε υδατικά διαλύματα *in vitro* (Προσαρμογή από (Goldsbury et al., 1997)) (Ράβδος 100nm). 15

Εικόνα 8. Σφαιρικές δομές αμυλοειδών ινιδίων. Παρουσιάζονται οι δομές σφαιρουλιτών στο οπτικό μικροσκόπιο (α) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση του σταυρού της Μάλτας, κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Ράβδος 4 μ m) (α) (Hamodrakas et al., 2004). 16

Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης που οδηγεί στη δημιουργία πολυμορφικών αμυλοειδών ινιδίων. Το

πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη συσσώρευση μη-φυσιολογικά διπλωμένων μονομερών σε περιοχές που μπορεί να περιέχουν μεταβαλλόμενο αριθμό μορίων νερού. Η περιοχές αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν διαφορετικά μη-φυσιολογικά διπλωμένα μόρια, τα οποία αλληλεπιδρούν με διακριτούς τρόπους προς το σχηματισμό πρωτοϊνιδίων, που διαφοροποιούνται όχι μόνο ως προς τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, αλλά και ως προς το περιεχόμενο του διαλύτη. Κατά το δεύτερο βήμα, η δημιουργία των ώριμων ινιδίων προκύπτει κατά την αλληλεπίδραση πρωτοϊνιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν περαιτέρω για να σχηματίσουν μία ποικιλία αμυλοειδών ινιδίων. Σε πολλές από τις πολυμορφικές δομές, ένας αριθμός μορίων νερού μπορεί να διατηρείται στη δομή του ινιδίου (Προσαρμογή από (Thirumalai et al., 2012)). 17

Εικόνα 10. Το πρώτο περιθλασίγραμμα της cross-β αρχιτεκτονικής. (α) Περιθλασίγραμμα της cross-β δομής από το μετάξι του εντόμου *Crysope flava*. (β) Σχηματικό διάγραμμα β-πτυχωτής επιφάνειας που δημιουργείται από αλληλεπίδραση μικρών πολυπεπτιδικών τμημάτων (1) ή από το κανονικό δίπλωμα μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας (2). Τα δύο διαγράμματα είναι η πρώτη εξήγηση της cross-β αρχιτεκτονικής από το Geddes και τους συνεργάτες του (Προσαρμογή από (Geddes et al., 1968)). 18

Εικόνα 11. Περιθλασίγραμμα *ex vivo* αμυλοειδών ινιδίων. (α) Περιθλασίγραμμα cross-β δομής αμυλοειδών ινιδίων που απομονώθηκαν από το σπλήνα και το ήπαρ ασθενών (Προσαρμογή από (Eanes and Glenner, 1968)). (β) Περιθλασίγραμμα cross-β δομής αμυλοειδών ινιδίων του Αβ πεπτιδίου, από ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer. Η κεφαλή βέλους σημειώνει την ανάκλαση στα 4.7 Å, ενώ τα μικρά βέλη σημειώνουν την ανάκλαση στα 10 Å (Προσαρμογή από (Kirschner et al., 1986)). 19

Εικόνα 12. Η αρχιτεκτονική των ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση του Αβ πεπτιδίου. Τυπικό περιθλασίγραμμα της cross-β δομής (αριστερά). Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των ινιδίων του Αβ πεπτιδίων σε ατομικό επίπεδο (δεξιά). Οι τιμές των ανακλάσεων αφορούν πειράματα σε προσανατολισμένη ίνα ινιδίων του Αβ πεπτιδίου (Προσαρμογή από (Serpell, 2000)). 20

Εικόνα 13. Η αρχιτεκτονική της ινιδιακής δομής της τρανθυρετίνης βασισμένη σε δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ. Απεικόνιση πιθανού μοντέλου του πυρήνα της δομής των αμυλοειδών πρωτοϊνιδίων κατά μήκος (α) και κάθετα (β) στο άξονα του ινιδίου. Οι β-κλώνοι οργανώνονται σε τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες. (γ) Χωροπληρωτικό μοντέλο του πυρήνα των αμυλοειδών πρωτοϊνιδίων της τρανσθυρετίνης. Οι

τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες δημιουργούν δύο ζεύγη β-πτυχωτών επιφανειών (γαλάζιο και φούξια) και συγκροτούν ένα πρωτοϊνίδιο διαμέτρου 50 Å (Προσαρμογή από (Blake and Serpell, 1996))...... 21

Εικόνα 14. Απλοποιημένη αναπαράσταση των πιθανών στερεοδιατάξεων των β-κλώνων στην cross-β δομή. Τα στερεοδιαταξικά φερμουάρ ταξινομούνται με βάση τις διευθετήσεις των β-κλώνων που συγκροτούν τις β-πτυχωτές επιφάνειες σε 9 διακριτές κλάσεις (Προσαρμογή από (Eisenberg and Sawaya, 2017)). 23

Εικόνα 15. Χρώση μυοκαρδίου από ασθενή με αμυλοειδή καρδιομυοπάθεια, με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη (δεξιά) (Προσαρμογή από (Ruberg and Berk, 2012))...... 25

Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει συνοπτικά τα χαρακτηριστικά της δομής των αμυλοειδών ινιδίων και την πρόσδεση της χρωστικής σε αυτά. (α) Πακεταρισμένες β-πτυχωτές επιφάνειες. (β) Περιθλασίγραμμα της cross-β δομής των αμυλοειδών ινιδίων. (γ) Υποθετικά μοντέλα πρόσδεσης της χρωστικής Congo Red στα αμυλοειδή -i- πρόσδεση των ομάδων του σε κάθε 5 πεπτιδικές αλυσίδες, -ii- απόθεση μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Προσαρμογή από (Frid *et al.*, 2007)). 26

Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας της *de novo* αμυλοειδογένεσης. (Προσαρμογή από (Eichner and Radford, 2011)).28

Εικόνα 18. Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση των μοριακών μονοπατιών της αμυλοειδογένεσης. Ξεκινώντας από ένα πρωτεϊνικό μονομερές (α), μία αλληλουχία από αντιστρεπτά γεγονότα (πορτοκαλί βέλη) οδηγεί στη δημιουργία παροδικών ολιγομερών (β). Η προσθήκη άλλων μονομερών (μπλε βέλη) στα παροδικά ολιγομερή (γ_1 , γ_2) μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πολυμορφικών ινιδίων (δ_1 , δ_2). Γεγονότα δευτερογενούς πυρήνωσης μπορεί να οδηγήσουν σε σχηματισμό ενδιάμεσων (πράσινα βέλη), όπως τα ολιγομερή στον μονοπάτι (ε) ή το πρωτοϊνίδιο στο μονοπάτι (στ), τα οποία με τη σειρά τους θα οδηγήσουν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων διακριτής μορφολογίας (ζ) (Προσαρμογή από (Tycko, 2015)). 30

Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε παθολογικές καταστάσεις. Περιγράφονται τέσσερα διαφορετικά μονοπάτια συσσωμάτωσης: (α) το μονοπάτι δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων από φυσιολογικά μονομερή που μετατρέπονται σε μη-φυσιολογικά μονομερή, (β) το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν μη τοξικά ολιγομερή που δεν καταλήγουν σε αμυλοειδή ινίδια, (γ) το μονοπάτι των

κατακερματισμένων ινιδίων που αυτοσυγκροτούνται ξανά προς το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων και (δ) το μονοπάτι των ώριμων αμυλοειδών ινιδίων που δρουν ως κριώματα για την κατάλυση δευτερογενούς ολιγομερισμού και πυρήνωσης (Προσαρμογή από (Verma *et al.*, 2015))...... 31

Εικόνα 20. Οι εναλλακτικοί μηχανισμοί της αυτοσυγκρότησης των πρωτεϊνικών μορίων σε αμυλοειδή ινίδια. Τα οργανωμένα συσσωματώματα μπορεί να αυτοσυγκροτούνται με μηχανισμούς τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών (1), cross-β σκελετού (2) ή στοιβαξης (3)(4) (Προσαρμογή από (Jahn and Radford, 2008))...... 33

Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου αναδίπλωσης. (α) Απλοποιημένο σχήμα της δομικής μετάβασης ενός πρωτεϊνικού μορίου από τη φυσιολογική στη ινιδιακή κατάσταση. Η μετατροπή από τη μία στην άλλη μορφή προκαλεί ξεδίπλωμα της φυσιολογικής πρωτεΐνης και εκ νέου δίπλωμα προς το σχηματισμό του αμυλοειδούς σκελετού (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β-ε) Το μοντέλο αναδίπλωσης κατά την αυτοσυγκρότηση της ινσουλίνης σε αμυλοειδή ινίδια. Η στερεοδιαταξική τροποποίηση των δύο αλυσίδων της ινσουλίνης (γ_1 , γ_2) οδηγεί στη δημιουργία αντικριστών β-κλώνων (δ), η στοιβαξη των οποίων οδηγεί στη συγκρότηση του άξονα των αμυλοειδών ινιδίων και κατ' επέκταση στη δημιουργία υπερελικών αμυλοειδών ινιδίων (ε) (Προσαρμογή από (Jimenez *et al.*, 2002))...... 35

Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών. (α) Απλοποιημένο σχήμα της δομικής μετάβασης ενός πρωτεϊνικού μορίου από την ενδογενώς μη δομημένη στην ινιδιακή κατάσταση (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β-γ) Το στερεοδιαταξικό φερμουάρ που δημιουργείται από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου GNNQQNY της χαντικτίνης του ανθρώπου (Προσαρμογή από (Nelson *et al.*, 2005)). 35

Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση των υποκατηγοριών του μοντέλου αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφορά (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006b)). 36

Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της στοιβαξης. (α) Απλοποιημένο σχήμα της στοιβαξης μονομερών προς τη δημιουργία του cross-β άξονα των ινιδίων (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)), (β-γ) Το προτεινόμενο μοντέλο πολυμερισμού της ανθρώπινης υπεροξειδικής δισμουτάσης 1 σε απεικόνιση χωροπληρωτικού μοντέλου (β) και καρτούν (γ). Σημειώνεται η διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ παρακείμενων μονομερών (Προσαρμογή από (Elam *et al.*, 2003))...... 37

- Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου του cross-β σκελετού. (α) Απλοποιημένο σχήμα της αλληλεπίδρασης διαδοχικών β-κλώνων προς τη δημιουργία του cross-β άξονα των ινιδίων (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β-γ) Ο αμυλοειδογόνος πυρήνας της β₂-μικροσφαιρίνης δημιουργείται από την αλληλεπίδραση γειτονικών καρβοξυτελικών τμημάτων με δομή β-φουρκέτας (Προσαρμογή από (Ivanova *et al.*, 2004)). 38
- Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. (α) Απλοποιημένο σχήμα της συνεχόμενης συνεισφοράς αυτοτελών δομικών στοιχείων μεταξύ γειτονικών μονομερών (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β) Η στερεοδιαταξική τροποποίηση μία περιοχής αρμού (λούπες) που συνδέει δύο αυτοτελή δομικά στοιχεία ενός πρωτεϊνικού μορίου (πράσινο & γαλάζιο) οδηγεί στη δημιουργία του σκελετού του αμυλοειδούς ινιδίου (Προσαρμογή από (Janowski *et al.*, 2004)). 39
- Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση ενός εύρους πιθανών ετεροπολυμερών β₂-μικροσφαιρίνης. Με μπλε απεικονίζεται η δομή της μεταλλαγμένης β₂-μικροσφαιρίνης (PDB ID: 2XKU) και με ματζέντα η δομή της β₂-μικροσφαιρίνης φυσικού τύπου (PDB ID: 2XKS) (Προσαρμογή από (Sarell *et al.*, 2013a)). 41
- Εικόνα 28. Απλοποιημένη παρουσίαση της δημιουργίας ετεροολιγομερών. Οι σφαιρικές υδατοδιαλυτές μορφές των πρωτεϊνικών μορίων παρουσιάζονται με πορτοκαλί και μοβ σφαίρες (αριστερά). Παρατηρούμε ότι η αμυλοειδογένεση κατά τη διασταυρωτή πυρήνωση μεταξύ των δύο διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων διαφοροποιεί την κινητική δημιουργίας του ετεροολιγομερών (Προσαρμογή από (Young *et al.*, 2017)). 42
- Εικόνα 29. Πειραματικά αποτελέσματα για την αυτοτελή δομική περιοχή της υπομονάδας p85a της κινάσης της φωσφατυδιλοϊνσιτόλης. Παρατηρούμε αμυλοειδή ινίδια με χαρακτηριστικές ιδιότητες (αριστερά), καθώς και περιθλασίγραμμα χαρακτηριστικό της cross-β δομής (Προσαρμογή από (Guijarro *et al.*, 1998)). 53
- Εικόνα 30. Αμυλοειδογόνα τμήματα οδηγούν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων στην RNase A (α) Η δομή της RNase A. Τα τμήματα που χρωματίζονται είναι υποψήφιος περιοχές για την προσθήκη αμυλοειδογόνων τμημάτων. Το αμινοτελικό τμήμα χρωματίζεται με πράσινο, ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα και η περιοχή αρμός με πορτοκαλί. (β) Πιθανό μοντέλο πολυμερισμού της χιμαιρικής RNase A μετά την προσθήκη εξαπεπτιδίων. (γ) Τα πειραματικά αποτελέσματα των χιμαιρικών ενζύμων έπειτα από την προσθήκη των εξαπεπτιδίων στην καρβοξυτελική περιοχή αρμό (Προσαρμογή από (Teng *et al.*, 2012)). 57
- Εικόνα 31. Βάσεις δεδομένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών..... 80
- Εικόνα 32. Το περιβάλλον του λογισμικού Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). 82
- Εικόνα 33. Καρτέλα αποτελεσμάτων υπολογισμού απλών παραμέτρων της μεθόδου NetworkAnalyzer (Assenov *et al.*, 2008), όπως εμφανίζεται στο εργαλείο Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). 83
- Εικόνα 34. Απλοποιημένη απεικόνιση ενός απλού, μη κατευθυνόμενου γράφου. Ο γράφος αποτελείται από 4 κόμβους (V1 – V4)..... 84
- Εικόνα 35. Απλοποιημένο παράδειγμα για τη μέτρηση της πυκνότητας δικτύου. Πυκνό δίκτυο (αριστερά), αραιό δίκτυο (δεξιά). 85
- Εικόνα 36. Εύρεση μέσου μήκους μονοπατιού σε απλοποιημένο μη κατευθυνόμενο γράφο. Το μέσο μήκος μονοπατιού του παραπάνω γράφου δίνεται από το πηλίκο αθροίσματος των μικρότερων μονοπατιών μεταξύ των κόμβων του δικτύου (6) προς τον αριθμό των ζευγών κόμβων (5)..... 86
- Εικόνα 37. Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών των ανθρώπινων κυστατινών, ανά ομόλογη οικογένεια. (α) Οικογένεια στεφινών (β) Οικογένεια κυστατινών (γ) Οικογένεια κινινογενινών. Οι ακολουθίες έχουν εξαχθεί από τη βάση UniProtKB (UniProt, 2015). Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις του εργαλείου T-coffee (Notredame *et al.*, 2000), ενώ για την οπτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). Οι στοίχισεις χρωματίζονται με βάση την ποσοστιαία ταύτιση των ακολουθιών (κατώφλι συντήρησης >=30%).. 90
- Εικόνα 38. Η τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (*cystatin fold*) στην πρώτη κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη κυστατίνη του *Gallus gallus*. Η τοπολογία των δευτεροταγών στοιχείων της παραπάνω δομής είναι N – β1 – α1 – β2 – L1 – β3 – AS – β4 – L2 – β5 – C, όπου β: οι β-κλώνοι, α: οι α-έλικες, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο. Στην περίπτωση της κυστατίνης του κοτόπουλου στην περιοχή AS εντοπίζεται και η έλικα α2 (κωδικός 1CEW στη βάση PDB). 91
- Εικόνα 39. Μονομερές της ανθρώπινης κυστατίνης C. Τεχνητά-σταθεροποιημένο μονομερές της ανθρώπινης κυστατίνης C που δημιουργήθηκε από τον Kolodziejczyk και τους συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το μονομερές της κυστατίνης C του κοτόπουλου (44% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας) και κατευθύνοντας τον σχηματισμό δύο νέων δισουλφιδικών δεσμών (κωδικός 3GAX στη βάση PDB) (Kolodziejczyk *et al.*, 2010). Παρατηρούμε την χαρακτηρισική τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (Εικόνα 38). (α) Η β-πτυχωτή επιφάνεια των πέντε αντιπαράλληλων β-κλώνων

χρωματίζεται με πορτοκαλί, ενώ η κεντρική α-έλικα χρωματίζεται με κυανό (β: οι β-κλώνοι, α: οι α-έλικες, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο). (β) Σημειώνεται με φούξια η θέση της λευκίνης 68, η οποία μεταλλάσσεται σε γλουταμίνη στην περίπτωση της εγκεφαλικής αγγειοπάθειας Ισλανδικού τύπου.... 93

Εικόνα 40. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας μετά θάνατον (*post mortem*) σε ιστούς εγκεφάλου ατόμου με εγκεφαλική αγγειοπάθεια Ισλανδικού τύπου. Παρατηρείται η δέσμευση του αντισώματος έναντι της κυστατίνης C στον έσω χιτώνα των αγγείων του εγκεφάλου. (α) (Προσαρμογή από (Rostagno *et al.*, 2010)) (β) (Προσαρμογή από (Palsdottir *et al.*, 2006))..... 94

Εικόνα 41. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων από την *in vitro* αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης κυστατίνης C. (α) Αμυλοειδή ινίδια της ανθρώπινης κυστατίνης C, φυσικού τύπου. (β) Αμυλοειδή ινίδια της μεταλλαγμένης (L68Q) ανθρώπινης κυστατίνης C. (γ)(δ) Ολιγομερή αμυλοειδών ινιδίων της ανθρώπινης κυστατίνης C φυσικού τύπου σχήματος ντόνατ (*donut-shaped oligomers*). (Προσαρμογή από (Wahlbom *et al.*, 2007)) (Ράβδοι 100nm)..... 96

Εικόνα 42. Κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές της ανθρώπινης κυστατίνης C. Οι δομές παρουσιάζονται σε αναπαράσταση cartoon με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). (α) Φυσιολογικό μονομερές (κωδικός 3GAX στη βάση PDB) (Kolodziejczyk *et al.*, 2010). (β) Μη-φυσιολογικό μονομερές, (γ) διμερές, (δ) τετραμερές, (ε) οκταμερές (κωδικός 1R4C στη βάση PDB) (Janowski *et al.*, 2004). ... 98

Εικόνα 43. Κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές της ανθρώπινης στεφίνης A. (α) Το μονομερές της ανθρώπινης στεφίνης A ακολουθεί την τοπολογία του διπλωματος των κυστατινών (Εικόνα 38). Η δομή έχει συνκρυσταλλωθεί με την πρωτεΐνη καθεψίνη B και παρουσιάζει τη στεφίνη A στην φυσιολογική ενεργή της στερεοδιάταξη (κωδικός 3K9M στη βάση PDB) (Renko *et al.*, 2010). Η πρωτεΐνη χρωματίζεται με βάση τα στοιχεία δευτεροτατούς δομής. Η β-πτυχωτή επιφάνεια των πέντε αντιπαράλληλων β-κλώνων χρωματίζεται με πορτοκαλί, ενώ η κεντρική α-έλικα χρωματίζεται με κυανό (β: οι β-κλώνοι, α: α-έλικα, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο). (β) Η διμερισμένη δομή της ανθρώπινης στεφίνης A (κωδικός 1N9J στη βάση PDB) (Staniforth *et al.*, 2001) προκύπτει με το μηχανισμό της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. Οι A και B αλυσίδες σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα. Οι δομές παρουσιάζονται σε αναπαράσταση cartoon με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005)..... 100

Εικόνα 44. Πιθανή αναπαράσταση ολιγομερισμένων μορφών της ανθρώπινης στεφίνης A. Η πρόταση δημιουργίας ινδιακών δομών της στεφίνης A εμπλέκει το μηχανισμό της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. Παρουσιάζεται το πιθανό μοντέλο 'στοίβαξης' διμερών στεφίνης A, όπως έχει προταθεί από τη Staniforth και τους συνεργάτες της (Προσαρμογή από (Staniforth *et al.*, 2001)). 101

Εικόνα 45. Η διαδικασία ωρίμανσης της προ-προαμυλίνης σε ώριμη αμυλίνη. (α) Η πρωτοταγής ακολουθία της προ-προαμυλίνης, (β) της προαμυλίνης και της (γ) ώριμης αμυλίνης (Προσαρμογή από (Cao *et al.*, 2013))..... 102

Εικόνα 46. Η αμινοξική σύσταση της ώριμης αμυλίνης των θηλαστικών. Ακολουθείται η αριθμηση της ανθρώπινης ακολουθίας. Η αμυλίνη είναι υψηλά συντηρημένη αλλά εμφανίζει σημαντικές αλλαγές στην περιοχή 20-29 (σημειώνεται με κόκκινο κουτί) μεταξύ των οργανισμών. Τα κατάλοιπα προλίνης στις θέσεις 25, 28 και 29, που συναντώνται στα τρωκτικά, θεωρήθηκαν σημαντικά για την αναστολή της αμυλοειδογονικότητας (Προσαρμογή από (Westermarck *et al.*, 2011))..... 103

Εικόνα 47. Η εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων αμυλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος. (α-ε) Η αρχική εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων πραγματοποιείται στο εσωτερικό των β-κυττάρων. Η αλληλουχία των γεγονότων περιλαμβάνει αρχικά τη σύντηξη του πρόδρομου μορίου της αμυλίνης (προαμυλίνη) με μακρομόρια στο εσωτερικό των β-κυττάρων και τη σταδιακή αύξηση της μάζας των εναποθέσεων, η οποία αντικαθιστά τον κυτταροπλασματικό χώρο του β-κυττάρου και επάγει τη δράση των αποπτωτικών μηχανισμών. Μετά την καταστροφή του β-κυττάρου οι εναποθέσεις, που τώρα αποτελούνται από την ώριμη μορφή του πεπτιδίου, μεταφέρονται εξωκυτταρικά, όπου και λειτουργούν ως 'εστίες πυρήνωσης' για την εξάπλωση του φαινομένου (Προσαρμογή από (Paulsson *et al.*, 2006)). (στ) Ανθρώπινο παγκρεατικό νησίδιο, όπου παρατηρούνται εξωκυτταρικές εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων αμυλίνης, έπειτα από χρώση με Congo Red (Προσαρμογή από (Westermarck *et al.*, 2011)). (ζ) Ηλεκτρονιογραφία κυστιδίων των β-κυττάρων του παγκρέατος διαγονιδιακού ποντικού που εκφράζει την ανθρώπινη αμυλίνη. Παρατηρούνται ινδιακές εναποθέσεις εσωτερικά των κυστιδίων σημασμένες με ειδικό αντίσωμα (κόκκινα βέλη) (Προσαρμογή από (Westermarck *et al.*, 2011))..... 104

Εικόνα 48. Προσδιορισμένες πειραματικά δομές της ανθρώπινης αμυλίνης. (α) Η ανθρώπινη αμυλίνη συν-κρυσταλλωμένη με την MBP (maltose binding protein -γκρι χρώμα) (Wiltzius *et al.*, 2008). Με κόκκινο παρουσιάζεται ο πεπτιδικός

συνδέτης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. (β),(γ) Η δομή της αμυλίνης προσδιορισμένη σε διάλυμα με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) σε φυσιολογικό pH (β) (Nanga *et al.*, 2011) και σε όξινο pH (γ) (Patil *et al.*, 2009). Η δισουλφιδική γέφυρα παρουσιάζεται με κίτρινες ράβδους. 105

Εικόνα 49. Κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένα πεπτιδία-ανάλογα της ανθρώπινης αμυλίνης. Παρουσιάζονται οι κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές 6 αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων της περιοχής 13-37 της ανθρώπινης αμυλίνης των πεπτιδίων ¹³NFLVHS¹⁸, ¹³NFLVHSS¹⁹, ¹⁸HSSNNF²³, ²¹NNFGAIL²⁷, ²⁸SSTNVG³³, ³¹NVGSNTY³⁷ (Wiltzius *et al.*, 2008)..... 106

Εικόνα 50. Πιθανά μοντέλα διπλώματος της ανθρώπινης αμυλίνης στην ινδιακή κατάσταση. Τα μοντέλα κατασκευάστηκαν με βάση τα πειραματικά και θεωρητικά αποτελέσματα των (Kajava *et al.*, 2005) (α), (Luca *et al.*, 2007) (β) και (Wiltzius *et al.*, 2008) (γ)..... 107

Εικόνα 51. Σχηματική αναπαράσταση της ώριμης κλαστερίνης του ανθρώπου. Στο σχήμα παρουσιάζεται σε απλοποιημένη μορφή, υπό κλίμακα η α-αλυσίδα (ανοιχτό πράσινο) και η β-αλυσίδα (γαλάζιο) της ανθρώπινης κλαστερίνης (UniProtKB AC P10909) (UniProt, 2014; UniProt, 2015). Οι θέσεις γλυκοζυλίωσης σημειώνονται με κόκκινο, οι θέσεις των φωσφοσερινών σημειώνονται με πράσινο και οι πέντε δισουλφιδικές γέφυρες εμφανίζονται με κίτρινες στικτές γραμμές. Οι θέσεις της πρωτεολυτικής αποκοπής μεταξύ των δύο αλυσίδων εμφανίζονται με το σχήμα του ψαλιδιού. 108

Εικόνα 52. Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού μηχανισμού δράσης της κλαστερίνης. Σε συνθήκες στρες και συγκεκριμένα κατά την ελάττωση του pH, οι φυσιολογικές πρωτεΐνες υποβάλλονται σε μία διαδικασία 'ξεδιπλώματος', κατά την οποία από τη φυσιολογικά διπλωμένη κατάσταση θα βρεθούν σε ενδιάμεσες καταστάσεις – κατάσταση της δομημένης εύπλαστης σφαίρας (*ordered molten globule*) ή κατάσταση της μη-δομημένης εύπλαστης σφαίρας (*disordered molten globule*) –, πριν καταλήξει στη μη-διπλωμένη της μορφή. Οι ενδιάμεσες καταστάσεις της μη-δομημένης εύπλαστης σφαίρας εκθέτουν συνήθως υδρόφοβα τμήματα και για το λόγο αυτό μπορεί να συσσωματωθούν και να κατακρημνιστούν, μη-αναστρέψιμα. Στην πορεία αυτή επεμβαίνει η ετεροδιμερής κλαστερίνη, η οποία αλληλεπιδρά με τις ενδιάμεσες αυτές καταστάσεις και οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων συμπλόκων κλαστερίνης και μη-δομημένων εύπλαστων σφαιρών, 'διασώζοντας' τη μη-φυσιολογικά διπλωμένη πρωτεΐνη. Η μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ της συσσωματωμένης και της μη-συσσωματωμένης κλαστερίνης ενισχύεται σε

όξινο pH προς τη μη-συσσωματωμένη μορφή, επιτρέποντάς της να δρα ως μόριο-συνοδός (Προσαρμογή από (Roon *et al.*, 2002)). 110

Εικόνα 53. Επίδραση της κλαστερίνης στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων *in vitro*. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης ινιδίων υπο την επίδραση (κλαστερίνη +) και χωρίς την επίδραση (κλαστερίνη -) της κλαστερίνης σε γνωστές αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Προσαρμογή από (Yerbury *et al.*, 2007)). 111

Εικόνα 54. Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών διεργασιών ωρίμανσης της προ-προϊνσουλίνης (α) και της δομής της προϊνσουλίνης στο χώρο (β). (α) Η αλληλουχία των μοριακών διεργασιών μετατροπής της προ-προϊνσουλίνης σε ώριμη ινσουλίνη και C-πεπτιδίο. (β) Στο σχήμα παρουσιάζεται η ανθρώπινη προϊνσουλίνη, όπου με κόκκινο φαίνεται η Α αλυσίδα και με πράσινο η Β αλυσίδα, ενώ το C-πεπτιδίο -πεπτιδίο γέφυρα- παρουσιάζεται με μπλε. Τα κατάλοιπα κυστεϊνών που συμβάλλουν στη δημιουργία δύο διαμοριακών και ενός ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού απεικονίζονται με κίτρινο και ενώνονται με κίτρινη στικτή γραμμή. Τα βέλη εκατέρωθεν της προϊνσουλίνης σημαίνουν τα σημεία δράσης της καρβοξυπεπτιδάσης..... 112

Εικόνα 55. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας των κυτταρικών διεργασιών κατά τη βιοσύνθεση της ινσουλίνης (Προσαρμογή από (Dodson and Steiner, 1998)). 114

Εικόνα 56. Τα ώριμα κυστίδια της προϊνσουλίνης. (α) Η δημιουργία των ώριμων κυστιδίων ινσουλίνης περιλαμβάνει την ωρίμανση της προ-προϊνσουλίνης σε ινσουλίνη, μία διαμερισματοποιημένη διαδικασία, η οποία χωρίζεται 3 διακριτά στάδια. Η αρχική δημιουργία εξαμερών προϊνσουλίνης ξεκινά στο σύμπλεγμα trans-Golgi (TGN), ακολουθεί η μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ώριμη ινσουλίνη και C-πεπτιδίο στα ανώριμα κυστίδια, ενώ τέλος πραγματοποιείται η δημιουργία ενός συμπαγούς πυρήνα κρυσταλλικής ινσουλίνης με την αποκοπή του C-πεπτιδίου, που οδηγεί στην τελική ωρίμανση των κυστιδίων (Προσαρμογή από (Molinete *et al.*, 2000)). (β) Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης β-κυττάρων του παγκρέατος από ιστό υγιούς ποντικού, όπου παρουσιάζεται ένα τμήμα του κυτταροπλάσματος. Παρατηρούμε το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (RER), μεταφραστικά στοιχεία (TE), ένα προ-κυστίδιο του συμπλέγματος Golgi (pGI), το σύμπλεγμα Golgi (G) και ώριμα εκκριτικά κυστίδια ινσουλίνης (SG) (Προσαρμογή από (Zuber *et al.*, 2004)) (Ράβδος 0.17μm). (γ) Σχηματική αναπαράσταση ενός ώριμου κυστιδίου ινσουλίνης, όπου καταγράφονται τα συστατικά του συμπαγούς πυρήνα (εξαμερή ινσουλίνης) αλλά και

της περιφέρειας του (προϊνσουλίνη, αμυλίνη, προαμυλίνη, C-πεπτιδίο).	115
Εικόνα 57. Η δομή και η αμινοξική σύσταση του C-πεπτιδίου. (α) Η δομή του C-πεπτιδίου σε διάλυμα, όπως προέκυψε από πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (εγγραφή 1T0C στη βάση PDB, N: αμινοτελικό άκρο, C: καρβόξυτελικό άκρο) (Munte <i>et al.</i> , 2005). (β) Η αμινοξική σύσταση του 31 αμινοξικών καταλοίπων C-πεπτιδίου (Uniprot AC: P01308).	117
Εικόνα 58. Συνοπτική παρουσίαση της σύνθεσης (ν+1)-πεπτιδίου σε στερεά φάση.	120
Εικόνα 59. Μακροσκοπική εμφάνιση πηκτωμάτων διαφορετικών πεπτιδίων-αναλόγων, συγκέντρωσης 10 mg ml ⁻¹ , έπειτα από επώαση ~30 ημερών σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούμε ότι η διαφορετική αμινοξική σύσταση των πεπτιδίων-αναλόγων επηρεάζει την εμφάνιση των πηκτωμάτων. Τα πηκτώματα μπορεί να είναι διαυγή (α) ή 'θολά' (β), (γ), ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται η δημιουργία διακριτών φάσεων (δ, βέλη). Συχνά, διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης εμφανίζουν την τάση να προσκολλώνται στα τοιχώματα των σωληναρίων erpendorf (β, βέλος).	122
Εικόνα 60. Διαυγές πήκτωμα πεπτιδίου-αναλόγου, που προκύπτει από την αυτοσυγκρότηση αμυλοειδών ινιδίων, με χαμηλή ρευστότητα.	123
Εικόνα 61. Αρχιτεκτονική του πλέγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.	124
Εικόνα 62. Τα στάδια προετοιμασίας δειγμάτων κατάλληλα για παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.	125
Εικόνα 63. Τεχνική προσρόφησης του διαλύματος οξικού ουρανυλίου σε δείγμα. Παρουσιάζεται η πλευρική όψη (β) και η κάτοψη (α) του ίδιου δείγματος πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την εφαρμογή της αρνητικής χρώσης.	126
Εικόνα 64. Διάταξη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης Morgagni™ 268.	127
Εικόνα 65. Διάταξη ευθυγραμμισμένων ράβδων για τη δημιουργία προσανατολισμένων ινών αμυλοειδών ινιδίων. Τριχοειδείς γυάλινοι σωλήνες με επικάλυψη κεριού (επάνω), γυάλινες ράβδοι με επικάλυψη σιλικόνης (κάτω).	128
Εικόνα 66. Περιθλασίγραμμα-ελέγχου του καθαρού κεριού που επικαλύπτει τις ράβδους δημιουργίας ινών αμυλοειδών ινιδίων.	129
Εικόνα 67. Μεθοδολογίας περιθλασης ακτίνων-X από ίνες. Σχηματική αναπαράσταση της προετοιμασίας του δείγματος (α) και της λήψης περιθλασιγραμμάτων cross-β δομής (β).	130
Εικόνα 68. Μορφολογία ινών που προκύπτουν από την ευθυγράμμιση αμυλοειδών ινιδίων σε κατάλληλα κατασκευασμένη διάταξη.	131
Εικόνα 69. Διάταξη γεννήτριας ακτίνων-X SuperNova- Agilent Technologies X-ray.	132
Εικόνα 70. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου αποσβεννόμενης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance - ATR).	133
Εικόνα 71. Υμένια διαφορετικών αμυλοειδογόνων πεπτιδίων-αναλόγων που έχουν δημιουργηθεί από την τοποθέτηση εναιωρήματος τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα τύπου Tienta.	134
Εικόνα 72. Παρατήρηση ενυδατωμένων υμενίων πεπτιδίων-αναλόγων που έχουν σχηματιστεί σε ειδική μεταλλική αντικειμενοφόρο πλάκα, καλυμμένη με λεπτό υδρόφοβο υπόστρωμα.	135
Εικόνα 73. Μικροσκόπιο υπερερύθρου IRScope II (BrukerOPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) συνδεδεμένο με φασματοσκόπιο μετασχηματισμού Fourier Equinox 55 (BrukerOPTICS), στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.	136
Εικόνα 74. Χημικός τύπος της χρωστικής Congo Red.	137
Εικόνα 75. Απεικόνιση πορείας του στοιχειώδους ηλεκτρομαγνητικού κύματος που διαπερνά σύστημα πολωτών, σε πολωτικό μικροσκόπιο. Παράλληλα επίπεδα πολωτών (α), κάθετα επίπεδα πολωτών (β).	138
Εικόνα 76. Απλοποιημένη διάταξη πολωτικού μικροσκοπίου.	139
Εικόνα 77. Ενυδατωμένα υμένια πεπτιδίων-αναλόγων σε κοινή αντικειμενοφόρο πλάκα, έπειτα από χρώση με Congo Red.	140
Εικόνα 78. Διάταξη πολωτικού στερεομικροσκοπίου Leica MZ75.	141
Εικόνα 79. Φάσμα απορρόφησης της χρωστικής Congo Red.	142
Εικόνα 80. Φασματοφωτόμετρο ορατού-UV της BIO-RAD SmartSpec™ 3000 (170-2501).	143
Εικόνα 81. Απλοποιημένη πολλαπλή στοίχιση μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων.	144
Εικόνα 82. Βασικές λειτουργικότητες του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005).	149
Εικόνα 83. Αρχείο εισόδου του προγράμματος αυτοματοποιημένη δεικτοδότησης DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004).	150
Εικόνα 84. Αρχείο εξόδου μίας πιθανής λύσης στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα.	151

Εικόνα 85. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Το δίκτυο αποτελείται από 353 κόμβους, συνδεδεμένους με 1178 ακμές και 4 μη-συνδεδεμένους κόμβους. Τα δεδομένα αλληλεπιδράσεων συγκεντρώθηκαν από τη βάση δεδομένων IntAct (Herzjakob *et al.*, 2004) και οπτικοποιήθηκαν με το εργαλείο Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). Οι πρωτεΐνες παρουσιάζονται ως κόμβοι και οι αλληλεπιδράσεις ως ακμές. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων παρουσιάζονται με κόκκινους μεγάλους κόμβους, ενώ οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων ή οι πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων άλλων πρόδρομων μορίων παρουσιάζονται με κίτρινους - μεσαίου μεγέθους- κόμβους. Οι πρωτεΐνες-συνοδοί σημαίνονται με μπλε γραμμή. Τα σχήματα των κόμβων αλλάζουν για την περιγραφή στενωπών (τετράγωνος κόμβος), κεντρικών κόμβων (τρίγωνος κόμβος), κόμβων με ταυτόχρονα χαρακτηριστικά στενωπού και κεντρικού κόμβου (κόμβος διαμάντι). 156

Εικόνα 86. Τμήμα του δικτύου αλληλεπιδράσεων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με έμφαση στην αλληλεπίδραση Αβ – ATR – A β ροAI. Το πεπτιδίο Αβ μπορεί να συσχετιστεί με την τρανσθυρετίνη (ATR), διασχίζοντας την απολιποπρωτεΐνη AI (A β ροAI) σε μόνο δύο βήματα, επιβεβαιώνοντας πειραματικά δεδομένα, που υποδεικνύουν τη σημαντική δράση της τρανσθυρετίνης ως βιοδείκτη της νόσου του Alzheimer (Velayudhan *et al.*, 2012). 161

Εικόνα 87. Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομή του βαθμού κόμβου (*node degree*) για το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η κατανομή ακολουθεί το νόμο δύναμης και υποδηλώνει ότι το δίκτυο έχει χαρακτηριστικά δικτύου ανεξάρτητο από κλίμακα (*scale-free network*). 162

Εικόνα 88. Τμήμα του δικτύου αλληλεπιδράσεων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με έμφαση στις αλληλεπιδράσεις της APRs. 163

Εικόνα 89. Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομή της ενδιάμεσης κεντρικότητας (*betweenness centrality*) για το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες-στενωποί εντοπίζονται στο επάνω δεξιά τεταρτημόριο του διαγράμματος. 164

Εικόνα 90. Η θέση της ομάδας των *in vitro* αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επισημαίνονται μόνο οι κίτρινοι κόμβοι του δικτύου. 167

Εικόνα 91. Η θέση της ομάδας των *in vivo* αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και των *in vitro*

αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επισημαίνονται οι κόκκινοι και οι κίτρινοι κόμβοι του δικτύου. 168

Εικόνα 92. Η θέση της ομάδας των πρωτεϊνών-συνοδών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επισημαίνονται οι κόμβοι του δικτύου με μπλε περίγραμμα. 169

Εικόνα 93. Υποδίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών-συνοδών και αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Ποσοτικοποίηση της σημασίας των πρωτεϊνών-συνοδών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. 171

Εικόνα 94. Υποδίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ της αλβουμίνης του πλάσματος και των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η Hsc70-interacting protein φαίνεται να είναι σημαντικό στοιχείο του υποδικτύου καθώς συμμετέχει στις έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμυλοειδογόνων απολιποπρωτεϊνών, της κυστατίνης C, της τρανσθυρετίνης και της γκελσολίνης. 172

Εικόνα 95. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ανθρώπινης κυστατίνης C, όπως προβλέπεται από τους αλγορίθμους AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013). Η συναινετική πρόγνωση των αλγορίθμων αποκάλυψε, τρία πεπτιδικά τμήματα με υψηλή 'τάση προς συσσωμάτωση' (τα πεπτιδικά τμήματα ⁴⁷LQVVR⁵¹, ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ και ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵). Το αστέρι σημειώνει τα τμήματα με 'τάση προς συσσωμάτωση' και η κίτρινη γραμμή το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι κάθε αλγορίθμου (*consensus threshold*). 176

Εικόνα 96. Η αμινοξική ακολουθία και δομή της ανθρώπινης κυστατίνης C. (α) Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της ανθρώπινης κυστατίνης C αποτελείται από 120 αμινοξικά κατάλοιπα (Grubb, 2000). Τα πεπτιδία με 'τάση προς συσσωμάτωση' που προέβλεψε ο αλγόριθμος AMYLPRED χρωματίζονται με κόκκινο (⁴⁷LQVVR⁵¹), μπλε (⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵) και πράσινο (⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵), αντίστοιχα. Οι κίτρινες γραμμές σημειώνουν τις δυσουλφιδικές γέφυρες της πρωτεΐνης, ενώ με φούξια σημειώνεται η θέση μεταλλαγής (λευκίνη 68) στους ασθενείς με εγκεφαλική αγγειοπάθεια Ισλανδικού τύπου. (β) (γ) Οι δομές παρουσιάζονται με αναπαράσταση καρτούν και η θέση της λευκίνης 68 με αναπαράσταση ράβδου, με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). Σημειώνονται με αντίστοιχο κώδικα χρωμάτων οι θέσεις των πεπτιδίων με 'τάση προς συσσωμάτωση' στη δομή του φυσιολογικού μονομερούς (β) και στη δομή του μη-φυσιολογικού μονομερούς (γ) (β: οι β-κλώνοι, α: οι α-έλικες, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο). 177

Εικόνα 97. Φωτομικρογραφία σφαιρουλιτών του πεπτιδίου-αναλόγου ⁴⁷LQVVR⁵¹, όπως παρατηρούνται σε πολωτικό μικροσκόπιο, κάτω από διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη. Οι υπερμοριακές σφαιρικές δομές σχηματίζονται έπειτα από μία μέρα επώασης του πεπτιδίου-αναλόγου σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Οι διάμετρος των σφαιρουλιτών κυμαίνεται από 100 έως 300 nm. Παρατηρούμε τους χαρακτηριστικούς για τους σφαιρουλίτες ‘σταυρούς της Μάλτας’. 179

Εικόνα 98. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του ⁴⁷LQVVR⁵¹ πεπτιδίου-αναλόγου (10 mg ml⁻¹) σε απεσταγμένο νερό. Την 7^η ημέρα επώασης παρατηρούνται ταινίες ινιδίων (φούξια αιχμή βέλους). Λεπτομέρεια των μοναδιαίων πρωτοϊνιδίων του πεπτιδίου (διάμετρος ~30 Å) σημειώνεται με μικρό μαύρο βέλος. 180

Εικόνα 99. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου ⁴⁷LQVVR⁵¹ της ανθρώπινης κυστατίνης C, έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Η παρατήρηση με πολωμένο φως δείχνει τη δέσμευση της χρωστικής στο υμένιο των ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου, ενώ (β) η παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου αποκαλύπτει την κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β). 181

Εικόνα 100. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου-αναλόγου ⁴⁷LQVVR⁵¹ της ανθρώπινης κυστατίνης C. Το περιθλασίγραμμα είναι ενδεικτικό της cross-β δομής. Σημειώνονται οι χαρακτηριστικές ανακλάσεις στα 4.62 Å και στα 11.72 Å. 182

Εικόνα 101. Μοντέλο του εξαπεπτιδίου ⁴⁷LQVVRA⁵² που βρίσκεται κατατεθειμένο στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Παρουσιάζεται το στερεοδιαταξικό φερμουάρ του πεπτιδίου στις 0 και 90°. Η μέση απόσταση των C_α ανθράκων των καταλοίπων είναι 12.38 Å. Οι αναπαραστάσεις καρτούν (επάνω) και χωροπληρωτικών μοντέλων (κάτω) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). 182

Εικόνα 102. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου-αναλόγου ⁴⁷LQVVR⁵¹ της ανθρώπινης κυστατίνης C. Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση ταινιών στην αμιδική I. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative). 183

Εικόνα 103. Κινητική της αυτοσυγκρότησης του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ σε μονοδιάστατους

μικροκρυστάλλους. Η παρακολούθηση του φαινομένου της αυτοσυγκρότησης του πεπτιδίου αποκάλυψε την αυτοοργάνωση λεπτών αμυλοειδών ινιδίων (μαύρα βέλη) σε μονοδιάστατους μικροκρυστάλλους, μέσα σε διάστημα μόλις 10 ημερών. Παρατηρούμε τη φάση πυρήνωσης (0h), τη φάση επιμήκυνσης/επέκτασης (ημέρα 1^η & ημέρα 4^η) και τέλος της φάση σταθεροποίησης (ημέρα 11^η) (Ράβδοι 200nm)..... 185

Εικόνα 104. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης μικροκρυστάλλων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ πεπτιδίου-αναλόγου (5 mg ml⁻¹) σε απεσταγμένο νερό. Την 4^η ημέρα επώασης παρατηρούνται στραμμένοι μικροκρυστάλλοι του πεπτιδίου (*twisted microcrystals*), οι οποίοι αποτελούνται από περιελιγμένα ινίδια διαμέτρου 100 Å. Το μαύρο βέλος σημειώνει ένα μοναδιαίο ινίδιο. Τα πορτοκαλί βέλη σημειώνουν το μισό του βήματος της περιέλιξης του μικροκρυστάλλου (200-300 nm κατά μήκος του άξονα του). 186

Εικόνα 105. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β). 187

Εικόνα 106. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵. Το περιθλασίγραμμα είναι χαρακτηριστικό της cross-β δομής και παρουσιάζει μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.51Å και μία ισημερινή ανάκλαση στα 9.14Å. 188

Εικόνα 107. Διαγραμματική αναπαράσταση των μορίων του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ σε εκτεταμένη στερεοδιάταξη, σε ορθορομβική μοναδιαία κυψελίδα. Η δεικτοδότηση πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004). Το μοντέλο πακεταρίσματος προτείνεται κατά αναλογία με το μοντέλο του Fraser και των συνεργατών του (Fraser *et al.*, 1965). 190

Εικόνα 108. Διαδοχικά μοντέλα του δεκαπεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Παρουσιάζονται τα διαδοχικά στερεοδιαταξικά φερμουάρ του πεπτιδίου στις 0 και 90°. Οι αναπαραστάσεις καρτούν (επάνω) και χωροπληρωτικών μοντέλων (κάτω) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). 191

Εικόνα 109. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵. Τα αμυλοειδή ινίδια του

πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative)..... 192

Εικόνα 110. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου-αναλόγου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ (10 mg ml⁻¹) σε απεσταγμένο νερό. Την 7^η ημέρα επώασης παρατηρούνται δεμάτια ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους). Το μαύρο βέλος σημειώνει ένα μοναδιαίο ινίδιο διαμέτρου 100 Å. 194

Εικόνα 111. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β). 194

Εικόνα 112. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴. Το περιθλασίγραμμα είναι χαρακτηριστικό της cross-β δομής και παρουσιάζει μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.7Å και μία ισημερινή ανάκλαση στα 10Å. 195

Εικόνα 113. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴. Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative)..... 196

Εικόνα 114. Αλληλεπίδραση τετραμερών της ανθρώπινης κυστατίνης C. Γειτονικά τετραμερή της ανθρώπινης κυστατίνης C αλληλεπιδρούν μέσω του πενταπεπτιδίου ⁴⁷LQVVR⁵¹ (κόκκινο χρώμα) τόσο στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα (α), όσο και στο τετραγωνικό κρυσταλλικό σύστημα (β). Οι αλυσίδες κάθε τετραμερούς χρωματίζονται με λευκό, ανοιχτό γκρι, σκούρο γκρι και μαύρο, αντίστοιχα. Τα διμερή (λευκό-ανοιχτό γκρι & σκούρο γκρι-μαύρο) που προκύπτουν από την τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών στη δομή 1R4C (Janowski *et al.*, 2004) (α), αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν τετραμερή και έπειτα οκταμερή, ενώ ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μέσω της αλληλεπίδρασης των καταλοίπων λευκίνη 47 και βαλίνη 49 (ράβδοι) σταθεροποιεί το οκταμερές. Όμοια η αλληλεπίδραση στη δομή 1TIJ (Janowski *et al.*, 2005) (β), διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση των πενταπεπτιδίων ⁴⁷LQVVR⁵¹, χωρίς την δημιουργία δεσμού υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων 47 και 49. Οι αναπαραστάσεις των δομών (καρτούν αριστερά και χωροπληρωτικό

μοντέλο δεξιά), έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση του Pymol (Delano, 2005). 198

Εικόνα 115. Ένα πιθανό μοντέλο πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C βασισμένο στην κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή 1R4C (Janowski *et al.*, 2004). Το προτεινόμενο μοντέλο εμπλέκει τόσο το πεπτίδιο ⁴⁷LQVVR⁵¹ όσο και το πεπτίδιο ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, καθώς η επανάληψη της αλληλεπίδρασης τους οδηγεί στη δημιουργία μιας μεγάλης οργανωμένης ινδιακής δομής 'στοιβαγμένων' οκταμερών της ανθρώπινης κυστατίνης C (α). Το πεπτίδιο ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (μπλε) συμμετέχει τόσο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μη-φυσιολογικών μονομερών που συγκροτούν τα διμερή κυστατίνης C, όσο και σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών οκταμερών της κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένης δομής (γ). Το πεπτίδιο ⁴⁷LQVVR⁵¹ συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών τετραμερών, που αλληλεπιδρούν και συγκροτούν τα οκταμερή (β). 200

Εικόνα 116. Στοίχιση ακολουθιών μεταξύ της ανθρώπινης κυστατίνης C και της ανθρώπινης στεφίνης B. Η στοίχιση αποδεικνύει την υψηλή ομοιότητα μεταξύ των δύο εκκριτικών πρωτεϊνών. Τα χρωματιστά πλαίσια σημειώνουν τα πεπτίδια που μελετήθηκαν πειραματικά στην περίπτωση της ανθρώπινης κυστατίνης C (κόκκινο - ⁴⁷LQVVR⁵¹, μπλε - ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, πράσινο - ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵) και τα ομόλογα πεπτίδια στην ακολουθία της στεφίνης B. Οι μύρες περιοχές που σημειώνονται με αστερίσκο (*) δηλώνουν κατάλοιπα που ταυτίζονται, οι σκούρες γκρι περιοχές που σημειώνονται με άνω-κάτω τελείες (:) δηλώνουν κατάλοιπα με σημαντική ομοιότητα στις ιδιότητές τους, οι ανοιχτές γκρι περιοχές που σημειώνονται με τελεία (.) δηλώνουν κατάλοιπα με ασθενή ομοιότητα στις ιδιότητές τους. Οι ακολουθίες έχουν αποσπαστεί από τη βάση UniProt (UniProt, 2015) (στεφίνη B - Uniprot AC: P04080, κυστατίνη C - Uniprot AC: P01034). Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007) και η οπτικοποίηση έγινε με τη χρήση του λογισμικού BioEdit (Hall, 1999)..... 202

Εικόνα 117. Αναπαράσταση του πιθανού μονοπατιού πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C. Το προτεινόμενο μονοπάτι ακολουθεί το παράδειγμα της στεφίνης B (Morgan *et al.*, 2008). Η α-έλικες αναπαρίστανται ως κύλινδροι και οι β-κλώνοι ως βέλη. Μετά τον διμερισμό και τον αποκλεισμό των α-ελίκων, δημιουργείται το τετραμερές της κυστατίνης C από την αλληλεπίδραση δύο διμερών, ενώ στοιβαξη πολλών διμερών δημιουργεί τον πυρήνα του ινιδίου. Ο αμυλοειδογόνος πυρήνας εμπλέκει τους β-κλώνους β2, β3, β4 και β5, καθώς και τις λούπες

μεταξύ των κλώνων 2 και 3 (L1 λούπα), που περιλαμβάνουν τα πεπτιδία ⁴⁷LQVVR⁵¹ (κόκκινο), ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (μπλε) και ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ (πράσινο). Η επανάληψη των υπο-μελέτη πεπτιδίων-αναλόγων φαίνεται να συγκροτεί τον αμυλοειδογόνο πυρήνα των ινιδίων της ανθρώπινης κυστατίνης C. 203

Εικόνα 118. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης των μικροκρυσταλλιτών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C ⁴⁷LQVVR⁵¹ : ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 1:1 και ο χρόνος επώασης είναι 15 ημέρες. Παρατηρώντας λεπτομερώς τους μικροκρυσταλλίτες διακρίνουμε πρωτοϊνίδια διαμέτρου ~50-60Å (λεπτά μαύρα βέλη), ώριμα ινίδια (μαύρο βέλος), καθώς και δεμάτια πολλών ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους). 204

Εικόνα 119. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C ⁴⁷LQVVR⁵¹ : ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 1:1 και ο χρόνος επώασης είναι 15 ημέρες. Σημειώνονται τα πρωτοϊνίδια (λεπτά μαύρα βέλη), οι υπερέλικες πρωτοϊνιδίων (μαύρα βέλη), καθώς και σφαιρικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα (κίτρινα βέλη), που κατανέμονται ομοιόμορφα στο δείγμα. 205

Εικόνα 120. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ και ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 1:1 και ο χρόνος επώασης είναι 15 ημέρες. Παρατηρούμε τυπικά αμυλοειδή ινίδια ~100Å, που σχηματίζουν δεμάτια (κόκκινη αιχμή βέλους), είτε ταινίες (φούξια αιχμή βέλους) αλληλεπιδρώντας πλευρικά. Με λεπτό μαύρο βέλος σημειώνεται πρωτοϊνίδιο ~60Å. 206

Εικόνα 121. Φωτομικρογραφίες των αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμών των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C, έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (δεξιά). 208

Εικόνα 122. Περιθλασιγράμματα ακτίνων-Χ που προέκυψαν από αμυλοειδή ινίδια συνδυασμού των πεπτιδίων ⁴⁷LQVVR⁵¹, ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³ και ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵. (α) (β) Παρουσιάζονται πειθλασιγράμματα χαρακτηριστικά της cross-β αρχιτεκτονικής. (γ) Αδυναμία δημιουργίας προσανατολισμένης ίνας ινιδίων από το διάλυμα συνεπώασης των πεπτιδίων ⁴⁷LQVVR⁵¹ και ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³. 209

Εικόνα 123. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ομοδιμερών πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C. Στιγμιότυπα των 0, 100 και 200 ns. 211

Εικόνα 124. Αλληλεπίδραση του συστήματος ομοδιμερούς ⁴⁷LQVVR⁵¹ στα 100 ns. Η αλληλεπίδραση επιβεβαιώνεται από την κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή του οκταμερούς της κυστατίνης με κωδικό στη βάση PDB 1R4C (Janowski *et al.*, 2004). 211

Εικόνα 125. Αλληλεπίδραση του συστήματος ομοδιμερούς ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ στα 200 ns. Τα δύο πεπτιδία αποδεικνύεται ότι αλληλεπιδρούν με αντιπαράλληλη κατεύθυνση, κάτι που επιβεβαιώνεται από την προσδιορισμένη δομή του οκταμερούς της κυστατίνης με κωδικό στη βάση PDB 1R4C (Janowski *et al.*, 2004). 212

Εικόνα 126. Αλληλεπίδραση του συστήματος ⁴⁷LQVVR⁵¹ - ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵. Παρατηρείται η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με αντιπαράλληλη διευθέτηση. 213

Εικόνα 127. Αλληλεπίδραση του συστήματος ⁴⁷LQVVR⁵¹ - ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³. Παρατηρείται η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με παράλληλη διευθέτηση σε υπολογιστικό χρόνο 200 ns. 213

Εικόνα 128. Λεπτομέρεια από το στιγμιότυπο αλληλεπίδρασης του συστήματος ⁴⁷LQVVR⁵¹ - ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³. (α) Καταγράφεται η απόσταση μεταξύ των παρακείμενων β-κλώνων. (β) Απεικόνιση των β-κλώνων σε αναπαράσταση καρτούν, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PyMol (Delano, 2005). 214

Εικόνα 129. Αλληλεπίδραση του συστήματος ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ - ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰³. Παρατηρείται η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με αντιπαράλληλη διευθέτηση σε υπολογιστικό χρόνο 200 ns. 215

Εικόνα 130. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ανθρώπινης αμυλίνης, όπως προβλέπεται από τον αλγόριθμο AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013). Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την συναινετική πρόγνωση του αλγορίθμου για πιθανές περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στην ανθρώπινη αμυλίνη. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). 216

Εικόνα 131. Κινητική της αυτοσυγκρότησης της ανθρώπινης αμυλίνης σε ώριμα αμυλοειδή ινίδια. Η παρακολούθηση του φαινομένου της αυτοσυγκρότησης της αμυλίνης αποκάλυψε την αυτό-οργάνωση λεπτών αμυλοειδών ινιδίων σε ένα πυκνό δίκτυο αμυλοειδών ινιδίων, μέσα σε διάστημα μόλις 8 ημερών. Παρατηρούμε λεπτά 'κατακερματισμένα' ινίδια κατά το χρόνο 0 της διαλυτοποίησης (0h), τα οποία μετασχηματίζονται σε ώριμα αμυλοειδή ινίδια κατά την 3^η ημέρα

επάσης. Ο πολυμερισμός των ινιδίων ολοκληρώνεται την 8^η ημέρα επάσης του πεπτιδίου, όπου και παρατηρείται δημιουργία πηκτώματος ώριμων αμυλοειδών ινιδίων (ημέρα 8^η) (Ράβδοι 200nm). 218

Εικόνα 132. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης πηκτώματος αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης αμυλίνης (0.5 mg ml⁻¹) σε υδατικό διάλυμα. Τα ινίδια έχουν υποστεί αρνητική χρώση (οξικό ουρανύλιο 2%). Το βέλος σημειώνει ένα μοναδιαίο ινίδιο διαμέτρου 100 Å, ενώ η κόκκινη αιχμή βέλους σημειώνει ένα δεμάτι ώριμων αμυλοειδών ινιδίων. 219

Εικόνα 133. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ προσανατολισμένης ίνας που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια της ανθρώπινης αμυλίνης. Διακρίνονται οι δύο χαρακτηριστικές ανακλάσεις της cross-β δομής, η μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.7 Å και η ισημερινή ανάκλαση στα 10 Å. Ο προσανατολισμός των αμυλοειδών ινιδίων είναι ευδιάκριτος από την εμφάνιση τόξων τόσο στο μεσημβρινό (M) άξονα, όσο και στον ισημερινό (E) άξονα. Ο άξονας της ίνας σημειώνεται με την ένδειξη F. 220

Εικόνα 134. Φωτομικρογραφίες από υμένιο που δημιουργούν τα αμυλοειδή ινίδια της ανθρώπινης αμυλίνης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, έπειτα από χρώση με Congo red. (α) Παρατηρούμε τη δέσμευση της χρωστικής Congo red με μη διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. (β) Η κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα είναι εμφανής με διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. 221

Εικόνα 135. Οι αλληλουχίες των δύο υπό μελέτη ομάδων πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές των αμινοξικών καταλοίπων. (α) Η ομάδα μελέτης πεπτιδίων-αναλόγων της περιοχής 1-12 της ανθρώπινης αμυλίνης. (β) Η ομάδα μελέτης πεπτιδίων-αναλόγων της περιοχής 4-10 της ανθρώπινης αμυλίνης. 222

Εικόνα 136. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου και των μεταλλαγών της στην περιοχή 1-12 του αμινοτελικού άκρου. Η στικτή γραμμή αναπαριστά την πρόγνωση του αλγορίθμου AMYLPRED για την αμυλίνη φυσικού τύπου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Παρατηρούμε ότι οι νεοεισαχθείσες μεταλλαγές (πράσινα αστέρια) μειώνουν σε κάθε περίπτωση το αμυλοειδογόνο δυναμικό της ορμόνης φυσικού τύπου. 224

Εικόνα 137. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής 1-12 της ανθρώπινης αμυλίνης. Τα πεπτίδια-ανάλογα διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό, pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. Οι ηλεκτρονιογραφίες παρουσιάζουν δείγματα μετά από επάση 7 ημερών. 226

Εικόνα 138. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου ¹KCNTATCATQRL¹² έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (β). 227

Εικόνα 139. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ¹KCNTATCATQRL¹². Στο περιθλασίγραμμα καταγράφονται ανακλάσεις χαρακτηριστικές της cross-β δομής. Οι ανακλάσεις παρουσιάζονται ασθενείς και διάχυτες λόγω της μη κανονικής ευθυγράμμισης των ινιδίων στην προς μελέτη ίνα. 228

Εικόνα 140. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου και των μεταλλαγών της στην περιοχή 4-10 του αμινοτελικού άκρου. Η στικτή γραμμή αναπαριστά την πρόγνωση του αλγορίθμου AMYLPRED για την αμυλίνη φυσικού τύπου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Παρατηρούμε ότι οι νεοεισαχθείσες μεταλλαγές (πράσινα αστέρια) μειώνουν σε κάθε περίπτωση το αμυλοειδογόνο δυναμικό της ορμόνης φυσικού τύπου. 229

Εικόνα 141. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής 4 - 10 της ανθρώπινης αμυλίνης. Τα πεπτίδια-ανάλογα διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. Οι ηλεκτρονιογραφίες παρουσιάζουν δείγματα επάσης 7 ημερών. 231

Εικόνα 142. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου έπειτα από χρώση με Congo Red ⁴TATASTQ¹⁰. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (β). 232

Εικόνα 143. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ⁴TATASTQ¹⁰. Στο περιθλασίγραμμα καταγράφονται μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.51 Å (M) και μία ισημερινή ανάκλαση στα 7.83 Å (E),

χαρακτηριστικές της cross-β δομής (Sunde and Blake, 1997). 232

Εικόνα 144. Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές των αμινοξικών καταλοίπων. Όλα τα πεπτίδια φέρουν αμιδιωμένο καρβοξυτελικό άκρο. Η ομάδα μελέτης αφορά πεπτίδια-ανάλογα της περιοχής 30-37 της ανθρώπινης αμυλίνης. 234

Εικόνα 145. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου και των μεταλλαγών της στο καρβοξυτελικό άκρο. Η στικτή γραμμή αναπαριστά την πρόγνωση του αλγορίθμου AMYLPRED για την αμυλίνη φυσικού τύπου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Παρατηρούμε ότι οι νεοεισαχθείσες μεταλλαγές (πράσινα αστέρια) μειώνουν το αμυλοειδογόνο δυναμικό της ορμόνης φυσικού τύπου. 235

Εικόνα 146. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης. Τα πεπτίδια-ανάλογα διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. Οι ηλεκτρονιογραφίες παρουσιάζουν δείγματα επώασης 7 ημερών. 237

Εικόνα 147. Φωτομικρογραφίες υμενίων των πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης, έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου και εντοπισμός της κίτρινοπράσινης διπλοθλαστικότητας (δεξιά). 238

Εικόνα 148. Προσανατολισμένα περιθλασιγράμματα των πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης. Τα πεπτίδια-ανάλογα ³⁰TNGSNTY³⁷ (α), ³⁰TKGSNTY³⁷ (β) και ³⁰TNVGSKAF³⁷ (γ) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. (M: μεσημβρινός, E: ισημερινός, F: άξονας της ίνας) 239

Εικόνα 149. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτίδιο-ανάλογο ¹KCNTATCATQRL¹². Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (βέλη). 241

Εικόνα 150. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτίδιο-ανάλογο ¹KCNTATCATQGE¹². Η

αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη), προϊνιδιακά συσσωμάτωμα (πράσινα βέλη) και σφαιρικό συσσωμάτωμα, σχήματος πρωτεϊνικού 'πόρου' (γαλάζιο βέλος). 242

Εικόνα 151. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτίδιο-ανάλογο ⁴TATCATQ¹⁰. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη) και παρατηρείται ο έντονος πολυμορφισμός τους. 243

Εικόνα 152. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτίδιο-ανάλογο ⁴TATASTQ¹⁰. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη) και άμορφα συσσωμάτωμα που κατανέμονται ομοιόμορφα στο πλέγμα μικροσκοπίας (πράσινα βέλη). 244

Εικόνα 153. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτίδιο-ανάλογο ³⁰TNGSNTY³⁷. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη) καθώς και ινιδιακά θραύσματα (μπλε βέλη). 245

Εικόνα 154. Πρόγνωση δευτεροταγούς δομής του C-πεπτιδίου με τον αλγόριθμο SecStr (Hamodrakas, 1988). Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την πρόγνωση της δευτεροταγούς δομής του C-πεπτιδίου ανά κατάλοιπο. Με κόκκινο φαίνεται η πρόγνωση των στροφών, με μωβ η πρόγνωση των α-ελίκων και με πράσινο η πρόγνωση των β-κλώνων. Η κίτρινη διακοπτόμενη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Τα πεπτιδικά τμήματα ⁶QVGQV¹⁰ και ²²QPL²⁴ προβλέπονται ως περιοχές με χαρακτηριστικά ακολουθιών χαμαιλέοντα, καθώς, όπως σημειώνεται με τα στικτά πλαίσια, προβλέπεται να υιοθετούν ταυτόχρονα ελικοειδή και εκτεταμένη στερεοδιάταξη (H: α-έλικα, B: β-κλώνος, T: στροφή). 249

Εικόνα 155 Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας του C-πεπτιδίου, όπως προβλέπεται από τον αλγόριθμο AMYLPRED2 (Frousios *et al.*, 2009). Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την ασθενή συναινετική πρόγνωση του αλγορίθμου για πιθανές περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στην 31 καταλοίπων αμινοξική ακολουθία του C-πεπτιδίου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*).250

Εικόνα 156. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου (10 mg ml⁻¹) σε απεσταγμένο νερό. Την 7^η ημέρα επώασης παρατηρούνται δεμάτια ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους) και μη διακλαδισμένες υπερέλικες ινιδίων με απροσδιόριστο μήκος και ποικίλες διαμέτρους (μπλε βέλη). Η λεπτομέρεια ενός μοναδιαίου πρωτοϊνιδίου του C-πεπτιδίου (διάμετρος ~50 Å) σημειώνεται με μικρό μαύρο βέλος, ενώ μία απομονωμένη υπερέλικα δύο πρωτοϊνιδίων (διάμετρος ~100 Å) σημειώνεται με δύο μεγάλα μαύρα βέλη..... 252

Εικόνα 157. Ηλεκτρονιογραφίες ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης. (επάνω) Παρατηρούνται προϊνιδιακοί σχηματισμοί διαμέτρου ~70-100 Å (βέλη) οι οποίοι δημιουργούνται αμέσως μετά τη διάλυση του πεπτιδίου σε απεσταγμένο νερό (Ημέρα επώασης 0). (κάτω) Η 3^η ημέρα επώασης αποκαλύπτει τη δημιουργία ώριμων αμυλοειδών ινιδίων, που εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου είναι 10 mg ml⁻¹. Το μικρό βέλος στην ηλεκτρονιογραφία διέλευσης σημειώνει την εμφάνιση ενός μοναδιαίου πρωτοϊνιδίου του C-πεπτιδίου, διαμέτρου ~50 Å. 253

Εικόνα 158. Φάσματα της χρωστικής Congo Red (10 mM) παρουσία του 10mg ml⁻¹ C-πεπτιδίου και φωτομικρογραφίες των ινιδίων του C-πεπτιδίου έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Η καταγραφή της πρόσδεσης της χρωστικής Congo Red στα ινίδια του C-πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε για διάστημα 7 ημερών. Οι καμπύλες με διαφορετικά χρώματα παρουσιάζουν τις μετρήσεις για τις ημέρες επώασης 0, 1, 3 και 7. Η στικτή κόκκινη γραμμή παρουσιάζει το πείραμα ελέγχου της χρωστικής Congo Red. Η πρώτη μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από 500nm σε 540nm (πορτοκαλί καμπύλη) εντοπίζεται μόλις 24 ώρες μετά τη διαλυτοποίηση του πεπτιδίου και υποδηλώνει την εμφάνιση ώριμων αμυλοειδών ινιδίων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από τις ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης για τις ημέρες επώασης 0 (β), 3 (γ) και 7 (δ) (Ράβδοι 200nm)..... 254

Εικόνα 159. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του C-πεπτιδίου έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β). 255

Εικόνα 160. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του C-πεπτιδίου. Το περιθλασίγραμμα είναι χαρακτηριστικό της cross-β

δομής, παρουσιάζοντας μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.68 Å και μία ισημερινή ανάκλαση στα 8.7 Å. 256

Εικόνα 161. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου. Τα αμυλοειδή ινίδια του C-πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative). 258

Εικόνα 162. Σχηματική απεικόνιση του πιθανού μονοπατιού αυτοσυγκρότησης του C-πεπτιδίου. Η πλειοψηφία των δομικών πειραμάτων συμφωνεί ότι το C-πεπτιδίο υιοθετεί τυχαία δομή (random coil), κάτω από αδιευκρίνιστες όμως συνθήκες μπορεί να μεταβεί σε μία μη-φυσιολογικά διπλωμένη στερεοδιάταξη και συγκεκριμένα να αποκτήσει δομή β-φουρκέτας (β-κλώνος / στροφή / β-κλώνος) (Landreh *et al.*, 2014). Στοίβαξη μη-φυσιολογικά διπλωμένων μονομερών του C-πεπτιδίου μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία οργανωμένων πολυμερών, δηλαδή αμυλοειδών ινιδίων (N: αμινοτελικό άκρο, C: καρβόξυτελικό άκρο, F: ο άξονας του ινιδίου). Η σχεδίαση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό TopDraw (Bond, 2003) του πακέτου CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994), υπό κλίμακα. 260

Εικόνα 163. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης των αμυλοειδών ινιδίων από αυτοσυγκρότηση της αμυλίνης, του C-πεπτιδίου και συνδυασμών τους. Πειράματα συνεπώασης C-πεπτιδίου / αμυλίνης σε αναλογία 1:1 (β) και 10:1 (γ) αποδεικνύουν το σχηματισμό πηκτωμάτων ινιδίων, σε απεσταγμένο νερό. Η αύξηση της συγκέντρωσης του C-πεπτιδίου επιδρά στη μορφολογία των ινιδίων (περιγραφή κυρίως κείμενο). Οι ηλεκτρονιογραφίες (α) και (δ) αποτελούν πειράματα ελέγχου..... 261

Εικόνα 164. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της α-αλυσίδας της κλαστερίνης, όπως προβλέπεται από τους συναινετικούς αλγόριθμους AMYLPRED(Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2(Tsolis *et al.*, 2013). Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν την συναινετική πρόγνωση του αλγορίθμου για πιθανές περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στην 222 καταλοίπων αμινοξική ακολουθία της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του κάθε αλγορίθμου (*consensus threshold*). Με αστερίσκο σημειώνονται τα πεπτιδικά-τμήματα που ξεπερνούν ή βρίσκονται στο προεπιλεγμένο κατώφλι πρόγνωσης. Ο αλγόριθμος AMYLPRED προβλέπει τα πεπτιδικά τμήματα ¹²NFHAMFQ¹⁸, ³¹MDIHF³⁵, ⁸²LSVD⁸⁴, ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³. Ο αλγόριθμος AMYLPRED2 προβλέπει τα πεπτιδικά τμήματα ¹⁶MFQ¹⁸, ¹⁵⁵YYLRVTTA¹⁶² και ¹⁷⁷EVVVKLFD¹⁸⁴. 264

Εικόνα 165. Πρόγνωση δευτεροταγούς δομής της α-αλυσίδας της κλαστερίνης με τον αλγόριθμο SecStr (Hamodrakas, 1988). Με κόκκινο σημειώνεται η πρόγνωση των στροφών (t), με πράσινο η πρόγνωση των β-κλώνων (b) και με μπλε η πρόγνωση των ελίκων (h). Παρατηρούνται πεπτιδικά τμήματα με χαρακτηριστικά ακολουθιών χαμαιλέοντα, καθώς προβλέπεται να εμφανίζουν την τάση να υιοθετούν ταυτόχρονα ελικοειδή και εκτεταμένη στερεοδιάταξη. 265

Εικόνα 166. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης πολυμορφικών αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Τα πεπτιδία-ανάλογα ¹²NFHAMFQ¹⁸ (α), ³⁰AMDIHF³⁵ (β), ⁸¹ILSVD⁸⁴ (γ), ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ (δ) και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³ (ε) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. Παρατηρούμε ινίδια επώασης 7 ημερών. 269

Εικόνα 167. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων των πεπτιδίων-αναλόγων της α-αλυσίδας της κλαστερίνης έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (δεξιά). (¹²NFHAMFQ¹⁸ (α), ³⁰AMDIHF³⁵ (β), ⁸¹ILSVD⁸⁴ (γ), ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ (δ) και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³ (ε)). 271

Εικόνα 168. Προσανατολισμένα περιθλασιγράμματα των πεπτιδίων-αναλόγων της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Τα πεπτιδία-ανάλογα ¹²NFHAMFQ¹⁸ (α), ³⁰AMDIHF³⁵ (β), ⁸¹ILSVD⁸⁴ (γ), ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ (δ) και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³ (ε) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. (M: μεσημβρινός, E: ισημερινός, F: άξονας της ίνας) 272

Εικόνα 169. Διαδοχικά μοντέλα του επταπεπτιδίου ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³, που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Παρουσιάζονται τα διαδοχικά στερεοδιαταξικά φερμουάρ του πεπτιδίου στις 0 και 90°. Οι αναπαραστάσεις καρτούν (επάνω) και χωροπληρωτικών μοντέλων (κάτω) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). 273

Εικόνα 170. Φάσματα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση των πεπτιδίων-αναλόγων ¹²NFHAMFQ¹⁸ (α), ³⁰AMDIHF³⁵ (β), ⁸¹ILSVD⁸⁴ (γ), ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ (δ) και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³ (ε) της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές θέσεις των αμιδικών I και II κορυφών του

φάσματος. Δίνονται και τα φάσματα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative). 276

Εικόνα 171. Ιστογράμματα του προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ανθρώπινης στεφίνης A, όπως προκύπτουν έπειτα από τη χρήση των αλγορίθμων AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013). Η συναινετική πρόγνωση των αλγορίθμων αποκάλυψε, τρία πεπτιδικά τμήματα με υψηλή 'τάση προς συσσωμάτωση' (τα πεπτιδικά τμήματα ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶, ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ και ⁷⁹LVVTG⁸³). Το αστέρι σημειώνει τα τμήματα με 'τάση προς συσσωμάτωση' και η κίτρινη γραμμή το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι κάθε αλγορίθμου (*consensus threshold*). 278

Εικόνα 172. Η δομή της ανθρώπινης στεφίνης A. Τα πεπτιδία με 'τάση προς συσσωμάτωση' που προέβλεψε ο αλγόριθμος AMYLPRED χρωματίζονται με μπλε (¹⁶QEIV¹⁹), φούξια (⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶), κόκκινο (⁶⁴MHLKVF⁶⁹) και πράσινο (⁷⁹LVVTG⁸³), αντίστοιχα. (α) (β) Οι δομές παρουσιάζονται με αναπαράσταση καρτούν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). Σημειώνονται με αντίστοιχο κώδικα χρωμάτων οι θέσεις των πεπτιδίων με 'τάση προς συσσωμάτωση' στη δομή του φυσιολογικού μονομερούς (α) και στη δομή του μη-φυσιολογικού μονομερούς (β) (L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο). 279

Εικόνα 173. Παρατήρηση σφαιρικών κρυστάλλων που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ¹⁵IQEIV¹⁹ σε οπτικό στερεομικροσκόπιο. Παρατηρούμε την εμφάνιση μικροκρυσταλλιτών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προς το σχηματισμό δομών 'αχινών'. Η εμφάνιση αυτή παραπέμπει σε μικροκρυστάλλους άλλων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων-αναλόγων (Landau *et al.*, 2011). 280

Εικόνα 174. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A (α) Παρατηρείται κρύσταλλος που προκύπτει από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ¹⁵IQEIV¹⁹. Στην επιφάνεια του κρυστάλλου παρατηρούνται ραβδώσεις, ενώ το μέγεθός του είναι ~150μm. (β) Πυκνό δίκτυο ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶. Το μαύρο βέλος σημειώνει μοναδιαίο ινίδιο διαμέτρου ~100 Å. (γ) Άμορφα συσσωματώματα του πεπτιδίου ⁶⁴MHLKVF⁶⁹. (δ) Δίκτυο επίπεδων ταινιών που δημιουργούνται κατά την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ⁷⁹LVVTG⁸³. Με το βέλος σημειώνονται ινίδια διαμέτρου ~60-70 Å, ενώ με τον αστερίσκο σημειώνεται το πυκνό πλέγμα των ινιδίων. 282

Εικόνα 175. Φωτομικρογραφίες υμενίων των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A, έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με

διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (δεξιά). Τα πεπτίδια ανάλογα $^{49}\text{GTNYYIKV}^{56}$ (β), $^{49}\text{GTNYYIKV}^{56}$ (γ) και $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$ (δ) εμφανίζουν τη χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα, σε αντίθεση με το πεπτίδιο-ανάλογο $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (α)..... 284

Εικόνα 176. Περιθλασιγράμματα των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης Α. Τα πεπτίδια-ανάλογα $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (α), $^{49}\text{GTNYYIKV}^{56}$ (β) και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ (γ) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό, pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. Η πολυκρυσταλλικότητα των πεπτιδίων $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (α) και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$, χαρακτηρίζει πολλά αμυλοειδογόνο πεπτίδια-ανάλογα πρωτεϊνών (M: μεσημβρινός, E: ισημερινός, F: άξονας της ίνας). 285

Εικόνα 177. Φάσματα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση των πεπτιδίων-αναλόγων $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (α), $^{49}\text{GTNYYIKV}^{56}$ (β), $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$ (γ) και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ (δ) της ανθρώπινης στεφίνης Α. Τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων αποτελούνται από β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές θέσεις των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. 286

Κεφάλαιο I

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βασικές Αρχές Πρωτεϊνικού Διπλώματος

Ο ανθρώπινος οργανισμός περιλαμβάνει 100,000 διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών οι οποίες ελέγχουν και πυροδοτούν κάθε χημική διαδικασία. Το εσωτερικό ενός κυττάρου, όπου οι πρωτεΐνες εκφράζονται και ωριμάζουν, είναι ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο περιβάλλον στο οποίο τα πρωτεϊνικά μόρια, όπως και τα υπόλοιπα μακρομόρια, βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 300-400 mg ml⁻¹ (Ellis and Minton, 2003). Μετά τη βιοσύνθεσή τους, η πλειοψηφία των πρωτεϊνών θα πρέπει να διπλωθεί σε μία καλά πακεταρισμένη δομή, που ονομάζεται **φυσιολογική στερεοδιάταξη** και απαιτείται έτσι ώστε τα πρωτεϊνικά μακρομόρια να είναι λειτουργικά (Dobson, 2004). Ο όρος ‘πρωτεϊνικό δίπλωμα’ (*protein folding*) είναι καθολικά αποδεκτός και αναφέρεται στη διαδικασία κατά την οποία μία τελείως αποδιαταγμένη / ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη αποκτά τη φυσιολογική της στερεοδιάταξη (Εικόνα 1, φυσιολογική στερεοδιάταξη). Το πιο σημαντικό ερώτημα της μοριακής βιολογίας, που παραμένει αναπάντητο μέχρι σήμερα είναι, *η διαδικασία κατά την οποία η αλληλουχία των αμινοξικών καταλοίπων καθορίζει τη φυσιολογική στερεοδιάταξη ενός πρωτεϊνικού μορίου* (Dill and Chan, 1997; Karplus, 1997; Wolynes *et al.*, 1995).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Σήμερα είναι γνωστό ότι σε όλα τα κύτταρα και σε όλες τις κυτταρικές θέσεις υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από παράγοντες που συνεπικουρούν στη διαδικασία του διπλώματος, συμπεριλαμβανομένων **ανόργανων καταλυτών ή εξειδικευμένων πρωτεϊνών που ονομάζονται μόρια-συνοδοί (molecular chaperones)**. Οι παράγοντες αυτοί επιτρέπουν στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να διπλώνουν στη φυσιολογική τους στερεοδιάταξη, όντας στο πολύπλοκο και συνωστισμένο περιβάλλον του κυττάρου, αλλά δεν καθορίζουν τη δευτεροταγή τους δομή, καθώς αυτή βρίσκεται κωδικοποιημένη στην αμινοξική τους ακολουθία (Hartl and Hayer-Hartl, 2002).

Τα βιολογικά συστήματα ρυθμίζουν και ελέγχουν τις διαφορετικές χημικές μετατροπές που συμβαίνουν στο κύτταρο προσαρμόζοντας με ακρίβεια τις στερεοδιατάξεις μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδα σε δεδομένο χρόνο και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Συχνά μη-φυσιολογικά διπλωμένα μόρια υπόκεινται σε έναν μηχανισμό ελέγχου, ο οποίος περιλαμβάνει την αναγνώριση και της σήμανση τους προς αποικοδόμηση μέσω του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Kaufman *et al.*, 2002) (Εικόνα 1, κατακερματισμένη πρωτεΐνη). Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι, ένα **ενδιάμεσο πρωτεϊνικό μονομερές** που διαμεσολαβεί μίας διαδικασίας διπλώματος δεν περιγράφεται ως ‘μη-φυσιολογικά διπλωμένο’, ακόμα και αν συγκρατείται παροδικά από μη-φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις. Αποδεικνύεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις οι μη-φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται παροδικά για να κρύψουν τμήματα της πρωτεΐνης με υψηλή ‘τάση προς συσσωμάτωση’, όπως π.χ. μικρές υδρόφοβες εκτεθειμένες επιφάνειες.

Κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες, πολλές πρωτεΐνες αδυνατούν να αποκτήσουν / διατηρήσουν την φυσιολογική τους στερεοδιάταξη και οδηγούνται σε ένα εναλλακτικό – μη κανονικό – δίπλωμα της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας στο χώρο. Αυτά τα ‘λάθος’ διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια, **αυτοσυγκροτούνται είτε σε άμορφα πρωτεϊνικά συσσωματώματα** (Εικόνα 1, άμορφα συσσωματώματα), **είτε σε οργανωμένα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, που ονομάζονται αμυλοειδή ινίδια** (Εικόνα 1, αμυλοειδή ινίδια). Οι μη-φυσιολογικά διπλωμένες πρωτεΐνες, στην πραγματικότητα, δραπέτευουν από όλους τους μηχανισμούς προστασίας του κυττάρου και δημιουργούν αδιάλυτα συσσωματώματα είτε στον ενδοκυττάριο είτε στον εξωκυττάριο χώρο. Στον άνθρωπο, τα αμυλοειδή ινίδια μπορούν να προσβάλουν κάθε όργανο ή ιστό και να οδηγήσουν σε στερεοδιαταξικές ασθένειες, γνωστές ως αμυλοειδώσεις, λόγω της τοξικότητας που προκαλούν στην περιοχική συσσώρευσή τους.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

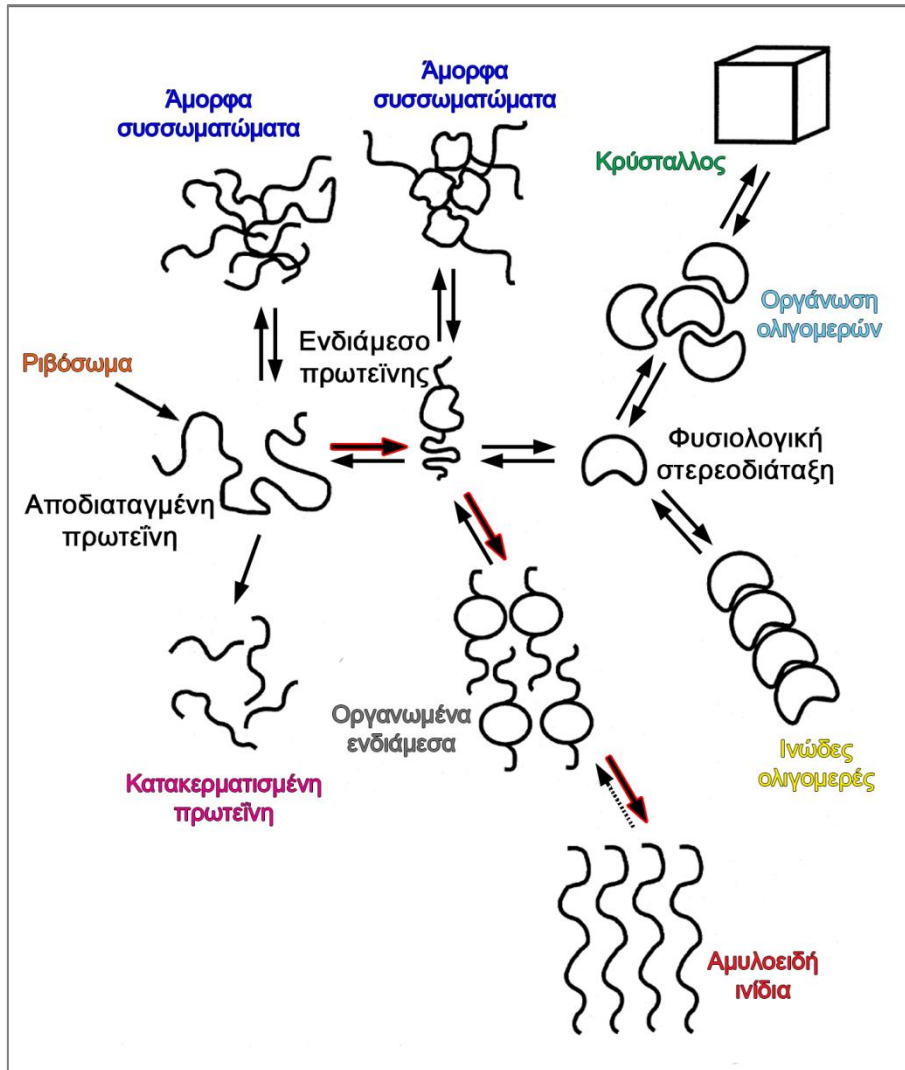
Η διαδικασία της συσσωμάτωσης που οδηγεί ένα πεπτίδιο ή μία πρωτεΐνη στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων **μπορεί να περιγραφεί γενικά με τον όρο ‘μη-φυσιολογικό πρωτεϊνικό δίπλωμα’** (*protein misfolding*), καθώς οι αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν τη δομή και τις ιδιότητες των ινιδίων είναι ξεκάθαρα διαφορετικές από εκείνες που καθορίζουν τη φυσιολογική στερεοδιάταξη. Ειδικότερα, ο όρος **‘μη-φυσιολογικό πρωτεϊνικό δίπλωμα’** (*misfolding*) χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τη διαδικασία κατά την οποία **μία πρωτεΐνη αποκτά επαρκή αριθμό από συνεχόμενες, μη-φυσιολογικές (*non-native*) αλληλεπιδράσεις, μεγάλης εμβέλειας** που επιδρούν συνολικά, με βιολογικά σημαντικό τρόπο, στην αρχιτεκτονική και στις ιδιότητες των μορίων (Dobson, 1999).

Τα αμυλοειδή ινίδια είναι υψηλά οργανωμένες δομές που υιοθετούνται από μία αποδιαταγμένη / ξεδιπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, όταν αυτή αυτοσυγκροτείται και συμπεριφέρεται ως ένα τυπικό πολυμερές. Τα βασικά χαρακτηριστικά αυτών των δομών καθορίζονται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ενώ, όπως συμβαίνει και με άλλα υψηλά οργανωμένα υλικά, η δομή τους βασίζεται στη διαδοχική εμφάνιση αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας που δημιουργούνται από την επανάληψη του ίδιου τύπου πεπτιδίου ή πρωτεΐνης. Η οργάνωση των αμυλοειδών ινιδίων παραπέμπει στη δημιουργία κρυστάλλων (Εικόνα 1, κρύσταλλος), γι’ αυτό και συχνά τα αμυλοειδή ινίδια καλούνται κρύσταλλοι μίας διάστασης ή μονοδιάστατοι κρύσταλλοι (*one-dimensional crystals*) (Eisenberg and Jucker, 2012).

Επομένως, οι πρωτεΐνες με **‘τάση να δημιουργούν αμυλοειδή ινίδια’** ή **‘αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες’**, είτε στη φυσιολογική είτε στη μεταλλαγμένη τους μορφή, συντίθενται στο ανθρώπινο σώμα σε διάφορα σημεία, εκκρίνονται στο πλάσμα μεταφερόμενες μέσω της κυκλοφορίας και εναποτίθενται στους ιστούς με τη μορφή προϊνιδιακών συσσωματωμάτων ή και ώριμων ινιδίων. Τα ινίδια αυτά συσχετίζονται με μια ομάδα ασθενειών, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι Alzheimer’s, Parkinson’s και Huntington’s, οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (*prion diseases*), και άλλες, όπως ο διαβήτης τύπου II και ορισμένες μορφές καρκίνου. Τουλάχιστον 35 διαφορετικές πρωτεΐνες είναι σήμερα γνωστό ότι μπορούν να αυτοσυγκροτηθούν σε αμυλοειδή ινίδια, ενώ εξελικτικά η δημιουργία τους συσχετίστηκε με γενετικές μεταλλαγές που επιδρούν στη φυσιολογική διαδικασία διπλώματος μιας πρωτεΐνης (Sipe *et al.*, 2016). Συνολικά, οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων είναι **ένα ‘ιδιότυπο’ σύνολο πρωτεϊνών, που διαφέρουν μεταξύ τους τόσο σε επίπεδο ακολουθίας όσο και σε επίπεδο δομής**. Το σύνολο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών εμπλουτίζεται συνεχώς, καθώς όλο και

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

περισσότερες πρωτεΐνες, που προηγουμένως δεν είχαν συσχετιστεί με κάποια επιβεβαιωμένη αμυλοείδωση, εμφανίζουν την τάση να δημιουργούν ινίδια με ‘αμυλοειδογόνες ιδιότητες’, *in vitro*. Η ιδιότητα της δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων ονομάζεται αμυλοειδογονικότητα (*amyloidogenicity*) (Fandrich, 2007).



Εικόνα 1. Τα μονοπάτια των πιθανών στερεοδιαταξικών καταστάσεων στις οποίες μπορεί να βρεθεί μία πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.2. Σύντομη Ιστορική Αναδρομή

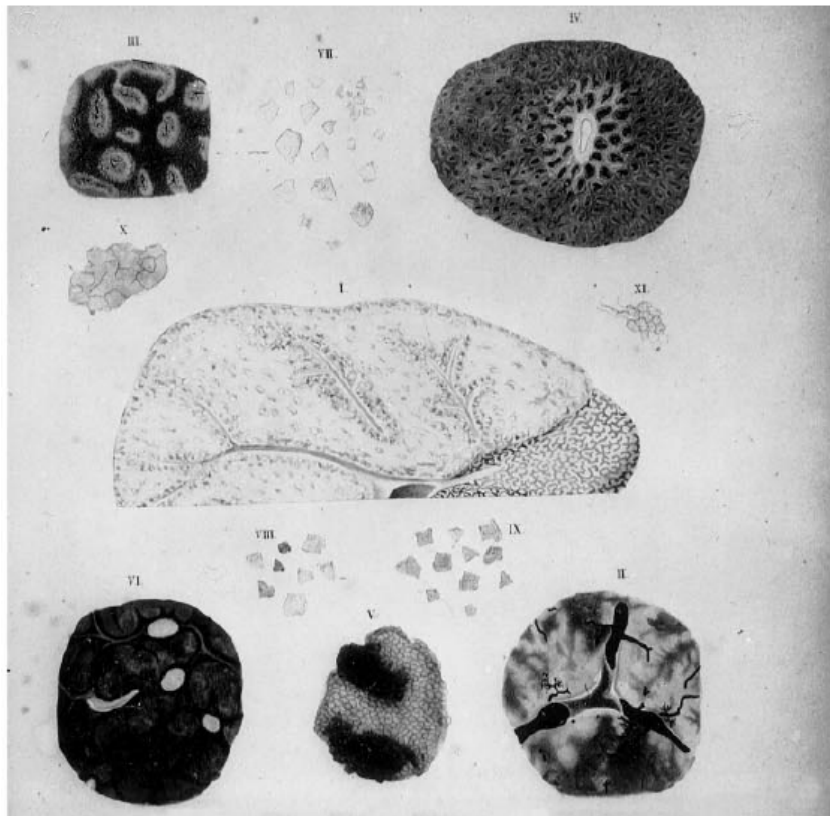
Ο όρος αμυλοειδή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1854 από τον Γερμανό γιατρό Rudolph Virchow, όταν βασισμένος στην επιστημονική γνώση και την τεχνολογία της εποχής του χρησιμοποίησε την ιωδίνη για να βάψει αμυλοειδείς εναποθέσεις (*corpora amylacea*) από ιστούς εγκεφάλου ασθενών, στους οποίους παρατήρησε μία ιδιάζουσα εμφάνιση *post mortem* (Εικόνα 2). Η μακροσκοπική εμφάνιση του ιστού ήταν παρόμοια με προηγούμενες πρώιμες περιγραφές του 1639 (από τους Nicolous Fontanus και Thomas Bertholin), οι οποίες είχαν ήδη περιγράψει ιστούς ήπατος ως λιπαρούς (*lardaceous*), κερωμένους (*waxy*) ή σπογγώδεις (*spongy*), ενώ αντίστοιχα είχαν καταγράψει λευκές πέτρες (*white stones*) σε ιστούς σπλήνα (Sipe and Cohen, 2000) (Εικόνα 2). Η ανακάλυψη ότι η επεξεργασία των αμυλοειδών εναποθέσεων με ιωδίνη τις χρωματίζει γαλάζιες και έπειτα μοβ με την προσθήκη θεικού οξέος, ώθησε τον Virchow στο συμπέρασμα ότι το υπόστρωμα των ευρημάτων αυτών είναι η κυτταρίνη και για αυτό το λόγο ονόμασε τις εναποθέσεις ‘αμυλοειδή’, σύμφωνα με τον λατινικό όρο ‘*amyllum*’ και τον ελληνικό ‘*άμυλον*’. Την εποχή εκείνη, βέβαια, ο διαχωρισμός μεταξύ του αμύλου και της κυτταρίνης ήταν ασαφής και επομένως, ο Virchow ακολουθώντας τη βιβλιογραφία της εποχής κατέγραψε το υπόστρωμα των αμυλοειδών ως άμυλο (Kyle, 2001).

Το 1859 ο Friedrich και Kekulé απέδειξαν την παρουσία πρωτεϊνών στις αμυλοειδείς μάζες και την απουσία υδατανθράκων, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας αζώτου (Friedrich and Kekule, 1859). Τελικά, κατά τον 19^ο και τον 20^ο αιώνα η ταυτοποίηση βασίστηκε στα κλινικά συμπτώματα που εντοπίζονταν σε ασθενείς, λόγω της εμφάνισης των εναποθέσεων αυτών. Έτσι, ο όρος αμυλοειδή χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τα μακροσκοπικά μη-φυσιολογικά ευρήματα που παρατηρούνταν σε ιστούς ασθενών *post mortem*, ενώ με βάση τα εκάστοτε κλινικά συμπτώματα των ασθενών οι εναποθέσεις ταξινομήθηκαν ως πρωτογενείς ή ιδιοπαθείς, δευτερογενείς, εντοπισμένες, κληρονομούμενες, ενδοκρινείς ή συσχετιζόμενες με τη γήρανση.

Η τεχνολογική ανάπτυξη στον κλάδο της μακροσκοπικής, αλλά και της μικροσκοπικής παρατήρησης, επέτρεψε με το πέρασμα των χρόνων την αποσαφήνιση των βασικών αρχών που διέπουν τη δημιουργία των αμυλοειδών εναποθέσεων. Αρχικά οι ερευνητές άρχισαν να χρησιμοποιούν, το οπτικό μικροσκόπιο και ιστοπαθολογικές χρωστικές, όπως η Thioflavin T και το Congo Red, και συμπέραναν ότι τα αμυλοειδή, από ένα εύρος πηγών, είναι άμορφες

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

πρωτεϊνικές εναποθέσεις (Bennhold, 1922). Το 1927, όμως, η παρατήρηση τους με πολωτική μικροσκοπία απέδειξε ότι οι εναποθέσεις δεσμεύουν τη χρωστική Congo Red και εμφανίζουν θετική διπλοθλαστικότητα (Divry and Florkin, 1927), μία ιδιότητα που αποδόθηκε αργότερα στην ανισότροπη φύση του αμυλοειδογόνου υλικού (Missmahl and Hartwig, 1953). Έτσι, **η τάση δέσμευσης της χρωστικής Congo Red**, που ονομάστηκε και κονγκοφιλικότητα (*congophilia*), ήταν το πρώτο κριτήριο ταυτοποίησης των αμυλοειδών ινιδίων που υιοθετήθηκε.

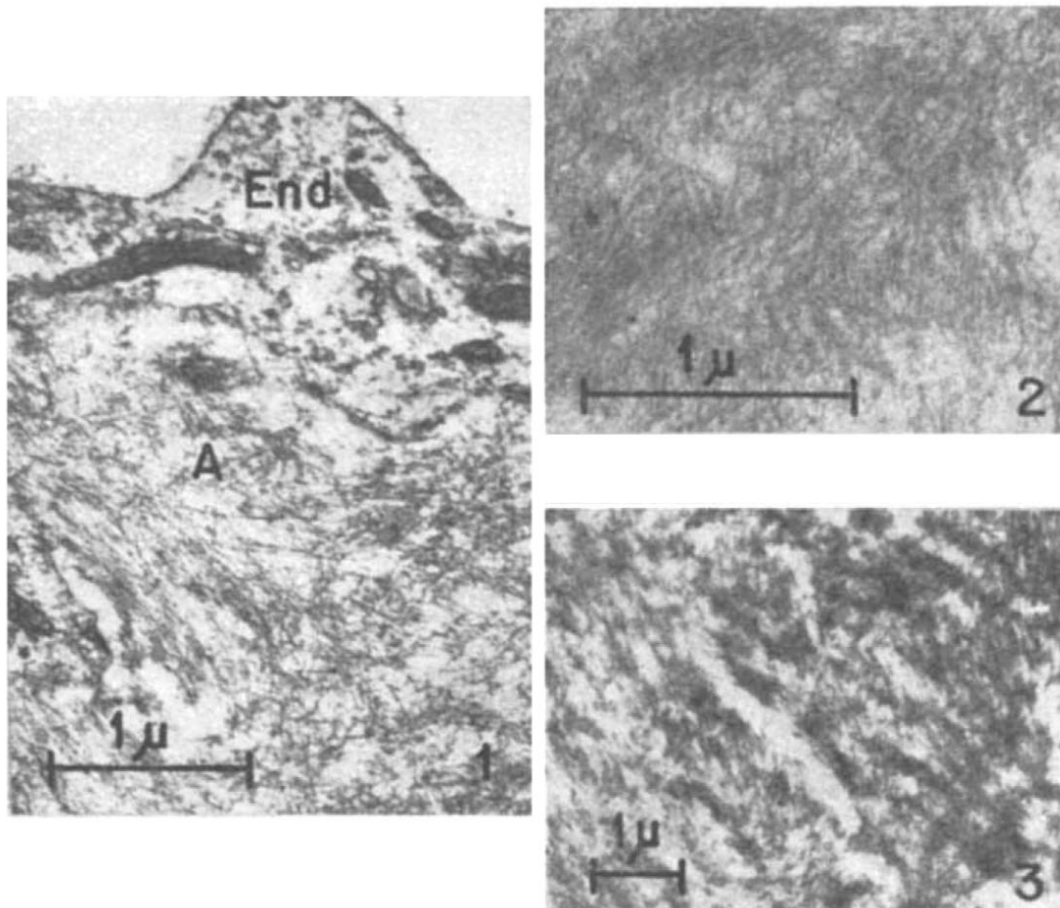


Εικόνα 2. Αμυλοειδείς εναποθέσεις σε ιστούς από πρώιμες μελέτες ασθενών. Προσαρμογή από Frerichs, 1862 (Sipe and Cohen, 2000).

Η εύρεση της διπλοθλαστικότητας υπέδειξε ότι οι αμυλοειδείς εναποθέσεις μπορεί να φέρουν κάποιας μορφής μικροσκοπική οργάνωση και έτσι, οδήγησε τους Cohen και Calkins το 1959 να πραγματοποιήσουν τις πρώτες μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε ιστούς (Cohen and Calkins, 1959). Η αρχική τους παρατήρηση απέδειξε ξεκάθαρα ότι όλες οι υπό μελέτη εναποθέσεις, σε τομές ιστών, εμφανίζουν μία συγκρίσιμη ινώδη αρχιτεκτονική· αποτελούνται από **δεμάτια ευθύγραμμων και αδιακλάδιστων ινιδίων, που κυμαίνονται σε διάμετρο από 60 έως 130 Å και έχουν απροσδιόριστο μήκος (περίπου 1000 με 16000 Å)**

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

(Εικόνα 3). Συγκεκριμένα, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ιστούς κουνελιού με αμυλοείδωση που σχετίζεται με την καζεΐνη, σε βιοψίες από δέρμα ασθενών με κλινικά καταγεγραμμένη πρωτογενή αμυλοείδωση (σήμερα γνωστή ως αμυλοείδωση της ελαφριάς αλυσίδας) και σε ιστό από νεφρούς ασθενούς με αμυλοείδωση.



Εικόνα 3. Οι πρώτες ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης αμυλοειδών εναποθέσεων, με αρνητική χρώση (Προσαρμογή από (Cohen and Calkins, 1959)).

Η συνεργατική μελέτη των Shirahama και Cohen κατέγραψε την συναινετική δομή των ινιδίων που αποτελούν τις αμυλοειδείς εναποθέσεις, με μία εκτενή καταγραφή των πειραματικών δεδομένων της εποχής σε δείγματα με αρνητική χρώση (Shirahama and Cohen, 1967). Με χρονολογική σειρά οι Gueft και Ghidoni το 1963, παρατήρησαν τη δημιουργία διπλών ελίκων και συγκεκριμένα πρότειναν ότι τα ανθρώπινα και τα ζωϊκά αμυλοειδή εμφανίζονται με τη μορφή των χαντρών σε ένα κομπολόι (*beaded structure*) (Gueft and Ghidoni, 1963), ενώ ένα χρόνο αργότερα ο Terry και οι συνεργάτες του σε μελέτες εναποθέσεων ινιδίων στον εγκέφαλο ασθενών με τη νόσο του Alzheimer, ανέφεραν ότι η διάμετρος των μοναδιαίων ινιδίων κυμαίνεται μεταξύ 70-90 Å (Gonatas *et al.*, 1964; Terry *et*

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

al., 1964). Η παρατήρηση απομονωμένων αμυλοειδών ινιδίων με ήπιες τεχνικές από ιστούς, απέδειξε ότι τα αμυλοειδή ινίδια έχουν μία ιεραρχική οργάνωση στην οποία σφιχτά, πακεταρισμένα πλευρικά, νημάτια με διάμετρο 25-35 Å, γνωστά και ως πρωτοϊνίδια αλληλεπιδρούν δημιουργώντας ώριμα ινίδια με μέση διάμετρο 75-100 Å (Shirahama and Cohen, 1965). Η μεθοδολογία της αρνητικής χρώσης θεωρήθηκε κατάλληλη, καθώς είναι ο καλύτερος τρόπος για την παρατήρηση του σχήματος, της συμμετρίας και της δομικής στερεοδιάταξης ενός δείγματος. Έτσι, **η εμφάνιση της μορφολογίας των αμυλοειδών ινιδίων, σε δείγματα που έχουν προετοιμαστεί με αρνητική χρώση, υιοθετήθηκε ως το δεύτερο κριτήριο προσδιορισμού των αμυλοειδών ινιδίων.**

Ένα συναρπαστικό εύρημα είναι το γεγονός ότι δύο τελείως διαφορετικές πρωτεΐνες μπορεί να υιοθετούν την ίδια μοριακή αρχιτεκτονική και άρα η μακρομοριακή τους εμφάνιση μπορεί να είναι παρόμοια. Παρόλα αυτά είναι προφανές ότι ο σχηματισμός των αμυλοειδών ινιδίων εξαρτάται από ένα συνδυασμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της πρωτοταγούς δομής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και των θερμοδυναμικών παραμέτρων του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται (Kelly, 1998). Οι μελέτες των ινιδίων ενός μεγάλου εύρους συστημάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία απέδειξε ότι **η δομική ομοιότητα που εντοπίζεται σε όλα τα συστήματα των αμυλοειδών υπάρχει σε μοριακό επίπεδο.** Περίθλαση ακτίνων-Χ σε κατάλληλες διατάξεις απομονωμένων ινιδίων αποκάλυψε ότι όλες οι πρωτεϊνικές μορφές που αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια είναι οργανωμένες σε μία κοινή ατομική στερεοδιάταξη. Μετά την απομόνωση των αμυλοειδών από τους ιστούς και τις πρωταρχικές αυτές παρατηρήσεις, έγινε η διασύνδεση μεταξύ των ευρημάτων της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και της περίθλασης ακτίνων-Χ.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.3. Αμυλοειδή Ινίδια

Ο προσδιορισμός της αμινοξικής ακολουθίας των πρωτεϊνικών μορίων που αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια οδήγησε γρήγορα στη διαπίστωση ότι, **ένα συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μόριο σχετίζεται βιοχημικά με την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων**, αν και πιο σύγχρονα ανοσοϊστολογικά ευρήματα υποστήριξαν την συνεύρεση και άλλων μακρομορίων, ως δευτερεύοντα συστατικά των αμυλοειδών εναποθέσεων (η αμυλοειδής P πρωτεΐνη του πλάσματος, οι πρωτεογλυκάνες ή η απολιποπρωτεΐνη E) (Sipe and Cohen, 2000; Snow and Wight, 1989). Σημαντικό ακόμη εύρημα των πρωταρχικών μελετών υπήρξε το γεγονός ότι η εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων μπορεί να αφορούσε τμήματα των σφαιρικών πρωτεϊνών και όχι πρωτεΐνες πλήρους μήκους, αποδεικνύοντας την επιπρόσθετη επεξεργασία των πρωτεϊνικών μορίων κατά την μη-φυσιολογική συσσωμάτωση και την εμφάνιση των κλινικών διαταραχών.

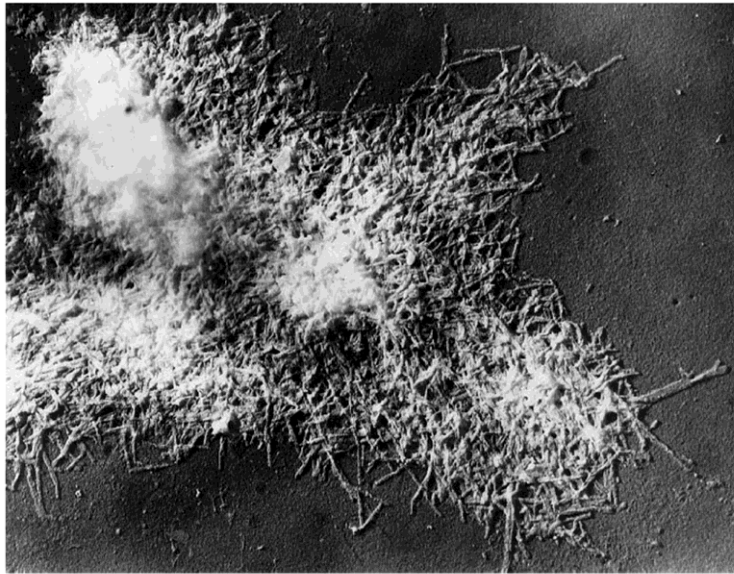
Τα αμυλοειδή ινίδια από ιστούς και όργανα δεν παρουσίαζαν διαφορές στη μορφολογία ή την τάση να προσδένουν τη χρωστική Congo Red, σε σχέση με ινίδια τα οποία απομονώθηκαν σε ήπιες συνθήκες από τους ιστούς (Shirahama and Cohen, 1965; Shirahama and Cohen, 1967). Έτσι, ήδη από το 1970 ο αριθμός των βιοχημικά διαφορετικών πρωτεϊνών, που ικανοποιούν τα κριτήρια των αμυλοειδών ινιδίων και απομονώθηκαν από παθολογικές καταστάσεις στο ζωϊκό βασίλειο, προσέγγιζε τις 20 (Sipe, 1992). Οι ομοιότητες στις διαστάσεις και τη μορφολογία μεταξύ απομονωμένων πρωτεϊνικών ινιδίων και ινιδίων των ιστών, τελικά, υποστήριξε τις *in vitro* πειραματικές μελέτες πρωτεϊνικών ινιδίων, για τα οποία **προτάθηκε ότι είναι βιοχημικά και δομικά πανομοιότυπα με τα αμυλοειδή ινίδια που παρατηρούνται στους ιστούς**.

Σήμερα, με τον όρο αμυλοειδή αναφερόμαστε σε **εξωκυτταρικές εναποθέσεις ή ενδοκυτταρικά έγκλειστα αδιάλυτων πρωτεϊνικών ινιδίων που δημιουργούνται από διαλυμένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια, όταν αυτά διπλώνονται κατά μη-φυσιολογικό τρόπο και αυτοσυγκροτούνται, προκαλώντας την καταστροφή κυττάρων και ιστών**. Το κοινό βιοχημικό υπόβαθρο των διαταραχών που προκαλούνται από την εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων δημιούργησε ιστορικά **μία ομάδα από ετερογενείς ασθένειες, τις αμυλοειδώσεις, ενώ οι εναποθέσεις ινιδίων που εντοπίστηκαν στις διαταραχές αυτές ονομάστηκαν παθολογικά αμυλοειδή ινίδια** (Harrison *et al.*, 2007). Τομή στη μελέτη των παθολογικών αμυλοειδών, που εδώ και δεκαετίες σχετίστηκαν με ασθένειες, όπως η νόσος Alzheimer ή η

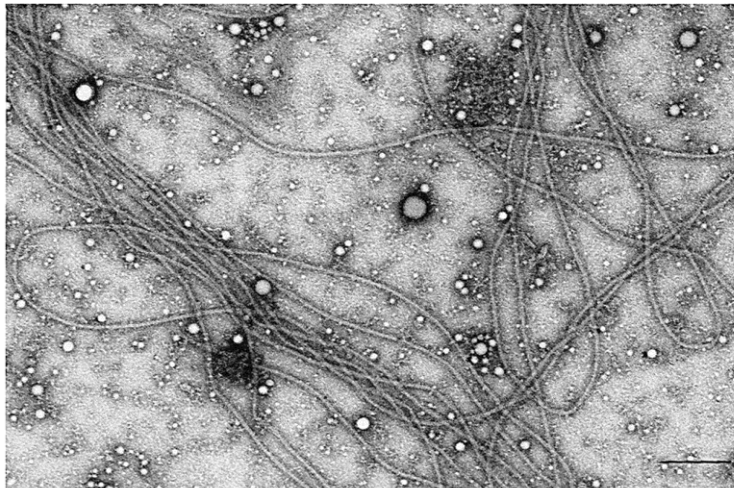
Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια υπήρξε το 2000 η πρόταση των Iconomidou και συνεργατών της για την **ύπαρξη προστατευτικών αμυλοειδών** στο χόριο του αυγού του μεταξοσκώληκα με αξιοθαύμαστο λειτουργικό ρόλο (Iconomidou *et al.*, 2000). Έκτοτε, διαπιστώθηκε ότι μια πληθώρα οργανισμών (από προκαρυωτικούς έως τον άνθρωπο) εκμεταλλεύεται **τις μοναδικές ιδιότητες και την ιδιαίτερη αρχιτεκτονική των αμυλοειδών ινιδίων** για να υποστηρίξει πολύπλοκες βιολογικές λειτουργίες. Οι λειτουργικές αυτές δομές ονομάζονται **λειτουργικά αμυλοειδή** (*functional amyloids*).

[α]



[β]



Εικόνα 4. Ηλεκτρονιογραφίες αμυλοειδών ινιδίων. (α) Αμυλοειδή ινίδια, που απομονώθηκαν από σπλήνα ασθενούς με αμυλοείδωση (σκίαση – x 37,000) (Προσαρμογή από (Sipe and Cohen, 2000)) (β) Αμυλοειδή ινίδια τρανσθυρετίνης, που απομονώθηκαν από ασθενείς με οικογενή αμυλοειδή πολυνευροπάθεια (FAP) (αρνητική χρώση – Ράβδος 100 nm) (Προσαρμογή από (Serpell et al., 1995)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.3.1. Μορφολογία των αμυλοειδών ινιδίων

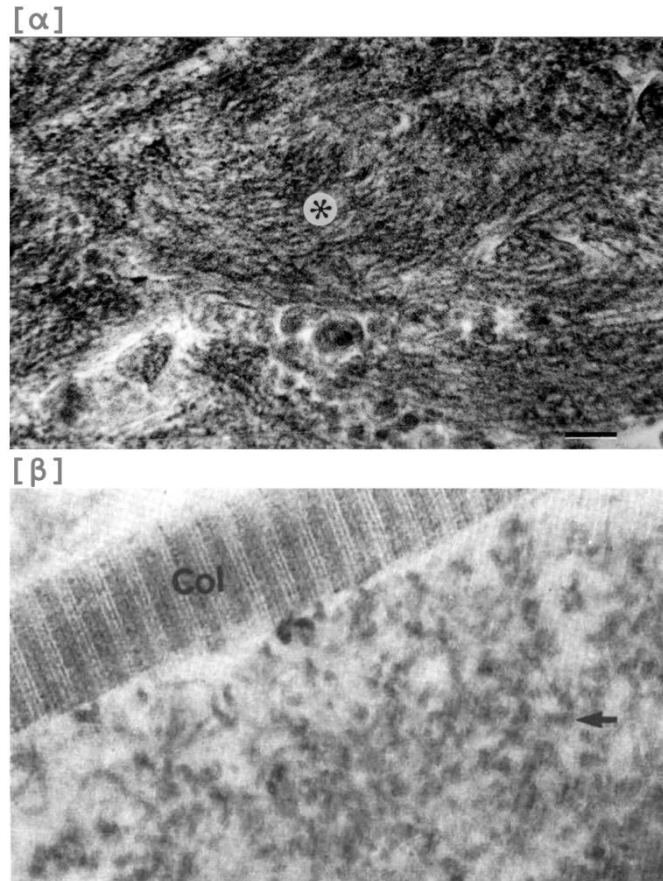
Σε μακροσκοπικό επίπεδο, τα διαφορετικά στάδια της δημιουργίας των αμυλοειδών ινιδίων μπορούν να παρατηρηθούν με την χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (διέλευσης ή σάρωσης), ενώ, όπως παρουσιάζεται στις επόμενες ενότητες, σε ατομικό επίπεδο σημαντική είναι η συνεισφορά μεθοδολογιών όπως η περίθλαση ακτίνων-Χ. Καθώς περισσότερα δεδομένα για τις συναθροίσεις ινιδίων έρχονταν στο φως, γίνονταν κατανοητό ότι οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες αυτοσυγκροτούνται **σε λεπτές ινιδιακές δομές που εμφανίζουν έντονη τάση να αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς τρόπους προς το σχηματισμό πολύπλοκων υπερμοριακών συμπλεγμάτων με διακριτή μορφολογία**. Οι πληροφορίες για τη δομή των αμυλοειδών ινιδίων παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την επιστημονική κοινότητα, καθώς η κατανόηση των μηχανισμών σχηματισμού τους μπορεί να συμβάλει στην διαλεύκανση της δράσης τους.

Σε αντίθεση με τις σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να διπλωθούν κατά την απομάκρυνση των υδρόφοβων καταλοίπων από το διαλύτη, οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες ακολουθούν έναν καταρράκτη πολύπλοκων γεγονότων για την τελική δημιουργία της δομής του ινιδίου (Thirumalai *et al.*, 2003). Υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και ένα ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου, συνεργούν στη σταθεροποίηση των ινιδίων. Η κοινή αρχιτεκτονική των αμυλοειδών ινιδίων, δηλαδή οι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν το σκελετό των ινιδίων, θεωρείται ότι καθοδηγεί τη θερμοδυναμική και την κινητική του σχηματισμού τους (Nelson *et al.*, 2005). Ωστόσο, σήμερα είναι αποδεκτό ότι η ‘διακριτική’ αλληλεπίδραση μεταξύ μη-ειδικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, των στερεοδιαταξικά επιτρεπτών υδρογονικών δεσμών, και αλληλεπιδράσεων που μεσολαβούνται από το νερό είναι καθοριστικά για την κινητική αυτοσυγκρότησης των οργανωμένων δομών των αμυλοειδών ινιδίων.

Τα αμυλοειδή ινίδια που αποτελούν ευρήματα των ιστών (*in situ*) είναι μη διακλαδισμένα ινίδια ακαθόριστου μήκους που μοιάζουν αρκετά με τα μικροϊνίδια του συνδετικού ιστού, τόσο στο μέγεθος όσο και στην εμφάνιση. Η βασική διαφοροποίηση μεταξύ των ινιδίων αυτών έγκειται στην επιφάνειά τους, η οποία στην περίπτωση των μικροϊνιδίων σχετίζεται με περιοδική εμφάνιση της ινιδίνης (*fibrillin*) και συσσωματώματα πρωτεογλυκανών. Μελέτες σε ασθενείς με αμυλοείδωση που σχετίζεται με την αιμοκάθαρση (*Dialysis-related amyloidosis*) φανέρωσαν την ύπαρξη αμυλοειδών ινιδίων και συσσωματωμάτων της β₂-μικροσφαιρίνης διαφόρων μεγεθών, που εντοπίζονταν στο χώρο ανάμεσα στα ινίδια του κολλαγόνου, ενώ το πιο ‘ύποπτο’ χαρακτηριστικό των

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

ινιδίων αυτών ήταν ο έντονος πολυμορφισμός τους (Inoue *et al.*, 1997). Στην Εικόνα 5 παρατηρούμε συσσωματώματα λεπτών περιελιγμένων ινιδίων σε λεπτές τομές ιστού, περίπου 12 nm σε διάμετρο. Τα ινίδια των ιστών δεν είναι ικανά να δημιουργήσουν δεμάτια, λόγω της πυκνότητας των συστατικών του ιστού, γι' αυτό και συγκεντρώνονται σε χαλαρά, τυχαία συσσωματώματα (Glennner, 1981).



Εικόνα 5. *In situ* εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων σε ασθενείς με (α) την νόσο του Alzheimer και (β) με αμυλοειδωση που ακολουθεί τη χρόνια αιμοκάθαρση. Ο αστερίσκος υποδεικνύει περιοχή με πυκνές εναποθέσεις ινιδίων. Παρατηρείται συσσώρευση αμυλοειδών ινιδίων (βέλος) ανάμεσα στα ινίδια του κολλαγόνου (Col). (Μεγέθυνση x 186,700 ((α) Προσαρμογή από (Inoue *et al.*, 1997), (β) Προσαρμογή από (Inoue, 2008))

Από βιοφυσικής σκοπιάς, ο πολυμορφισμός των αμυλοειδών ινιδίων είναι ένα ερευνητικό ερώτημα που δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμα. Με τον όρο πολυμορφισμός αναφερόμαστε στο φάσμα των διαφορετικών μορφών συσσωματωμάτων που υιοθετούνται από αμυλοειδή ινίδια κατά την αυτοσυγκρότηση της ίδιας πρωτεΐνης (Eisenberg and Sawaya, 2017). Ο πολυμορφισμός συναντάνται τόσο σε επίπεδο ώριμων ινιδίων όσο και σε επίπεδο πρωτοϊνιδίων και εικάζεται ότι οφείλεται στο διαφορετικό πακετάρισμα των πλευρικών αλυσίδων, στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που δημιουργείται κατά την αυτοσυγκρότηση των πρωτεϊνικών μορίων και στην εκάστοτε περιεκτικότητα σε

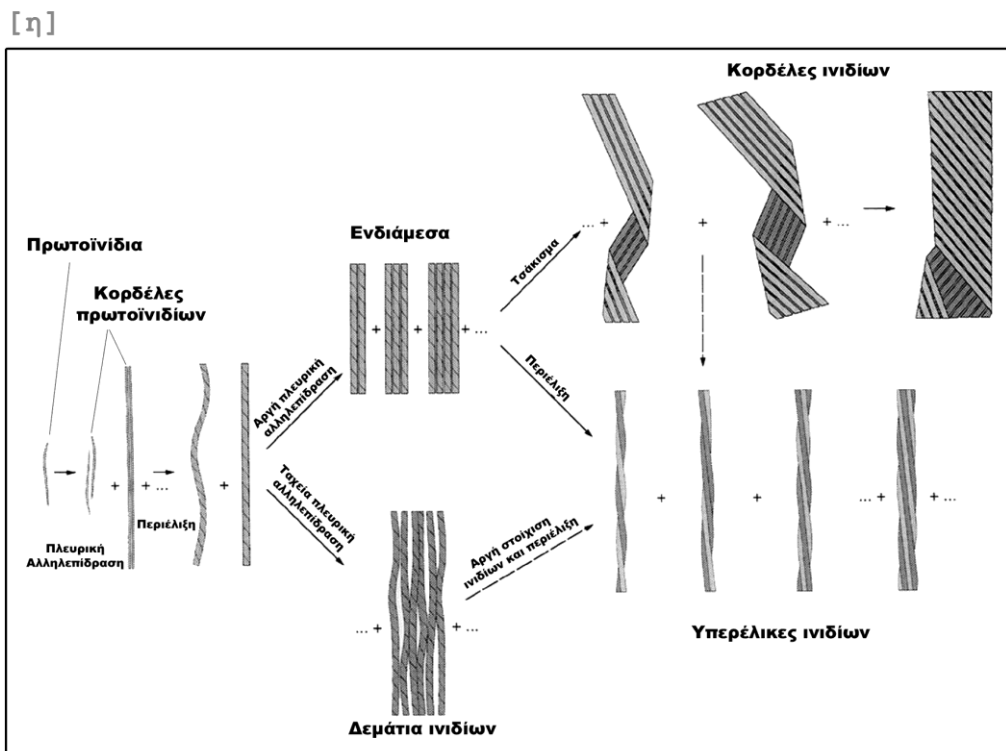
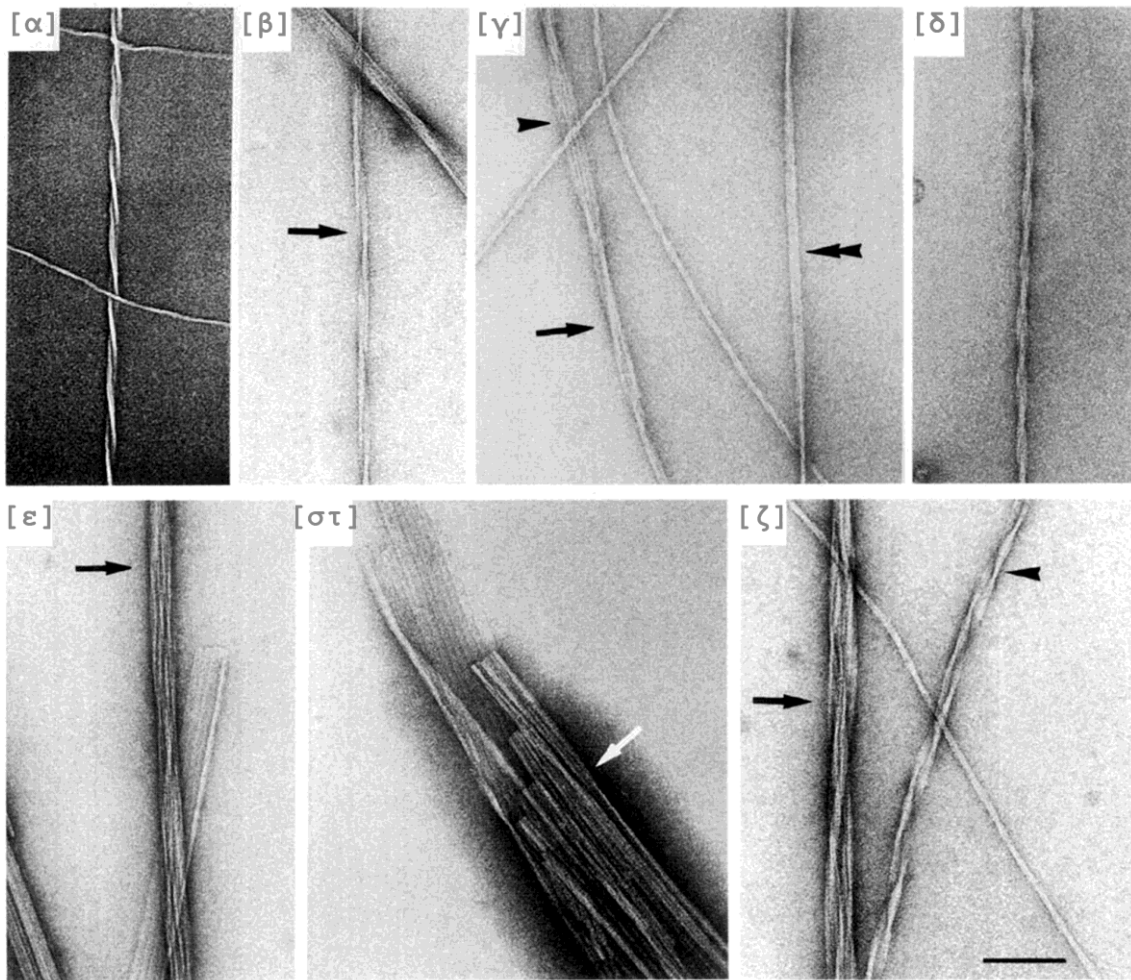
Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

διαλύτη. Έτσι, προτείνεται ότι η μη-διπλωμένη ακολουθία των πρωτεϊνών με τάση προς συσσωμάτωση περιέχει **κωδικοποιημένη την πληροφορία του είδους του πολυμορφισμού που θα εμφανίσουν τα μονομερή ή τα οργανωμένα ολιγομερή και μπορεί να καθοδηγήσει τον ακόλουθο πολυμορφισμό των πρωτοϊνιδίων και των ινιδίων.** Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι ιδιότητες ενός μεμονωμένου ινιδίου δεν αλλάζουν κατά μήκος του ινιδίου, γι' αυτό και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως το πάχος του ινιδίου ή το βήμα περιέλιξης εμφανίζουν την τάση να εξαπλώνονται (Tysko, 2014).

Ο πολυμορφισμός των ινιδιακών συσσωματωμάτων μελετήθηκε ευρέως σε αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες *in vitro*, όπου επιτεύχθηκε η καταγραφή των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των αμυλοειδογόνων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, απαλλαγμένων από το 'συνωστισμένο διάκοσμο' των ιστών. Η παρατήρηση των ινιδίων σε πλέγματα μικροσκοπίας έδωσε τη δυνατότητα της καταγραφής της ποικιλομορφίας των πολυμερών, που μπορεί να εμφανίζονται ως άμορφες, σφαιρικές ή ινιδιακές συναθροίσεις υψηλότερης οργάνωσης. Συχνά, τα ινιδιακά ευρήματα δημιουργούν πυκνά δίκτυα με χαρακτηριστική μορφολογία, καθώς μεμονωμένα ινίδια συναντώνται να συμμετέχουν στη συγκρότηση τρισδιάστατων υπερδομών (Nilsson, 2004).

Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), καθώς και μικροσκοπία σάρωσης-διέλευσης (STEM) χρησιμοποιήθηκαν για τη συστηματική μελέτη της αυτοσυγκρότησης της αμυλοειδογόνου ανθρώπινης καλσιτονίνης σε υδατικά διαλύματα *in vitro* από τον Bauer και τους συνεργάτες του (Bauer *et al.*, 1995). Οι ηλεκτρονιογραφίες που παρατίθενται στην Εικόνα 6 παρουσιάζουν, εκτός από πρωτοϊνίδια και ινίδια καλσιτονίνης και υψηλότερης οργάνωσης συναθροίσεις με έντονο πολυμορφισμό. Συγκεκριμένα, μοναδιαία ινίδια εμφανίζουν τη τάση να σχηματίζουν υπερέλικες διαφορετικής μορφολογίας και διαφορετικών βημάτων περιέλιξης, καθώς μπορούν να δημιουργούν χαλαρές 'δίκλωνες' κορδέλες ινιδίων με μεγάλο βήμα περιέλιξης (Εικόνα 6γ), είτε πιο 'σφιχτές' υπερέλικες ινιδίων (Εικόνα 6δ). Άλλοτε, μοναδιαία ινίδια μπορούν να αλληλεπιδρούν πλευρικά προς τη δημιουργία επίπεδων ταινιών (Εικόνα 6στ) είτε δεματιών που συγκροτούνται από την ακανόνιστη πλευρική αλληλεπίδραση ινιδίων (Εικόνα 6ζ). Στην Εικόνα 6η παρουσιάζεται η απλοποιημένη αναπαράσταση του δομικού πολυμορφισμού της ανθρώπινης καλσιτονίνης, όπως προέκυψε από *in vitro* πειράματα.

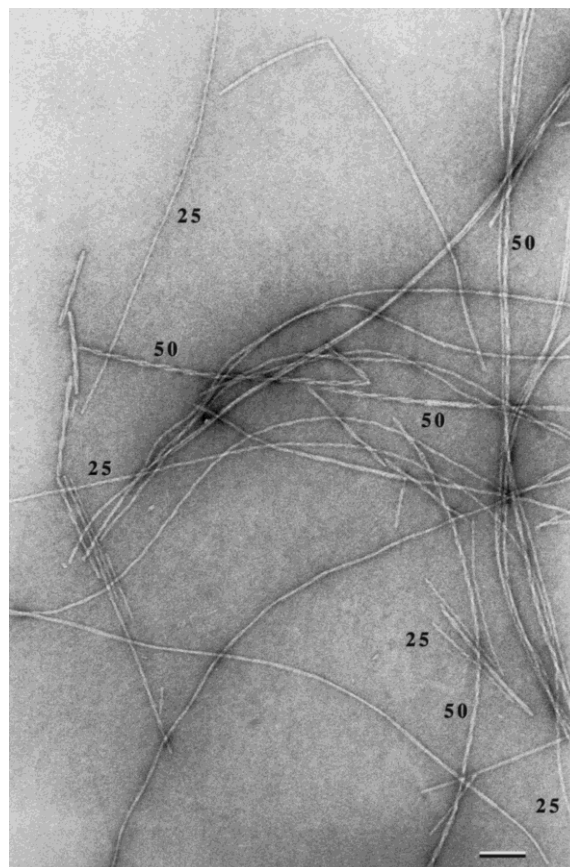
Κεφάλαιο I – Εισαγωγή



Εικόνα 6. Αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης καλσιτονίνης σε υδατικά διαλύματα *in vitro* (Προσαρμογή από (Bauer *et al.*, 1995)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

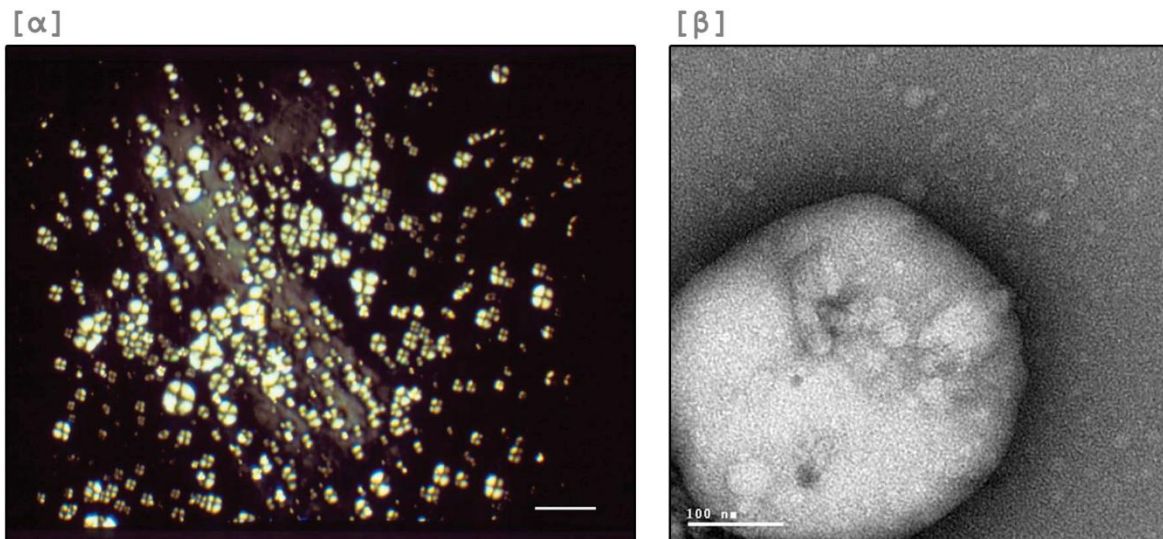
Την ίδια στιγμή, ακόμα μία δημοσίευση από τον Goldsbury και τους συνεργάτες του απέδειξε ότι **τα πρωτοϊνίδια σπάνια παραμένουν μεμονωμένα, καθώς εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς τρόπους προς το σχηματισμό δομών ανώτερης οργάνωσης** (Goldsbury *et al.*, 1997). Η ανθρώπινη αμυλίνη, για παράδειγμα, εμφανίζει μία αξιοθαύμαστη τάση να σχηματίζει ινδιακές συναθροίσεις σε υδατικά διαλύματα *in vitro*, σε ένα εύρος διαφορετικών συνθηκών pH και ιοντικής ισχύος. Τα αμυλοειδή ινίδια που παρατηρούνται στην Εικόνα 7 έχουν μήκος αρκετών μικρομέτρων (μm) και διάμετρο της τάξης των νανομέτρων (nm) με μικρότερη τιμή τα 5 nm. Δύο πληθυσμοί ινιδίων καταγράφονται στο παρόν δείγμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας· ο πρώτος πληθυσμός περιλαμβάνει επίπεδα ινίδια διαμέτρου 5 nm, χωρίς αξιοσημείωτη μορφολογία, που αλληλεπιδρούν πλευρικά και σχηματίζουν επίπεδες ταινίες ή κορδέλες, ενώ ο δεύτερος πληθυσμός περιλαμβάνει ελικοειδή ινίδια ποικίλων διαμέτρων. Συγκεκριμένα ο δεύτερος πληθυσμός εμφανίζει υπερέλικες διαφορετικών βημάτων περιέλιξης με επαναλήψεις 25 nm ή 50 nm. Έτσι, αντίστοιχες πειραματικές προσεγγίσεις υπήρξαν σημαντικοί σταθμοί για το χαρακτηρισμό των μοριακών αλληλεπιδράσεων που διέπουν την αμυλοειδογένεση και πιθανά σχετίζονται και με την *in vivo* εναπόθεση ινιδίων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Πολυμορφισμός των αμυλοειδών ινιδίων της ανθρώπινης αμυλίνης σε υδατικά διαλύματα *in vitro* (Προσαρμογή από (Goldsbury *et al.*, 1997)) (Ράβδος 100nm).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι, σε ινίδια που δημιουργούνται *in vitro* έχουν βρεθεί υψηλής οργάνωσης δομές, που ονομάζονται σφαιρουλίτες και μπορούν να εντοπιστούν από την εμφάνιση των χαρακτηριστικών σταυρών της Μάλτας, όταν παρατηρούνται κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Hamodrakas *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2003; Krebs *et al.*, 2005; Krebs *et al.*, 2004b). Αυτές οι μορφές παρατηρούνται και κατά την προετοιμασία συνθετικών πολυμερών, όπως του πολυαιθυλενίου, ένα εύρημα σε συμφωνία με την ιδέα ότι τα αμυλοειδή ινίδια έχουν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των κλασικών πολυμερών (Shtukenberg *et al.*, 2012). Ανάλογες σφαιρικές υπερδομές έχουν παρατηρηθεί σε πολλά συστήματα παθολογικών (Conway *et al.*, 2000; Ionescu-Zanetti *et al.*, 1999) αλλά και λειτουργικών αμυλοειδών (Hamodrakas *et al.*, 2004). Οι σφαιρουλίτες είναι δομές υγροκρυσταλλική φύσης, που χαρακτηρίζονται γενικά από την ύπαρξη β-πτυχωτών επιφανειών και την υψηλή τάση να δεσμεύουν τις διαγνωστικές χρωστικές των αμυλοειδών ινιδίων (π.χ. Congo Red), όταν δημιουργούνται από αμυλοειδογόνα υλικά. Στις μελέτες συσσωμάτωσης έχουν εντοπιστεί ως δομές των πρώιμων σταδίων της ινιδογένεσης, που διαμεσολαβούν στη δημιουργία ώριμων αμυλοειδών ινιδίων (Hamodrakas *et al.*, 2004) (Εικόνα 8).

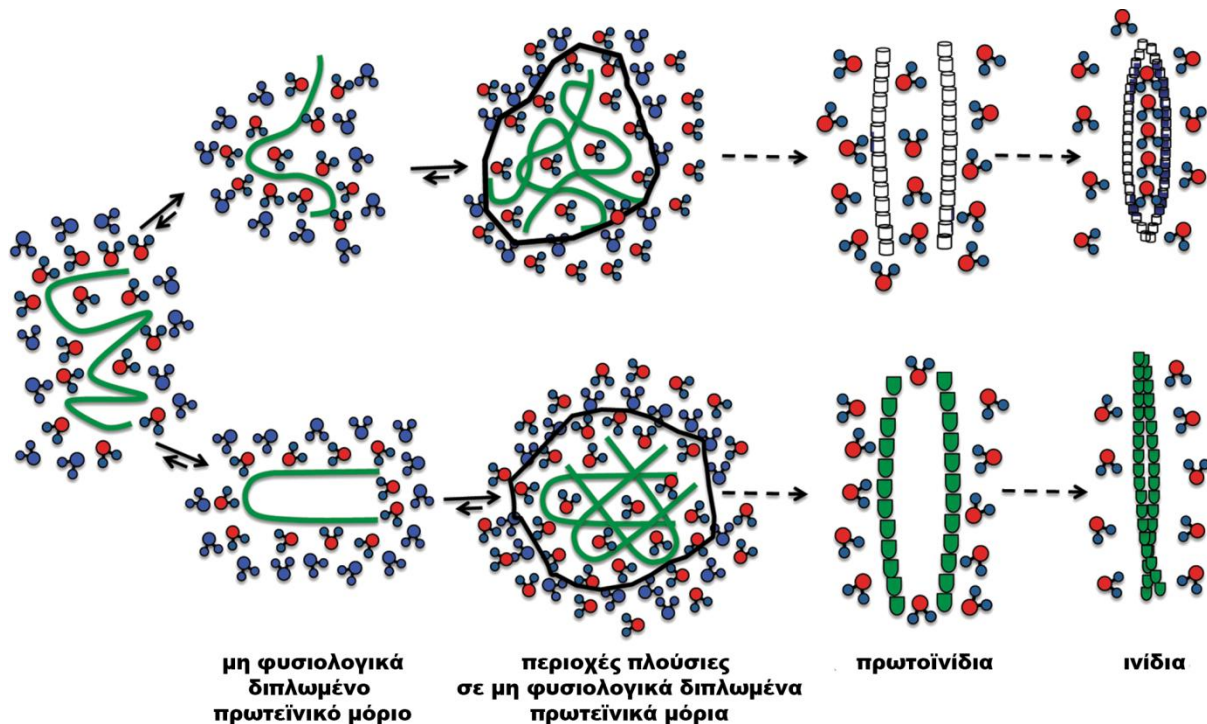


Εικόνα 8. Σφαιρικές δομές αμυλοειδών ινιδίων. Παρουσιάζονται οι δομές σφαιρουλιτών στο οπτικό μικροσκόπιο (α) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση του σταυρού της Μάλτας, κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Ράβδος 4μm) (α) (Hamodrakas *et al.*, 2004).

Η ιδέα ότι ο διαλύτης αποτελεί καθοριστικό μέτρο του τελικού διπλώματος των πρωτεϊνικών μορίων τόσο κατά το φυσιολογικό πρωτεϊνικό δίπλωμα (Cheng and Rossky,

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1998), όσο και κατά την πρωτεϊνική συσσωμάτωση (Thirumalai *et al.*, 2012), έδωσε μία πιθανή ερμηνεία για την εμφάνιση του πολυμορφισμού. Η παγίδευση μορίων νερού που πραγματοποιείται κατά την πυρήνωση μη-φυσιολογικά διπλωμένων μονομερών στην πρωτεϊνική συσσωμάτωση, αλλά και η ακόλουθη επιλεκτική απομάκρυνσή τους πιθανολογείται πως είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση πολυμορφικών ινδιακών συναθροίσεων (Εικόνα 9).

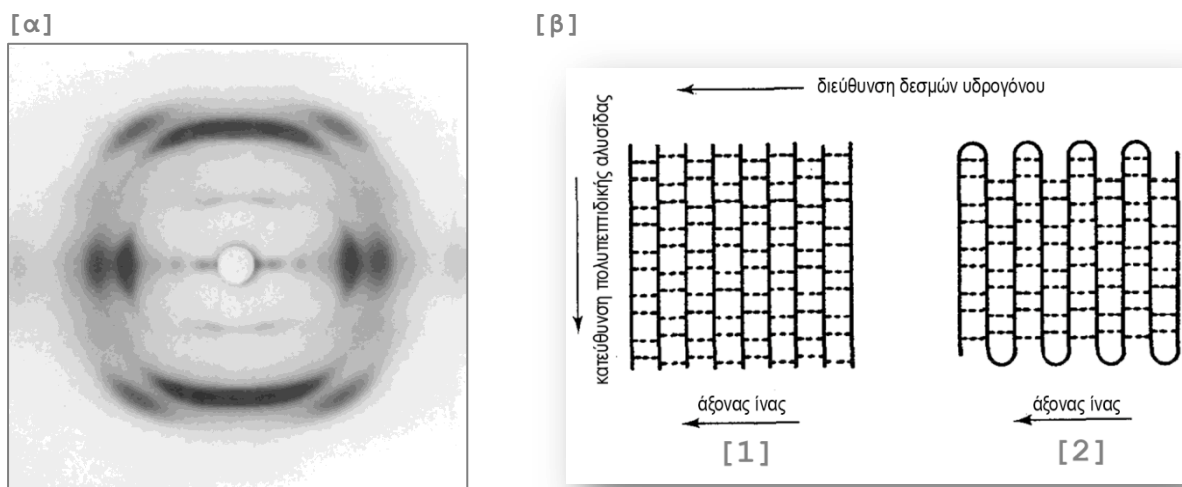


Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης που οδηγεί στη δημιουργία πολυμορφικών αμυλοειδών ινιδίων. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη συσσώρευση μη-φυσιολογικά διπλωμένων μονομερών σε περιοχές που μπορεί να περιέχουν μεταβαλλόμενο αριθμό μορίων νερού. Η περιοχή αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν διαφορετικά μη-φυσιολογικά διπλωμένα μόρια, τα οποία αλληλεπιδρούν με διακριτούς τρόπους προς το σχηματισμό πρωτοϊνιδίων, που διαφοροποιούνται όχι μόνο ως προς τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, αλλά και ως προς το περιεχόμενο του διαλύτη. Κατά το δεύτερο βήμα, η δημιουργία των ώριμων ινιδίων προκύπτει κατά την αλληλεπίδραση πρωτοϊνιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν περαιτέρω για να σχηματίσουν μία ποικιλία αμυλοειδών ινιδίων. Σε πολλές από τις πολυμορφικές δομές, ένας αριθμός μορίων νερού μπορεί να διατηρείται στη δομή του ινιδίου (Προσαρμογή από (Thirumalai *et al.*, 2012)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.3.2. Cross-β αρχιτεκτονική των αμυλοειδών ινιδίων

Η περιθλαση ακτίνων-X από ίνες (*X-ray fiber diffraction*) καθιερώθηκε ως θεμελιώδης τεχνική για την κατανόηση της αρχιτεκτονικής των αμυλοειδών ινιδίων, καθώς έχει συμβάλει καθοριστικά στην αποσαφήνιση του βασικού πυρήνα τους, δηλαδή της cross-β δομής. Η καταγραφή της αρχιτεκτονικής της cross-β δομής έγινε στο μεταξύ του εντόμου *Crysope flava*, από τον Geddes και τους συνεργάτες του το 1968 (Εικόνα 10α). Σχετικά περιθλασιγράμματα από ινώδεις δομές όμως, είχαν ήδη παρατηρηθεί για το μεταξύ του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Marsh *et al.*, 1955), τις β-κερατίνες αλλά και την αλβουμίνη (Astbury *et al.*, 1935). Ειδικότερα, οι επιστήμονες απέδωσαν τη μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.7 Å, στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων και την ισημερινή ανάκλαση στα ~5 Å, στην περιοδική απόσταση του πακεταρίσματος των β-πτυχωτών επιφανειών, που σχηματίζονται από τους β-κλώνους. Οι β-κλώνοι, που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου, είναι κάθετοι στον άξονα της ίνας, ενώ οι β-πτυχωτές επιφάνειες εκτείνονται παράλληλα ως προς τον άξονα αυτής (Εικόνα 10β).

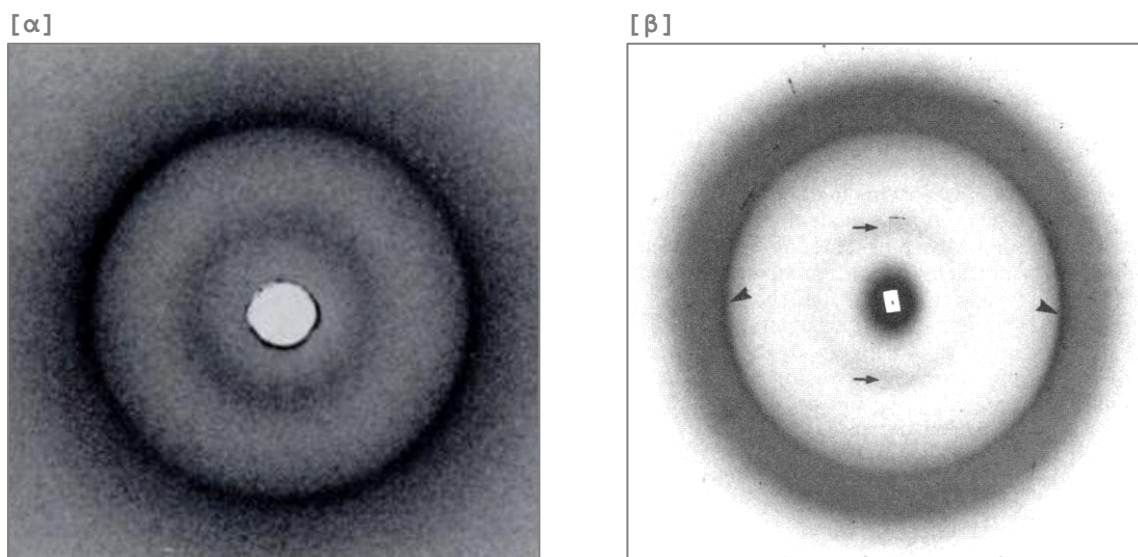


Εικόνα 10. Το πρώτο περιθλασίγραμμα της cross-β αρχιτεκτονικής. (α) Περιθλασίγραμμα της cross-β δομής από το μεταξύ του εντόμου *Crysope flava*. (β) Σχηματικό διάγραμμα β-πτυχωτής επιφάνειας που δημιουργείται από αλληλεπίδραση μικρών πολυπεπτιδικών τμημάτων (1) ή από το κανονικό δίπλωμα μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας (2). Τα δύο διαγράμματα είναι η πρώτη εξήγηση της cross-β αρχιτεκτονικής από το Geddes και τους συνεργάτες του (Προσαρμογή από (Geddes *et al.*, 1968)).

Η αρχική εξήγηση του περιθλασιγράμματος του μεταξιού της *Crysope flava* και το μοντέλο πολυμερισμού των πρωτεϊνών του (Εικόνα 10), βρέθηκε αργότερα να είναι κομβικής σημασίας στη δομικές μελέτες των παθολογικών αμυλοειδών ινιδίων. Πρώτοι οι

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Eanes και Glenner κατέγραψαν το 1968 την ομοιότητα των περιθλασιγραμμάτων των αμυλοειδών ινιδίων που απομονώθηκαν από το σπλήνα και το ήπαρ ασθενών, με περιθλασιγράμματα της cross-β αρχιτεκτονικής του μεταξιού της *Crysope flava* (Eanes and Glenner, 1968) (Εικόνα 11α). Η σύνδεση των αμυλοειδών εναποθέσεων με την παθολογία διαφόρων ασθενειών έκανε τις μελέτες ινωδών πρωτεϊνών ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Έτσι, το 1986 πραγματοποιήθηκε συλλογή περιθλασιγραμμάτων και από *ex vivo* ινίδια του Αβ πεπτιδίου, που σχετίζονται με τη νόσο του Alzheimer (Kirschner *et al.*, 1986) (Εικόνα 11β), ενώ έκτοτε μία πληθώρα συστημάτων συνθετικών ή φυσικών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, που αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια, μελετούνται με περίθλαση ακτίνων-X.

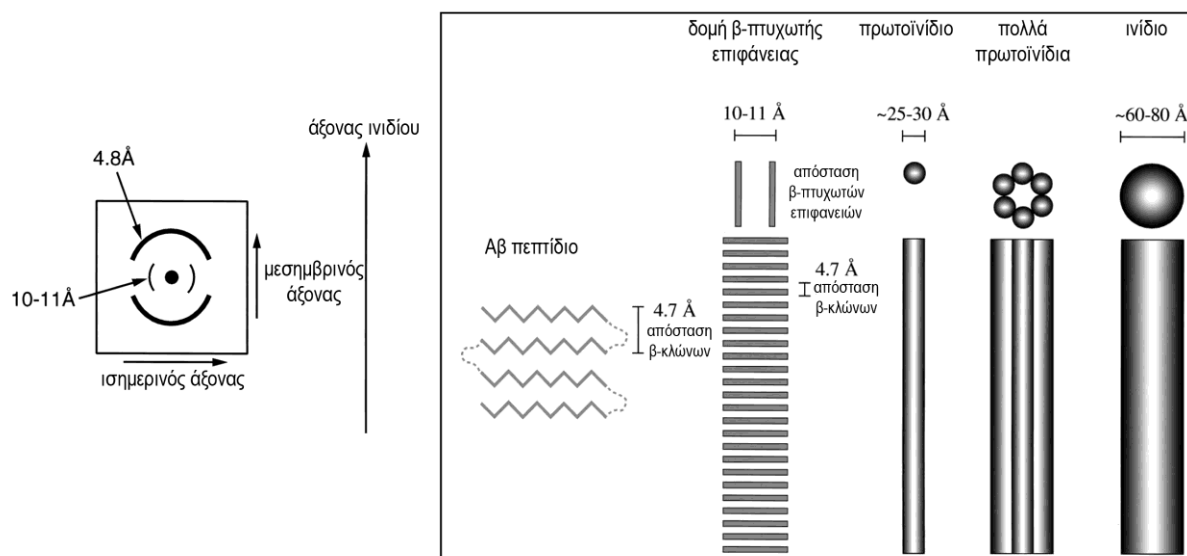


Εικόνα 11. Περιθλασιγράμματα *ex vivo* αμυλοειδών ινιδίων. (α) Περιθλασιγράμματα cross-β δομής αμυλοειδών ινιδίων που απομονώθηκαν από το σπλήνα και το ήπαρ ασθενών (Προσαρμογή από (Eanes and Glenner, 1968)). (β) Περιθλασιγράμματα cross-β δομής αμυλοειδών ινιδίων του Αβ πεπτιδίου, από ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer. Η κεφαλή βέλους σημειώνει την ανάκλαση στα 4.7 Å, ενώ τα μικρά βέλη σημειώνουν την ανάκλαση στα 10 Å (Προσαρμογή από (Kirschner *et al.*, 1986)).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η cross-β αρχιτεκτονική περιγράφει τις επαναλήψεις απροσδιόριστου μήκους β-πτυχωτών επιφανειών, οι οποίες αποτελούνται από κανονικά επαναλαμβανόμενους β-κλώνους. Η απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων είναι τυπικά 4.7 Å και σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ των ατόμων της κύριας αλυσίδας και οργανώνονται με κάθετο προσανατολισμό ως προς τον άξονα του ινιδίου. Η απόσταση μεταξύ β-πτυχωτών επιφανειών κυμαίνεται μεταξύ 8-12 Å

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

και σταθεροποιείται από ασθενείς αλληλεπιδράσεις, όπως υδρόφοβες ή ηλεκτροστατικές ή αλληλεπιδράσεις van der Waals, ανάλογα από τη σύνθεση των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που αλληλεπιδρούν. Για παράδειγμα, η μικρή απόσταση μεταξύ των β-πτυχωτών επιφανειών στο μετάξι της *Crysope flava* (~5 Å) (Εικόνα 10), οφείλεται στο μικρό μήκος των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων που συγκροτούν την αμινοξική ακολουθία του μεταξιού (Geddes *et al.*, 1968). Η ανάκλαση στα 4.7 Å εντοπίζεται στο μεσημβρινό άξονα του περιθλασιγράμματος, ενώ η ανάκλαση στα 8-12 Å εντοπίζεται στον ισημερινό άξονα (Εικόνα 12). Η εμφάνιση των ανακλάσεων με τη μορφή τόξων στον μεσημβρινό και τον ισημερινό άξονα σε σχήμα σταυρού, έδωσε το όνομα στην cross-β αρχιτεκτονική. Η κοινή αρχιτεκτονική των αμυλοειδών ινιδίων παρουσιάζεται συνοπτικά στην Εικόνα 12, όπου απεικονίζεται σχηματικά η συγκρότηση του πυρήνα των ινιδίων του Αβ πεπτιδίου (Serpell, 2000).

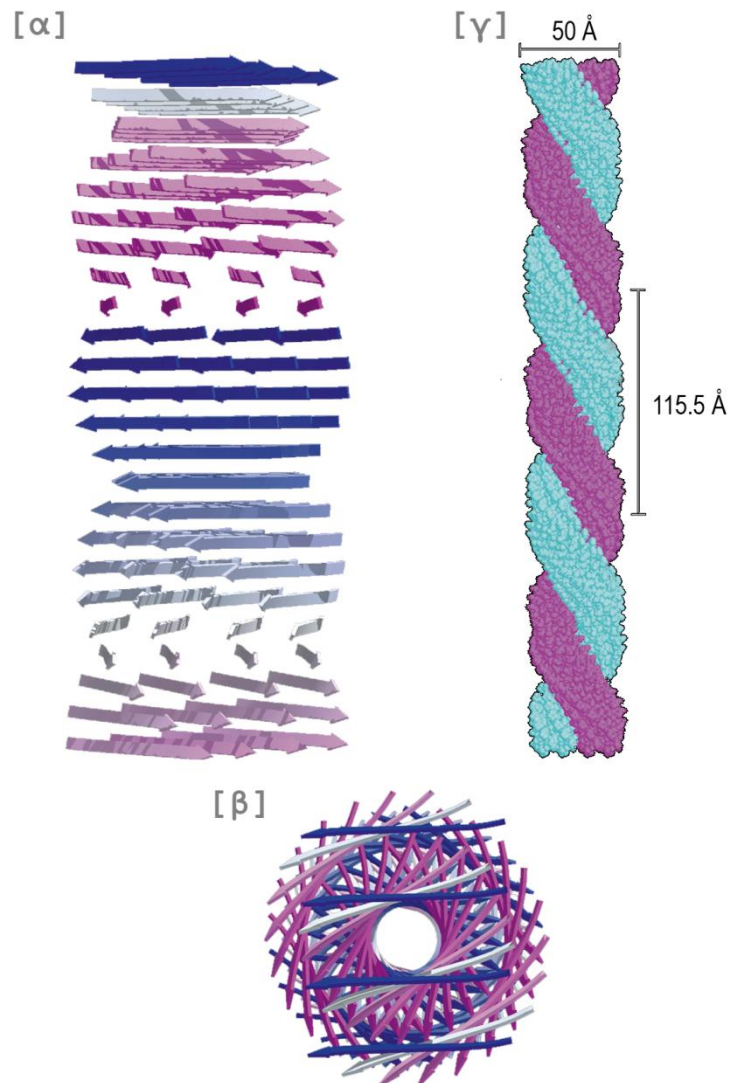


Εικόνα 12. Η αρχιτεκτονική των ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση του Αβ πεπτιδίου. Τυπικό περιθλασίγραμμα της cross-β δομής (αριστερά). Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των ινιδίων του Αβ πεπτιδίων σε ατομικό επίπεδο (δεξιά). Οι τιμές των ανακλάσεων αφορούν πειράματα σε προσανατολισμένη ίνα ινιδίων του Αβ πεπτιδίου (Προσαρμογή από (Serpell, 2000)).

Η σχέση μεταξύ των μοντέλων των αμυλοειδών που βλέπουμε στην περίθλαση ακτίνων-X και της ιεραρχίας των δομών που συναντάμε στις ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης προσδιορίστηκε για πρώτη φορά σε ατομικό επίπεδο για τις εναποθέσεις της αμυλοειδογόνου τρανσθυρετίνης, με τη διεξαγωγή πειραμάτων περίθλασης ακτίνων X σε αμυλοειδή ινίδια της

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

οικογενούς αμυλοειδούς πολυνευροπάθειας (*familial amyloidotic polyneuropathy - FAP*) (Blake and Serpell, 1996). Η δομή ενός πρωτοϊνιδίου που συγκροτεί τα ινίδια της FAP παρουσιάζεται στην Εικόνα 13. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δομή παρουσιάζει μόνο των πυρήνα του πρωτοϊνιδίου που περιθλά κατά την ακτινοβόληση και όχι το πρωτεϊνικό υλικό που πιθανά οργανώνεται και περιβάλλει τον πυρήνα.



Εικόνα 13. Η αρχιτεκτονική της ινιδιακής δομής της τρανθυρετίνης βασισμένη σε δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X. Απεικόνιση πιθανού μοντέλου του πυρήνα της δομής των αμυλοειδών πρωτοϊνιδίων κατά μήκος (α) και κάθετα (β) στο άξονα του ινιδίου. Οι β-κλώνοι οργανώνονται σε τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες. (γ) Χωροπληρωτικό μοντέλο του πυρήνα των αμυλοειδών πρωτοϊνιδίων της τρανθυρετίνης. Οι τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες δημιουργούν δύο ζεύγη β-πτυχωτών επιφανειών (γαλάζιο και φούξια) και συγκροτούν ένα πρωτοϊνίδιο διαμέτρου 50 Å (Προσαρμογή από (Blake and Serpell, 1996)).

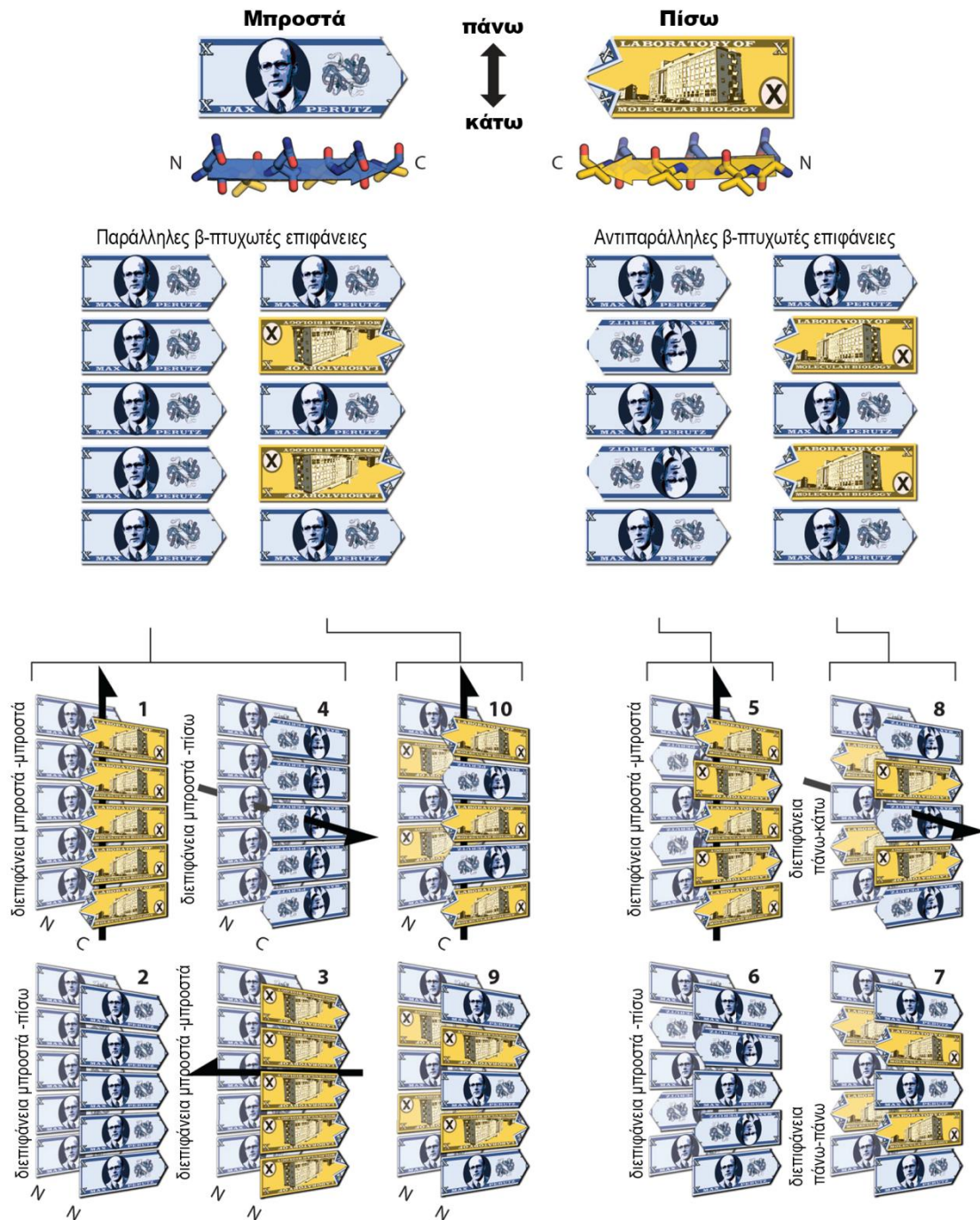
Η cross-β αρχιτεκτονική του πρωτοϊνιδίου συγκροτείται από 4 β-πτυχωτές επιφάνειες απροσδιόριστου μήκους οι οποίες προσανατολίζονται παράλληλα ως προς τον άξονα της

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

ίνας, με τους β-κλώνους τους να βρίσκονται κάθετα σε αυτόν (Εικόνα 13α). Ο αριθμός των β-πτυχωτών επιφανειών προσδιορίστηκε από την πληροφορία των ισημερινών ανακλάσεων του περιθλασιγράμματος, ενώ η ανάλυση των β-κλώνων προέκυψε από τις μεσημβρινές ανακλάσεις (Blake and Serpell, 1996). Κάθε β-κλώνος βρίσκεται στραμμένος περίπου 15° σε σχέση με τους γείτονές τους, μία τιμή που δείχνει ότι 24 συνεχόμενοι β-κλώνοι παρουσιάζουν μία στρέψη 360° , η οποία δημιουργεί μία ελικοειδή περιέλιξη στις πακεταρισμένες β-πτυχωτές επιφάνειες, γύρω από έναν άξονα του πρωτοϊνιδίου (Εικόνα 13γ, βήμα 115.5 \AA). Έτσι, παρότι η cross-β αρχιτεκτονική των αμυλοειδών ινιδίων είχε περιγραφεί από τα πρωταρχικά πειράματα του μεταξιού του *Crysope flava*, η προτεινόμενη επίπεδη αρχιτεκτονική των β-πτυχωτών επιφανειών αποδείχθηκε μία στερεοδιάταξη που δεν παρατηρείται ευρέως στις σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (Geddes *et al.*, 1968), καθώς η ευνοϊκότερη ενεργειακά στερεοδιάταξη είναι εκείνη των στραμμένων β-πτυχωτών επιφανειών (Chothia, 1973). Αυτή η ελικοειδής στρέψη του πρωτοϊνιδίου της τρανσθυρετίνης είναι η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα του μοντέλου, στο οποίο εικάζεται ότι οι 4 β-πτυχωτές επιφάνειες του πρωτοϊνιδίου αλληλεπιδρούν σε δύο συμμετρικά ζεύγη, που δημιουργούν μία δομή με χαρακτήρα διπλής έλικας (Εικόνα 13γ).

Οι εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις που επιτρέπουν το πακετάρισμα των β-πτυχωτών επιφανειών, στην cross-β αρχιτεκτονική, προέκυψαν από τη μελέτη μικρών τμημάτων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η πρώτη δομή που προσδιορίστηκε το 2005 αφορούσε ένα επταπεπίδιο της p18 πρωτεΐνης της ζύμης, Sup35, και παρουσίαζε β-πτυχωτές επιφάνειες που συσχετίζονται κατά ζεύγη. Οι πλευρικές αλυσίδες κάθε μέλους αλληλεπιδρούν ειδικά με τις πλευρικές αλυσίδες της απέναντι β-πτυχωτής επιφάνειας και για το λόγο αυτό προτάθηκε ο όρος στερεοδιαταξικό φερμουάρ, καθώς η αλληλοεπικάλυψη των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων ομοιάζει με τα 'δόντια' ενός φερμουάρ (Nelson *et al.*, 2005). Η αλληλεπίδραση της Sup35 έκτοτε εντοπίστηκε σε δεκάδες δομές ατομικής διακριτικότητας τμημάτων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Eisenberg and Sawaya, 2017). Στην Εικόνα 14 παρουσιάζονται απλοποιημένα οι πιθανές διευθετήσεις των β-κλώνων στις β-πτυχωτές επιφάνειες του cross-β σκελετού, όπως παρουσιάζονται στο πρόσφατο άρθρο των ερευνητών που εισήγαγαν τον όρο 'στερεοδιαταξικό φερμουάρ' (Sawaya *et al.*, 2007). Τα στερεοδιαταξικά φερμουάρ ταξινομούνται με βάση αυτές τις διευθετήσεις σε 9 διακριτές κλάσεις (Εικόνα 14) (Sawaya *et al.*, 2007).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή



Εικόνα 14. Απλοποιημένη αναπαράσταση των πιθανών στερεοδιατάξεων των β-κλώνων στην cross-β δομή. Τα στερεοδιαταξικά φερμονάρ ταξινομούνται με βάση τις διευθετήσεις των β-κλώνων που συγκροτούν τις β-πτυχωτές επιφάνειες σε 9 διακριτές κλάσεις (Προσαρμογή από (Eisenberg and Sawaya, 2017)).

Οι δομές των τμημάτων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών **παρουσιάζουν κοινά γνωρίσματα**: **1)** Συγκροτούνται από εκτεταμένα τμήματα β-κλώνων τα οποία συκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των N-H και C=O ομάδων του, σχηματίζοντας β-πτυχωτές

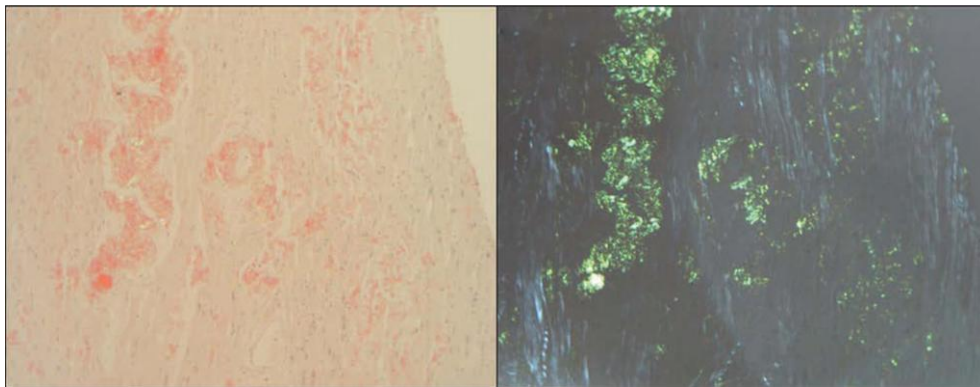
Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

επιφάνειες με κλώνους που έχουν απόσταση $\sim 4.7 \text{ \AA}$. Οι αμιδικές ομάδες είναι ‘διπολικές’, κάτι που σημαίνει ότι δημιουργούν διπολικά επίπεδα που μπορεί να διευθετούνται είτε προς τα επάνω είτε προς τα κάτω. **2)** Τα ζεύγη των β-πτυχωτών επιφανειών αλληλεπιδρούν σφιχτά με αντικριστές ή μη-αντικριστές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων που βρίσκονται και στις δύο επιφάνειες των αλυσίδων. Το μήκος των πλευρικών αλυσίδων καθορίζει την απόσταση μεταξύ των β-πτυχωτών επιφανειών, η οποία κυμαίνεται από 5 μέχρι 16 \AA . **3)** Οι φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης μπορούν επίσης να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των επιπέδων των εκτεταμένων πρωτεϊνικών αλυσίδων, δημιουργώντας ‘σκάλες’ δεσμών υδρογόνου (*hydrogen-bonded ladders*). Άλλες πλευρικές αλυσίδες με παρόμοια χαρακτηριστικά είναι η τυροσίνη, η σερίνη και η θρεονίνη. Τέλος, **4)** η διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο γειτονικών β-πτυχωτών επιφανειών στις περισσότερες περιπτώσεις στερείται μορίων νερού, ωστόσο σε λίγες δομές εντοπίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων του νερού και των β-πτυχωτών επιφανειών. Πιστεύεται ότι **η κοινή αρχιτεκτονική της cross-β δομής είναι εκείνη που καθορίζει την εμφάνιση των αμυλοειδών ινιδίων στις ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης** (Eisenberg and Sawaya, 2017).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.3.3. Δέσμευση της χρωστικής Congo Red

Το Congo Red είναι μία ευρέως γνωστή ιστολογική χρωστική, η οποία προσελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών για περισσότερο από 100 χρόνια (Frid *et al.*, 2007). Συγκεκριμένα, η χρωστική είναι ένα μικρό διάζο-άλας που αλληλεπιδρά ειδικά με τα αμυλοειδή ινίδια και χρησιμοποιείται από το 1920 ως μία αναλυτική βιοχημική τεχνική για τον χαρακτηρισμό των αμυλοειδών ινιδίων και τη διάγνυσή τους (Benditt *et al.*, 1970) (Εικόνα 15). Η χρώση με Congo Red, ιστορικά, ήταν η πρώτη διαγνωστική τεχνική για το χαρακτηρισμό του αμυλοειδογόνου υλικού (Bennhold, 1922; Divry and Florkin, 1927), ενώ αυτή η ιδιότητα αλληλεπίδρασης της χρωστικής ονομάστηκε κονγκοφιλικότητα (*congophilia*) (Missmahl and Hartwig, 1953). Εκτός όμως από την εξειδικευμένη πρόσδεσή της, η χρωστική χρησιμοποιήθηκε εκτενώς ως μοριακός ανιχνευτής της ύπαρξης αμυλοειδογόνου υλικού *in vivo* (Higuchi *et al.*, 2005) και ως αναστολέας της αμυλοειδογένεσης (Lorenzo and Yankner, 1994). Η τελευταία ιδέα, βέβαια, απορρίφθηκε σύντομα λόγω της υψηλής κυτταροτοξικότητάς της και της ανεπαρκούς φαρμακοκινητικής του μορίου, σε αντίστοιχες πειραματικές διαδικασίες.

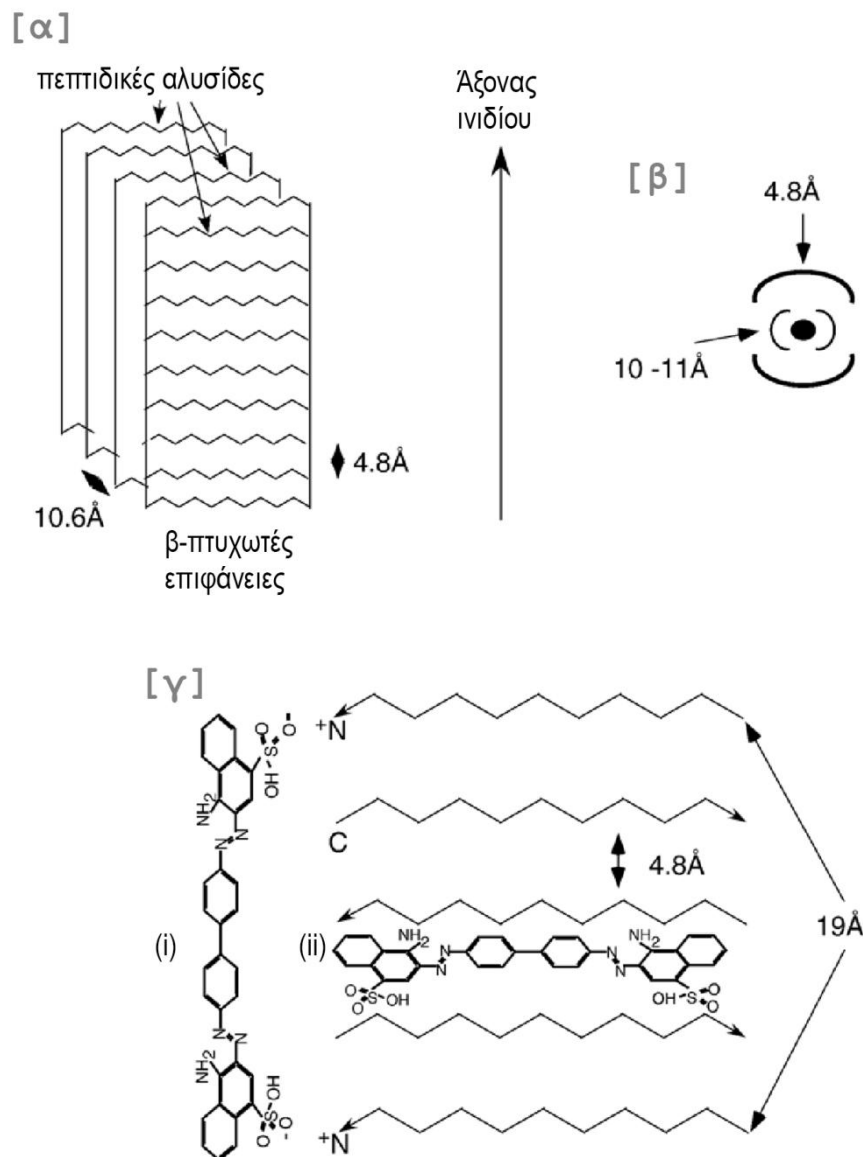


Εικόνα 15. Χρώση μυοκαρδίου από ασθενή με αμυλοειδή καρδιομυοπάθεια, με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη (δεξιά) (Προσαρμογή από (Ruberg and Berk, 2012))

Οι εναποθέσεις που προσδέουν εξειδικευμένα τη χρωστική Congo Red εμφανίζονται ως κόκκινες ομογενείς μάζες, όταν παρατηρούνται με πολωμένο φως (Εικόνα 15, αριστερά), ενώ αποκτούν κιτρινοπράσινη εμφάνιση, λόγω της διπλοθλαστικότητάς τους (Εικόνα 15, δεξιά), όταν παρατηρούνται κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη, πολωτικού μικροσκοπίου (Romhanyi, 1971). Ωστόσο, τα πειραματικά αποτελέσματα της χρώσης των ινιδίων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* συχνά αποδεικνύουν της ύπαρξη ενός συνδυασμού

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

χρωμάτων, εκτός από την εμφάνιση του πράσινου. Η χρωματική παλέτα που προκύπτει κατά την παρατήρηση του ανισότροπου αμυλοειδογόνου υλικού εξαρτάται από τις σχετικές διευθετήσεις των μορίων της χρωστικής στα ινίδια, αλλά και από το πάχος του υπό μελέτη υλικού (Howie, 2015). Το εύρημα αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι, φασματοσκοπικά η πρόσδεση της χρωστικής στα αμυλοειδή ινίδια επάγει μία μετατόπιση στην απορρόφηση της από τα 500 nm στα 540 nm (2.3.2.5, 2.3.2.6).



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει συνοπτικά τα χαρακτηριστικά της δομής των αμυλοειδών ινιδίων και την πρόσδεση της χρωστικής σε αυτά. (α) Πακεταρισμένες β-πτυχωτές επιφάνειες. (β) Περιθλασίγραμμα της cross-β δομής των αμυλοειδών ινιδίων. (γ) Υποθετικά μοντέλα πρόσδεσης της χρωστικής Congo Red στα αμυλοειδή –i– πρόσδεση των ομάδων του σε κάθε 5 πεπτιδικές αλυσίδες, –ii– απόθεση μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Προσαρμογή από (Frid *et al.*, 2007)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Ο πολυμορφικός χαρακτήρας των αμυλοειδών ινιδίων, καθώς και ο χαρακτηριστικός cross-β σκελετός ήταν η βάση για την πρόταση πιθανών μηχανισμών για την πρόσδεση της χρωστικής Congo Red στα υπερομοριακά σύμπλοκα των ινιδίων. Ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης εικάζεται ότι εξαρτάται από τη δευτεροταγή στερεοδιάταξη του σκελετού, η οποία αποτελείται από β-πτυχωτές επιφάνειες απροσδιόριστου μήκους, με τους β-κλώνους τους να βρίσκονται κάθετα σε αυτές (DeLellis *et al.*, 1968). Η ίδια δομή της χρωστικής προτείνει ότι η **‘πρόσδεση’ στο αμυλοειδογόνο υλικό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενός συνδυασμού υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των βενζολικών δακτυλίων καθώς και των φορτισμένων ομάδων της χρωστικής** (Frid *et al.*, 2007) (Εικόνα 16).

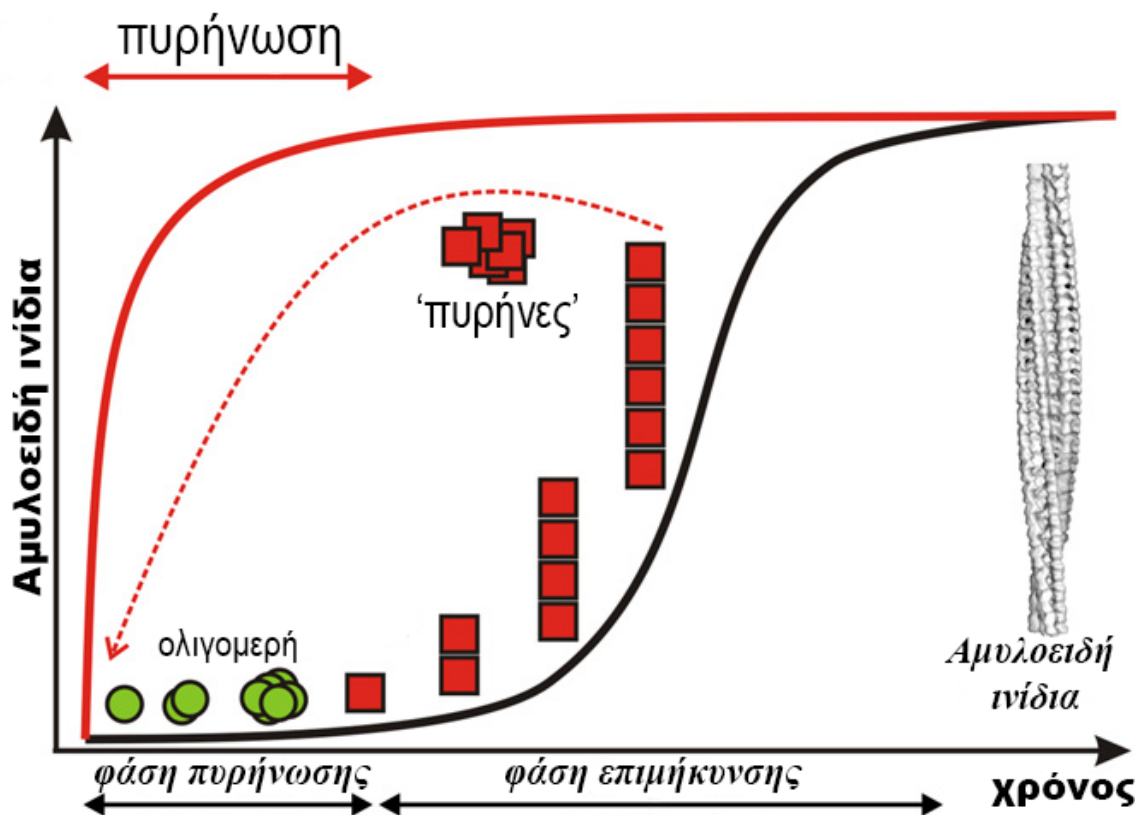
Η ιδέα ότι η απόσταση μεταξύ 4 διαδοχικών β-κλώνων σε μία εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια είναι περίπου 19 Å (4.7 Å απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών β-κλώνων) και συμπίπτει με τη μέτρηση του μήκους μεταξύ των θειομάδων στα άκρα του Congo Red, προτείνει το πρώτο μοντέλο αλληλεπίδρασης (Klunk *et al.*, 1989) (Εικόνα 16γ-i). Η χρωστική φαίνεται ότι διευθετείται παράλληλα στον άξονα του ινιδίου και άρα κάθετα στους β-κλώνους που συγκροτούν τη β-πτυχωτή επιφάνεια. Η παράλληλη ευθυγράμμιση της χρωστικής κατά μήκος του άξονα των ινιδίων και η ‘φυλάκιση’ των μορίων εξηγεί τη θετική εμφάνιση διπλοθλαστικότητας και φαίνεται να ευνοείται από την ύπαρξη αλυσίδων, όπως η ιστιδίνη, η αργινίνη και η λυσίνη, οι οποίες προτείνεται ότι προωθούν την κογγοφιλικότητα. Το δεύτερο εναλλακτικό μοντέλο υποστηρίζει την τοποθέτηση της χρωστικής παράλληλα στους β-κλώνους, και άρα κάθετα στον άξονα των ινιδίων (Carter and Chou, 1998). Στην περίπτωση αυτή η χρωστική μπορεί να αλληλεπιδρά με τις πλευρικές αλυσίδες των β-κλώνων, οι οποίες τοποθετούνται κανονικά, δημιουργώντας χαρακτηριστικά δομικά μοτίβα (ή αυλάκια) κατά μήκος του άξονα των ινιδίων (Εικόνα 16γ-ii).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.4. Αμυλοειδογένεση

1.4.1. Μηχανισμοί αμυλοειδογένεσης

Ο μηχανισμός της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης εμπλέκει έναν καταρράκτη γεγονότων που πραγματοποιούνται σταδιακά και οδηγούν μία πρωτεΐνη από την μονομερή στην πολυμερή – ινιδιακή κατάσταση. Παράγοντες όπως η πρωτεϊνική συγκέντρωση, η αμινοξική ακολουθία των πρωτεϊνών, καθώς και οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος επώασης (pH, ιοντική ισχύς, θερμοκρασία) επηρεάζουν την κινητική της αυτοσυγκρότησης με μοναδικούς τρόπους, κάνοντας δύσκολη την περιγραφή ακόμα και της *in vitro* πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης. Η δομική μετάβαση μη-φυσιολογικά διπλωμένων μονομερών σε οργανωμένες δομές αμυλοειδών ινιδίων και όχι σε άμορφα συσσωματώμα πρωτεϊνών, απαιτεί συνθήκες που ευνοούν την αργή πυρήνωση των μονομερών και την οργανωμένη αυτοσυγκρότηση τους σε ινιδιακές υπερδομές.



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας της *de novo* αμυλοειδογένεσης. (Προσαρμογή από (Eichner and Radford, 2011)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

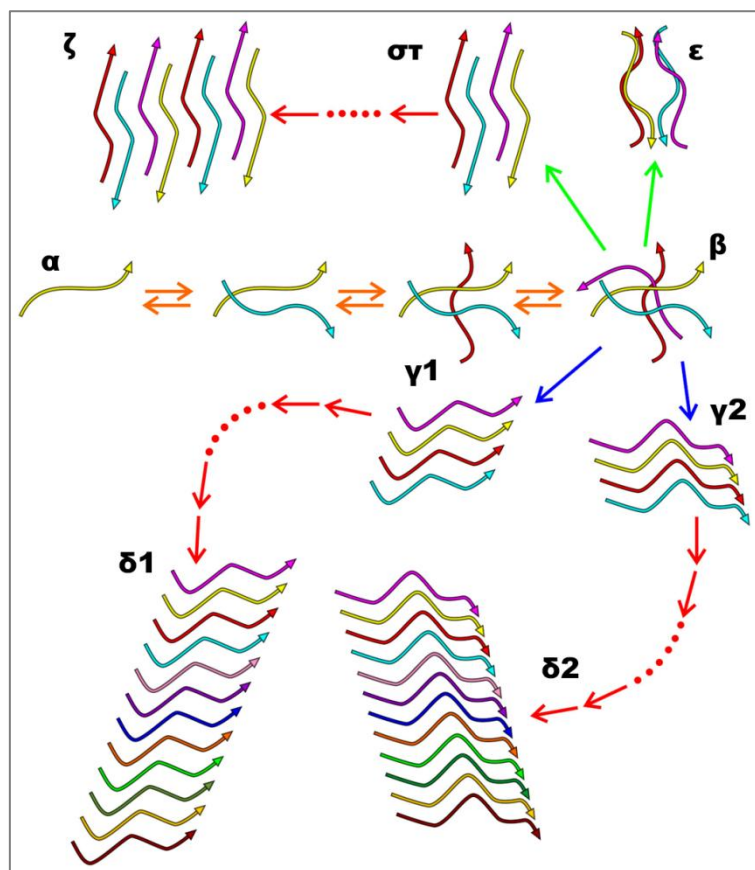
Η συνήθης διαδικασία της *de novo* αμυλοειδογένεσης πραγματοποιείται σε χρονικά διαστήματα που κυμαίνονται από λεπτά μέχρι ημέρες, ενώ η δημιουργία ινιδίων σε συσχέτιση με το χρόνο εμφανίζει μία σιγμοειδή κατανομή (Εικόνα 17, μαύρη καμπύλη). Το χρονικό διάστημα της μετατροπής της πρωτεΐνης ή του πεπτιδίου στην ινδιακή κατάσταση (όπως μετράται από τη δέσμευση χρωστικών ή άλλες τεχνικές) τυπικά περιλαμβάνει **μία φάση πυρήνωσης** – αργή φάση –, η οποία ακολουθείται από **τη φάση επιμήκυνσης** – εκθετική φάση – και τέλος **τη φάση σταθεροποίησης** – στατική φάση (plateau) – (Naiki *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2004; Serio *et al.*, 2000). Στη φάση πυρήνωσης, κατά την οποία η συγκέντρωση των ινιδίων παραμένει σχεδόν μη ανιχνεύσιμη, δημιουργούνται τα πρώτα παροδικά ολιγομερή, καθώς και προϊνδιακές δομές ή ‘πυρήνες’ που πρόκειται να υποβοηθήσουν τη δημιουργία πολυμερών των επόμενων σταδίων. Η φάση αυτή ακολουθείται από τη φάση επιμήκυνσης, ένα εκθετικό στάδιο στο οποίο καταγράφονται απότομη αύξηση στη συγκέντρωση των προϊνδιακών ολιγομερών και ανιχνεύσιμη πλέον συγκέντρωση ινδιακών δομών. Το τελικό στάδιο είναι η φάση σταθεροποίησης, κατά την οποία η διαθέσιμη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα καταναλώνεται πλήρως και επικρατεί η εμφάνιση δομών τυπικών αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 17) (Eichner and Radford, 2011).

Ειδικότερα, η αργή φάση πυρήνωσης έχει μελετηθεί τόσο πειραματικά όσο και θεωρητικά σε διαφορετικά συστήματα και έχει προταθεί ότι εμφανίζει ομοιότητες με τη διαδικασία της πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης (Chayen, 2005). Προσθήκη προσχηματισμένων προϊνδιακών μορφών στο διάλυμα μπορεί να προκαλέσει μείωση της αργής φάσης ή και κατάργησή της, όταν ο βαθμός συσσωμάτωσης είναι ραγδαίος και ανεξάρτητος από την ανάγκη πυρήνωσης (Εικόνα 17, κόκκινη καμπύλη). Έχει ακόμα αποδειχθεί ότι αλλαγές στις πειραματικές συνθήκες ή συγκεκριμένοι τύποι μεταλλαγών, μπορεί να μειώσουν ή να εξαλείψουν την αργή φάση, επιδρώντας πάλι σε μία κατάσταση στην οποία ο βαθμός συσσωμάτωσης δεν εξαρτάται από την πυρήνωση (Chiti *et al.*, 1999).

Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι κατά την ινδογένεση είναι πιθανό να πραγματοποιηθούν περισσότερα από ένα διακριτά γεγονότα πυρήνωσης (Cohen *et al.*, 2013). Η δημιουργία σταθερών ολιγομερισμένων μορφών αποτελεί την ‘**βασική πυρήνωση**’ (*primary nucleation event*) και αφορά ολιγομερή με δομές στις οποίες παρατηρείται η δυναμική προσθήκη πρωτεϊνικών μονομερών (Εικόνα 18, γ1 & γ2). Έπειτα από τη συγκέντρωση ικανοποιητικού αριθμού ώριμων ινιδίων είναι πιθανή η παρατήρηση και ‘**δευτερογενούς πυρήνωσης**’ (*secondary nucleation*), **με κατακερματισμό των**

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

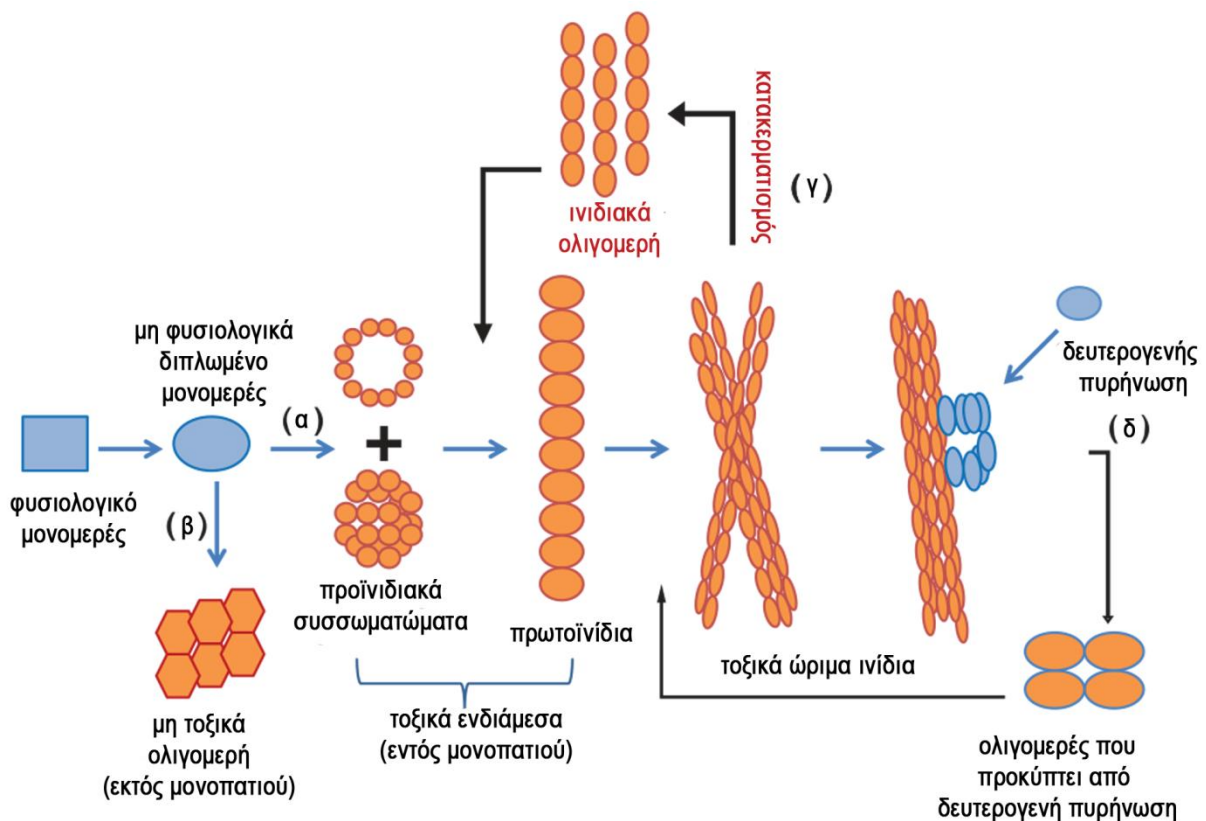
υπαρχόντων ινιδίων (*fragmentation*) και δημιουργία νέων ολιγομερισμένων πυρήνων. Με την εμφάνιση αυτών των λιγότερο σταθερών ολιγομερών παρουσιάζεται μία δυναμική προσθήκη μονομερών ή ολιγομερών, τα οποία τείνουν να δημιουργήσουν και πάλι σταθερά πολυμερή (Εικόνα 18, ε & στ). Παρότι πολλές λεπτομέρειες παραμένουν άγνωστες, η γενική ιδέα είναι ότι ο μηχανισμός ινιδογένεσης είναι μία δυναμική διαδικασία κατά την οποία τα πρωτεϊνικά μόρια αυτό-οργανώνονται σε ινδιακούς σχηματισμούς με τη συνεχή προσθήκη και αφαίρεση μορίων από τα ινδιακά άκρα. Έτσι, ακόμα και μετά από τη φάση σταθεροποίησης τα ώριμα ινίδια συνυπάρχουν μαζί με εξαιρετικά χαμηλή συγκέντρωση μονομερών, τα οποία συνεισφέρουν σε γεγονότα συνεχούς αλληλεπίδρασης και απομάκρυνσης στα άκρα των ινιδίων (Εικόνα 18, Εικόνα 19) (Tycko, 2015).



Εικόνα 18. Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση των μοριακών μονοπατιών της αμυλοειδογένεσης. Ξεκινώντας από ένα πρωτεϊνικό μονομερές (α), μία αλληλουχία από αντιστρεπτά γεγονότα (πορτοκαλί βέλη) οδηγεί στη δημιουργία παροδικών ολιγομερών (β). Η προσθήκη άλλων μονομερών (μπλε βέλη) στα παροδικά ολιγομερή (γ1, γ2) μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πολυμορφικών ινιδίων (δ1, δ2). Γεγονότα δευτερογενούς πυρήνωσης μπορεί να οδηγήσουν σε σχηματισμό ενδιάμεσων (πράσινα βέλη), όπως τα ολιγομερή στον μονοπάτι (ε) ή το πρωτοϊνίδιο στο μονοπάτι (στ), τα οποία με τη σειρά τους θα οδηγήσουν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων διακριτής μορφολογίας (ζ) (Προσαρμογή από (Tycko, 2015)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Η συσσώρευση των ινδιακών συσσωματωμάτων στις αμυλοειδώσεις θεωρείται ότι πραγματοποιείται μέσω της πυρήνωσης και της επέκτασης των ινιδίων, η οποία βασίζεται στην προσθήκη ολιγομερών στα άκρα των ινιδίων (Tanaka *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010), όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η Εικόνα 19 παρουσιάζει σχηματικά τα γεγονότα, κατά την αμυλοειδογένεση, σε παθολογικές καταστάσεις. Τα διαφορετικά ολιγομερή που συσσωματώνονται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων δημιουργίας των ινιδίων (Εικόνα 19, τοξικά ενδιάμεσα) έχουν προταθεί ως πηγή της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας που σχετίζεται με τις αμυλοειδώσεις, ενώ ο κατακερματισμός θεωρείται μία δευτερεύουσα διαδικασία 'κλειδί' στη ραγδαία εξάπλωση της αμυλοειδογένεσης *in vivo* (Kayed *et al.*, 2003; Lesne *et al.*, 2006; Sarell *et al.*, 2013b) (Εικόνα 19, ινδιακά ολιγομερή).



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης σε παθολογικές καταστάσεις. Περιγράφονται τέσσερα διαφορετικά μονοπάτια συσσωμάτωσης: (α) το μονοπάτι δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων από φυσιολογικά μονομερή που μετατρέπονται σε μη-φυσιολογικά μονομερή, (β) το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν μη τοξικά ολιγομερή που δεν καταλήγουν σε αμυλοειδή ινίδια, (γ) το μονοπάτι των κατακερματισμένων ινιδίων που αυτοσυγκροτούνται ξανά προς το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων και (δ) το μονοπάτι των ώριμων αμυλοειδών ινιδίων που δρουν ως ικρίσματα για την κατάλυση δευτερογενούς ολιγομερισμού και πυρήνωσης (Προσαρμογή από (Verma *et al.*, 2015)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

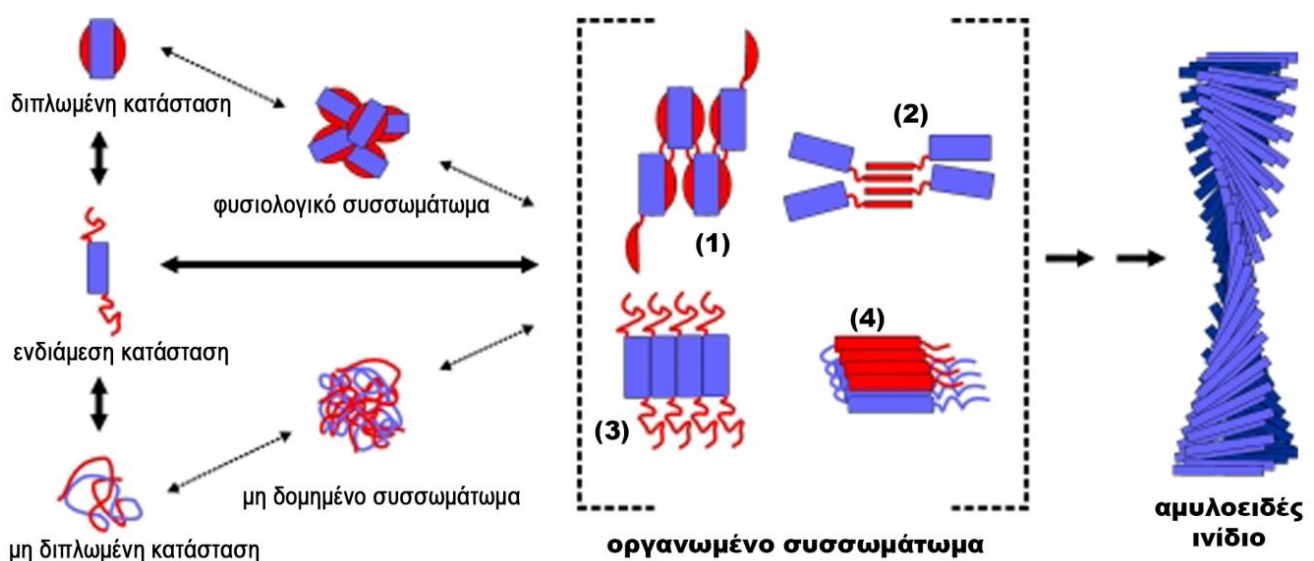
Οι περισσότερες πειραματικές προσεγγίσεις προτείνουν ότι οι καθοριστές της κυτταροτοξικότητας δεν σχετίζονται πάντα με ένα είδος μορίων, επομένως τα ώριμα ινίδια δεν πρέπει να εξαιρούνται κατά τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας, καθώς δεν αποδεικνύεται ότι είναι ανενεργές μορφές σε παθολογικές καταστάσεις (Εικόνα 19, τοξικά ώριμα ινίδια). Κάτω από συνθήκες στις οποίες η πυρήνωση είναι αργή ο βαθμός της ινιδιακής αύξησης επιταχύνεται δραστικά από τον ινιδιακό κατακερματισμό (Εικόνα 19γ), μία διαδικασία στην οποία τα ινιδιακά ολιγομερή δημιουργούν νέες επιφάνειες δυνητικής αλληλεπίδρασης (Xue *et al.*, 2010). Η ανάκτηση νέων επιφανειών αλληλεπίδρασης αλλάζει τη δυναμική των ινιδίων και επιτρέπει τη συσχέτισή τους με επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών μεμβρανών ή άλλων ινιδίων, ακόμα και όταν η σύνδεση ή η μοριακή αρχιτεκτονική των ινιδίων αλλάζει. Η σχετική συγκέντρωση των ολιμερών που προκύπτουν από τη δευτερογενή πυρήνωση και των διαθέσιμων ώριμων ινιδίων ρυθμίζει τα γεγονότα δευτερογενούς πυρήνωσης και συμβάλει στην ανακύκλιση των ολιγομερών και στην ανατροφοδότηση της αμυλοειδογένεσης (Karamanos *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2015).

Έχει βρεθεί ότι ενδοφλέβια ένεση ή χορήγηση προσχηματισμένων ινιδίων από διαφορετικές πηγές μπορεί να οδηγεί στην επιτάχυνση αμυλοείδωσης σε ποντικούς που έχουν υποστεί φλεγμονώδη αντίδραση (Lundmark *et al.*, 2005; Lundmark *et al.*, 2002). Όμοια, ένεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης p₁₀ του ποντικού σε μορφή αμυλοειδών ινιδίων έχει βρεθεί ότι προκαλεί την εμφάνιση αμυλοείδωσης που επάγεται από τα p₁₀ (Legname *et al.*, 2004). Έτσι, έχει γίνει ευρέως αποδεκτό ότι ένα περιβάλλον εμπλουτισμένο με ινιδιακό υλικό, αποτελεί παράγοντα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση μίας ασθένειας που σχετίζεται με τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων (Lundmark *et al.*, 2005).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.4.2. Αυτοσυγκρότηση αμυλοειδών ινιδίων σε ατομικό επίπεδο

Η ιδέα της κοινής αρχιτεκτονικής της cross-β δομής που απαντάται σε όλα τα αμυλοειδή ινίδια υπήρξε η αφορμή για την πρόταση μοντέλων πολυμερισμού και σε ατομικό επίπεδο. Τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X, παρότι περιγράφουν την επαναλαμβανόμενη διευθέτηση των μορίων στο χώρο, δεν έχουν μέχρι σήμερα περιγράψει την ακριβή μοριακή οργάνωση των πρωτεϊνών που δημιουργούν τον κοινό σκελετό των ινιδίων. Η αυτοσυγκρότηση των αμυλοειδών ινιδίων σε ατομικό επίπεδο διαμεσολαβείται από ενδιάμεσες – μερικώς διπλωμένες – καταστάσεις, οι οποίες δημιουργούνται είτε μέσω του μερικού ξεδιπλώματος φυσιολογικών πρωτεϊνών ή μέσω της μερικής οργάνωσης εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών (*intrinsically disordered proteins* - IDPs). Τα οργανωμένα συσσωματώματα, που προηγούνται της δημιουργίας της τελικής ινδιακής δομής, είναι οι δομικοί λίθοι των πολυμερισμένων δομών των αμυλοειδών ινιδίων και το κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους είναι οι τοπικές ή εκτεταμένες στερεοδιαταξικές τροποποιήσεις, που έχουν υποστεί κατά την αμυλοειδογένεση.



Εικόνα 20. Οι εναλλακτικοί μηχανισμοί της αυτοσυγκρότησης των πρωτεϊνικών μορίων σε αμυλοειδή ινίδια. Τα οργανωμένα συσσωματώματα μπορεί να αυτοσυγκροτούνται με μηχανισμούς τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών (1), cross-β σκελετού (2) ή στοιβαξης (3)(4) (Προσαρμογή από (Jahn and Radford, 2008)).

Τα μοριακά μοντέλα της δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων σε ατομικό επίπεδο επιχειρούν να περιγράψουν με ακρίβεια τον τρόπο με τον οποίο μη-φυσιολογικά διπλωμένα μονομερή συσχετίζονται και αλληλεπιδρούν με τελικό στόχο τη δημιουργία των αμυλοειδών

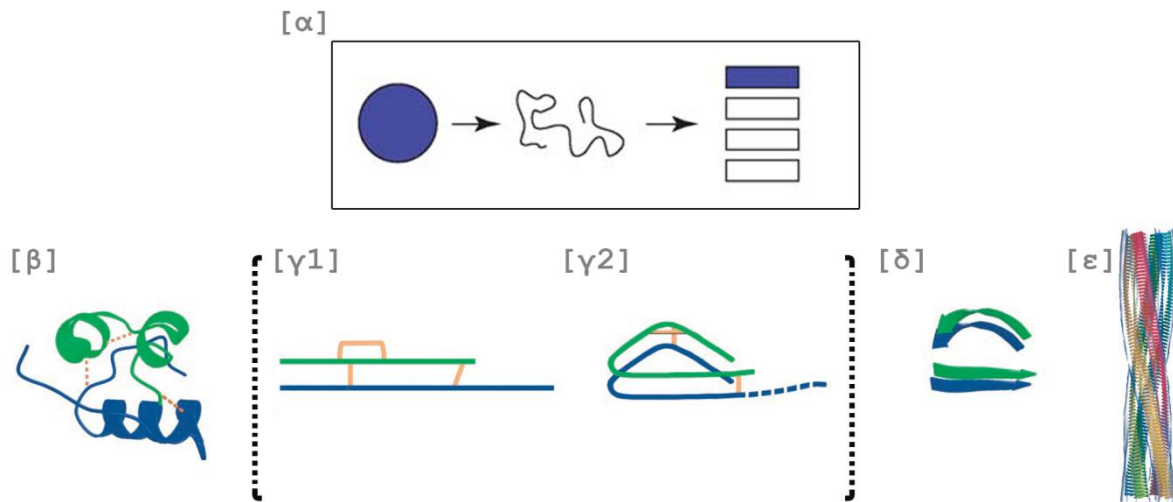
Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

ινιδίων. Τα μοντέλα πολυμερισμού περιγράφουν τρεις γενικές κατηγορίες: **το μοντέλο αναδίπλωσης** (*refolding model*), **το μοντέλο εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών** (*natively disordered model*) και τέλος, **το μοντέλο αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς** (*gain of interaction model*) (Nelson and Eisenberg, 2006c).

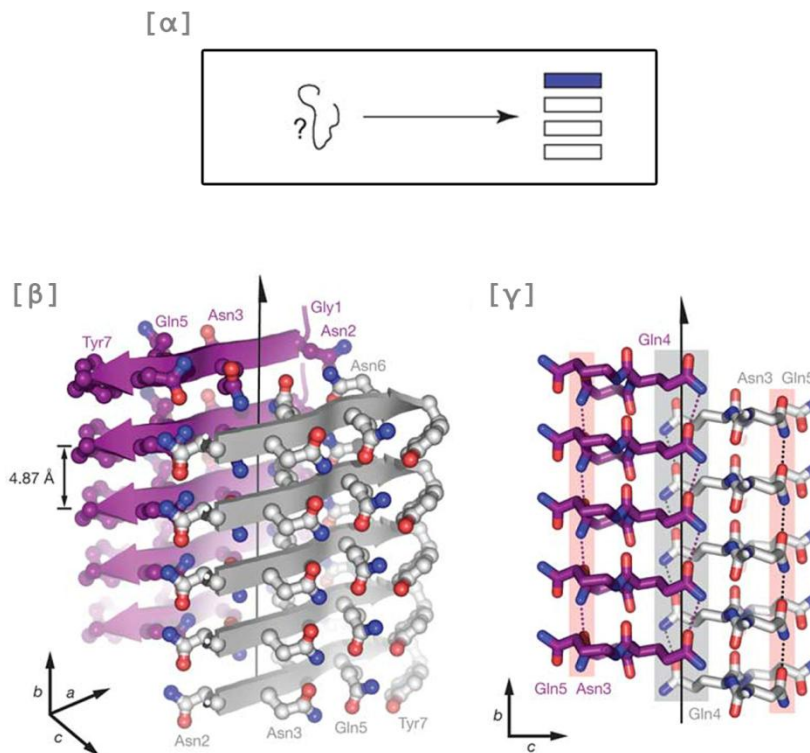
Μοντέλο αναδίπλωσης. Το μοντέλο της αναδίπλωσης περιγράφει την κάθε αμυλοειδογόνο πρωτεΐνη ως ένα μόριο που μπορεί να βρίσκεται σε δύο διακριτές καταστάσεις, τη φυσιολογική διπλωμένη κατάσταση και την ινιδιακή κατάσταση (Nelson and Eisenberg, 2006b) (Εικόνα 21). Κατά την μετάβαση από τη μία κατάσταση στην άλλη η **πρωτεΐνη ξεδιπλώνεται και έπειτα διπλώνεται εκ νέου στην ινιδιακή κατάσταση**, μία διαδικασία που έχει προταθεί για την ινσουλίνη (Jimenez *et al.*, 2002), την SH₃ αυτοτελή δομική περιοχή (Jimenez *et al.*, 1999) και την prion πρωτεΐνη (Govaerts *et al.*, 2004). Η δημιουργία της ινιδιακής κατάστασης καθορίζεται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού, ενώ η αμινοξική σύσταση των πρωτεϊνών που υπόκεινται σε αυτό το μηχανισμό δεν παίζει καθοριστικό ρόλο (Fandrich and Dobson, 2002; Fandrich *et al.*, 2001).

Μοντέλο εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών. Πολλά πρωτεϊνικά μόρια, ή τμήματα των πρωτεϊνικών μορίων που σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια ανήκουν στην κατηγορία των εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών (*intrinsically disordered proteins - IDPs*) ή τμημάτων (*intrinsically disordered regions - IDRs*). Η ιδιαίτερη αυτή ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν καθορισμένη στερεοδιάταξη ή τρισδιάστατη δομή, αλλά την αποκτούν παρά μόνο όταν βρεθούν σε ένα περιβάλλον στο οποίο μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα μόρια. Κατά τη διαδικασία της ινιδογένεσης θεωρείται **ότι τμήματα ή ολόκληρες οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών συμμετέχουν στη δημιουργία του cross-β σκελετού**, καθώς η απουσία καθορισμένης στερεοδιάταξης προσδίδει σε αυτά τα μόρια μεγάλη στερεοδιαταξική ελευθερία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα σε αυτή την κατηγορία είναι το τμήμα HET-s των μυκήτων (Ritter *et al.*, 2005), το αμινοτελικό τμήμα των prion της ζύμης (Kajava *et al.*, 2004), το τμήμα πολυγλουταμίνης της χαντικτίνης του ανθρώπου (Nelson *et al.*, 2005), καθώς και το Αβ πεπτίδιο (Luhrs *et al.*, 2005).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή



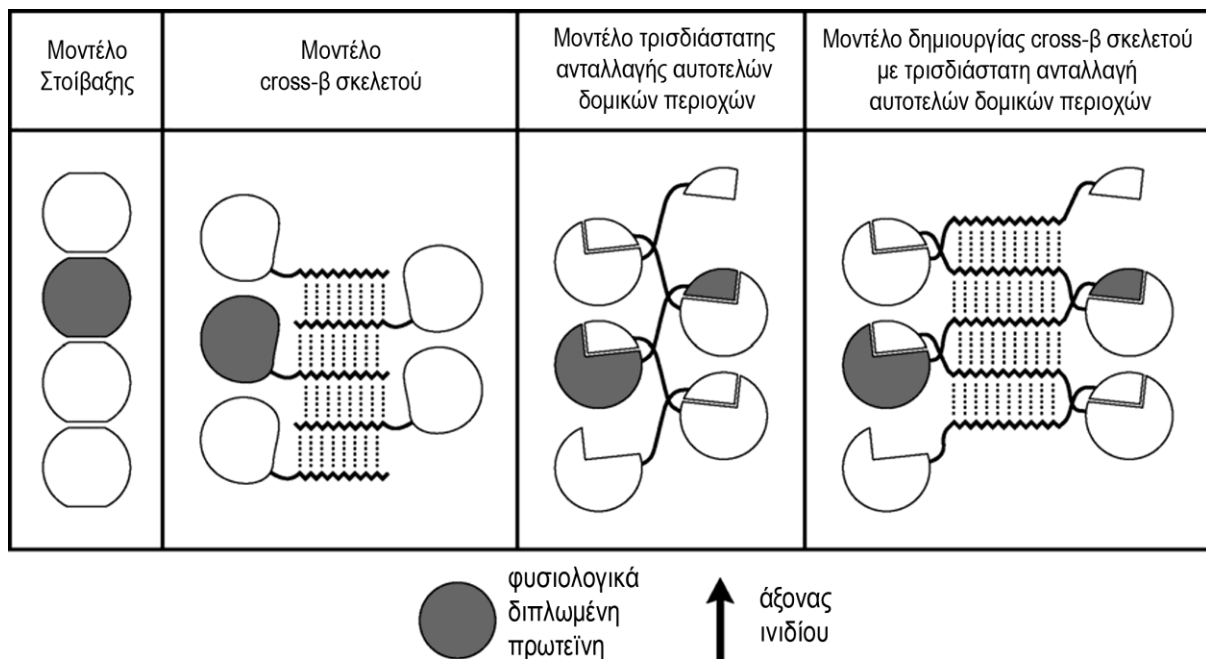
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου αναδίπλωσης. (α) Απλοποιημένο σχήμα της δομικής μετάβασης ενός πρωτεϊνικού μορίου από τη φυσιολογική στη ινδιακή κατάσταση. Η μετατροπή από τη μία στην άλλη μορφή προκαλεί ξεδίπλωμα της φυσιολογικής πρωτεΐνης και εκ νέου δίπλωμα προς το σχηματισμό του αμυλοειδούς σκελετού (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β-ε) Το μοντέλο αναδίπλωσης κατά την αυτοσυγκρότηση της ινσουλίνης σε αμυλοειδή ινίδια. Η στερεοδιαταξική τροποποίηση των δύο αλυσίδων της ινσουλίνης ($\gamma 1$, $\gamma 2$) οδηγεί στη δημιουργία αντικριστών β -κλώνων (δ), η στοίβαξη των οποίων οδηγεί στη συγκρότηση του άξονα των αμυλοειδών ινιδίων και κατ' επέκταση στη δημιουργία υπερελίκων αμυλοειδών ινιδίων (ϵ) (Προσαρμογή από (Jimenez *et al.*, 2002)).



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών. (α) Απλοποιημένο σχήμα της δομικής μετάβασης ενός πρωτεϊνικού μορίου από την ενδογενώς μη δομημένη στην ινδιακή κατάσταση (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β-γ) Το στερεοδιαταξικό φερμουάρ που δημιουργείται από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου GNNQQNY της χανκτικτίνης του ανθρώπου (Προσαρμογή από (Nelson *et al.*, 2005)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Μοντέλο αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς. Η κατηγορία της αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς αντιστοιχεί σε **μοντέλα που αφορούν τη στερεοδιαταξική αλλαγή μίας περιοχής της φυσιολογικής πρωτεΐνης**, ενώ χαρακτηριστικό του μοντέλου είναι η διατήρηση μεγάλου τμήματος στη φυσιολογική στερεοδιάταξη στην ινιδιακή κατάσταση. **Συνεχόμενη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνικών τμημάτων που συνεισφέρονται οδηγεί στη δημιουργία του σκελετού της ινιδιακής δομής**, ενώ θεωρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης παραμένει ως διακόσμηση του αμυλοειδογόνου πυρήνα στην τελική ινιδιακή κατάσταση. Τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών τμημάτων που συμμετέχουν στην ινιδιογένεση, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν διαχωρίζουν την παρούσα κατηγορία ινιδιογένεσης σε τέσσερα επιμέρους μοντέλα: 1) **το μοντέλο της στοίβαξης (direct stacking)**, 2) **το μοντέλο του cross-β σκελετού (cross-β spine)**, 3) **το μοντέλο της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών (3D Domain swapping)** και τέλος, 4) **το μοντέλο του cross-β σκελετού που δημιουργείται από την τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών (3D Domain swapping with “cross-β” spine)**.

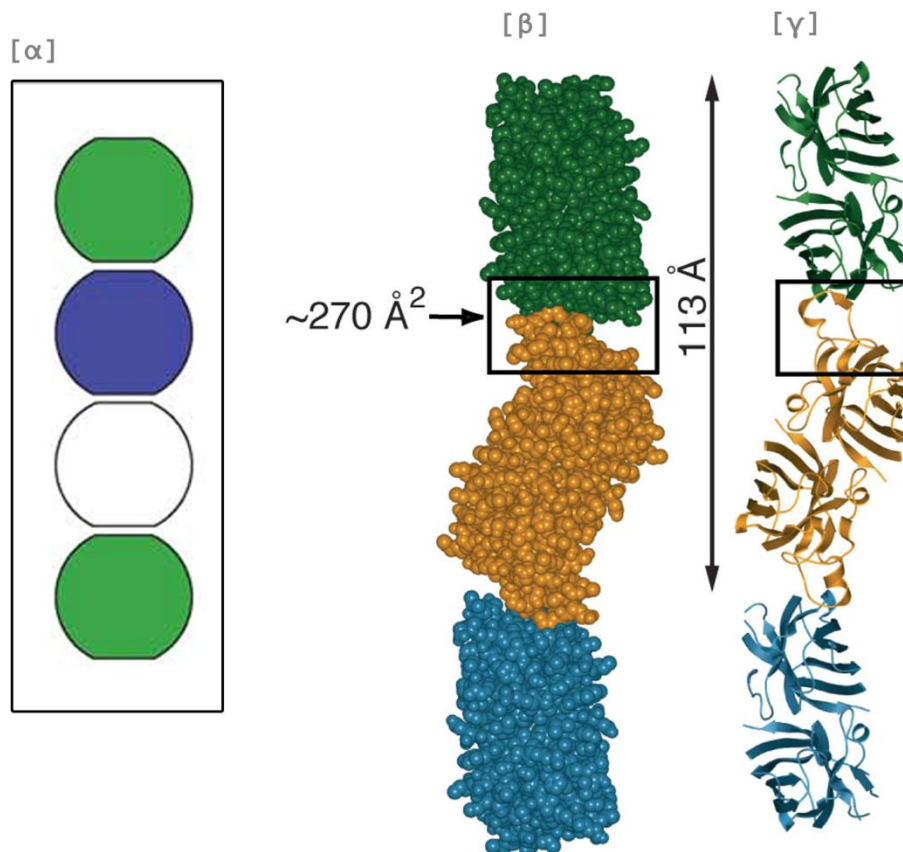


Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση των υποκατηγοριών του μοντέλου αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006b)).

Η πρώτη κατηγορία (μοντέλο στοίβαξης) περιλαμβάνει **αυτοσυγκρότηση μεταξύ διαδοχικών μονομερών που αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας στοίβα κατά μήκος του άξονα του ινιδίου**. Οι επιφάνειες αλληλεπίδρασης είναι τύπου *αλληλεπίδρασης κεφαλή –*

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

ουρά και η στερεοδιαταξική αλλαγή εντοπίζεται κοντά στην επιφάνεια ή αποκαλύπτεται μέσω τοπικής τροποποίησης στη δομή του μονομερούς. Ο μηχανισμός ινιδογένεσης μέσω στοίβαξης περιγράφει ιδανικά την ινιδογένεση σε αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες με φυσιολογικά διπλώματα τύπου ανοσοσφαιρίνης (β -sandwich fold) ή β -βαρελιών (β -barrels). Χαρακτηριστικά παραδείγματα σε αυτή την κατηγορία αποτελούν η τρανσθυρετίνη (Peterson *et al.*, 1998), η υπεροξειδική δισμουτάση 1 (Elam *et al.*, 2003) και η ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης (Huang *et al.*, 1997).

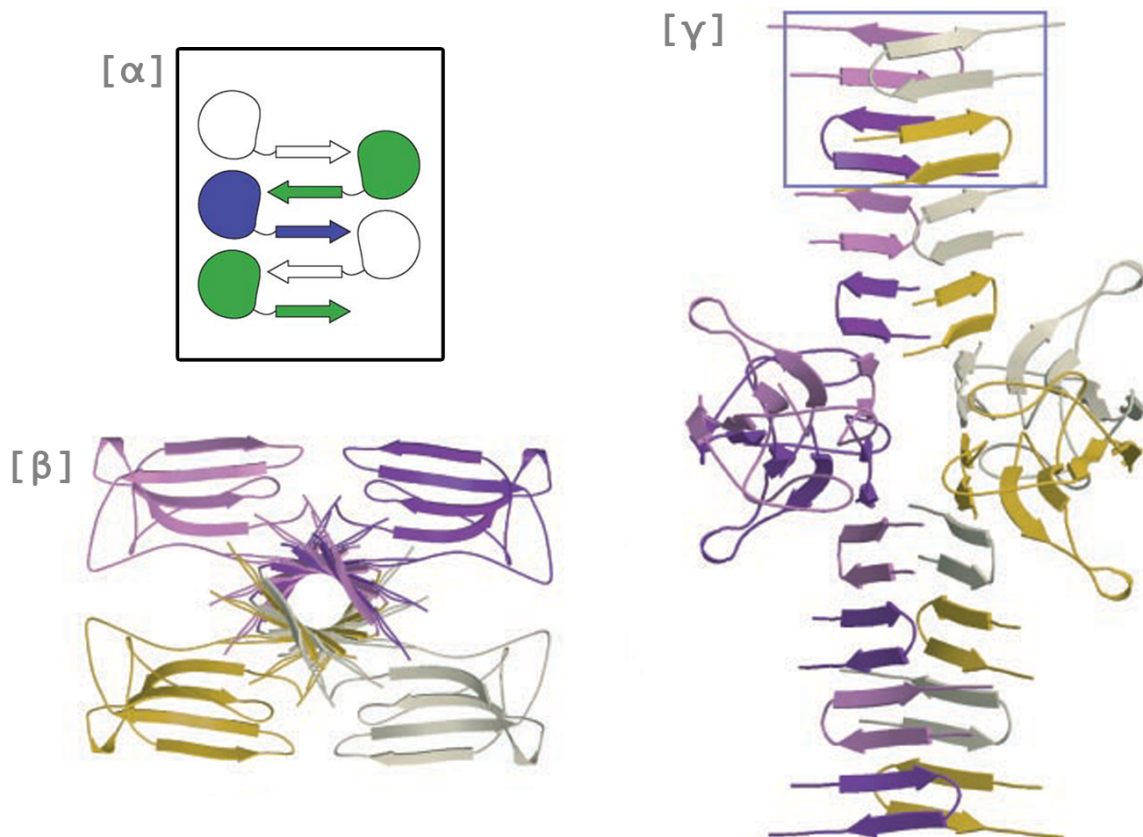


Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της στοίβαξης. (α) Απλοποιημένο σχήμα της στοίβαξης μονομερών προς τη δημιουργία του cross- β άξονα των ινιδίων (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)), (β-γ) Το προτεινόμενο μοντέλο πολυμερισμού της ανθρώπινης υπεροξειδικής δισμουτάσης 1 σε απεικόνιση χωροπληρωτικού μοντέλου (β) και καρτούν (γ). Σημειώνεται η διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ παρακείμενων μονομερών (Προσαρμογή από (Elam *et al.*, 2003)).

Όπως είναι γνωστό, ο cross- β σκελετός αποτελείται από δύο ή περισσότερες, επίπεδες ή στραμμένες β -πτυχωτές επιφάνειες, που συγκροτούνται από παράλληλους ή αντιπαράλλους β -κλώνους. Η αρχιτεκτονική αυτή προτείνει τη δεύτερη κατηγορία αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς στην οποία η στερεοδιαταξική αλλαγή ενός μικρού μόνο αμυλοειδογόνου τμήματος μίας φυσιολογικής πρωτεΐνης είναι αρκετή για να συγκροτήσει τον cross- β άξονα μίας ινιδιακής δομής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

κατηγορίας αυτής είναι το μοντέλο πολυμερισμού που έχει προταθεί για την αμυλοειδογόνο πρωτεΐνη β_2 -μικροσφαιρίνη, στην οποία μία μικρή στερεοδιαταξική τροποποίηση αλλάζει το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης σε δομή β -φουρκέτας, η οποία αυτοσυγκροτείται με άλλες όμοιες της προς τη δημιουργία του άξονα του ινιδίου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η υπόλοιπη πρωτεΐνη διατηρεί τη φυσιολογική δομή της, καθώς πακετάρεται περιμετρικά και προστατεύει τις δύο β -πτυχωτές επιφάνειες του σκελετού (Ivanova *et al.*, 2004).

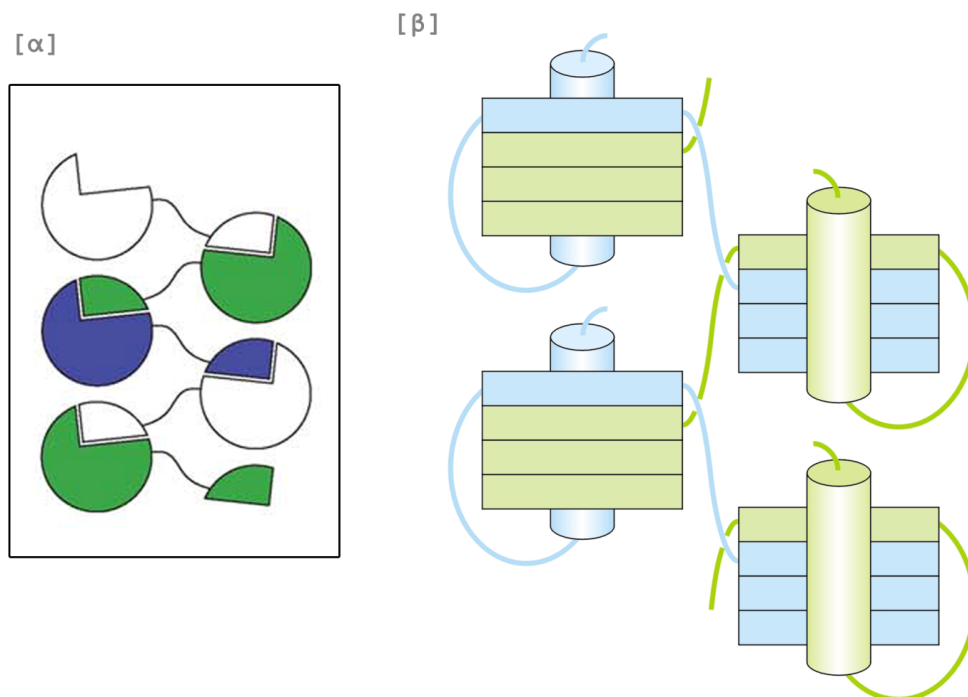


Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου του cross- β σκελετού. (α) Απλοποιημένο σχήμα της αλληλεπίδρασης διαδοχικών β -κλώνων προς τη δημιουργία του cross- β άξονα των ινιδίων (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β-γ) Ο αμυλοειδογόνος πυρήνας της β_2 -μικροσφαιρίνης δημιουργείται από την αλληλεπίδραση γειτονικών καρβοξυτελικών τμημάτων με δομή β -φουρκέτας (Προσαρμογή από (Ivanova *et al.*, 2004)).

Το μοντέλο της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών βασίζεται στην **στερεοδιαταξική τροποποίηση μία περιοχής αρμού που συνδέει δύο αυτοτελή δομικά στοιχεία ενός πρωτεϊνικού μορίου**. Η στερεοδιαταξική αλλαγή επιτρέπει είτε την συνεχόμενη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτοτελών δομικών περιοχών διαφορετικών μορίων προς το σχηματισμό του σκελετού του αμυλοειδούς ινιδίου (Εικόνα 26β), είτε εναλλακτικά τη δημιουργία διμερών που προκύπτουν από την παραπάνω τρισδιάστατη ανταλλαγή και

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

μπορούν να στοιβάζονται προς το σχηματισμό συνεχόμενων β-πτυχωτών επιφανειών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μοριακή αλληλεπίδραση στην περίπτωση της αμυλοειδογόνου κυστατίνης C (Janowski *et al.*, 2004; Staniforth *et al.*, 2001). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μοντέλο της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών, παρότι έχει μελετηθεί εκτενώς δεν περιγράφει με ακρίβεια το πακετάρισμα των β-κλώνων και τη συγκρότηση των διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών της cross-β δομής. Τέλος, το μοντέλο του cross-β σκελετού που δημιουργείται από την τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών αποτελεί συνδυασμό των δύο προηγούμενων μοντέλων αυτοσυγκρότησης και συναντάται στην μεταλλαγμένη δομή της ριβονουκλεάσης A (Sambashivan *et al.*, 2005).



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. (α) Απλοποιημένο σχήμα της συνεχόμενης συνεισφοράς αυτοτελών δομικών στοιχείων μεταξύ γειτονικών μονομερών (Προσαρμογή από (Nelson and Eisenberg, 2006a)). (β) Η στερεοδιαταξική τροποποίηση μία περιοχής αρμού (λούπες) που συνδέει δύο αυτοτελή δομικά στοιχεία ενός πρωτεϊνικού μορίου (πράσινο & γαλάζιο) οδηγεί στη δημιουργία του σκελετού του αμυλοειδούς ινιδίου (Προσαρμογή από (Janowski *et al.*, 2004)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

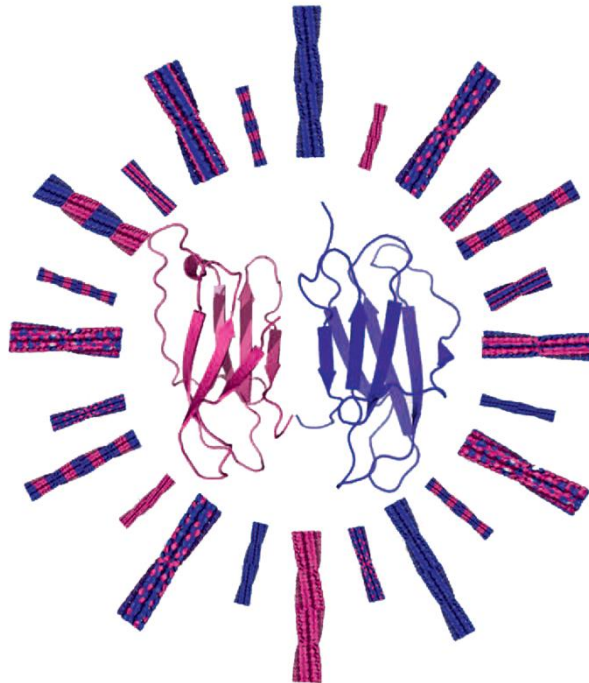
1.4.3. Διασταυρωτή πυρήνωση μεταξύ αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών

Ένα κοινό εύρημα στο νευροεκφυλισμό είναι η συνύπαρξη περισσότερων του ενός πρωτεϊνικών μορίων στις εναποθέσεις των αμυλοειδών ινιδίων. Ενδεικτικά, στο σύνδρομο Gerstmann-Sträussler-Scheinker, έχει καταγραφεί η εξωκυτταρική συν-εναπόθεση της prion και του Αβ πεπτιδίου (Miyazono *et al.*, 1992), ενώ ομοίως, στην οικογενή αμυλοείδωση ατόμων με καταγωγή από τη Δανία (*Familial Danish Dementia*) το Αβ πεπτίδιο συνυπάρχει με το πεπτίδιο ADan σε εναποθέσεις των αγγείων (Tomidokoro *et al.*, 2005). Αντίστοιχα, στη νόσο του Parkinson, ενδοκυτταρικά έγκλειστα α -συνουκλεΐνης και tau μπορεί να βρίσκονται στα ίδια κύτταρα και να εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία (Crystal *et al.*, 2003). Το φαινόμενο αυτό, που ονομάζεται **διασταυρωτή πυρήνωση (*cross-seeding*) ή συνεργατικός πολυμερισμός (*co-polymerization*)**, θεωρείται ότι ευνοείται από την ύπαρξη παρόμοιων κύριων πρωτεϊνικών αλυσίδων μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων που αυτοσυγκροτούνται σε απροσδιόριστου μήκους, μη-διακλαδισμένα αμυλοειδή ινίδια (Eisenberg and Jucker, 2012). Η διασταυρωτή πυρήνωση παρέχει μία ‘έλκυστική’ εξήγηση για τη συνεύρεση των μορίων στις ενδοκυτταρικές ή εξωκυτταρικές εναποθέσεις, μολονότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη απόδειξη για το μηχανισμό της. Η εύρεση ότι η αλληλεπίδραση της αμυλοειδογόνου κυστατίνης C και του Αβ πεπτιδίου στον εγκέφαλο μπορεί να καθυστερεί την εκδήλωση της νόσου του Alzheimer σε διαγονιδιακούς ποντικούς (Kaeser *et al.*, 2007), ανέδειξε και **τη διασταυρωτή αναστολή** ως διαδικασία κλειδί για την πιθανή ανάπτυξη μορίων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος (Yan *et al.*, 2007).

Η διασταυρωτή πυρήνωση πιστεύεται ότι οδηγεί στο **σηματισμό μίας ετερογενούς cross- β κύριας πρωτεϊνικής αλυσίδας** (Εικόνα 27), αν και εναποθέσεις από δύο διαφορετικές πηγές μπορεί να αναπτύσσονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη (Dobson, 1999). Συχνά η μη φυσιολογική απομάκρυνση λάθος διπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων δημιουργεί πρωτεϊνικά ιζήματα τα οποία μπορεί να πυροδοτούν έμμεσα τη συσσώματωση άλλων πρωτεϊνών. Αν η πυρήνωση μίας πρωτεΐνης είναι συμπληρωματική ως προς το σχήμα της σε ένα τμήμα της δεύτερης πρωτεΐνης, αναμένουμε να σχηματιστεί ένα συνδυαστικός cross- β σκελετός, ο οποίος θα λειτουργεί ως πυρήνας συνεργατικής συσσώματωσης ετεροπολυμερών ινιδίων (Andreetto *et al.*, 2010). Αποδεικνύεται πειραματικά ότι ο συνεργατικός πολυμερισμός μπορεί να τροποποιήσει το βαθμό ή/και το μηχανισμό συσσώματωσης και να συνεισφέρει στην παθογένεια (Εικόνα 28). Ο Young και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν πρόσφατα ότι ο συνεργατικός πολυμερισμός διαφορετικών

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

ακολουθιών μπορεί να αλλάξει δραστικά το βαθμό δημιουργίας ώριμων αμυλοειδών ινιδίων λόγω της τροποποίησης των ιδιοτήτων των ολιγομερών που συνυπάρχουν στο διάλυμα (Young *et al.*, 2017).



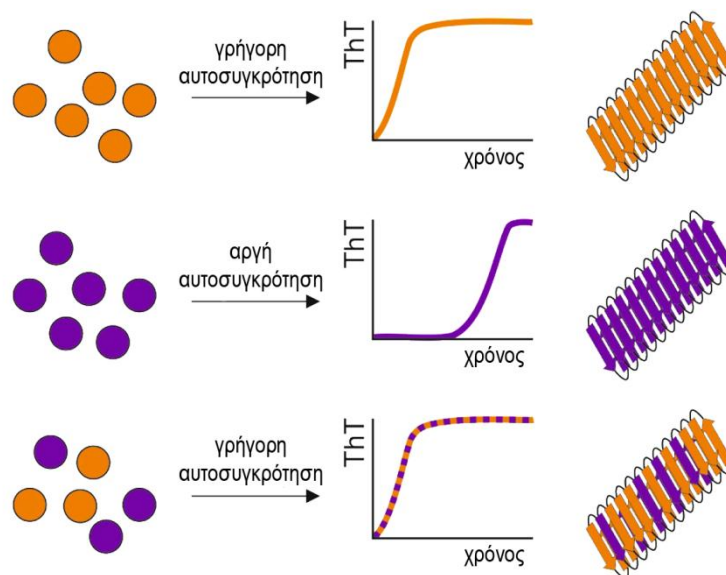
Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση ενός εύρους πιθανών ετεροπολυμερών β_2 -μικροσφαιρίνης. Με μπλε απεικονίζεται η δομή της μεταλλαγμένης β_2 -μικροσφαιρίνης (PDB ID: 2XKU) και με ματζέντα η δομή της β_2 -μικροσφαιρίνης φυσικού τύπου (PDB ID: 2XKS) (Προσαρμογή από (Sarell *et al.*, 2013a)).

Στο άρθρο ανασκόπησης της Sarell και των συνεργατών της η διασταυρωτή πυρήνωση ή συνεργατικός πολυμερισμός μπορεί να οφείλεται κατά περίπτωση σε διαφορετικά πιθανά σενάρια (Sarell *et al.*, 2013a). Ο **συνεργατικός πολυμερισμός πρωτεϊνών ή πεπτιδίων με παρόμοια πρωτοταγή δομή** προτείνει ότι η επιτυχία της πυρήνωσης εξαρτάται από την ομοιότητα των ‘πυρήνων’ και των μονομερών, σε επίπεδο ακολουθίας. Το εύρημα αυτό ταυτοποιήθηκε σε πειράματα συσσωμάτωσης στη λυσοζύμη, στα οποία απόκλιση από την ακολουθία της πρωτεΐνης δεν εμφάνιζε κάποια επίδραση στην ινιδογένεση, ενώ παραλλαγές της πρωτεΐνης με μικρές διαφοροποιήσεις (ομοιότητα ~95%) παρουσίαζαν ίδια συμπεριφορά πυρήνωσης με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη (Krebs *et al.*, 2004a). Ωστόσο, η σημασία της πρωτοταγούς δομής στον καθορισμό της ικανότητας των πρωτεϊνών να συμπαρασύρουν η μία την άλλη είναι πιο πολύπλοκη από την ‘μία προς μία δράση των πρωτεϊνών. Ένα αντιπαράδειγμα αποτελεί η σημαντική επίδραση των υψηλά αμυλοειδογόνων πεπτιδίων της

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

αμυλίνης στο Αβ πεπτίδιο, με το οποίο μοιράζονται πολύ μικρή ομολογία (~39%) (Andreetto *et al.*, 2010).

Μία διαφορετική προσέγγιση αφορά **τον συνεργατικό πολυμερισμό κατά τον οποίο η μία πρωτεΐνη ενισχύει το αμυλοειδογόνο δυναμικό της άλλης**. Η μείξη δύο αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών μπορεί να αλλάξει τα χαρακτηριστικά των μορίων που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της αμυλοειδογένεσης. Τα ετεροπολυμερή δεν έχουν μία μέση δομή ή μία μέση θερμοδυναμική, καθώς προκύπτουν από το συνδυασμό δύο διαφορετικών πρόδρομων μορίων. Στην περίπτωση αυτή η συνεργατική συσσωμάτωση μπορεί να διαφοροποιήσει τη μορφολογία και τη σταθερότητα πρώτα των ενδιάμεσων ολιγομερών, παρατείνοντας τη ζωή των τοξικών μορφών και έπειτα των ώριμων μορφών συμβάλλοντας στην εμφάνιση έντονα πολυμορφικών αμυλοειδών ινιδίων. Τέλος, **η δομή και οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις επηρεάζουν τη δυνατότητα συνεργατικού πολυμερισμού** καθώς πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι αμινοξικά κατάλοιπα που δρουν ως ‘καθοριστές’ στις ακολουθίες των πρωτεϊνικών μορίων συμβάλλουν στη διασταυρωτή πυρήνωση και οδηγούν στην εμφάνιση πολυμορφικών ετεροπολυμερών (Sarell *et al.*, 2013b).



Εικόνα 28. Απλοποιημένη παρουσίαση της δημιουργίας ετεροολιγομερών. Οι σφαιρικές υδατοδιαλυτές μορφές των πρωτεϊνικών μορίων παρουσιάζονται με πορτοκαλί και μοβ σφαίρες (αριστερά). Παρατηρούμε ότι η αμυλοειδογένεση κατά τη διασταυρωτή πυρήνωση μεταξύ των δύο διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων διαφοροποιεί την κινητική δημιουργίας του ετεροολιγομερών (Προσαρμογή από (Young *et al.*, 2017)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.5. Αμυλοειδώσεις – Στερεοδιαταξικές Ασθένειες

Ένα μεγάλο φάσμα ανθρώπινων ασθενειών προκύπτει από την αποτυχία συγκεκριμένων πρωτεϊνών να αποκτήσουν ή να διατηρήσουν τη φυσιολογική τους – λειτουργική – στερεοδιάταξη. Οι παθολογικές αυτές καταστάσεις αναφέρονται συχνά ως **ασθένειες που προκύπτουν λόγω του μη-φυσιολογικού διπλώματος των πρωτεϊνικών μορίων** (*protein misfolding diseases*) ή **στερεοδιαταξικές ασθένειες** (*protein conformational diseases*), καθώς περιλαμβάνουν καταστάσεις στις οποίες μία ‘βλάβη’ στη διαδικασία του διπλώματος της πρωτεΐνης οδηγεί στην ελάττωση της ποσότητας που υπάρχει διαθέσιμη για να επιτελέσει το φυσιολογικό της ρόλο (Chiti and Dobson, 2006).

Η μεγαλύτερη ομάδα ασθενειών που σχετίζονται με το μη-φυσιολογικό δίπλωμα ονομάζονται αμυλοειδώσεις και οφείλονται στη μετατροπή συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή πεπτιδίων από τη λειτουργική – σφαιρική υδατοδιαλυτή μορφή τους σε αδιάλυτα, υψηλά οργανωμένα πολυμερή. Οι δομές αυτές καλούνται **αμυλοειδείς πλάκες όταν συσσωρεύονται εξωκυτταρικά**, ενώ χαρακτηρίζονται ως **ενδοκυτταρικά έγκλειστα** (*intracellular inclusions*) **όταν συναντώνται στο εσωτερικό ενός κυττάρου** (Westermarck *et al.*, 2005). Παρότι δεν είναι ακόμα βέβαιο αν η εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων είναι η κύρια αιτία της παθολογικής κατάστασης, μία ποικιλία πειραματικών παρατηρήσεων προτείνουν ότι **υπάρχει μία σημαντική διασύνδεση μεταξύ της δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων και της εμφάνισης των αμυλοειδώσεων** (Coelho, 1996; Lansbury and Caughey, 1996).

Ένα χαρακτηριστικό των παραπάνω ασθενειών είναι **η παρατεταμένη περίοδος πριν την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων**, κατά την οποία οι μη-φυσιολογικά διπλωμένες πρωτεΐνες συσσωματώνονται και σταδιακά προσβάλλουν τη λειτουργία των κυττάρων και των ιστών. Παρόλο που ο χρόνος εμφάνισης των συμπτωμάτων διαφέρει, οι περισσότερες διαταραχές γίνονται αντιληπτές στην τρίτη ηλικία, αν και σε κάποιες επιθετικές μορφές εμφανίζονται και σε νεαρά άτομα ή άτομα μέσης ηλικίας. Αποδεικνύεται ότι **ο χρόνος επώασης των πρόδρομων μη-φυσιολογικά διπλωμένων μορίων, καθώς και το περιβάλλον πυρήνωσης, παίζει σημαντικότερο ρόλο από την ηλικία**. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το σύνδρομο Down στο οποίο οι ασθενείς με τρισωμία 21 εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα συσσωματωμάτων του Αβ πεπτιδίου στον εγκέφαλο, ήδη από την ηλικία των 10 ετών, εξαιτίας της υπερέκφρασης της προδρόμου αμυλοειδούς πρωτεΐνης (APP) που κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 21. Όμοια, οι κληρονομούμενες

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (*missense mutation*) σε αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες μπορεί να επιταχύνουν την ινιδογένεση, προκαλώντας γρηγορότερα την εμφάνιση μίας ασθένειας, από ότι θα περιμέναμε από την πρωτεΐνη φυσικού τύπου. Παράδειγμα αποτελούν η συστημακή αμυλοείδωση της τρίτης ηλικίας (*senile systemic amyloidosis*), η οποία εμφανίζεται κατά τη συσσωμάτωση της φυσικού τύπου τρανσθυρετίνης, ενώ η κληρονομούμενη αμυλοειδής πολυνευροπάθεια (*familial amyloidotic polyneuropathy - FAP*) εμφανίζεται σε άτομα μέσης ηλικίας από την επιταχυνόμενη συσσωμάτωση της μεταλλαγμένης τρανσθυρετίνης.

Επομένως, πολλές από τις αμυλοειδώσεις είναι **σποραδικές** (νόσος του Alzheimer ή νόσος του Parkinson), ενώ έχουν εντοπιστεί και πολλές **κληρονομούμενες μορφές** (αμυλοείδωση της λυσοζύμης). Συνολικά, μαζί με τις σποραδικές αμυλοειδώσεις που αγγίζουν το 85% των περιπτώσεων, οι κληρονομούμενες μορφές αφορούν το 10%, ενώ οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες αφορούν το 5% αυτών. Η ειδική αυτή κατηγορία στερεοδιαταξικών ασθενειών μπορεί σε γενικές γραμμές να ταξινομηθεί σε υποκατηγορίες που αφορούν: 1) **μη-νευροπαθολογικές συστημικές αμυλοειδώσεις** (*nonneuropathic systemic amyloidoses*), στις οποίες η συσσωμάτωση συμβαίνει σε περισσότερους από έναν ιστούς, 2) **μη-νευροπαθολογικές εντοπισμένες αμυλοειδώσεις** (*nonneuropathic localized amyloidoses*) ή **οργανοεξαρτώμενες αμυλοειδώσεις** (*organ-limited extracellular amyloidoses*), στις οποίες η συσσωμάτωση συμβαίνει σε ένα είδος ιστού – διαφορετικό από τον εγκέφαλο – και 3) **νευροεκφυλιστικές ασθένειες** (*neurodegenerative disorders*), στις οποίες η συσσωμάτωση λαμβάνει χώρα στον εγκέφαλο και θεωρείται ότι πρόκειται για έναν ηλικιοεξαρτώμενο νευροεκφυλισμό.

Συστημικές αμυλοειδώσεις μπορεί να εμφανιστούν **λόγω των διάφορων παθολογικών καταστάσεων προκαλείται έντονη αύξηση στη συγκέντρωση ενός αμυλοειδογόνου πολυπεπτιδίου**, παρότι δεν είναι σήμερα γνωστός ο λόγος της επιλεκτικής εναπόθεσης στους ιστούς ή ο μηχανισμός που οδηγεί στην κυτταρική δυσλειτουργία. Για παράδειγμα στη ρευματοειδή αρθρίτιδα ένα πρωτεολυτικό θραύσμα 76-καταλοίπων της αμυλοειδούς πρωτεΐνης του πλάσματος 1 (*serum amyloid A – SAA1*), το πεπτίδιο συσσωματώνεται και εναποτίθεται στον συνδετικό ιστό πολλών διαφορετικών οργάνων συμπεριλαμβανομένων του σπλήνα, των πνευμόνων ή του ήπατος. Αντίστοιχα, στο πολλαπλό μύελωμα η υπερπαραγωγή μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών στο πλάσμα του αίματος οδηγεί στο σχηματισμό εναποθέσεων στον εξωκυττάριο χώρο πολλών ιστών. Ακόμα, σε άλλες συστημακές αμυλοειδώσεις, η αυξανόμενη συγκέντρωση μίας πρωτεΐνης **μπορεί να οφείλεται στην διαταραχή του μηχανισμού εκκαθάρισής της**. Ένα

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σταδιακή αύξηση της β₂-μικροσφαιρίνης στους ιστούς στην αμυλοείδωση που σχετίζεται με την αιμοκάθαρση (Argiles *et al.*, 1987). Ο Πίνακας 1 συγκεντρώνει μία λίστα από συχνά απαντώμενες κλινικές καταστάσεις συστηματικών αμυλοειδώσεων. Η εμφάνιση των εναποθέσεων σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι προσβάλλει τη μικροαγγειακή κυκλοφορία ενός ιστού μέσω φυσικών πιέσεων, καθώς τα εξωκυτταρικά αμυλοειδή ινίδια ή, σε μικρότερο βαθμό, συστατικά όπως εξωκυτταρικά ολιγομερή ή πρωτοϊνίδια, μπορεί να δράσουν μη-επιλεκτικά και να διαταράξουν κυτταρικούς υποδοχείς και/ ή κανάλια, ζωτικής σημασίας για τους ιστούς.

Πίνακας 1. Λίστα συχνά απαντώμενων συστηματικών αμυλοειδώσεων που προκύπτουν από εξωκυτταρική εναπόθεση ινιδίων.

Κλινική κατάσταση	Κύριο συστατικό των εναποθέσεων
Πρωτογενής συστηματική αμυλοείδωση	Ανοσοσφαιρίνες φυσικού τύπου ή θραύσματα ανοσοσφαιρινών
Δευτερογενής συστηματική αμυλοείδωση	Τμήματα της αμυλοειδούς πρωτεΐνης του πλάσματος Α
Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός	Τμήματα της αμυλοειδούς πρωτεΐνης του πλάσματος Α
Οικογενής αμυλοειδής πολυνευροπάθεια I	Μεταλλαγμένη τρανσθυρετίνη και θραύσματα αυτής
Συστηματική αμυλοείδωση της τρίτης ηλικίας	Τρανσθυρετίνη φυσικού τύπου και θραύσματα αυτής
Οικογενής αμυλοειδής πολυνευροπάθεια II	Θραύσματα της απολιποπρωτεΐνης ΑΙ
Αμυλοείδωση που σχετίζεται με την αιμοκάθαρση	β ₂ -μικροσφαιρίνη
Οικογενής αμυλοείδωση Φινλανδικού τύπου	Θραύσματα μεταλλαγμένης γκελσολίνης
Αμυλοείδωση της λυσοζύμης	Λυσοζύμη φυσικού τύπου
Αμυλοείδωση της ινσουλίνης	Ινσουλίνη φυσικού τύπου
Αμυλοείδωση της α-αλυσίδας του ινωδογόνου	Παραλλαγές της α-αλυσίδας του ινωδογόνου

Μία μεγάλη κατηγορία από διαταραχές, οι **οργανοεξαρτώμενες αμυλοειδώσεις** είναι οι ασθένειες στις οποίες η **πρωτεΐνη συσσωματώνεται και εναποτίθεται τοπικά**, δηλαδή κοντά στο όργανο ή στον ιστό στον οποίο εκφράζεται. Βασικά παραδείγματα αυτού του τύπου είναι η εναπόθεση της καλσιτονίνης στο θυρεοειδή αδένα (μυελώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς), της αμυλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος (διαβήτης τύπου II), του νατριουρητικού πεπτιδίου στην καρδιά (κολπική αμυλοείδωση της καρδιάς) και του Αβ

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

πεπτιδίου στον εγκέφαλο (νόσος του Alzheimer). Παρόλο που οι πρωτεΐνες αυτές εισέρχονται στην κυκλοφορία, σε παθολογικές καταστάσεις τα υψηλά επίπεδα παραγωγής τους στην περιοχή που εκφράζονται οδηγούν σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα κρίσιμα επίπεδα και έτσι οδηγούνται σε τοπική εναπόθεση. Στις διαταραχές αυτές, τα αμυλοειδή ινίδια και οι πρόδρομες μορφές τους εναποτίθενται κυρίως στον εξωκυτταρικό χώρο του κάθε οργάνου και με τον τρόπο αυτό προσβάλλουν την τοπική βιωσιμότητα των κυττάρων. Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει μία λίστα από κοινές οργανοεξαρτώμενες αμυλοειδώσεις.

Πίνακας 2. Λίστα συχνά απαντώμενων οργανοεξαρτώμενων αμυλοειδώσεων που προκύπτουν από εξωκυτταρική εναπόθεση ινιδίων.

Κλινική κατάσταση	Κύριο συστατικό των εναποθέσεων
Νόσος Alzheimer	Αβ πεπτίδιο
Σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια	Prion φυσικού τύπου ή θραύσματα αυτού
Οικογενής αμυλοείδωση με εγκεφαλικές αιμορραγίες	Αβ πεπτίδιο ή Κυστατίνη C
Διαβήτης τύπου II	Αμυλίνη
Μυελώδης καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου	Πρόδρομη μορφή καλσιτονίνης
Αμυλοείδωση των κόλπων της καρδιάς	Νατριουρητικό πεπτίδιο A

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι εξωκυτταρικές εναποθέσεις που εντοπίζονται σε ασθενείς που πάσχουν από κάποια μορφή αμυλοείδωσης αποτελούνται από ένα κύριο συστατικό, το οποίο δημιουργεί τον ‘ινιδιακό πυρήνα’ και έπειτα, από επιπρόσθετα συσχετιζόμενα στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων άλλων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, μεταλλικών ιόντων, γλυκοζαμινογλυκανών, την αμυλοειδογόνο πρωτεΐνη P του πλάσματος (serum amyloid P component), την απολιποπρωτεΐνη E, το κολλαγόνο και πολλές άλλες (Alexandrescu, 2005; Hirschfield and Hawkins, 2003).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, σημειώθηκαν αξιοσημείωτες αλλαγές στην αντίληψή μας για τις αιτίες και την παθολογία του ηλικιοεξαρτώμενου νευροεκφυλισμού στον εγκέφαλο. Μία λίστα από διαταραχές του εγκεφάλου με προηγουμένως άγνωστες αιτίες εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία. Οι πιο κοινές νευροεκφυλιστικές διαταραχές είναι η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Δύο σημαντικά χαρακτηριστικά των διαταραχών είναι ότι τα συσσωματώματα μπορεί να

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

συγκεντρώνονται μέσα στα κύτταρα και ότι τα πολυμερή των συσσωματωμάτων δεν είναι ίδια με αυτά των εξωκυτταρικών αμυλοειδών ινιδίων. Το γεγονός αυτό δημιούργησε προβληματισμό σχετικά με το κατά πόσο οι διαταραχές μπορεί να κατατάσσονται μαζί με τις αμυλοειδώσεις. Οι ιδιότητες, όμως, των δομών αυτών (π.χ. η διπλοθλαστικότητά τους όταν δεσμεύουν τη χρωστική Congo Red), η αδιαλυτότητά τους και τα περιθλασιγράμματά τους **εμφανίζουν παρόμοιες ιδιότητες με εκείνες των αμυλοειδών**, γι' αυτό και είναι εύλογο να τα κατατάσσουμε ως μία ειδική μορφή αμυλοειδών ινιδίων.

Μία μεγάλη λίστα από διαφορετικές πρωτεΐνες μπορεί να δημιουργούν ενδοκυτταρικές εναποθέσεις ινιδίων. Στη νόσο του Parkinson, η α-συνουκλείνη, αυτοσυγκροτείται και συσσωματώνεται σε σφαιρικές μάζες με ινδιακό περιεχόμενο μέσα σε επιλεγμένα νευρικά κύτταρα, τα λεγόμενα σωματίδια Lewy (*Lewy bodies*). Μία άλλη αναγνωρισμένη ομάδα ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι οι διαταραχές όπου συναντώνται επαναλήψεις γλουταμινών, όπως η νόσος του Huntington, με την εμφάνιση μικροσκοπικών ανιχνεύσιμων ινδιακών εγκλείστων. Εντούτοις, η νόσος του Alzheimer είναι η μόνη διαταραχή του εγκεφάλου που χαρακτηρίζεται **τόσο από την εξωκυτταρική συσσωμάτωση του αμυλοειδογόνου Αβ πεπτιδίου** (δημιουργία αμυλοειδών πλακών), **όσο και ενδοκυτταρική δημιουργία έγκλειστων της αμυλοειδογόνου πρωτεΐνης tau** (δημιουργία νευροϊνδιακών συναθροίσεων). Πειραματικές προσεγγίσεις αποκαλύπτουν ότι και τα δύο ευρήματα συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου· κληρονομούμενες μεταλλάξεις που συναντώνται στις πρωτεάσες ωρίμανσης της προδρόμου πρωτεΐνης APP (πρεσενιλίνες ή γ-σεκρετάση) προκαλούν επιθετική εμφάνιση της νόσου, ενώ μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη tau προκαλούν μία λιγότερο κοινή, αλλά εξίσου επώδυνη διαταραχή που ονομάζεται μετωπιαία άνοια με παρκινσονισμό (*frontotemporal dementia with parkinsonism*).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6. Αμυλοειδογόνες Πρωτεΐνες

1.6.1. Αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες *in vivo*

Η ποικιλομορφία των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και των αμυλοειδώσεων μελετάται εντατικά ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 1970 και έτσι, σήμερα ο αριθμός των γνωστών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στον άνθρωπο ανέρχεται στις 36 (Sipe *et al.*, 2016) (Πίνακας 3). Η διαδικασία κατάταξης των πρωτεϊνικών μορίων στην οικογένεια των αμυλοειδών υπήρξε από την αρχή αρκετά πολύπλοκη και ασαφής, γι' αυτό και έγινε **επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός κανόνα που θα αποσαφηνίζει τον όρο 'αμυλοειδή' για κάθε νέα μελέτη**. Για περισσότερα από 40 χρόνια, η επιτροπή ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης των Αμυλοειδώσεων (*International Society of Amyloidosis – ISA*), η οποία δημιουργήθηκε στο 2^ο συνέδριο της ISA (2nd *International Symposium on Amyloidosis*), συγκροτείται κάθε δύο χρόνια, καταγράφει μελέτες με νέα υποψήφια πρωτεϊνικά μόρια και δημοσιεύει συστηματικά κατευθυντήριες γραμμές για τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες και τις αμυλοειδώσεις.

Η πιο σημαντική αποστολή της επιτροπής είναι η δημιουργία μίας ενιαίας, περιεκτικής και αυστηρής ονοματολογίας που θα περιγράφει τον αυξανόμενο αριθμό των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και επομένως θα προσδιορίζει με ακρίβεια τον όρο 'αμυλοειδή', όταν αναφερόμαστε σε αυτόν. Οι πρώτες παρατηρήσεις των ερευνητών πρότειναν ότι τα αμυλοειδή αναφέρονται σε εναποθέσεις που εντοπίζονται στους ιστούς και είναι κυρίως πρωτεϊνικής φύσης (Westermarck *et al.*, 2005). Αργότερα, η ορολογία έγινε πιο εξειδικευμένη και αναφέρονταν σε εξοκτυταρικές εναποθέσεις πρωτεϊνικών ινιδίων με χαρακτηριστική εμφάνιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τυπικά περιθλασιγράμματα cross-β αρχιτεκτονικής και συγγένεια δέσμησης της χρωστικής Congo Red με επακόλουθη εμφάνιση της διπλοθλαστικότητας (*'referring to extracellular depositions of protein fibrils with characteristic appearance in electron microscope, typical X-ray diffraction pattern, and affinity for Congo red with concomitant green birefringence'*) (Sipe *et al.*, 2010). Ο δεύτερος ορισμός διαχώριζε τα ενδοκυτταρικά έγκλειστα και σημείωνε ότι πρόκειται για μία ξεχωριστή λίστα από πρωτεΐνες που όμως έχουν άμεση συνάφεια με τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες. Η ύπαρξη των ενδοκυτταρικών έγκλειστων υπήρξε πεδίο έντονων αντιπαραθέσεων, καθώς κατά τις πρώιμες καταγραφές πολλοί θεωρούσαν ότι δεν θα έπρεπε να καλούνται αμυλοειδή (Westermarck *et al.*, 2005).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Πίνακας 3. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες στον άνθρωπο, όπως παρουσιάστηκαν από την International Society of Amyloidosis (ISA) το 2005, 2010, 2012, 2014 και 2016. Με μπλε σημειώνονται οι νέες εγγραφές της λίστας για την εκάστοτε χρονολογία.

2005 (Westermarck <i>et al.</i> , 2005)	2010 (Sipe <i>et al.</i> , 2010)	2012 (Sipe <i>et al.</i> , 2012)	2014 (Sipe <i>et al.</i> , 2014)	2016 (Sipe <i>et al.</i> , 2016)
Immunoglobulin light chain	Immunoglobulin light chain	Immunoglobulin light chain	Immunoglobulin light chain	Immunoglobulin light chain
Immunoglobulin heavy chain	Immunoglobulin heavy chain	Immunoglobulin heavy chain	Immunoglobulin heavy chain	Immunoglobulin heavy chain
β_2 -microglobulin	β_2 -microglobulin	β_2 -microglobulin	β_2 -microglobulin	β_2 -microglobulin
Transthyretin	Transthyretin	Transthyretin	Transthyretin	Transthyretin
(Apo)serum AA	(Apo)serum AA	(Apo)serum AA	(Apo)serum AA	(Apo)serum AA
Apolipoprotein AI	Apolipoprotein AI	Apolipoprotein AI	Apolipoprotein AI	Apolipoprotein AI
Apolipoprotein AII	Apolipoprotein AII	Apolipoprotein AII	Apolipoprotein AII	Apolipoprotein AII
Apolipoprotein AIV	Apolipoprotein AIV	Apolipoprotein AIV	Apolipoprotein AIV	Apolipoprotein AIV
Gelsolin	Gelsolin	Gelsolin	Gelsolin	Gelsolin
Lysozyme	Lysozyme	Lysozyme	Lysozyme	Lysozyme
Fibrinogen α -chain	Fibrinogen α -chain	Fibrinogen α -chain	Fibrinogen α -chain	Fibrinogen α -chain
Cystatin C	Cystatin C	Cystatin C	Cystatin C	Cystatin C
ABriPP	ABriPP	ABriPP	ABriPP	ABriPP
ADanPP	ADanPP	ADanPP	ADanPP	ADanPP
A β protein precursor	A β protein precursor	A β protein precursor	A β protein precursor	A β protein precursor
Prion protein	Prion protein	Prion protein	Prion protein	Prion protein
(Pro)calcitonin	(Pro)calcitonin	(Pro)calcitonin	(Pro)calcitonin	(Pro)calcitonin
Atrial natriuretic factor	Atrial natriuretic factor	Atrial natriuretic factor	Atrial natriuretic factor	Atrial natriuretic factor
Prolactin	Prolactin	Prolactin	Prolactin	Prolactin
Insulin	Insulin	Insulin	Insulin	Insulin
Lactadherin	Lactadherin	Lactadherin	Lactadherin	Lactadherin
Kerato-epithelin	Kerato-epithelin	Kerato-epithelin	Kerato-epithelin	Kerato-epithelin
Lactoferrin	Lactoferrin	Lactoferrin	Lactoferrin	Lactoferrin
άγνωστη	Odontogenic ameloblast-associated protein	Odontogenic ameloblast-associated protein	Odontogenic ameloblast-associated protein	Odontogenic ameloblast-associated protein
	Leukocyte chemotactic factor 2	Leukocyte chemotactic factor 2	Leukocyte chemotactic factor 2	Leukocyte chemotactic factor 2
	Amylin	Amylin	Amylin	Amylin
	Semenogelin I	Semenogelin I	Semenogelin I	Semenogelin I
	Lung surfactant protein	Lung surfactant protein	Lung surfactant protein	Lung surfactant protein
	Galectin 7	Galectin 7	Galectin 7	Galectin 7
	Corneodesmin	Corneodesmin	Corneodesmin	Corneodesmin
	Enfuvirtide	Enfuvirtide	Enfuvirtide	Enfuvirtide
				Apolipoprotein C II
				Apolipoprotein C III
				α -Synuclein
				Tau

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Σήμερα, ο όρος ‘αμυλοειδή’ αναφέρεται σε αδιάλυτα πρωτεϊνικά ινίδια που εναποτίθενται - κυρίως εξωκυτταρικά - σε όργανα και ιστούς, ως αποτέλεσμα μίας ακολουθίας γεγονότων που τροποποιούν τη φυσιολογική στερεοδιάταξη μίας πρωτεΐνης και έχουν ως αποτέλεσμα στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, γνωστών ως αμυλοειδώσεων. Η χημική ταυτοποίηση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών προκειμένου να συμπεριληφθούν στη λίστα των αμυλοειδώσεων έρχεται από ξεκάθαρα χαρακτηρισμένες ακολουθίες, που προέρχονται από πρωτεϊνική αλληλούχηση και περιγράφεται σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με το σύστημα των κριτών. Η ονοματολογία των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών βασίζεται στην χημική φύση των αμυλοειδών ινιδίων στις εναποθέσεις, γι’ αυτό κάθε αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη καταγράφεται με το πρόθεμα A (από τη λέξη *amyloid*) και ακολουθείται από μία σύντμηση της μητρικής ακολουθίας από την οποία προέρχεται ή της προδρόμου μορφής της πρωτεΐνης (Sipe *et al.*, 2016).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των πρωτεϊνών που συσσωματώνονται *in vivo* είναι πολύ μικρός σε σύγκριση με τον απόλυτο αριθμό των πρωτεϊνών στον άνθρωπο. Ωστόσο ο αριθμός των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, καθώς και των στερεοδιαταξικών ασθενειών στις οποίες εμπλέκονται, έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων και σίγουρα θα συνεχίσει να αυξάνεται. Ο Πίνακας 3 συνοψίζει τις καταγραφές των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών από το 2005 μέχρι και το 2016.

Τα τελευταία χρόνια οι προσπάθειες κατανόησης του μηχανισμού με τον οποίο οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες αποκτούν την εξειδικευμένη στερεοδιάταξη των αμυλοειδών ινιδίων έγινε πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. Έτσι, η ερευνητική κοινότητα στράφηκε στη μελέτη των μηχανισμών αυτοσυγκρότησης με τη χρήση συνθετικών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, λόγω των πρακτικών προβλημάτων που προκύπτουν κατά τη μελέτη αμυλοειδών ινιδίων από ιστούς. Η χρήση συνθετικών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και η μελέτη τους *in vitro* δημιούργησε αρκετά προβλήματα σχετικά με την ονοματολογία, ειδικότερα σε σχέση με τη χρήση του όρου ‘αμυλοειδή’.

Αρχικά για τα αμυλοειδή ινίδια από συνθετικές πηγές προτάθηκε η λέξη ‘amylog’ ένας όρος που συνδυάζει τη λέξη ‘amyloid’ με τη λέξη ‘analog’ (=ανάλογο), και ουσιαστικά μπορεί να αποδοθεί περιφραστικά με τον όρο αμυλοειδές ανάλογο. Ο όρος όμως που προτάθηκε και χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα για τα ινίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες με αμυλοειδείς ιδιότητες είναι ινίδια με αμυλοειδείς ιδιότητες (amyloid-like). Οι ιδιότητες αφορούν την ύπαρξη του cross-β σκελετού, τη συγγένεια για τη χρωστική Congo Red και την ακόλουθη χαρακτηριστική εμφάνιση της διπλοθλαστικότητας.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Πίνακας 4. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες και το όργανο ή ο ιστός στο οποίο εναποτίθενται.

Αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη	Συστημική ή Εντοπισμένη Αμυλοείδωση	Όργανο ή Ιστός
Immunoglobulin light chain	Σ, Ε	Εκτός ΚΝΣ
Immunoglobulin heavy chain	Σ, Ε	Εκτός ΚΝΣ
β ₂ -microglobulin	Σ, Ε	Μυοσκελετικό σύστημα / ΑΝΣ
Transthyretin	Σ, Ε	Καρδιά / ΠΝΣ / ΑΝΣ / Μάτια
(Apo)serum AA	Σ	Εκτός ΚΝΣ
Apolipoprotein AI	Σ	Καρδιά / Ήπαρ / Συκώτι / Νεφροί / ΠΝΣ κ.α.
Apolipoprotein AII	Σ	Νεφροί
Apolipoprotein AIV	Σ	Νεφροί
Gelsolin	Σ	ΠΝΣ / Κερατοειδής χιτώνας
Lysozyme	Σ	Νεφροί
Fibrinogen α-chain	Σ	Νεφροί
Cystatin C	Σ	ΠΝΣ / Δέρμα / ΚΝΣ
ABriPP	Σ	ΚΝΣ
ADanPP	Ε	ΚΝΣ
Aβ protein precursor	Ε	ΚΝΣ
Prion protein	Ε	ΚΝΣ
(Pro)calcitonin	Ε	Θυροειδής αδένας
Atrial natriuretic factor	Ε	Καρδιά
Prolactin	Ε	Υπόφυση
Insulin	Ε	Ινσουλίνωμα
Lactadherin	Ε	Καρδιά
Kerato-epithelin	Ε	Κερατοειδής χιτώνας
Lactoferrin	Ε	Κερατοειδής χιτώνας
Odontogenic ameloblast-associated protein	Ε	Όγκος δοντιών
Leukocyte chemotactic factor 2	Σ	Νεφροί
Amylin	Ε	Πάγκρεας
Semenogelin I	Ε	Σπερματικά σωληνάκια
Lung surfactant protein	Ε	Πνεύμονες
Galectin 7	Ε	Δέρμα
Corneodesmin	Ε	Επιθηλιακός ιστός
Enfuvirtide	Ε	Αντιρετροϊκό φάρμακο
Apolipoprotein C II	Σ	Νεφροί
Apolipoprotein C III	Σ	Νεφροί
α-Synuclein	Ε	ΚΝΣ
Tau	Ε	ΚΝΣ

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Πίνακας 5. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που δημιουργούν ενδοκυτταρικά έγκλειστα.

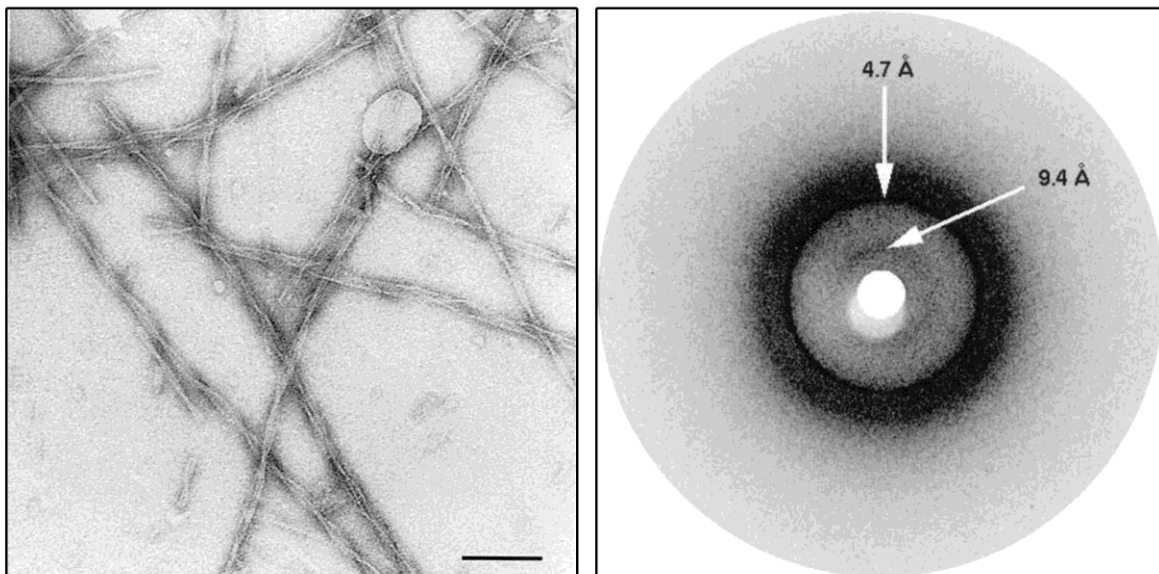
Ενδοκυτταρικά έγκλειστα	Αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη	Τύπος κυττάρου	Πιθανή συσχέτιση με Αμυλοείδωση
Lewy bodies	α -synuclein	Νευρώνες	Νόσος του Parkinson
Huntington bodies	PolyQ expanded huntingtin	Νευρώνες	Νόσος του Huntigton
Hirano bodies	Actin	Νευρώνες	Νευροεκφυλιστικές διαταραχές
Collins bodies	Neuroserpin	Νευρώνες	Οικογενή αμυλοείδωση που σχετίζεται με την πρεσενιλίνη
Μη προσδιορισμένα έγκλειστα	Ferritin	Πολλά διαφορετικά κύτταρα	Οικογενής νευροεκφυλιστική ασθένεια
Neurofibrillary tangles	Tau	Νευρώνες	Νόσος του Alzheimer
AaSyn	α -synuclein	Νευρώνες	Νόσος του Parkinson

Οι παραπάνω πίνακες (Πίνακας 4, Πίνακας 5) συνοψίζουν τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εξωκυτταρική εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων και την ενδοκυτταρική δημιουργία έγκλειστων, στην πιο πρόσφατη δημοσίευση της Διεθνούς Ένωσης των Αμυλοειδώσεων (Sipe *et al.*, 2016). Για πρώτη φορά το 2016 τα ενδοκυτταρικά έγκλειστα της α -συνουκλεΐνης και της πρωτεΐνης tau εντάχθηκαν στη λίστα των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών που εναποτίθενται σε ιστούς, καθώς επιβεβαιώθηκαν ευρήματά τους εξωκυτταρικά (Avila *et al.*, 2014; Hanger *et al.*, 2014). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι πρόσφατα πειράματα ανοσοϊστοχημείας αποκάλυψαν αμυλοειδείς εναποθέσεις της πρωτεΐνης καθεψίνης K, σε καρκινικό ιστό νεφρού (Linke *et al.*, 2017). Το εύρημα αυτό, αφενός αναμένεται να ενσωματώσει την καθεψίνη K στην επίσημη λίστα των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων και αφετέρου αποδεικνύει την δυναμική των πειραματικών μελετών που αφορούν την μελέτη των αμυλοειδών και των αμυλοειδώσεων.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.2. Αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες *in vitro*

Το ερευνητικό πεδίο της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης και συγκεκριμένα του μηχανισμού της δομικής μετάβασης φυσιολογικών σφαιρικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών σε αμυλοειδή ινίδια **ευνοήθηκε από τη χρήση συνθετικών πρωτεϊνικών ή πεπτιδικών μορίων που συνέβαλαν στην αναπαραγωγή των πειραμάτων *in vitro*** (Dobson, 1999). Η ανίχνευση μερικών μόνο πρωτεϊνών στις αμυλοειδώσεις αρχικά εξηγήθηκε ότι έχει άμεση σχέση με πληροφορία που βρίσκεται κωδικοποιημένη στην ακολουθία των πρωτεϊνικών μορίων, κάτι που αργότερα απορρίφθηκε, καθώς οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες διαφέρουν σημαντικά τόσο στην αμινοξική τους ακολουθία, όσο και στη φυσιολογική τρισδιάστατη δομή τους. Μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι η ικανότητα σχηματισμού αμυλοειδών ινιδίων δεν είναι χαρακτηριστική μόνο των πρωτεϊνών αυτής της ομάδας, αλλά συναντάται και σε άλλα πρωτεϊνικά μόρια, όταν μελετώνται σε ήπιες συνθήκες αποδιάταξης, όπως είναι το χαμηλό pH ή η αυξημένη θερμοκρασία (Dobson, 1999).



Εικόνα 29. Πειραματικά αποτελέσματα για την αυτοτελή δομική περιοχή της υπομονάδας p85a της κινάσης της φωσφατυδιλοϊνοσιτόλης. Παρατηρούμε αμυλοειδή ινίδια με χαρακτηριστικές ιδιότητες (αριστερά), καθώς και περιθλασίγραμμα χαρακτηριστικό της cross-β δομής (Προσαρμογή από (Guijarro *et al.*, 1998)).

Η αυτοτελής δομική περιοχή SH3 της υπομονάδας p85a της κινάσης της φωσφατυδιλοϊνοσιτόλης (PI-3'-kinase) ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που βρέθηκε να σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια κάτω από όξινες συνθήκες *in vitro*. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι διάλυμα της πρωτεΐνης, που δεν είχε συσχετιστεί μέχρι τότε με τη δημιουργία αμυλοειδών

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

ινιδίων, σχηματίζει σε χαμηλό pH και έπειτα από μερικές μόνο ώρες επώασης ένα παχύρρευστο πήκτωμα. Όταν το πήκτωμα αυτό μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπιστώθηκε ότι περιέχει καλά σχηματισμένα ινίδια που εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων (Guijarro *et al.*, 1998). Ακολουθώντας την ίδια τακτική, ο Chiti και οι συνεργάτες του το 1998 κατάφεραν να σχεδιάσουν τις επιθυμητές συνθήκες για την παραγωγή ινιδίων σε μία τυχαία πρωτεΐνη της επιλογής τους. Το μόρια που επέλεξαν ήταν η ακετυλοφωσφατάση, μία πρωτεΐνη η οποία δεν σχετίζεται με καμία από τις γνωστές παθολογικές καταστάσεις και αντίθετα από την αυτοτελή δομική περιοχή SH3, δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη τάση σχηματισμού β-πτυχωτών επιφανειών. Με τα ευρήματα αυτά πρότειναν ότι η βάση της αμυλοειδογένεσης **είναι η παρουσία αποδιατακτικών συνθηκών που αποσταθεροποιούν το φυσιολογικό δίπλωμα των πρωτεϊνών, αλλά δεν αποκλείουν και ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων μιας πρωτεΐνης.** Αυτές οι συνθήκες είναι πιθανό να επιδρούν σε μερικώς μη διπλωμένες καταστάσεις των πρωτεϊνών και συγκεκριμένα σε περιπτώσεις όπου υδρόφοβα κατάλοιπα και άτομα δότες ή δέκτες δεσμών υδρογόνων της κύριας αλυσίδας είναι εκτεθειμένα (Chiti *et al.*, 1999).

Με αυτόν τον τρόπο αποδείχθηκε ότι **η ικανότητα δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων είναι μία γενικευμένη ιδιότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.** Η ιδιότητα αυτή μπορεί εύκολα να εξηγηθεί από το γεγονός ότι **οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν τα ινίδια εμπλέκουν την κύρια αλυσίδα των πρωτεϊνών, η οποία είναι κοινή σε όλες τις πρωτεΐνες.** Η παρατήρηση της κοινής αρχιτεκτονικής των αμυλοειδών ινιδίων υποδηλώνει ότι οι αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ατομικό επίπεδο αφορούν αλληλεπιδράσεις σταθεροποίησης του κοινού πρωτεϊνικού σκελετού, όπως είναι υδρογονικοί δεσμοί ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων που συγκροτούν την κύρια αλυσίδα, παρά εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων (Kelly, 1998; Sunde and Blake, 1997).

Έτσι, τα αμυλοειδή ινίδια σήμερα εμφανίζονται ως μία προκαθορισμένη κατάσταση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, πλην μερικών εξαιρέσεων, αφού **είναι η δομική κατάσταση που υιοθετούν οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε υψηλές συγκεντρώσεις, όταν δεν κατορθώνουν να διπλωθούν στην σφαιρική υδατοδιαλυτή τους μορφή.** Η τάση ή ικανότητα δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων είναι η πιο κοινή, γενικευμένη ιδιότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.3. Αμυλοειδογόνοι καθοριστές

Μία από τις βασικές αρχές στη βιολογία είναι ότι η πληροφορία που απαιτείται για το δίπλωμα μίας πρωτεΐνης βρίσκεται κωδικοποιημένη στην αμινοξική της ακολουθία. Τα προηγούμενα χρόνια είχε αποδειχθεί ότι μικρά συναινετικά τμήματα της πρωτοταγούς δομής μίας πρωτεΐνης καθόριζαν σημαντικά γεγονότα για τη ζωή της, όπως το τοπικό εντοπισμό της (*localization*), τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της (*posttranslational modifications*) ή την αποδιάταξή της (*degradation*) (Aitken, 1999). Η αποκάλυψη της **υπόθεσης των αμυλοειδογόνων τμημάτων** (*amyloid stretch hypothesis*) προσδίδει μία ακόμη λειτουργία στα συναινετικά αυτά πεπτιδικά τμήματα: **την εγγενή τάση για δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων**. Η υπόθεση αυτή ορίζει ότι ένα μικρό τμήμα μίας πρωτεΐνης που διαθέτει ένα αμυλοειδογόνο μοτίβο μπορεί να διοχετεύσει την αναγκαία κινητήρια δύναμη για να εκκινηθεί η διαδικασία συσσωμάτωσης ολόκληρης της πρωτεΐνης (Esteras-Chopo *et al.*, 2005).

Πειραματικές αναλύσεις, *in vitro*, απέδειξαν ότι **το αμυλοειδογόνο δυναμικό των πρωτεϊνών μπορεί να ‘συγκεντρώνεται’ σε συγκεκριμένες περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας** και ειδικότερα σε μικρά πεπτιδικά τμήματα της ακολουθίας, τα οποία **χαρακτηρίστηκαν ως το επίκεντρο της συσσωμάτωσης ή ‘hot-spot’ συσσωμάτωσης** (*aggregation ‘hot-spots’*) (Ivanova *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2003; Tjernberg *et al.*, 1996; Ventura *et al.*, 2004). Συγκρίσεις μεταξύ ομόλογων πρωτεϊνών με διαφορετικές αμυλοειδογόνες ιδιότητες έδειξαν ότι μικρές ακολουθίες μπορούν να επάγουν το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων μη-αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Ivanova *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004), ενώ σε επίπεδο τριτοταγούς δομής πεπτιδικά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι ικανά να στοιβάζονται για να σχηματίσουν των cross-β σκελετό, μετατρέποντας το υπόλοιπο της πρωτεΐνης ως διακόσμηση περιφερειακά του ινδιακού πυρήνα (Sambashivan *et al.*, 2005). Η σχέση μεταξύ της ακολουθίας και της αμυλοειδογονικότητας σε μικρά πεπτιδικά τμήματα μελετήθηκε σε βάθος με τη χρήση του πεπτιδικού μοντέλου STVIIIE, που σχεδιάστηκε *de novo* (Lopez de la Paz and Serrano, 2004). Η συστηματική εισαγωγή μεταλλαγών σε όλο το μήκος της ακολουθίας του εξαπεπτιδίου επέτρεψε την δόμηση ενός κανόνα αμυλοειδογόνων μοτίβων και αποκάλυψε ότι ακόμα και σε ένα μικρό πεπτίδιο εντοπίζονται αμινοξικές θέσεις που είναι ανεκτικές (στα άκρα) ή αντίθετα, καθόλου ανεκτικές (στον πυρήνα) στις αμινοξικές τροποποιήσεις.

Η θεωρία των αμυλοειδογόνων μοτίβων ή ‘hot-spot’ συσσωμάτωσης εμπλουτίστηκε από μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν εκτενώς οι μεμονωμένες ιδιότητες των αμινοξικών

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

καταλοίπων που προσδίδουν αμυλοειδογόνες ιδιότητες σε μία ακολουθία. Αμινοξικά κατάλοιπα όπως η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη, η λευκίνη ή η βαλίνη χαρακτηρίστηκαν ως κατάλοιπα που επάγουν στη συσσωμάτωση (Sanchez de Groot *et al.*, 2005). Αντίθετα, διαφορετικές πειραματικές μελέτες πρότειναν ότι η αποφυγή της συσσωμάτωσης επιτυγχάνεται εξελικτικά με την εμφάνιση αμινοξικών καταλοίπων (Tartaglia *et al.*, 2005), όπως η προλίνη που διαταράσσει τη δημιουργία β-πτυχωτών επιφανειών, η γλυκίνη που προσδίδει μία ευκαμψία στην πολυπεπτιδική αλυσίδα (Rauscher *et al.*, 2006), καθώς και το αυξημένο περιεχόμενο σε φορτισμένα κατάλοιπα (Kovacs *et al.*, 2010).

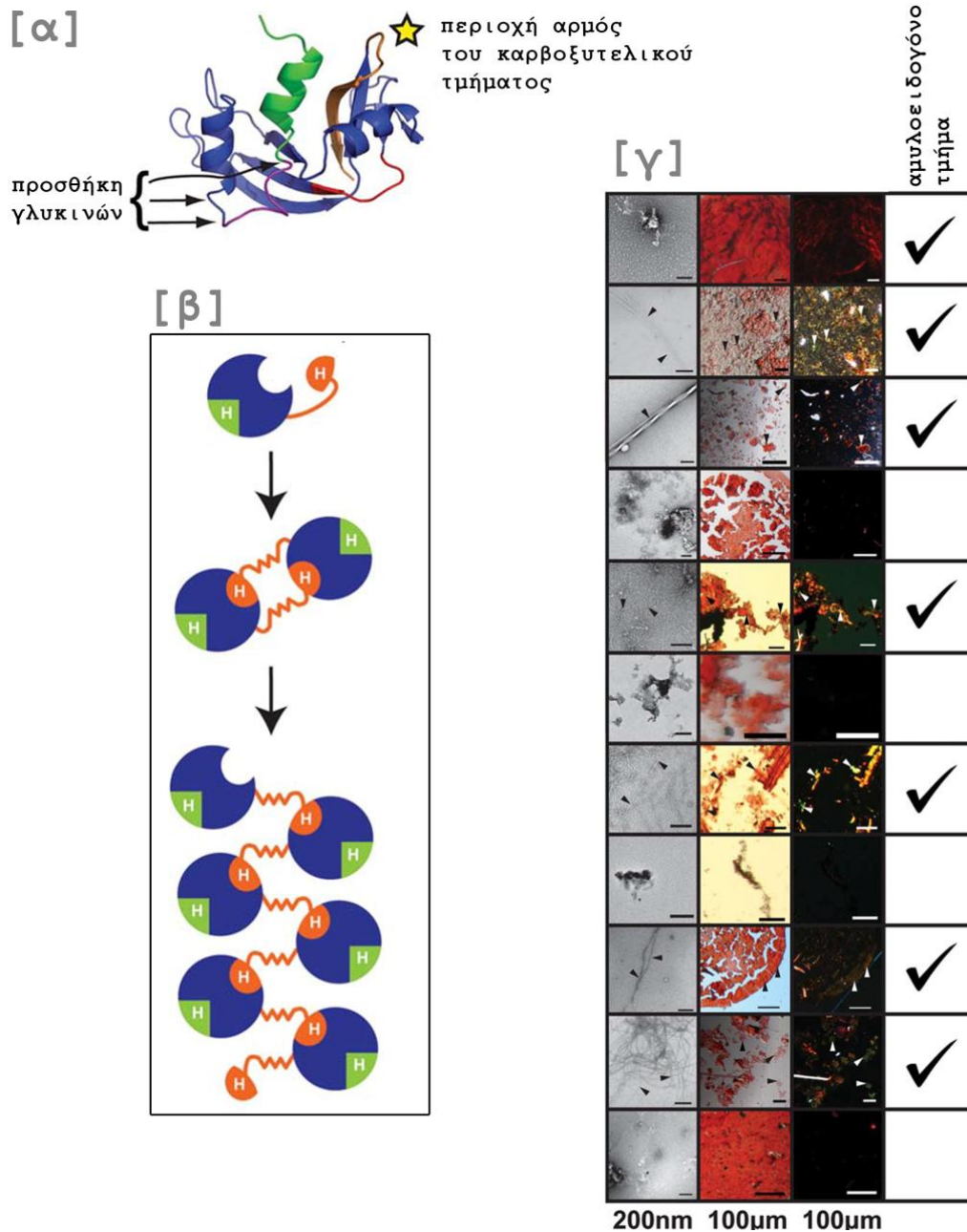
Επιπρόσθετα, το 2007 ο Hamodrakas και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι τα μικρά αμυλοειδογόνα τμήματα των πρωτεϊνών δρουν ως **‘στερεοδιαταξικοί διακόπτες’** (*conformational switches*), αφού **μπορεί να υιοθετήσουν διαφορετικές στερεοδιάταξεις ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται** (Hamodrakas *et al.*, 2007). Οι ακολουθίες που μπορούν να μεταβάλλουν τη στερεοδιάταξή τους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες **ονομάζονται ‘ακολουθίες χαμαιλέοντες’** και περιγράφουν μία γνωστή ιδιότητα των αμινοξικών ακολουθιών (Waterhous and Johnson, 1994; Zhong and Johnson, 1992), η οποία φαίνεται να συμπίπτει με την πλειοψηφία των αμυλοειδογόνων τμημάτων.

Κομβικής σημασίας ήταν το 2009 η πειραματική προσέγγιση της ερευνητικής ομάδας του Eisenberg, στο University of California στο Λος Άντζελες. Οι ερευνητές τοποθέτησαν στο καρβοξυτελικό άκρο της περιοχής αρμού του ενζύμου Rnase A, 10 διαφορετικά αμυλοειδογόνα τμήματα με μήκος από έξι μέχρι δέκα αμινοξικά κατάλοιπα. Η Rnase A είναι ένα ευρέως μελετημένο και καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο, το οποίο δεν δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών, ενώ τα 10 διαφορετικά τμήματα είχαν γνωστές αμυλοειδογόνες ιδιότητες, καθώς οι πρωτεΐνες προέλευσής τους ήταν η ταυ, η ασνουκλεΐνη, η prion και το Αβ πεπτίδιο (Sawaya *et al.*, 2007). Έτσι, το ερώτημα που τέθηκε ήταν **κατά πόσο αυτά τα αμυλοειδογόνα τμήματα μπορούν να προκαλέσουν την αμυλοειδογένεση σε μία μη αμυλοειδογόνο πρωτεΐνη**. Οι παρατηρήσεις έδειξαν ότι τα μικρά τμήματα με **‘τάση προς συσσωμάτωση’** οδήγησαν τις χμιαϊκές πρωτεΐνες στον πολυμερισμό σε 7 από τις 11 περιπτώσεις, επιβεβαιώνοντας ότι τα 7 αμυλοειδογόνα τμήματα μπορούν να καθοδηγήσουν το ένζυμο στη δημιουργία δομών με τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των αμυλοειδών ινιδίων (*amyloid-like fibrils*) (Teng and Eisenberg, 2009).

Τα μικρά αμυλοειδογόνα τμήματα που πυροδοτούν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων ονομάζονται σήμερα **‘αμυλοειδογόνοι καθοριστές’** (*‘amyloidogenic determinants’*) ή **‘πεπτίδια με τάση προς συσσωμάτωση’** (*‘aggregation-prone peptides’*) ή **‘hot-spot’**

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

συσσωμάτωσης (*aggregation 'hot-spot'*) και οι μελέτες τους παίζουν καθοριστικό ρόλο στις δομικές και βιοχημικές αναλύσεις των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.



Εικόνα 30. Αμυλοειδογόνα τμήματα οδηγούν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων στην RNase A (α) Η δομή της RNase A. Τα τμήματα που χρωματίζονται είναι υποψήφιες περιοχές για την προσθήκη αμυλοειδογόνων τμημάτων. Το αμινοτελικό τμήμα χρωματίζεται με πράσινο, ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα και η περιοχή αρμός με πορτοκαλί. (β) Πιθανό μοντέλο πολυμερισμού της χιμαιρικής RNase A μετά την προσθήκη εξαπεπτιδίων. (γ) Τα πειραματικά αποτελέσματα των χιμαιρικών ενζύμων έπειτα από την προσθήκη των εξαπεπτιδίων στην καρβοξυτελική περιοχή αρμό (Προσαρμογή από (Teng *et al.*, 2012)).

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.4. Ανασκόπηση των βάσεων πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης

Η πρωτεϊνική συσσωμάτωση, αλλά και ειδικότερα ο σχηματισμός οργανωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων - των αμυλοειδών ινιδίων -, προσελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών και γι' αυτό είναι σήμερα ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας (Chiti *et al.*, 1999). Στην κατεύθυνση αυτή, η υπολογιστική βιολογία τα τελευταία 15 χρόνια έχει συνεισφέρει στην *in silico* ανάλυση του αμυλοειδογόνου προφίλ των πρωτεϊνών με την ανάπτυξη πολλών εργαλείων (Ahmed and Kajava, 2013; De Baets *et al.*, 2014; Hamodrakas, 2011) (2.3.3.2).

Η διαθεσιμότητα των αποθηκευμένων βιολογικών δεδομένων σε ιδανικά σχεδιασμένες βάσεις δεδομένων, **άλλαξε τον τρόπο με τον οποίο οι επιστήμονες μελετούν την πρωτεϊνική συσσωμάτωση** και συνεισέφερε σημαντικά στην ανάπτυξη των βιολογικών, ιατρικών ακόμα και των προ-κλινικών διαδικασιών. Συχνά, επαρκώς σχολιασμένες εγγραφές σε γενικευμένες βάσεις δεδομένων σημαίνονται με 'λέξεις κλειδιά', που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση συγκεκριμένων υποσυνόλων. Για παράδειγμα λέξεις κλειδιά όπως 'amyloid' ή 'amyloid formation' ή 'amyloidosis' μπορεί να συνοδεύουν μία προχωρημένη αναζήτηση (*advanced search*) που αφορά την πρωτεϊνική συσσωμάτωση. Εντούτοις, οι γενικευμένες βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικών μορίων, όπως είναι η UniProtKB (Boutet *et al.*, 2016), περιέχουν υψηλής ποιότητας υπολογιστικά προσδιορισμένες εγγραφές, εμπλουτισμένες με αυτόματο σχολιασμό και ταξινόμηση, αλλά η εξόρυξη δεδομένων σε αυτές, μπορεί να είναι πολύπλοκη, εξαιτίας της ποσότητας της πληροφορίας και της ποικιλομορφίας των εγγραφών τους. Σήμερα, **τα δεδομένα της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης βρίσκονται σποραδικά συγκεντρωμένα σε βάσεις δεδομένων ή διασκορπισμένα στην διαθέσιμη βιβλιογραφία**, γι' αυτό και είναι επιτακτική η ανάγκη της οργάνωσης, της προσβασιμότητας και της εύκολης εξόρυξής τους.

Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφονται οι διαθέσιμες βάσεις της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης, ταξινομημένες σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες: 1) στα **σύνολα δεδομένων της αμυλοειδογονικότητας**, 2) στις **βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**, 3) στις **βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων**, και τέλος 4) στις **βάσεις δεδομένων αμυλοειδώσεων**.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.4.1. Σύνολα δεδομένων αμυλοειδογονικότητας.

Τα **σύνολα δεδομένων της αμυλοειδογονικότητας** υπήρξαν οι πρώτες πρώιμες προσπάθειες ‘αποθετηρίων της πρωτεϊνική συσσωμάτωσης’ που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη, τη βελτιστοποίηση και τον έλεγχο νέων αλγορίθμων (Lander *et al.*, 2001). Εκτός από την αξιοποίησή τους στην πειραματική έρευνα, η συλλογή αυτών των δεδομένων συνέβαλε στη μελέτη της αμυλοειδογονικότητας ή της ‘τάσης προς συσσωμάτωση’, καθώς υπήρξαν το υπόβαθρο για την ανάπτυξη δυναμικών και αποτελεσματικών υπολογιστικών μεθόδων. Ο Πίνακας 6 καταγράφει όλα τα διαθέσιμα σύνολα δεδομένων της αμυλοειδογονικότητας.

Μία πρώιμη μορφή συλλογής αμυλοειδογόνων πεπτιδίων σχεδιάστηκε από τους **Lopez de la Paz και Serrano το 2003** (Lopez de la Paz and Serrano, 2004), με τη συστηματική αντικατάσταση αμινοξικών καταλοίπων και τον *de novo* σχεδιασμό αμυλοειδογόνων πεπτιδίων. Οι ερευνητές χρησιμοποιώντας ως βάση το πεπτίδιο STVIIIE πραγματοποίησαν αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων σε μία προσπάθεια να καταγραφούν οι αμυλοειδογόνες ιδιότητες όλων των γνωστών αμινοξέων και να δοθεί φως στις αρχές τις αμυλοειδογονικότητας. Δύο ακόμα σύνολα αμυλοειδογόνων πεπτιδίων-αναλόγων δημιουργήθηκαν για την αξιολογήση της μεθόδου 3D profile (Thompson *et al.*, 2006). Το σύνολο **AmylHex** περιλαμβάνει αμυλοειδογόνα εξαπεπτίδια από τις πρωτείνες ινσουλίνη, β₂-μικροσφαιρίνη, αμυλίνη και ταυ, ενώ το σύνολο **AmylFrag** συγκεντρώνει πειραματικά επιβεβαιωμένα αμυλοειδογόνα πεπτίδια από τη βιβλιογραφία (Goldschmidt *et al.*, 2010). Τέλος, η **AmyloBase** (Belli *et al.*, 2011) παρουσιάστηκε ως ένα σύνολο που περιλαμβάνει μία λίστα, πειραματικά προσδιορισμένων δεδομένων που σχετίζονται με τη δημιουργία ολιγομερών ή αμυλοειδών ινιδίων και δημιουργήθηκε με στόχο να υποστηρίξει την ανάπτυξη νέων μεθόδων.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι, και άλλα σύνολα δεδομένων, βασισμένα σε διαφορετικές στρατηγικές, έχουν δημιουργηθεί για την υποστήριξη πολλών προγνωστικών μεθόδων [Pafig (Tian *et al.*, 2009), TANGO (Linding *et al.*, 2004), AGGREGSCAN (de Groot *et al.*, 2012), AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013)]. Τα σύνολα αυτά, παρότι είναι συνήθως ‘κρυφά’ στοιχεία των υπολογιστικών μεθόδων, μπορεί να αποδειχθούν εξαιρετικά σημαντικά εργαλεία για τους ερευνητές.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Πίνακας 6. Σύνολα δεδομένων αμυλοειδογονικότητας. Δίνεται σύντομη περιγραφή των περιεχομένων κάθε συνόλου δεδομένων, καθώς και η δημοσιευμένη εργασία από την οποία προέκυψαν.

Σύνολο δεδομένων	Περιγραφή	Αναφορά
Συλλογή Lopez de la Paz	Παραλλαγές – μεταλλαγές στο πεπτιδίου STVIEE	(Lopez de la Paz and Serrano, 2004)
AmylHex	158 πειραματικά προσδιορισμένα πεπτίδια από τις πρωτεΐνες ινσουλίνη, β ₂ -μικροσφαιρίνη, αμυλίνη και ταυ; 67 αμυλοειδογόνα και 91 μη-αμυλοειδογόνα	(Thompson <i>et al.</i> , 2006)
AmylFrag	45 πειραματικά προσδιορισμένα αμυλοειδογόνα πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνών	(Thompson <i>et al.</i> , 2006)
AmyloBase	Πειραματικά προσδιορισμένα δεδομένα κινητικής της δημιουργίας ολιγομερών ή αμυλοειδών ινιδίων	(Belli <i>et al.</i> , 2011)
Hexpepset	2452 εξαπεπτίδια: 1226 αμυλοειδογόνα 1226 μη-αμυλοειδογόνα	(Tian <i>et al.</i> , 2009)
TANGO Dataset	71 πεπτίδια από τις πρωτεΐνες prion, λυσοζύμη και β ₂ -μικροσφαιρίνη	(Fernandez-Escamilla <i>et al.</i> , 2004)
AGGRESCAN Dataset	160 σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες; 51 εγγενώς μη δομημένες πρωτεΐνες; 38 σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται σε βακτηριακά κύτταρα; 121 πρωτεΐνες που σχηματίζουν πρωτεϊνικά έγκλειστα και υπερεκφράζονται στα βακτηριακά κύτταρα; 57 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες	(de Groot <i>et al.</i> , 2012)
AMYL PRED Dataset	12 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες με γνωστές –κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες– δομές, που εκθέτουν πειραματικά και υπολογιστικά προσδιορισμένα αμυλοειδογόνα τμήματα	(Tsolis <i>et al.</i> , 2013), (Frousios <i>et al.</i> , 2009)

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.4.2. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών

Οι **βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών** αποτελούν βιβλιοθήκες αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων, που επιτρέπουν την εξόρυξη της πληροφορίας σε εξειδικευμένους χρήστες (Citron *et al.*, 1992). Ο Πίνακας 7 καταγράφει συγκεντρωτικά τις βάσεις δεδομένων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, τον σύνδεσμο του εξυπηρετητή τους, τη διαθεσιμότητα της βάσης, καθώς και μία σύντομη περιγραφή.

Η πρώτη σημαντική προσπάθεια, να συγκεντωθεί η πληροφορία σε επίπεδο αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, ήταν η βάση **fibril_one**, που δημοσιεύτηκε το 2002 (Siepen and Westhead, 2002), όμως σήμερα δεν είναι διαθέσιμη. Η βασική ιδέα πίσω από τη δημιουργία της ήταν βασισμένη στον τρόπο με τον οποίο διαφορετικές μεταλλάξεις επηρεάζουν την ινιδόγνεση των 22 γνωστών τότε αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η βάση περιείχε σχεδόν 250 μεταλλαγές και 50 διαφορετικές πειραματικές συνθήκες που σχετίζονταν με τις 22 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες.

Μία μεγάλης κλίμακας ανάλυση πραγματοποιήθηκε στη βάση **AMYpdb** (Pawlicki *et al.*, 2008). Η βάση δεδομένων είναι μία βιβλιοθήκη 31 επιλεγμένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών οικογενειών, η οποία εξυπηρετεί στην *in silico* καταγραφή του αμυλοειδογόνου προφίλ 600 διαφορετικών οργανισμών. Η ιδέα ότι η τάση για δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων βρίσκεται ‘κρυμμένη’ στην αμινοξική ακολουθία επέτρεψε την ανάπτυξη μιας συλλογής δεδομένων που βασίζεται σε γνωστά μοτίβα της βάσης PROSITE (Sigrist *et al.*, 2002). Κάθε εγγραφή αναλύεται συστηματικά και σχολιάζεται, ενώ περιλαμβάνει και μία λίστα από πρωτεϊνικές ακολουθίες που ταιριάζουν με το PROSITE μοτίβο των πρόδρομων πρωτεϊνικών μορίων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της βάσης είναι το προνόμιο του χρήστη να δημιουργεί υποσύνολα πρωτεϊνών και να αλληλεπιδρά διαδραστικά με τη βάση.

Η ιδέα της αποκρυπτογράφησης των παραγόντων που είναι υπεύθυνοι να οδηγούν μία πρωτεΐνη στην αμυλοειδογόνο κατάσταση επέτρεψε στον Goldschmidt και τους συνεργάτες του να παρουσιάσουν το 2009 το **Amylome**, μία συλλογή που αποκάλεσαν ‘**κόσμο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**’ (*the “universe” of amyloidogenic proteins*) και την κατέθεσαν στη βάση δεδομένων **ZipperDB** (Goldschmidt *et al.*, 2010). Η συγκεκριμένη βάση δημιουργήθηκε για να αποθηκεύσει μία μεγάλης κλίμακας ανάλυση της αμυλοειδογονικότητας διαφορετικών γονιδιωμάτων, καθώς τα δεδομένα της συλλογής προέκυψαν από την πρόγνωση του αμυλοειδογόνου προφίλ πρωτεωμάτων 76 διαφορετικών οργανισμών. Οι εγγραφές της βάσης είναι πρωτεΐνες οι οποίες αναλύονται σε

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

αλληλοεπικαλυπτόμενα εξαπεπίδια, για τα οποία καταγράφεται η πιθανότητα να συμμετέχουν στη δημιουργία ενός στερεοδιαταξικού φερμουάρ (Sawaya *et al.*, 2007) (1.3.2). Η βάση υπήρξε η πρώτη προσέγγιση που χρησιμοποίησε τη δομική πληροφορία για να προβλέψει πεπτιδικά τμήματα με τάση να αυτοσυγκροτούνται προς το σχηματισμό του πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων. Ο χρήστης μπορεί εύκολα να πλοηγηθεί στη βάση κάθε γονιδιώματος και να καταθέσει επερωτήματα χρησιμοποιώντας το όνομα της πρωτεΐνης, μία πεπτιδική αλληλουχία ή το όνομα του γονιδιώματος.

Τέλος, μία εξειδικευμένη βάση κατηγοριοποίησης των τρισδιάστατων σχημάτων των αμυλοειδών ινιδίων σε ατομικό επίπεδο δημιουργήθηκε από τον Smaoui και του συνεργάτες του (Smaoui *et al.*, 2013). Η βάση **CreateFibril** είναι μία υπολογιστική προσπάθεια συγκέντρωσης των τρισδιάστατων δομών πολυμορφικών ολιγομερών ή ινιδίων της πρωτεΐνης HET-s, του Αβ πεπτιδίου και της αμυλίνης. Η βιβλιοθήκη των διαθέσιμων δομών παρέχει πρότυπες στερεοδιατάξεις οι οποίες καταγράφουν σε ατομικό επίπεδο τα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων.

Πίνακας 7. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.

Βάση	Περιγραφή	URL	Διαθεσιμότητα	Αναφορά
fibril_one	250 μεταλλαγές και 50 πειραματικές συνθήκες που σχετίζονται με 22 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες	http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/group/online/fibril_one	-	(Siepen and Westhead, 2002)
AMYPdb	31 επιλεγμένες αμυλοειδογόνες πρωτεϊνικές οικογένειες και τα χαρακτηριστικά μοτίβα της αμινοξικής ακολουθίας τους σε 600 οργανισμούς	http://amypdb.genouest.org/e107_plugins/amypdb_project/project.php	✓	(Pawlicki <i>et al.</i> , 2008)
ZipperDB	Αμυλοειδογόνο προφίλ 76 διαφορετικών γονιδιωμάτων	https://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/	✓	(Goldschmidt <i>et al.</i> , 2010)
CreateFibril	Τρισδιάστατα μοντέλα ινιδίων της πρωτεΐνης HET-s, του πεπτιδίου Αβ και της αμυλίνης	http://amyloid.cs.mcgill.ca/database/index.html	✓	(Smaoui <i>et al.</i> , 2013)

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.4.3. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων

Πολλές βάσεις βιολογικών δεδομένων είναι αφιερωμένες σε μικρά πρωτεϊνικά τμήματα τα οποία αποτελούν τους πυρήνες της ινιδιογένεσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, καθώς εμφανίζουν εγγενώς την τάση να οδηγούν μία φυσιολογική πρωτεΐνη στην αμυλοειδή κατάσταση (Teng and Eisenberg, 2009). Οι **βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων** συγκεντώνονται στον Πίνακα 8.

Η βάση **WALTZ-DB** (Beerten *et al.*, 2015) είναι μία αναλυτική συλλογή δεδομένων αμυλοειδογόνων και μη-αμυλοειδογόνων εξαπεπτιδίων, η οποία κατασκευάστηκε από τους δημιουργούς του αλγορίθμου Waltz (Maurer-Stroh *et al.*, 2010). Η βάση αυτή συγκεντρώνει πειραματικά επιβεβαιωμένα εξαπεπτίδια σε μία λεπτομερή και εκτεταμένη συλλογή. Τα εξαπεπτίδια, που έχουν συγκεντρωθεί από διάφορες πηγές, σχολιάζονται λεπτομερώς καθώς καταγράφεται η αμυλοειδογόνος τάση τους με την παρουσίαση των διαθέσιμων πειραματικών δεδομένων, ενώ συμπεριλαμβάνεται και ο δομικός χαρακτηρισμός τους με βάση την ταξινόμηση των στερεοδιαταξικών φερμουάρ του Eisenberg (Eisenberg and Jucker, 2012) (1.3.2). Η πρόσβαση των χρηστών στην πειραματική πληροφορία που συνοδεύει κάθε εγγραφή επιτρέπει στους ερευνητές να αξιολογήσουν ανεξάρτητα την πληροφορία των δεδομένων της βάσης.

Μία ακόμη σημαντική βάση στο πεδίο της μελέτης των αμυλοειδογόνων πεπτιδίων είναι η συλλογή που δημιουργήθηκε για να συγκεντρώσει όλες τις αμυλοειδογόνες ακολουθίες, σε μία κοινή πλατφόρμα. Η βάση **AmyLoad** συγχώνευσε τις διαθέσιμες αμυλοειδογόνες και μη-αμυλοειδογόνες ακολουθίες σε μία προσπάθεια να συγκεντρώσει όλα εκείνα τα πεπτιδικά τμήματα που σχετίζονται με την αμυλοειδογονικότητα (Wozniak and Kotulska, 2015). Οι εμπνευστές της έκαναν ιδιαίτερες προσπάθειες να συνενώσουν τα σύνολα επαλήθευσης (validation datasets) διαφορετικών μεθόδων πρόγνωσης (AGGRESCAN (Conchillo-Sole *et al.*, 2007), TANGO (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004), AmylHex και AmylFrag (Goldschmidt *et al.*, 2010)) μαζί με δεδομένα που συγκέντρωσαν από τη βιβλιογραφία. Οι εγγραφές είναι εύκολα προσβάσιμες και η πληροφορία είναι προσεκτικά οργανωμένη, ενώ οι διασυνδέσεις με άλλες διαθέσιμες βάσεις και υπολογιστικές μεθόδους συνθέτουν ένα εύκολο για το χρήστη περιβάλλον εργασίας. Για παράδειγμα, για ένα συγκεκριμένο πεπτίδιο, οι ερευνητές μπορούν να αποκτήσουν σε βάθος πληροφορία, για την πειραματική προετοιμασία του δείγματος ή το όνομα της ασθένειας στην οποία εμπλέκεται η κάθε εγγραφή. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα για την επιστημονική κοινότητα

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

είναι η διαθεσιμότητα της πειραματικής μεθοδολογίας, η οποία χρησιμοποιείται για την εξακρίβωση της αμυλοειδογονικότητας της κάθε εγγραφής.

Πηγαίνοντας ένα βήμα παραπέρα, ο Thangakani και οι συνεργάτες του αναγνωρίζοντας το ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον των ερευνητών για την πρωτεϊνική συσσωμάτωση, ανέπτυξαν της βάση **Curated Protein Aggregation Database (CPAD)** (Thangakani *et al.*, 2016). Η βάση επιχείρησε να συγκεντρώσει την πρόσφατη πληροφορία στο πεδίο της συσσωμάτωσης και έτσι η συλλογή των πεπτιδίων σχετίζεται είτε με τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων είτε με τη δημιουργία άμορφων συσσωματωμάτων. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε ένα διαχωρισμός μεταξύ πεπτιδίων που σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια και άμορφα ή μη-αμυλοειδογόνα πεπτιδία, ενώ είναι διαθέσιμη και πρόσθετη δομική πληροφορία για τα πεπτιδία με γνωστή τρισδιάστατη δομή στη βάση PDB (Rose *et al.*, 2017).

Πίνακας 8. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων.

Βάση	Περιγραφή	URL	Διαθεσιμότητα	Αναφορά
WALTZ-DB	Πειραματικά προσδιορισμένα αμυλοειδογόνα και μη-αμυλοειδογόνα εξαπεπτιδία	http://waltzdb.s witchlab.org/	✓	(Beerten <i>et al.</i> , 2015)
AmyLoad	Αμυλοειδογόνα και μη-αμυλοειδογόνα πρωτεϊνικά τμήματα, πειραματικά ή υπολογιστικά προσδιορισμένα	http://comprec- lin.iiar.pwr.edu. pl/amyload	✓	(Wozniak and Kotulska, 2015)
CPAD	Πεπτιδία που σχετίζονται με τη δημιουργία άμορφων συσσωματωμάτων ή αμυλοειδών ινιδίων	http://www.iitm. ac.in/bioinfo/CP AD/	✓	(Thangakani <i>et al.</i> , 2016)

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.6.4.4. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδώσεων

Σύμφωνα με τη δημοσίευση της Διεθνούς Ένωσης των Αμυλοειδώσεων οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες μπορεί να οδηγούν στην εμφάνιση διακριτών αμυλοειδώσεων ή να παίζουν σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες ή να επάγουν ενδοκρινείς αντιδράσεις (Sipe *et al.*, 2016). Έτσι, οι αμυλοειδώσεις συγκροτούν μία εξαιρετικά ετερογενή λίστα από ασθένειες η οποίες ταξινομούνται σε εντοπισμένες ή συστημικές, πρωτογενείς ή δευτερογενείς, μεσενχυματικές ή παρενχυματικές (Pepys, 2006). Ο Πίνακας 9 συγκεντρώνει όλες τις διαθέσιμες **βάσεις δεδομένων αμυλοειδώσεων** και καταγράφει τα χαρακτηριστικά τους.

Η κληρονομούμενη αμυλοείδωση είναι ο τύπος της αμυλοείδωσης που προκαλείται από την μεταβίβαση ενός συγκεκριμένου γονιδίου στην επόμενη γενιά. Η βάση **Mutations in Hereditary Amyloidosis database** (Rowczenio *et al.*, 2014) συνενώνει την ανάγκη της επιστημονικής κοινότητας για πρόσβαση στην πληροφορία των φαινοτύπων που προκαλούν νέες μεταλλαγές στις κληρονομούμενες αμυλοειδώσεις. Η βάση περιέχει πληροφορία για γονίδια που σχετίζονται με διαφορετικές μορφές αμυλοειδώσεων και ενισχύεται με μία σύντομη περιγραφή σχετικά με τον κλινικό φαινότυπο ή την εθνικότητα του ασθενούς, επιτρέποντας μία πιο ολοκληρωμένη κατανόηση της σχέσης μεταξύ των γονιδίων και του γνωρίσματος της κάθε ασθένειας. Η διασύνδεση της βάσης με άλλες πηγές όπως η Medline (Wood, 1994) και η OMIM (Hamosh *et al.*, 2005) βοηθούν στη γεφύρωση της κλινικής εικόνας με την διαθέσιμη μοριακή γνώση.

Αντίθετα, λίγες μόνο βάσεις έχουν σχεδιαστεί για να συγκεντρώνουν τη γνώση συγκεκριμένων διαταραχών που σχετίζονται με το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων. Η αμυλοείδωση τη ελαφριάς αλυσίδας (Light chain amyloidosis (or AL amyloidosis)) είναι η πιο κοινή συστημική αμυλοείδωση (Sanchorawala, 2006). Η εμφάνιση της παθολογικής αυτής κατάστασης στον αναπτυγμένο κόσμο ήταν η αφορμή για τη δημιουργία της βάσης ALBase (Bodi *et al.*, 2009), μίας συλλογής 4364 νουκλεοτιδικών και αμινοξικών ακολουθιών ελαφριών αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης από ασθενείς.

Ακόμα, οι βάσεις AlzGene (Bertram *et al.*, 2007), PDGene (Lill *et al.*, 2012) και PDbase (Yang *et al.*, 2009) είναι εξειδικευμένες βάσεις της ασθένειας του Alzheimer και του Parkinson. Οι νευροεκφυλιστικές αυτές ασθένειες απαντώνται ευρέως και είναι υπεύθυνες για χιλιάδες θανάτους ανά τον κόσμο τις τελευταίες δεκαετίες. Οι AlzGene και PDGene συγκεντρώνουν όλες τις μελέτες με γενετικό υπόβαθρο στο πεδίο της ασθένειας του

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Alzheimer και του Parkinson αντίστοιχα, ενώ η βάση PDbase παρουσιάζει μία σε βάθος συλλογή των μοριακών χαρακτηριστικών που διέπουν τη συσσωμάτωση στην ασθένεια του Parkinson.

Πίνακας 9. Βάσεις δεδομένων αμυλοειδώσεων.

Βάση	Περιγραφή	URL	Διαθεσιμότητα	Αναφορά
Mutations in Hereditary Amyloidosis	Μεταλλαγές σε κληρονομούμενες αμυλοειδώσεις που σχετίζονται με 8 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες	www.amyloidosismutations.com	✓	(Rowczenio <i>et al.</i> , 2014)
ALBase	Νουκλεοτιδικές και αμινοξικές ακολουθίες της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης από ασθενείς με αμυλοείδωση της ελαφριάς αλυσίδας	http://albase.bu-mc.bu.edu/aldb/	✓	(Bodi <i>et al.</i> , 2009)
AlzGene	Γενετικές μελέτες στον κλάδο της νόσου του Alzheimer	http://www.alzgene.org/	✓	(Bertram <i>et al.</i> , 2007)
PDGene	Γενετικές μελέτες στον κλάδο της νόσου του Parkinson	http://www.pdgene.org/	✓	(Lill <i>et al.</i> , 2012)
PDbase	Γονίδια και γονιδιακά προϊόντα της νόσου του Parkinson	http://bioportal.kobic.re.kr/PDbase/	-	(Yang <i>et al.</i> , 2009)
AD&FTDMD	Μεταλλαγές της νόσου του Alzheimer και άλλων μετοπιαίων διαταραχών που περιγράφονται στη βιβλιογραφία	http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/	✓	(Cruts <i>et al.</i> , 2012)
Amyloidosis Foundation	Ανεπίσημα δεδομένα για επιλεγμένες μορφές αμυλοειδώσεων	http://www.amyloidosis.org/	✓	-
ProADD	Πληροφορίες για πρωτεΐνες που σχετίζονται με 12 διαταραχές συσσωμάτωσης	http://bicmku.in/ProADD	✓	(Shobana and Pandaranayaka, 2014)

Μία άλλη προσέγγιση για την ασθένεια του Alzheimer υπάρχει διαθέσιμη στη βάση Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database (AD&FTDMD)

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

(Cruts *et al.*, 2012), μία πλατφόρμα που στοχεύει στη συλλογή γνωστών γονιδιακών μεταλλαγών που σχετίζονται με την ασθένεια του Alzheimer και άλλες μορφές άνοιας. Τέλος η βάση **Amyloidosis foundation** (Eisenberg and Jucker, 2012), γνωστή κυρίως ως ένας χώρος συζητήσεων (*forum*) παρά ως βάση δεδομένων, περιέχει ανεπίσημη πληροφορία για επιλεγμένες μορφές αμυλοειδώσεων με στόχο την ευαισθητοποίηση του κοινού στις σπάνιες αυτές παθολογικές καταστάσεις.

Σε αντίθεση με τις παραπάνω εξειδικευμένες βάσεις η βάση **ProADD** συγκεντρώνει πληροφορίες περίπου 600 πρωτεϊνών που σχετίζονται εν γένει με την πρωτεϊνική συσσωμάτωση (Shobana and Pandaranayaka, 2014). Παρότι ο αντίκτυπος της εμφάνισης των αμυλοειδώσεων παγκοσμίως, επισκίασε τη σημασία σημαντικών διαταραχών που προκαλούνται από την πρωτεϊνική συσσωμάτωση, μία μεγάλη ποικιλία ασθενειών βρέθηκε ότι σχετίζεται με την εναπόθεση άμορφων συσσωματωμάτων. Οι πρωτεΐνες της βάσης σχολιάζονται και κατηγοριοποιούνται ως αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες, άμορφα συσσωματώματα ή εγγενώς μη δομημένες πρωτεΐνες με δεδομένα που συγκεντρώνονται από τη βιβλιογραφία ή με τη χρήση διαθέσιμων προγνωστικών αλγορίθμων.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

1.7. Στόχοι της Διδακτορικής Διατριβής

Η λεπτομερής κατανόηση της διαδικασίας της αυτοσυγκρότησης των πρωτεϊνών σε αμυλοειδή ινίδια, είναι πεδίο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, λόγω της άρρηκτης σχέσης των ινδιακών εναποθέσεων με κρίσιμες παθολογικές καταστάσεις, τις αμυλοειδώσεις. Το θεωρητικό υπόβαθρο των ιδιοτήτων, των μηχανισμών, καθώς και των χαρακτηριστικών των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, που παρουσιάστηκε συνοπτικά στις ενότητες που προηγήθηκαν, επισημαίνει τα αναπάντητα ερωτήματα που χρειάζεται να διαλευκανθούν σχετικά με τη μελέτη της αμυλοειδογονικότητας.

Η ομάδα των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων στο άνθρωπο είναι **ένα ετερογενές σύνολο πρωτεϊνών με σημαντικές διαφορές στην αμινοξική τους σύσταση, τη τριτοταγή δομή τους, αλλά και τη λειτουργία τους**. Ο επίσημος αριθμός των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών ανανεώνεται συνεχώς και γι' αυτό, ολοένα και περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια ενοχοποιούνται για τα κλινικά συμπτώματα ασθενειών, καθώς εντοπίζονται με τη μορφή αμυλοειδών ινιδίων. **Σημαντικός στόχος** στην παρούσας διατριβή υπήρξε **η εξόρυξη όλων των διαθέσιμων δεδομένων της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης του ανθρώπου και η εκτενής καταγραφή και κατηγοριοποίησή τους**. Επιμέρους στόχος υπήρξε **η 'μακροσκοπική' ανάλυση των συσχετίσεων του παραπάνω ετερόκλητου συνόλου δεδομένων, η οποία επιτεύχθηκε με την υπολογιστική δημιουργία ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών, που σχετίζονται με τη δημιουργία και την εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων, σε παθολογικές καταστάσεις**.

Μία από τις σημαντικότερες ιδέες στην πειραματική μελέτη της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης είναι ότι η αμυλοειδογονικότητα μπορεί να βρίσκεται 'κρυμμένη' σε μικρά πεπτιδικά τμήματα που χαρακτηρίζονται ως **'αμυλοειδογόνοι καθοριστές'**, συμμετέχουν ενεργά στον πολυμερισμό των πρωτεϊνών σε ινίδια και κατ' επέκταση στην εμφάνιση αμυλοειδώσεων. **Κύριος στόχος** στην διατριβή υπήρξε **ο εντοπισμός αμυλοειδογόνων καθοριστών** σε σημαντικούς εκπροσώπους της ομάδας των ανθρώπινων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, όπως η κυστατίνη C και η αμυλίνη, **η πειραματική επιβεβαίωση των ιδιοτήτων τους και η αποσαφήνιση της συνεισφοράς τους στο μηχανισμό αυτοσυγκρότησης των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**.

Κεφάλαιο I – Εισαγωγή

Η ιδέα ότι ο σχηματισμός αμυλοειδών ινιδίων είναι μία εγγενής ιδιότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες επέτρεψε τη πειραματική αποσαφήνιση των ιδιοτήτων και των μηχανισμών αυτοσυγκρότησης του C-πεπτιδίου, της α-αλυσίδας της κλαστερίνης και της στεφίνης A, ενώ ως επόμενος στόχος της διατριβής τέθηκε η μελέτη πεπτιδίων και πρωτεϊνών, που δεν έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με την εμφάνιση αμυλοειδών ινιδίων. Αποδεικνύεται βιβλιογραφικά ότι η δημιουργία οργανωμένων – και όχι άμορφων – συσσωματωμάτων είναι μία ιδιότητα που δεν είναι αυστηρά συνδεδεμένη μόνο με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την πρόκληση συγκεκριμένων παθολογικών καταστάσεων. Επομένως, βασική επιδίωξη υπήρξε η ανάδειξη των αμυλοειδογόνων χαρακτηριστικών νέων πρωτεϊνών που έχουν άμεση συσχέτιση με επιβεβαιωμένα αμυλοειδογόνα πρωτεϊνικά μόρια.

Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών και των πειραματικών προσεγγίσεων της διδακτορικής διατριβής, καθώς και η αποτίμηση αυτών, παρουσιάζονται στις ενότητες που ακολουθούν. Συνολικά, η παρούσα διατριβή άπτεται των σύγχρονων ερωτημάτων της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης, εν γένει, και προσπαθεί να αποκρυπτογραφήσει τους κανόνες της αμυλοειδογονικότητας, τόσο ‘μακροσκοπικά’ σε ένα σύνολο ετερόκλητων πρωτεϊνών, όσο και ‘μικροσκοπικά’ με στοχευμένες πειραματικές μελέτες σε επιλεγμένα πρωτεϊνικά μόρια. Απώτερος στόχος είναι η εύρεση του κοινού παρονομαστή που οδηγεί από το μη-φυσιολογικό δίπλωμα των πρωτεϊνών, στην εναπόθεση αδιάλυτων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, δηλαδή αμυλοειδών ινιδίων.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Κεφάλαιο II

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συστηματική Μελέτη Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών

Τα **βιολογικά δίκτυα** είναι σημαντικά εργαλεία υπολογιστικής ανάλυσης που καλούνται να απαντήσουν σε ερωτήματα στα πεδία της Βιολογίας και της Ιατρικής έρευνας. Χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό φαρμακευτικών-στόχων, τον καθορισμό της λειτουργίας πρωτεϊνών και γονιδίων, καθώς και το σχεδιασμό στρατηγικών για την έγκαιρη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών. Μία κατηγορία βιολογικών δικτύων, τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, μπορούν να αποκαλύψουν τον τρόπο με τον οποίο διαφορετικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν για την πραγματοποίηση βιολογικών διεργασιών στο εσωτερικό του κυττάρου και να αποτελέσουν μια πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την κατανόηση της λειτουργικής οργάνωσης του πρωτεώματος. Παρόλο που για την πλειοψηφία των πρωτεϊνών η αμινοξική ακολουθία είναι γνωστή, η μοριακή λειτουργία τους παραμένει άγνωστη, γεγονός που αποτελεί σημαντική τροχοπέδη στην βιοπληροφορική έρευνα. **Η μελέτη και η ανάλυση δικτύων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην επιτυχή αντιμετώπιση του συγκεκριμένου προβλήματος, καθώς μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό πιθανών πρωτεϊνικών σύμπλοκων ή στη**

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

συσχέτιση τους με ασθένειες και να αποτελέσει εφελτήριο για νέες πειραματικές προσεγγίσεις .

Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών αποτελούν ένα πεδίο αμείωτου ενδιαφέροντος για τους ερευνητές, καθώς παίζουν κομβικό ρόλο στη διεξαγωγή, αλλά και στη ρύθμιση όλων των βιολογικών διεργασιών. Με τον όρο ‘αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών’ αναφερόμαστε σε ασθενείς, μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, που ορίζουν τις ‘επαφές’ των πρωτεϊνικών μορίων και επιτρέπουν τη δημιουργία, συνήθως, φυσιολογικών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Ένας τύπος **μη-φυσιολογικής αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-πρωτεϊνών**, η πρωτεϊνική συσσωμάτωση, περιγράφει τη διαδικασία κατά την οποία μη-φυσιολογικά διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια αλληλεπιδρούν, σχηματίζοντας σύμπλοκα, που αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, στη μη φυσιολογική αλληλεπίδραση επικρατούν σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που αδυνατούν να αποκτήσουν ή/και να διατηρήσουν τη φυσιολογική τους στερεοδιάταξη και οδηγούνται σε ένα εναλλακτικό μη-κανονικό δίπλωμα της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας στο χώρο. Ως συνέπεια του γεγονότος αυτού, μη-φυσιολογικά διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια που αλληλεπιδρούν, μπορεί να οδηγηθούν είτε στη δημιουργία άμορφων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, είτε να διπλωθούν και να αυτοσυγκροτηθούν σε ινίδια, με χαρακτηριστικές ιδιότητες, τα αμυλοειδή ινίδια.

2.1.1. Εξόρυξη του συνόλου δεδομένων της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης

Η συλλογή του συνόλου δεδομένων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών προέκυψε από την καταγραφή όλων των πρωτεϊνικών μορίων που σχετίζονται με την εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων, *in vivo* ή *in vitro* στη βιβλιογραφία (Φεβρουάριος 2016). Βασικό κριτήριο για τη επιλογή των πρωτεϊνών αυτών ήταν **η πειραματική επιβεβαίωση της αμυλοειδογονικότητάς τους**. Αρχικά, προστέθηκαν πρωτεΐνες από την επίσημη λίστα της Διεθνούς Ένωσης των Αμυλοειδώσεων (<http://www.amyloidosis.nl/>), που δημοσιεύτηκε το 2014 και αριθμούσε 30 προδρόμους ανθρώπινων πρωτεϊνών και 1 πεπτιδικό αντιρετροϊκό φάρμακο (1.6.1).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται συγκεντρωμένες στη βιβλιογραφική αυτή πηγή σχετίζονται με την *in vivo* εξωκυτταρική εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων, η οποία επηρεάζει έναν ή περισσότερους ιστούς ή όργανα, ενώ περιλαμβάνει και μία λίστα **6 ανθρώπινων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ενδοκυτταρική δημιουργία έγκλειστων**, δηλαδή σφαιρικών, οργανωμένων συσσωματωμάτων ινιδίων (Sipe *et al.*, 2014). Από το παλαιότερο άρθρο ανασκόπησης του Harrison και των συνεργατών του, προστέθηκαν **ανθρώπινες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων** (Harrison *et al.*, 2007), ενώ αντίστοιχες πρωτεΐνες εντοπίστηκαν από το άρθρο ανασκόπησης του Uversky και των συνεργατών του (Uversky *et al.*, 1999), καθώς και από τη βάση δεδομένων AmyLoad (Wozniak and Kotulska, 2015). Τέλος καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες από τη βάση UniProtKB (UniProt, 2015) προέκυψαν έπειτα από εξειδικευμένα ερωτήματα στην αυτοματοποιημένη μηχανή αναζήτησης της βάσης. Τελικά, το σύνολο δεδομένων, που παρουσιάζει ο Πίνακας 11, αριθμεί **145 μοναδικές εγγραφές ανθρώπινων, προδρόμων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (*non-redundant amyloidogenic protein precursors*) με μοναδικές εγγραφές στη βάση UniProtKB και χαρακτηριστικούς κωδικούς καταχώρησης (*Accession Number – AC*).**

Η καταγραφή όλων των διαθέσιμων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων επέτρεψε την κατηγοριοποίηση τους σε τρεις διακριτές κατηγορίες:

αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων: είναι πρόδρομοι πρωτεϊνών ή πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνών που αυτοσυγκροτούνται προς το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων, επηρεάζοντας έναν ή περισσότερους ιστούς ή όργανα στον άνθρωπο

αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων: είναι πρόδρομοι πρωτεϊνών ή πεπτιδικά τμήματα πρωτεϊνών που αυτοσυγκροτούνται προς το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων **σε πειραματικό επίπεδο**. Οι πρωτεΐνες που αναφέρονται σε αυτή την κατηγορία αφορούν αποκλειστικά τον άνθρωπο.

πρωτεΐνες που συσχετίζονται με τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων άλλων πρόδρομων αμυλοειδογόνων μορίων: για τις οποίες δεν υπάρχουν, μέχρι σήμερα, καταγεγραμμένες αμυλοειδογόνες ιδιότητες.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Πίνακας 10. Συγκεντρωτικός πίνακας των 145 μοναδικών εγγραφών των προδρόμων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (*non-redundant amyloidogenic protein precursors*). Σημειώνεται το σύνολο δεδομένων από το οποίο έχει εξαχθεί η κάθε πρωτεΐνη (με +), καθώς και η ύπαρξη ή μη πεπτιδικού αμυλοειδογόνου τμήματος της πρωτεΐνης.

Όνομα αμυλοειδογόνου πρωτεΐνης	Κωδικός UniProtKB	Σύνολο δεδομένων*					Πεπτιδικό τμήμα
		1	2	3	4	5	
4F2 cell-surface antigen heavy chain	P08195				+		✓
60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	P10155				+		✓
Acetylcholinesterase fragment	P22303		+				✓
Actin, cytoplasmic 1, ACTB, Beta-actin	P60709	+					
Actin, cytoplasmic 2, ACTG1, Gamma-actin	P63261	+					
Acylophosphatase-2	P14621				+		✓
alpha beta crystallin (ABC)	P02511				+		✓
Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 9	Q9Y231				+		✓
Alpha-galactosidase A precursor	P06280				+		✓
alpha-synuclein	P37840	+	+	+			✓
Alstrom syndrome protein 1	Q8TCU4				+		✓
Aminopeptidase N	P15144				+		✓
Amphoterin	P09429		+				✓
Amyloid beta A4 protein	P05067	+	+	+			✓
Androgen receptor protein	P10275		+	+			
Apolipoprotein A-I	P02647	+	+	+			✓
Apolipoprotein A-II	P02652	+	+				✓
Apolipoprotein A-IV	P06727	+	+				
Apolipoprotein E	P02649					+	
Apolipoprotein C-II	P02655				+		✓
Aquaporin-2	P41181				+		✓
Ataxin 1	P54253		+	+			

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Ataxin 2	Q99700					+										
Ataxin 3	P54252											+				
ATP-binding cassette sub-family A member 12	Q86UK0											+	✓			
Atrophen-1	P54259												+			
a-tubulin (Tubulin alpha-1B chain)	P68363												+	✓		
Bardet-Biedl syndrome 5 protein	Q8N3I7												+	✓		
Beta-2-microglobulin	P61769											+	+	+	✓	
Beta-hexosaminidase subunit alpha precursor	P06865													+	✓	
Bloom syndrome protein	P54132													+	✓	
CA150 (Transcription elongation regulator 1)	O14776													+	✓	
CAAX prenyl protease 1 homolog	O75844													+	✓	
Calcitonin	P01258												+	+	+	✓
Caspase-3 precursor (subunit p17)	P42574													+	✓	
Coagulation factor XIII B chain	P05160													+		
Coagulation factor XIII, A chain	P00488													+		
Collagen alpha-1	Q9BXS0														+	
Corneodesmosin	Q15517													+		
Cystatin A	P01040													+		
Cystatin B	P04080													+		
Cystatin-C	P01034													+	+	+
Cystic fibrosis transmembrane	P13569														+	✓
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	O14672														+	
DNA mismatch repair protein Mlh3	Q9UHC1														+	✓
Endostatin (Collagen alpha-1(XVIII) chain)	P39060													+		✓
Ferritin heavy chain	P02794													+		
Ferritin light chain	P02792													+		
Fibrinogen alpha chain	P02671													+	+	

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Galectin 7	P47929	+					
Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-1 precursor	P18505					+	✓
Gelsolin	P06396	+	+	+			✓
Glycophorin A	P02724					+	✓
G-protein coupled receptor 20	Q99678					+	✓
GRB2-associated-binding protein 1	Q13480					+	✓
Growth/differentiation factor 3 precursor	Q9NR23					+	✓
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5	O14775					+	✓
Histone-lysine N-methyltransferase 2C	Q8NEZ4					+	✓
Homeobox protein DLX-3	O60479					+	✓
Huntingtin (Polyq expanded)	P42858	+	+	+			
Ig gamma-1 chain C region (Immunoglobulin Heavy Chain)	P01857	+	+				
Ig kappa chain C region (Immunoglobulin Light Chain)	P01834	+	+	+			✓
Ig kappa chain V-I region BAN	P04430					+	
Ig kappa chain V-II region TEW	P01617					+	
Ig lambda chain V-I region EPS	P06888					+	
Ig lambda chain V-II region NIG-84	P04209					+	
Ig lambda chain V-IV region MOL	P06889					+	
Ig lambda chain V-VI region AR	P01721					+	
Inner nuclear membrane protein Man1	Q9Y2U8					+	✓
Insulin	P01308	+	+				
Integral membrane protein 2B	Q9Y287	+	+				✓
Integrin alpha-8 precursor (extracellular domain)	P53708					+	✓
Interleukin-31 receptor subunit alpha	Q8NI17					+	
Islet amyloid polypeptide	P10997	+	+	+			✓
Kerato-epithelin	Q15582	+	+				
Kv channel-interacting protein 1	Q9NZI2					+	✓

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Lactadherin	Q08431	+	+				✓
Lactoferrin	P02788	+	+				✓
Leukocyte cell-derived chemotaxin-2	O14960	+					
Low-density lipoprotein receptor precursor	P01130				+		✓
Lysozyme C	P61626	+	+	+			
Major prion protein	P04156	+	+	+			✓
NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	Q96P20					+	
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	P03886					+	
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	P03891					+	
Natriuretic peptides A	P01160	+	+				
Neuroserpin	Q99574	+					
Nucleophosmin	P06748				+		✓
Odontogenic ameloblast-associated protein	A1E959	+	+				✓
Oncostatin-M-specific receptor subunit beta	Q99650					+	
Origin recognition complex subunit 3	Q9UBD5				+		✓
Otoferlin	Q9HC10				+		✓
P21-ras (GTPase HRas)	P01112				+		✓
p53	P04637		+				
Plasminogen activator inhibitor 1 precursor	P05121				+		✓
Polyadenine-binding protein 2	Q86U42		+				
Polycystin-1 precursor	P98161				+		✓
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	Q10472				+		✓
POU domain, class 2 transcription factor 1	P14859				+		✓
Presenilin 1	P49768		+				✓
Presenilin 2	P49810		+				✓
Prion-like protein doppel	Q9UKY0					+	
Procarboxypeptidase A2 activation domain	P48052		+				✓

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Prolactin	P01236	+	+				✓
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 precursor	P29122				+		✓
Prosaposin receptor GPR37 precursor	O15354				+		✓
Prostatic acid phosphatase	P15309					+	✓
Protein unc-13 homolog B	O14795				+		✓
Protocadherin beta-2 precursor	Q9Y5E7				+		✓
Protocadherin-15 precursor	Q96QU1				+		✓
Pulmonary surfactant-associated protein A1	P11686	+	+				✓
Putative BPIFA4P protein precursor	Q86YQ2				+		✓
Pyrin	O15553					+	
Relaxin receptor 2	Q8WXD0				+		✓
Ribose-5-phosphate isomerase	P49247				+		✓
RNA-binding protein FUS	P35637				+		✓
RNA-binding protein Musashi homolog 1	O43347				+		✓
Rod cGMP-specific 3', 5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha precursor	P16499				+		✓
Semenogelin-1	P04279	+	+				✓
Serine/threonine-protein phosphatase 5	P53041					+	✓
Serum amyloid A-1	P0DJI8	+	+	+			✓
Serum amyloid A-2	P0DJI9	+	+	+			✓
Serum amyloid P-component	P02743					+	
Shadow of prion protein	Q5BIV9					+	
SLIT and NTRK-like protein 5 precursor	O94991				+		✓
Sortilin-related receptor	Q92673					+	
Spectrin SH3	Q13813				+		✓
Splicing factor 3A subunit 2	Q15428				+		✓
Superoxide dismutase 1	P00441		+				
TAR DNA-binding protein 43	Q13148				+		✓

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Taste receptor type 2 member 5	Q9NYW4					+		✓	
TATA-box binding protein	P20226						+		
Tau	P10636	+	+	+				✓	
Titin	Q8WZ42						+	✓	
Transportin-1	Q92973						+	✓	
Transthyretin	P02766	+	+	+					
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	P19438							+	
Tumor-associated calcium signal transducer 2	P09758							+	
Tyrosine-protein kinase Mer precursor	Q12866							+	✓
Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2 precursor	Q01974							+	✓
Unconventional myosin-XV	Q9UKN7							+	✓
YLP motif-containing protein 1	P49750							+	✓
α1 Anti-trypsin C-terminal peptides	P01009							+	✓
Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	P27986							+	✓
α1A voltage-dependent calcium channel subunit	O00555							+	

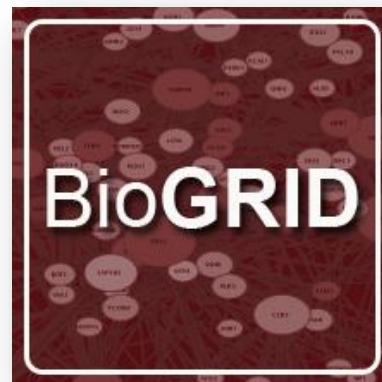
*

- Σύνολο δεδομένων 1: Sipe, *et al.* (2014) *Amyloid* 21(4):221-224;
 Σύνολο δεδομένων 2: Harisson, *et al.* (2007) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 159:1–77;
 Σύνολο δεδομένων 3: Uversky, *et al.* (1999) *Med. Sci. Monit.* 5(5): 1001-1012
 Σύνολο δεδομένων 4: Wozniak & Kotulska (2015) *Bioinformatics* 31(20):3395-3397;
 Σύνολο δεδομένων 5: UniProt Consortium (2015) *Nucl. Acids Res.* 43 (D1): D204-D212

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.1.2. Συλλογή συνόλου δεδομένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών

Οι χαρακτηριστικοί κωδικοί καταχώρησης της βάσης UniProtKB για τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Πίνακας 10) χρησιμοποιήθηκαν για τη **συλλογή δεδομένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών** από τις βάσεις IntAct (Hermjakob *et al.*, 2004), BioGRID (Stark *et al.*, 2006) και STRING (von Mering *et al.*, 2003), αντίστοιχα.



Εικόνα 31. Βάσεις δεδομένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών.

Συνοπτικά, η βάση δεδομένων **IntAct** (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>) είναι μία ελεύθερα διαθέσιμη βάση μοριακών αλληλεπιδράσεων με καλά σχολιασμένες εγγραφές που προκύπτουν από πειράματα που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία. Η βάση δεδομένων **BioGRID** (<https://thebiogrid.org/>) είναι βάση τόσο γενετικών όσο και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων διαφόρων οργανισμών, μεταξύ των οποίων και του ανθρώπου, ενώ τέλος, η βάση **STRING** (<https://string-db.org/>) συνδυάζει γνωστά δεδομένα αλληλεπιδράσεων από τις παραπάνω βάσεις, τα οποία εμπλουτίζει με πληροφορία από την εξόρυξη κειμένων (*text-mining*) καθώς και από άλλες βάσεις σημαντικής βιολογικής γνώσης, όπως π.χ. είναι οι βάσεις μοριακής σηματοδότησης. Γενικά, οι διαθέσιμες βάσεις δεδομένων αλληλεπιδράσεων **περιλαμβάνουν συνδυασμό πειραματικά προσδιορισμένων**

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

αλληλεπιδράσεων, μαζί με δεδομένα που προκύπτουν από διάφορες προγνωστικές μεθόδους (π.χ. *text-mining*).

Η εξόρυξη δεδομένων αλληλεπιδράσεων για τις 28 πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vivo* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων οδήγησε στη δημιουργία τριών ανεξάρτητων συνόλων δεδομένων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (σύνολο δεδομένων IntAct, σύνολο δεδομένων BioGRID, σύνολο δεδομένων STRING). Τα τρία αυτά ανεξάρτητα σύνολα δεν περιέχουν αναγκαστικά δεδομένα μεγάλης αξιοπιστίας, καθώς πολλές εγγραφές των βάσεων BioGRID και STRING περιέχουν ‘αλληλεπιδράσεις’ που καταγράφονται από την εξόρυξη κειμένων (*text-mining interactions*), εξαιτίας της πληθώρας των άρθρων ανασκόπησης που αφορούν τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες. Αντίθετα, οι εγγραφές της βάσης IntAct συγκεντρώνουν **καλά σχολιασμένες πειραματικά προσδιορισμένες αλληλεπιδράσεις**, οι οποίες διασφαλίζουν την ποιότητα και την συνέπεια της πληροφορίας του συνόλου δεδομένων (Licata and Orchard, 2016). Για το λόγο αυτό, **επιλέχθηκε το σύνολο δεδομένων της IntAct για την κατασκευή του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.**

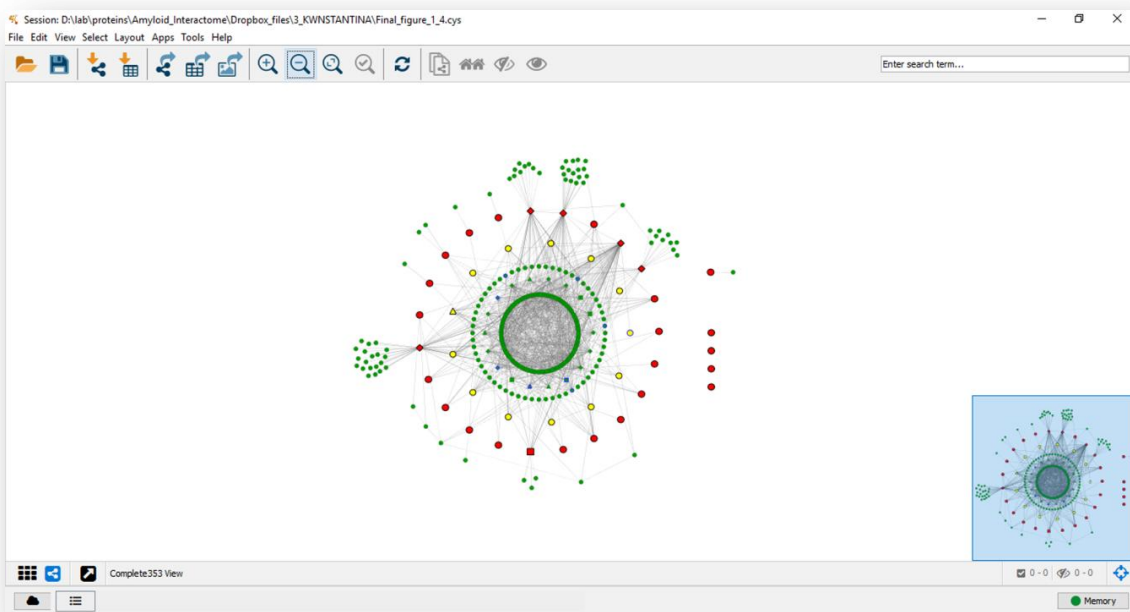
Το μη-επεξεργασμένο αρχικό σύνολο δεδομένων της IntAct επεξεργάστηκε έτσι ώστε να απομακρυνθούν μη-ανθρώπινες αλληλεπιδράσεις, καθώς και αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με τους εαυτούς τους, ενώ τέλος απομακρύνθηκαν οι αλληλεπιδράσεις με χημικά μόρια και οι κόμβοι που εμφανίζονταν πάνω από μία φορές. Το **τελικό σύνολο δεδομένων περιελάμβανε 1178 αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών** (οι μελλοντικές ακμές του δικτύου) **μεταξύ 353 ανθρώπινων πρωτεϊνών** (οι μελλοντικοί κόμβοι του δικτύου), ενώ μόνο 4 πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνονται στο σύνολο δεν εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις.

2.1.3. Οπτικοποίηση και κατασκευή του δικτύου

Η οπτικοποίηση του δικτύου, καθώς και η ανάλυσή του, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου Cytoscape 3.2.1 (Shannon *et al.*, 2003). Το εργαλείο αυτό επιτρέπει τη διαδραστική εξερεύνηση των σύνθετων βιολογικών συσχετίσεων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων ή γονιδίων, αφού αποτελεί μία ενιαία και φιλική προς το χρήστη πλατφόρμα για την οπτικοποίηση των βιολογικών δεδομένων σε ‘γράφους αλληλεπιδράσεων’ (Lotia *et al.*, 2013). Η πλατφόρμα είναι ‘λογισμικό ανοιχτού κώδικα’ (*open-source*), κάτι που εξηγεί τη

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

μεγάλη συνεισφορά των χρηστών στην ανάπτυξη εφαρμογών, οι οποίες προσδίδουν στο εργαλείο ποικίλες λειτουργικότητες.

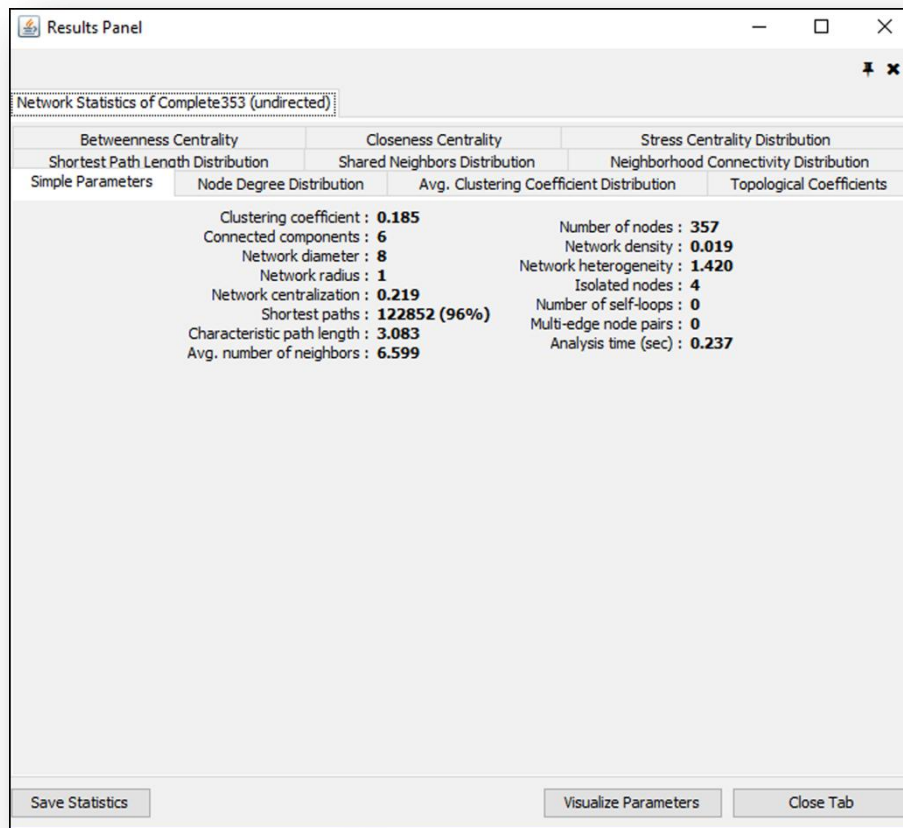


Εικόνα 32. Το περιβάλλον του λογισμικού Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).

Ρουτίνες του εργαλείου χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για τη διαχείριση, την ανάλυση, την οπτικοποίηση και την αποθήκευση των δεδομένων που αφορούν το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η ανάλυση των απλών, αλλά και των πολύπλοκων τοπολογικών παραμέτρων, που επαληθεύουν την ευρωστία και τη μαθηματική σημασία του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο NetworkAnalyzer (Assenov *et al.*, 2008). Η μέθοδος NetworkAnalyzer υπολογίζει τον αριθμό των κόμβων (*number of nodes*), την πυκνότητα του δικτύου (*network density*), την ετερογένειά του (*network heterogeneity*), τον αριθμό των κόμβων χωρίς διασυνδέσεις (*isolated nodes*), τη διάμετρο του δικτύου (*network diameter*), καθώς και παραμέτρους όπως το συντελεστή ομαδοποίησης (*clustering coefficient*), το

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

χαρακτηριστικό μήκος μονοπατιού (*characteristic path length*), και την κατανομή του βαθμού του κόμβου (*the distribution of node degrees*). Η σημασία των παραπάνω παραμέτρων περιγράφεται στις παρακάτω παραγράφους (2.1.4).



Εικόνα 33. Καρτέλα αποτελεσμάτων υπολογισμού απλών παραμέτρων της μεθόδου NetworkAnalyzer (Assenov *et al.*, 2008), όπως εμφανίζεται στο εργαλείο Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).

2.1.4. Ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων μέσω της θεωρίας γράφων

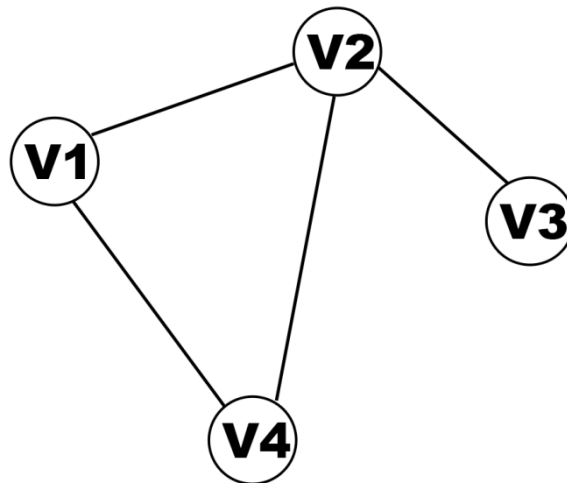
Η ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων με τεχνικές θεωρίας γράφων αφορά τον υπολογισμό **απλών και σύνθετων παραμέτρων του δικτύου**, με στόχο την εύρεση της τοπολογίας και των χαρακτηριστικών του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.

Ένα δίκτυο αντιμετωπίζεται ως ο **γράφος**

$$G = (V, E)$$

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

όπου V είναι το σύνολο των κορυφών του γράφου (κόμβοι), ενώ E είναι το σύνολο των ακμών του γράφου (συνδέσεις των κόμβων). Οι δύο όροι αντικαθιστούν ο ένας τον άλλο, καθώς ο όρος ‘γράφος’ χρησιμοποιείται για να περιγράψει μαθηματικά το δίκτυο, ενώ ο όρος ‘δίκτυο’ για να περιγράψει την εφαρμογές του (Huber *et al.*, 2007). Όταν ο παραπάνω γράφος δεν είναι διατεταγμένος ή βεβαρημένος, τότε ονομάζεται **απλός μη κατευθυνόμενος γράφος** (Εικόνα 34).



Εικόνα 34. Απλοποιημένη απεικόνιση ενός απλού, μη κατευθυνόμενου γράφου. Ο γράφος αποτελείται από 4 κόμβους (V1 – V4).

- **Γείτονες** (*neighbors*) ονομάζονται δύο κόμβοι ενός δικτύου όταν ενώνονται με μία απλή σύνδεση (π.χ. οι κόμβοι V1 και V2)
- **Βαθμός ενός κόμβου** (*node degree*) είναι ο αριθμός των συνδέσεων του κόμβου με άλλους κόμβους (π.χ. ο βαθμός του V2 ισούται με 3)
- **Συνολική συνδεσιμότητα** του δικτύου ορίζεται ως:

$$C = \frac{E}{N(N-1)}$$

όπου E είναι ο αριθμός των ακμών (Edge) και N ο αριθμός των κόμβων (Node).

Οι **ιδιότητες των δικτύων αλληλεπιδράσεων** παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την **εσωτερική οργάνωση** ενός βιολογικού δικτύου και κατ' επέκταση για την κατανομή των μορίων στις διεργασίες του κυττάρου και για τις πολύπλοκες μεταξύ τους σχέσεις. Στη συνέχεια περιγράφονται σημαντικές ιδιότητες που μελετήθηκαν στο δίκτυο των

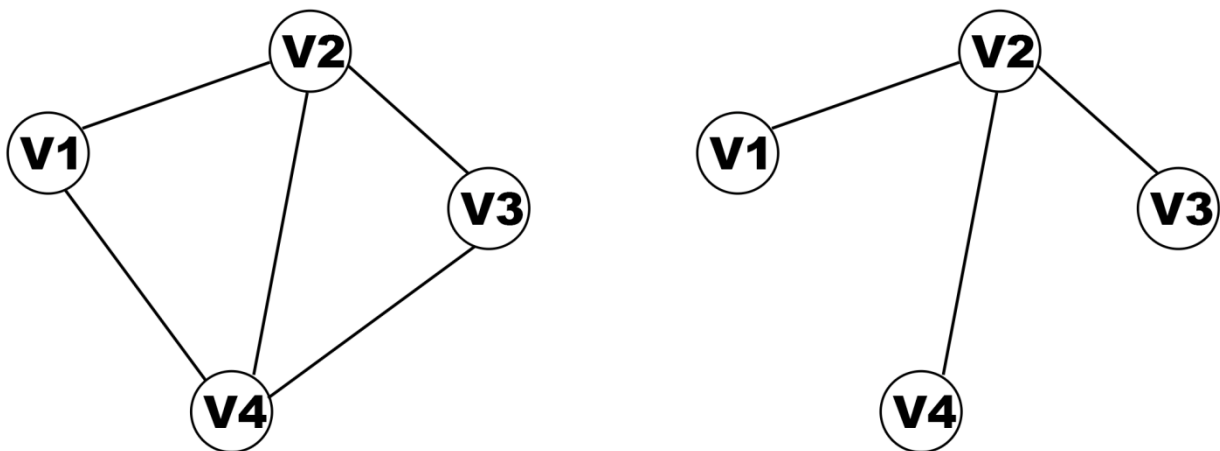
Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και καταγράφεται η σημασία τους στην ευρωστία ενός βιολογικού δικτύου.

- **Πυκνότητα δικτύου** (*network density* – D) ορίζεται το μέτρο που δείχνει πόσο αραιός ή πυκνός είναι ένας γράφος. Το μέγεθος αυτό αφορά στον αριθμό των συνδέσεων για κάθε σύνολο κόμβων και για έναν μη-κατευθυνόμενο γράφο δίνεται από τον τύπο:

$$D = \frac{2|E|}{|V|(|V| - 1)}$$

όπου $|E|$ ο αριθμός των ακμών (*Edge*) του δικτύου και $|V|$ ο αριθμός των κόμβων (*Vertice*). Αραιός είναι ένας γράφος όπου $|E| = O(|V^k|)$, όταν $2 < k > 1$. Έχει υποστηριχθεί ότι **τα βιολογικά δίκτυα είναι γενικά αραιά συνδεδεμένα**, καθώς αυτό παρέχει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα για τη διατήρηση της ευρωστίας τους (Εικόνα 35). Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί σε μια σειρά δικτύων στα οποία έχει καταγραφεί πυκνότητα μικρότερη 0.1 (Leclerc, 2008; Pavlopoulos *et al.*, 2011b).



Εικόνα 35. Απλοποιημένο παράδειγμα για τη μέτρηση της πυκνότητας δικτύου. Πυκνό δίκτυο (αριστερά), αραιό δίκτυο (δεξιά).

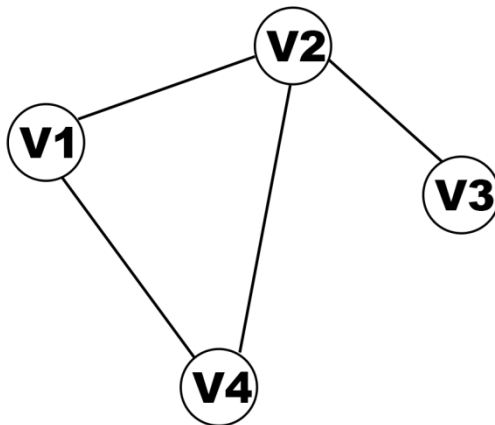
- Το **μέσο μήκος μονοπατιού** (*average path length*) ενός γράφου G ορίζεται ως η μέση τιμή της απόστασης $d(i, j)$ που λαμβάνεται από όλα τα ζεύγη διακριτών κόμβων $i, j \in V(G)$, οι οποίοι ανήκουν στο γράφο και είναι συνδεδεμένοι με ένα τουλάχιστον μονοπάτι. Έστω ότι το $d(v_i, v_j)$ υποδηλώνει τη μικρότερη απόσταση μεταξύ των v_i και v_j , με τα $v_i, v_j \in V$

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

να ανήκουν στους κόμβους του δικτύου. Το μέσο μήκος μονοπατιού υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\delta = \frac{1}{n(n-1)} \sum_{i \neq j} d(v_i, v_j)$$

όπου είναι n ο αριθμός των κόμβων. Έτσι, η **διάμετρος** του δικτύου είναι το μεγαλύτερο συντομότερο μονοπάτι μέσα στο δίκτυο, και ορίζεται ως: $diameter = \max_{i,j} d_{min}(i,j)$.



1) V1 - V2	1
2) V1 - V3	2
3) V1 - V4	1
4) V2 - V3	1
5) V2 - V4	1
	<hr/>
	6

Εικόνα 36. Εύρεση μέσου μήκους μονοπατιού σε απλοποιημένο μη κατευθυνόμενο γράφο. Το μέσο μήκος μονοπατιού του παραπάνω γράφου δίνεται από το πηλίκο αθροίσματος των μικρότερων μονοπατιών μεταξύ των κόμβων του δικτύου (6) προς τον αριθμό των ζευγών κόμβων (5).

- Η **κεντρικότητα του δικτύου** (*network centralization*) χαρακτηρίζεται από τον αριθμό των μεμονωμένων κόμβων, ο οποίος μπορεί να παράσχει κάποια πληροφορία ως προς τη διανομή της πυκνότητας του δικτύου. Τιμή κεντρικότητας κοντά στο 0 σημαίνει ότι είναι πιθανό οι κόμβοι του δικτύου να έχουν κατά μέσο όρο την ίδια συνδεσιμότητα. Τα αποκεντρωμένα δίκτυα χαρακτηρίζονται από κεντρικότητα συνήθως κοντά στο 0 (Dong and Horvath, 2007).

- Ο **συντελεστής ομαδοποίησης** (*clustering coefficient*) είναι η μέτρηση που δείχνει την τάση ενός γράφου να χωρίζεται σε ομάδες (*clusters*). Μία ομάδα ορίζεται το υποσύνολο κόμβων ενός δικτύου και οι μεταξύ τους συνδέσεις. Ο συντελεστής ομαδοποίησης C ενός δικτύου δίνεται από τον τύπο:

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

$$C = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{E_i}{k_i(k_i - 1)}$$

όπου N ο αριθμός των κόμβων, k ο βαθμός του κόμβου i και E_i οι ακμές του κόμβου i . Τα βιολογικά δίκτυα έχουν **σημαντικά υψηλότερο συντελεστή ομαδοποίησης σε σχέση με τυχαία δίκτυα**, κάτι που αποδεικνύει την τάση τους να οργανώνονται σε ομάδες. Το γεγονός αυτό συναντάται π.χ. στο κύτταρο, καθώς πολλές φυσιολογικές διεργασίες πραγματοποιούνται από ομάδες μακρομορίων που δρουν συνεργατικά (Ravasz *et al.*, 2002).

Ενδεικτικές μετρήσεις της τοπολογίας ενός δικτύου αποτελούν **ΟΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟΤΗΤΕΣ ΔΙΚΤΥΩΝ** (*network centralities*), οι οποίες παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη συνεισφορά συγκεκριμένων κόμβων, για τη συμμετοχή τους στην ακεραιότητα του δικτύου, αλλά και για τις πιθανές διαταραχές του δικτύου κατά την απαλοιφή τους, ενώ μας επιτρέπουν την κατάταξη των κόμβων. Περιγράφονται η **κεντρικότητα του δικτύου** (*network centralization*), η **πλησιέστερη κεντρικότητα** (*closeness centrality*), η **κεντρικότητα βαθμού**, η οποία επιτρέπει τον εντοπισμό κεντρικών κόμβων ή *hubs* και η **ενδιάμεση κεντρικότητα** η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση στενωπών ή *bottlenecks* (Barabasi *et al.*, 2011).

- Η **κεντρικότητα βαθμού** (*degree centrality – C_d*) υποδεικνύει ότι ένας κόμβος εμπλέκεται σε ένα μεγάλο αριθμό συνδέσεων (δηλαδή αλληλεπιδράσεων). Έτσι, για ένα κόμβο i η κεντρικότητα βαθμού ($C_d(i)$) ισούται με τον βαθμό του κόμβου i , δηλαδή:

$$C_d(i) = \text{deg}(i)$$

Συνεπώς, κόμβοι με υψηλή κεντρικότητα βαθμού καλούνται κεντρικοί κόμβοι ή *hubs*, αφού συνδέονται με πολλούς γείτονες.

- Η **πλησιέστερη κεντρικότητα** (*closeness centrality – C_{clo}*) υποδεικνύει σημαντικούς κόμβους που μπορούν να επικοινωνήσουν γρήγορα με άλλους κόμβους στο δίκτυο. Για έναν γράφο $G = (V, E)$ η κεντρικότητα ορίζεται ως:

$$C_{clo}(i) = \frac{1}{\sum_{t \in V} \text{distance}(i, j)}$$

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

όπου $distance(i, j)$ η απόσταση από το i στο j ή διαφορετικά, το συντομότερο μονοπάτι μεταξύ των δύο κόμβων.

- Η **ενδιάμεση κεντρικότητα** (*betweenness centrality*) υποδεικνύει σημαντικούς κόμβους, που συμμετέχουν μεταξύ άλλων κόμβων, σε μεγάλη αναλογία μονοπατιών μέσα στο δίκτυο. Οι κόμβοι αυτοί ονομάζονται στενωποί ή *bottlenecks* και λειτουργούν ως συνδέτες με λειτουργικές και δυναμικές ιδιότητες στο δίκτυο.

Η **τοπολογία** ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων αποκαλύπτει μοτίβα και κανόνες για τον τρόπο με το οποίο διασυνδέονται μεταξύ τους οι κόμβοι που το συγκροτούν (Pavlopoulos *et al.*, 2011b).

- Τα **δίκτυα χωρίς κλίμακα** (*scale-free networks*) είναι δίκτυα του πραγματικού κόσμου, τα οποία περιγράφουν φυσικά δίκτυα, όπως πχ. εκείνο του Παγκόσμιου Ιστού (www), με κόμβους τις μεμονωμένες σελίδες και συνδέσεις τους υπερσυνδέσμους από τη μία σελίδα στην άλλη. Αρκετά παραδείγματα βιολογικών δικτύων στα οποία οι κόμβοι αντιπροσωπεύουν βιομόρια και οι ακμές αλληλεπιδράσεις, έχουν ιδιότητες δικτύων χωρίς κλίμακα (Barabasi *et al.*, 2011). Τα δίκτυα αυτά εμφανίζουν **κατανομή νόμου δύναμης** (*power law distribution*) της μορφής:

$$P(k) \sim k^{-\gamma}$$

όπου $P(k)$ είναι η πιθανότητα ο βαθμός κόμβου ενός τυχαία επιλεγμένου κόμβου να ισούται με k , k είναι ο αριθμός των συνδέσεων που προέρχονται από έναν κόμβο και γ είναι ο εκθέτης του βαθμού. Η **κατανομή βαθμού κόμβου** είναι σημαντική για την τοπολογία του δικτύου. Τα δίκτυα χωρίς κλίμακα τείνουν να περιέχουν πολλούς κεντρικούς κόμβους, η απομάκρυνση των οποίων έχει μεγάλο αντίκτυπο στην τοπολογία του δικτύου. Έχει δειχθεί ότι τα βιολογικά δίκτυα τείνουν να είναι πιο ισχυρά έναντι τυχαίων διαταράξεων, αλλά η διάσπαση των *hubs* συχνά οδηγεί σε ‘καταστροφή’ του συστήματος (Levy and Siegal, 2008).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.2. Συστήματα Μελέτης Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών

2.2.1. Υπεροικογένεια κυστατινών

Οι κυστατίνες αποτελούν μία μεγάλη ομάδα από εξελικτικά σχετιζόμενες κυστεϊνικές πρωτεάσες με μεγάλη ομολογία στις ακολουθίες τους (Abrahamson *et al.*, 2003; Abrahamson *et al.*, 1986). Το όνομά τους αντικατοπτρίζει τη βασική τους ιδιότητα, μιας και η πρώτη κυστατίνη που απομονώθηκε από το αυγό του κοτόπουλου (*Gallus gallus*) ήταν ένας αναστολέας παπαΐνης, ο οποίος είχε την ιδιότητα να αλληλεπιδρά και να αναστέλλει τις κυστεϊνικές πρωτεάσες (Grubb and Lofberg, 1982). Οι κυστατίνες είναι παρούσες στα θηλαστικά (άνθρωπος, ποντικός, αρουραίος κ.α.), τα φυτά, τα πουλιά, τα ψάρια, τα έντομα, σε πολλά πρωτόζωα και πρέπει να αποτελούν μία ‘παλιά’ εξελικτικά οικογένεια πρωτεϊνών που μοιράζεται παρόμοιες αμινοξικές ακολουθίες (Εικόνα 37).

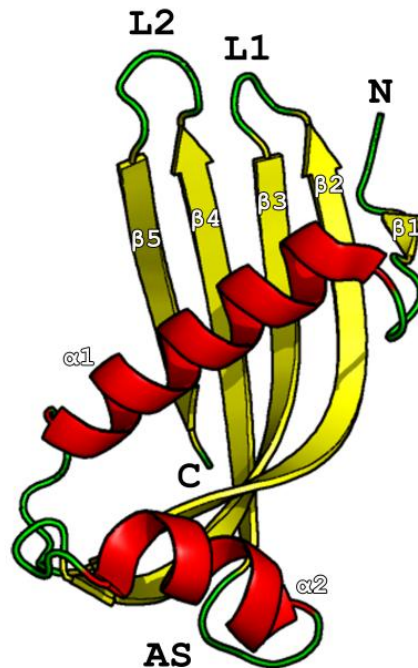
Η ονοματολογία και η ταξινόμηση των πρωτεϊνών της υπεροικογένειας, είχε ήδη συζητηθεί από το 1985 στο 1^ο Διεθνές Συμπόσιο των Κυστεϊνικών Πρωτεασών και των Αναστολέων τους (Barrett *et al.*, 1986). Εκεί αποφασίστηκε ότι οι πρωτεΐνες που δείχνουν σημαντική εξελικτική σχέση με την κυστατίνη του κοτόπουλου, θα ονομάζονται **πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των κυστατινών**. Οι διαφοροποιήσεις μέσα στην οικογένεια σε επίπεδο δομής, λειτουργίας αλλά και φυσιολογίας, όπως π.χ. η ύπαρξη ή απουσία δισουλφιδικών δεσμών, τα τμήματα με ιδιότητες της κυστεϊνικής οικογένειας (*cysteine-like properties*) ή η δράση σε συγκεκριμένους ιστούς, οδήγησαν στην ταξινόμηση τους σε τρεις μεγάλες οικογένειες. Συγκεκριμένα η πρώτη οικογένεια ονομάζεται **οικογένεια στεφινών** και περιλαμβάνει πρωτεΐνες που διαφοροποιούνται από την υπεροικογένεια, λόγω της απουσίας δισουλφιδικών δεσμών (Εικόνα 37α). Η δεύτερη οικογένεια ονομάζεται **οικογένεια κυστατινών** και περιλαμβάνει πρωτεΐνες που φέρουν δύο σχετικά συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς (Εικόνα 37β). Η τρίτη οικογένεια συνιστά μία ομάδα γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος που ονομάζεται **οικογένεια κινινογενινών** και περιλαμβάνει πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους με 9 δισουλφιδικούς δεσμούς (Εικόνα 37γ). Στον άνθρωπο συναντάμε 13 πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των κυστατινών (*οικογένεια στεφινών* – στεφίνη Α και στεφίνη Β / *οικογένεια κυστατινών* – κυστατίνες C, D, M, F, S, SN, SA, 8, 11 / *οικογένεια κινινογενινών* – L και H κυστατίνες), κάθε μία από τις οποίες παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες και έχει μοναδική έκφραση και κατανομή (Grubb and Lofberg, 1982).

[α]	stefin A/1-98	1	MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYGKLEAVQYKTVVAGTNYIKVRAGDNKYMHLKVFKSLFGQNEDELVLGTGQVDKMKDELTFE	98
	stefin B/1-98	1	MMCAPSATQPATAETQHLADQVRSQLEEKENKKFPVFKAVSFKSQVVAGTNYFKVHVGDDEDFVHLRVFQSLFHEHMKPLTISNYQTNAKHDELTFE	98
	cystatin C/1-120	1	SSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVRRALDFAVGEYNKASNDMYHSRALQVVRARKQIVAGVNYFLDVELGRITCTKTPQNLNDCPFHDQPHLKRKAFCS	98
	cystatin D/1-122	1	GSASAQSRITLGGIHATDLNDKSVQCALDFALSEYNKVIKDEYYSRPLQVMAAYQIVGGVNYFNVKFGRTTCTKSQPNLNDPCFNDQPKLEEEFCS	100
	cystatin F/1-126	1	GSQDLNSRVKGFPKTIKTNDPGVLQAARYSVEKFNCTNDMFLFKESRITRALVQIVKGLKYMLEVEIGRTTCKKNQHRLLDDCFQTNHTLKQTLSCY	106
	cystatin M/1-121	1	R---PQER-MGELRDLSRDDPQVQKAAQAAVASYNMGNSIYYFRDTHIILKAQSQLVAGIKYFLTMEMGSTDCRKTRVDLTCPLAAG-AQQEKLKCD	99
	Cystatin S/1-121	1	SSSKEENRIIGGIYDADLNDEWVQRALHFAISEYNKATEDEYRRRLQVLRAREQTFGGVNYFFDVEVGRTICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCS	99
	cystatin SA/1-121	1	WSPQEDRIIGGIYDADLNDEWVQRALHFVISEYNKATEDEYRRRLRVLRLAREQIVGGVNYFFDIEVGRTICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCS	99
	cystatin SN/1-121	1	WSPKEEDRIIGGIYNADLNDEWVQRALHFAISEYNKATKDDYRRRLRVLRLAREQIVGGVNYFFDVEVGRTICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCS	99
	cystatin 8/1-121	1	KDPKKNETGVRKLPVNASNANVKQLWFAMQEYNKESDKYVFLVVKTLQAQLQVTLNLEYLIDVEIARSDCRKPLSTNEICAIQENSKLKRKLSCS	99
	cystatin 11/1-112	1	R----KK-TLSVHEVMAVENYAKDSLQWITDQYNKESDDKYHFRFVRLKVVQRQVTDHLEVHLNVEMQWTTQKPE--TTNCVPER-ELHKQVNGF	90
[β]	cystatin C/1-120	99	FQIYAVPWQGTMTLSKSTQDA	120
	cystatin D/1-122	101	FQINEVPWEDKISILNYKCRKV	122
	cystatin F/1-126	107	SEVWVVPWLQHFVPLRCH--	126
	cystatin M/1-121	100	FEVLVVPWQNSSQLLKHNCVQM	121
	Cystatin S/1-121	100	FEIYEVPEWDRMSLVNSRCQEA	121
	cystatin SA/1-121	100	FQIYEVPEWDRMSLVNSRCQEA	121
	cystatin SN/1-121	100	FEIYEVPEWDRMSLVNSRCQES	121
	cystatin 8/1-121	100	FLVGALPWNGEFTVMEKKCEDA	121
	cystatin 11/1-112	91	FVFAVPEWFEQYKILNKSQSSD	112
		cystatin L/1-255	1	SSRIGEIKEETTVPSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGKHERDQGHGHRGHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDDLEHQG
	cystatin H/1-362	1	-----QESQSEIIDCNDKD-LFKAVDAALKYNSQNSNNQ-----FVLYRITAEATKTVGS-----	50
	cystatin L/1-255	99	GHVLDHGHHKHHGHGHCKHKNGKKNKNGKNGWTEHLASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPT---PIPSLAKPQVTVTFSDFQSDLIATMPPISP----	189
	cystatin H/1-362	51	----DTFYSFKEYEIKEGDCPVQSGKQWQDCQCEYKDAAKAATGECTAIVGKRSSSTKFSVATQTCQITPAEGEVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRH	144
[γ]	cystatin L/1-255	190	-----APIQ-----SDDDWIPDIQIDPNGLSF----NPIISDFPDTT	221
	cystatin H/1-362	145	GIQYFNNTQHSLSFMLEVNEVKRAQRQVAGLNFRITYSIVQTNCSENFLLFPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYEGKDFVQPP	242
	cystatin L/1-255	222	SPKCPQRFW-----KSVSEINPTTQMKESYYFDLT-----DGLS-----	255
	cystatin H/1-362	243	TKIIVGCCERDIPTNSPELEETLHTITKLNAA--ENNATFYFKIDNVKKARVQVAGKQYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKGQSLDCNAEVY	338
	cystatin L/1-255	339	-----	362
	cystatin H/1-362	339	VVPWEKKIYPTVNCQPLGMSLMK	362

Εικόνα 37. Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών των ανθρώπινων κυστατινών, ανά ομόλογη οικογένεια. (α) Οικογένεια στεφινών (β) Οικογένεια κυστατινών (γ) Οικογένεια κινινογενινών. Οι ακολουθίες έχουν εξαχθεί από τη βάση UniProtKB (UniProt, 2015). Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις του εργαλείου T-coffee (Notredame *et al.*, 2000), ενώ για την οπτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). Οι στοιχίσεις χρωματίζονται με βάση την ποσοστιαία ταύτιση των ακολουθιών (κατώφλι συντήρησης $\geq 30\%$)

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Η αποκάλυψη της βασικής στερεοδιάταξης ενός αντιπροσωπευτικού μονομερούς της κυστατίνης έγινε όταν προσδιορίστηκε πειραματικά η δομή της κυστατίνης του κοτόπουλου (Bode *et al.*, 1988). Η τοπολογία του διπλώματος της κυστατίνης (*cystatin fold*) περιλαμβάνει μία **β-πτυχωτή επιφάνεια πέντε αντιπαράλληλων β-κλώνων**, η οποία **περιβάλλει μία κεντρική – ευθεία – α-έλικα**. Η στερεοδιάταξη αυτή δημιουργεί την περιοχή αναστολής (αμινοτελικό άκρο, L1 λούπα, L2 λούπα) και την αντιδιαμετρική της, ένθετη περιοχή (*appending structure* - AS), μία περιοχή χωρίς καταγεγραμμένη σημαντική λειτουργική συνεισφορά. Το μοτίβο της αμινοξικής ακολουθίας στην περιοχή της L1 λούπας (Q – x – V – y – G, όπου x, y οποιοδήποτε από τα 20 αμινοξικά κατάλοιπα) αποτελεί και στόχο των ενζύμων της υπεροικογένειας (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Η τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (*cystatin fold*) στην πρώτη κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη κυστατίνη του *Gallus gallus*. Η τοπολογία των δευτεροταγών στοιχείων της παραπάνω δομής είναι N – β1 – α1 – β2 – L1 – β3 – AS – β4 – L2 – β5 – C, όπου β: οι β-κλώνοι, α: οι α-έλικες, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο. Στην περίπτωση της κυστατίνης του κοτόπουλου στην περιοχή AS εντοπίζεται και η έλικα α2 (κωδικός 1CEW στη βάση PDB).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

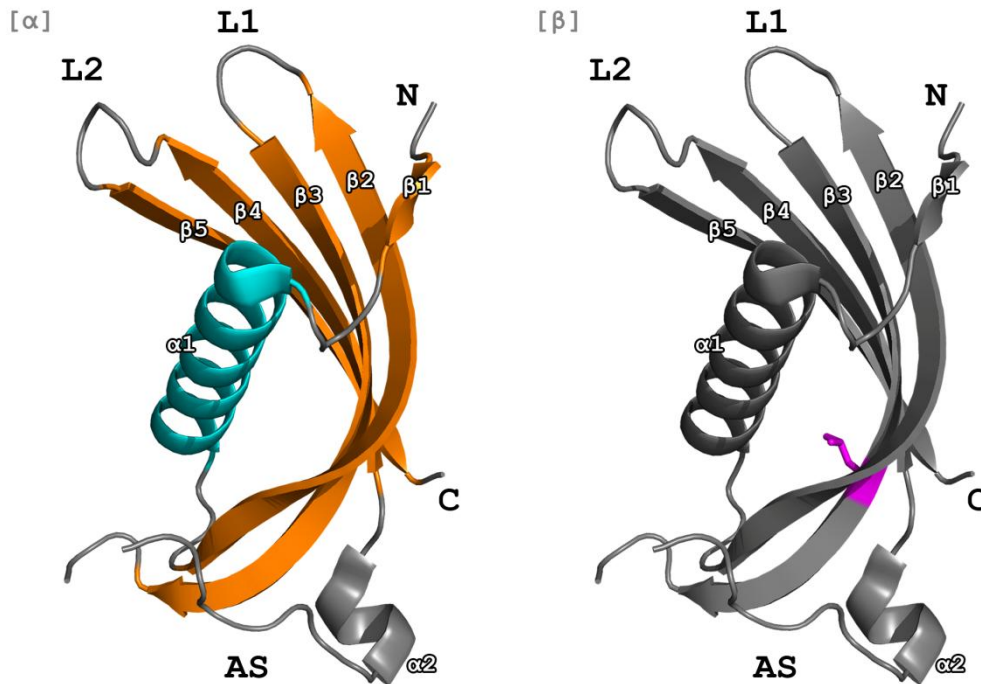
2.2.1.1. Κυστατίνη C

Η ανθρώπινη κυστατίνη C είναι μία πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους που ανήκει στην οικογένεια των κυστατινών (Abrahamson *et al.*, 1987; Barrett, 1986; Turk and Bode, 1991). Εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα, ως μία εκκριτική κυστατίνη, η οποία έχει κυρίως εξωκυτταρική δράση (Abrahamson *et al.*, 1986; Grubb, 2000). Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στη βιβλιογραφία με εναλλακτικά ονόματα, όπως κυστατίνη 3 (όνομα που λαμβάνει από το αντίστοιχο γονίδιο που την κωδικοποιεί, *cystatin-3*), νευροενδοκρινές βασικό πολυπεπτίδιο (*Neuroendocrine basic polypeptide*) και τέλος μετα-γ-σφαιρίνη (*post-gamma-globulin*).

Στον άνθρωπο η λειτουργία της φυσιολογική πρωτεΐνης δεν εξαρτάται από το φύλο ή την ηλικία, εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς και στα σωματικά υγρά (Abrahamson *et al.*, 1986) και βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Abrahamson *et al.*, 1987; Grubb and Lofberg, 1982). Εξίσου μεγάλα ποσοστά έκφρασης μετρώνται στην επιδιδυμίδα, το σπερματικό πόρο, τις ωοθήκες αλλά και το θύμο αδέν, όπου βρίσκεται να ρυθμίζει τη δράση των κυστεϊνικών πρωτεασών που απελευθερώνονται από τα λυσοσώματα κατεστραμμένων κυρίως κυττάρων (Cabarkara, 2015). Το 1985 προτάθηκε για πρώτη φορά ως βιοδείκτης για τη μέτρηση του βαθμού διήθησης των νεφρών, επειδή η απομάκρυνση της πρωτεΐνης από το αίμα πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της σπειραματικής διήθησης, που λαμβάνει χώρα στους νεφρούς (Randers and Erlandsen, 1999).

Η ώριμη πρωτεΐνη αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 120 αμινοξικών καταλοίπων (Grubb, 2000) και η φυσιολογική της στερεοδιάταξη ακολουθεί την χαρακτηριστική τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (Εικόνα 38, Εικόνα 39). Το 2010, ο Koladziejczyk και οι συνεργάτες του (Kolodziejczyk *et al.*, 2010) κατόρθωσαν να δημιουργήσουν ένα τεχνητά-σταθεροποιημένο μονομερές της ανθρώπινης κυστατίνης C και αποκάλυψαν για πρώτη φορά την τρισδιάστατη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης στη μονομερή, φυσιολογική της κατάσταση (Εικόνα 39). Όπως συμβαίνει σε όλες τις πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των κυστατινών, το αμινοτελικό άκρο της κυστατίνης, σε συνδυασμό με τις L1 και L2 λούπες, δημιουργούν έναν επίτοπο στο άκρο της πρωτεΐνης, ο οποίος εμφανίζει μεγάλη συνάφεια αλληλεπίδρασης με τις κυστεϊνικές πρωτεάσες (Bode *et al.*, 1988; Grubb, 2000; Henskens *et al.*, 1996; Turk and Bode, 1991).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι



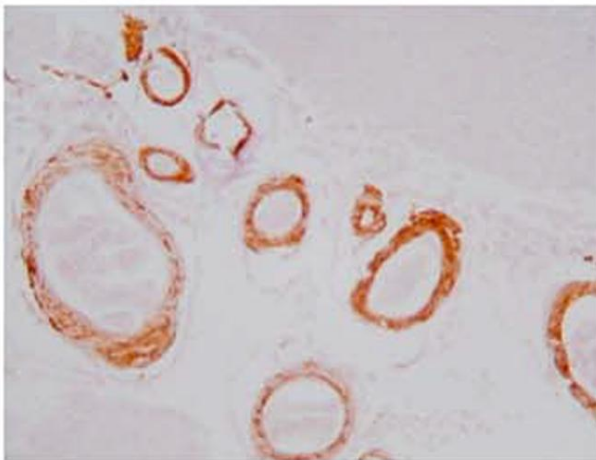
Εικόνα 39. Μονομέρες της ανθρώπινης κυστατίνης C. Τεχνητά-σταθεροποιημένο μονομέρες της ανθρώπινης κυστατίνης C που δημιουργήθηκε από τον Kolodziejczyk και τους συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το μονομέρες της κυστατίνης C του κοτόπουλου (44% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας) και κατευθύνοντας τον σχηματισμό δύο νέων δισουλφιδικών δεσμών (κωδικός 3GAX στη βάση PDB) (Kolodziejczyk *et al.*, 2010). Παρατηρούμε την χαρακτηριστική τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (Εικόνα 38). (α) Η β-πτυχωτή επιφάνεια των πέντε αντιπαράλληλων β-κλώνων χρωματίζεται με πορτοκαλί, ενώ η κεντρική α-έλικα χρωματίζεται με κυανό (β: οι β-κλώνοι, α: οι α-έλικες, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο). (β) Σημειώνεται με φούξια η θέση της λευκίνης 68, η οποία μεταλλάσσεται σε γλουταμίνη στην περίπτωση της εγκεφαλικής αγγειοπάθειας Ισλανδικού τύπου.

Η συσσωμάτωση και ο ολιγομερισμός της κυστατίνης C επιταχύνει **μία σπάνια μορφή αμυλοείδωσης που ονομάζεται κληρονομούμενη εγκεφαλική αγγειοπάθεια από αμυλοειδή της κυστατίνης C (Hereditary Cystatin C Cerebral Amyloid Angiopathy)** ή, πιο απλά, **εγκεφαλική αγγειοπάθεια Ισλανδικού τύπου (Icelandic Cerebral Angiopathy)** (Gudmundsson *et al.*, 1972). Η αγγειοπάθεια είναι μία αυτοσωμική επικρατής διαταραχή, η οποία οφείλεται σε εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων στα αγγεία του εγκεφάλου νεαρών ενηλίκων που κατάγονται από την Ισλανδία. Βιβλιογραφικά, η παραπάνω παθολογική κατάσταση είναι η πρώτη κληρονομούμενη μορφή αμυλοείδωσης που σχετίζεται με μία σημειακή μεταλλαγή σε γονίδιο που κωδικοποιεί έναν αναστολέα (Ghiso *et al.*, 1986a; Ghiso *et al.*, 1986b; Yamada, 2000).

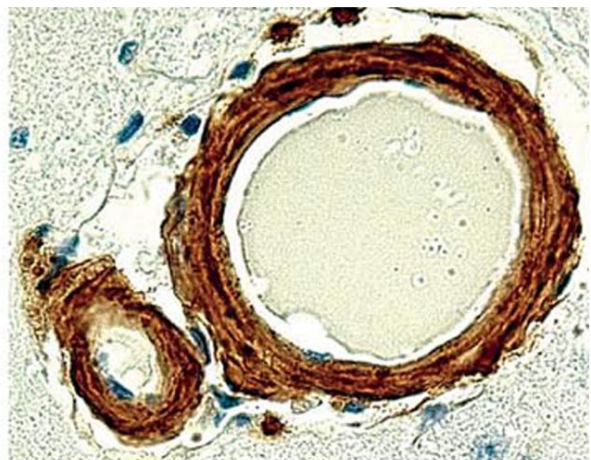
Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Γενικά, οι κληρονομούμενες αμυλοειδώσεις που οδηγούν σε εγκεφαλική αιμορραγία (*Hereditary Cerebral Hemorrhage With Angiopathy*) είναι αμυλοειδώσεις με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα που εντοπίζονται στα αγγεία του εγκεφάλου και ευθύνονται για αιμορραγίες και θρομβωτικά επεισόδια πριν την ηλικία των 40 (Ghiso *et al.*, 1986a). Στο σύνολό τους είναι μία πολύπλοκη ομάδα χρόνιων και προοδευτικών ασθενειών που ταξινομούνται με κοινό παρονομαστή τις ενδο- και έξω- κυτταρικές εναποθέσεις αδιάλυτων πρωτεϊνικών ινιδίων στον έσω και έξω χιτώνα των αγγείων, των αρτηριδίων και των τριχοειδών του εγκεφάλου, χωρίς συγκεκριμένα την εμφάνιση πλακών (Revesz *et al.*, 2009) (Εικόνα 40). Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται δεσμεύουν τις χρωστικές Congo Red και Thioflavin T, ενώ όπως προέκυψε από ιστοπαθολογικές, βιοχημικές και γενετικές μελέτες διαγονιδιακών ποντικών, εναποθέσεις με διαφορετική πρωτεϊνική σύσταση στις παραπάνω περιπτώσεις ακολουθούν, τελικά, το ίδιο μονοπάτι μη φυσιολογικού διπλώματος και εναποτίθενται στα αγγεία σταδιακά, μέχρι κάλυψης ολόκληρου του τοιχώματος (Rostagno *et al.*, 2010).

[α]



[β]



Εικόνα 40. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας μετά θάνατον (*post mortem*) σε ιστούς εγκεφάλου ατόμου με εγκεφαλική αγγειοπάθεια Ισλανδικού τύπου. Παρατηρείται η δέσμευση του αντισώματος έναντι της κυστατίνης C στον έσω χιτώνα των αγγείων του εγκεφάλου. (α) (Προσαρμογή από (Rostagno *et al.*, 2010)) (β) (Προσαρμογή από (Palsdottir *et al.*, 2006)).

Τα αμυλοειδή ινίδια που εντοπίζονται στους ασθενείς με εγκεφαλική αγγειοπάθεια Ισλανδικού τύπου δημιουργούνται από μία μεταλλαγμένη μορφή της κυστατίνης C, η οποία συσσωματώνεται ραγδαία και ανεξέλεγκτα και οδηγεί σε θανατηφόρες εγκεφαλικές αιμορραγίες (Revesz *et al.*, 2009). Η μεταλλαγμένη μορφή προκύπτει από μία σημειακή

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

μεταλλαγή στο γονίδιο που κωδικοποιεί την κυστατίνη C, η οποία μετατρέπει τη λευκίνη στη θέση 68 σε γλουταμίνη (L68Q) (Εικόνα 41). Η λευκίνη 68 βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του β3-κλώνου στη φυσιολογική πρωτεΐνη (Εικόνα 39β) και η πλευρική της αλυσίδα συμμετέχει στον υδρόφοβο πυρήνα που σταθεροποιεί την κλειστή δομή της πρωτεΐνης (Rostagno *et al.*, 2010). Στην περίπτωση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης η αλλαγή της φύσης των αμινοξέων στον υδρόφοβο πυρήνα επηρεάζει σημαντικά την σταθερότητα του μορίου, καθώς η μακριά πολική αλυσίδα της γλουταμίνης δεν μπορεί να φιλοξενηθεί στο υδρόφοβο περιβάλλον του πυρήνα, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της α/β διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης.

Το 2000 προτάθηκε ότι, ενώ η μεταλλαγή στη θέση 68 εμπεριέχει το γενετικό υπόβαθρο για την εμφάνιση της ασθένειας σε νεαρά άτομα με καταγωγή από την Ισλανδία, **ολιγομερή κυστατίνης C δημιουργούνται και κατά τη συσσωμάτωση μονομερών κυστατίνης φυσικού τύπου** (Olafsson and Grubb, 2000). Έτσι, παράλληλα με την εμφάνιση εναποθέσεων κυστατίνης στη σπάνια αμυλοείδωση, κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες, ο ολιγομερισμός της φυσιολογικής πρωτεΐνης μπορεί να οδηγεί στην εναπόθεση αμυλοειδών στους μήνιγγες, στον εγκεφαλικό φλοιό και στο στέλεχος του εγκεφάλου ατόμων σε προχωρημένη ηλικία (Revesz *et al.*, 2009). Τέλος, πιο πρόσφατες μελέτες βρίσκουν την κυστατίνη C να συνεναποτίθεται και στις αμυλοειδείς πλάκες στην νόσο του Alzheimer (Levy *et al.*, 2001), ενώ ευρήματα εναποθέσεών της έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Down (Zerovnik, 2009) και σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

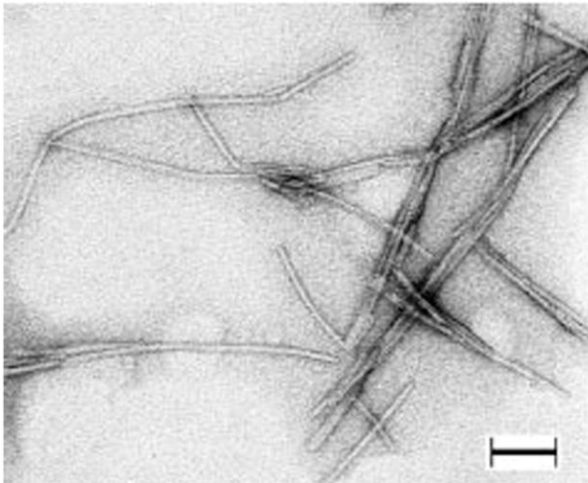
Ο πολυμερισμός της ανθρώπινης κυστατίνης C βασίζεται στο μοντέλο της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών (Liu and Eisenberg, 2002), όπως μαρτυρούν οι διαθέσιμες κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές της πρωτεΐνης (Janowski *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2005; Janowski *et al.*, 2001) (Εικόνα 42). Από τη στιγμή της ανακάλυψής του ο μηχανισμός αυτός βρέθηκε να εξηγεί τον πολυμερισμό αρκετών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων τον πολυμερισμό των prion και της β₂-μικροσφαιρίνης (Nelson and Eisenberg, 2006a; Nelson and Eisenberg, 2006c).

Στην περίπτωση της κυστατίνης C, η L1 λούπα είναι το τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης που υφίσταται τη στερεοδιαταξική αλλαγή κατά τη δημιουργία του ολιγομερούς (Εικόνα 42α, Εικόνα 42β) και εκείνο που ουσιαστικά συνδέει την α-ελικοειδή αυτοτελή δομική υπο-περιοχή με την β αυτοτελή δομική υπο-περιοχή (Εικόνα 42α). Αρχικά, δύο όμοια, μη-φυσιολογικά, μονομερή ανταλλάσσουν ισότιμα δομικά τμήματα και σχηματίζουν δύο κλειστές επιφάνειες επαφής (*closed interface*) (Εικόνα 42γ). Η κάθε κλειστή επιφάνεια

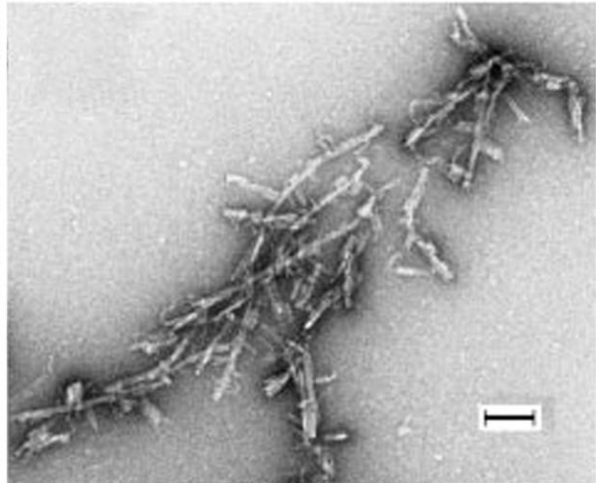
Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

επαφής έχει πανομοιότυπα δομικά χαρακτηριστικά με την επιφάνεια επαφής στην φυσιολογική μονομερή κατάσταση, όπου συναντάμε την χαρακτηριστική τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (Εικόνα 39), με τη διαφορά ότι στην διμερισμένη μορφή περισσότερες της μιας πρωτεϊνικές αλυσίδες συνεισφέρουν στην αλληλεπίδραση (Nelson and Eisenberg, 2006c) (1.4.1).

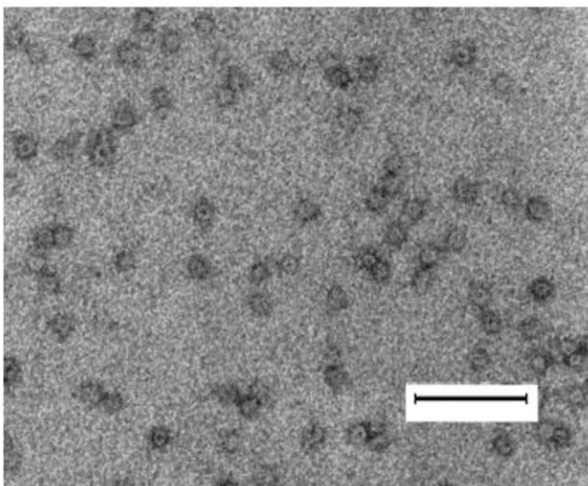
[α]



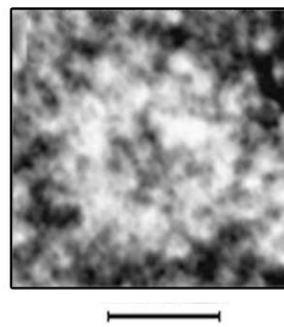
[β]



[γ]



[δ]



Εικόνα 41. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων από την *in vitro* αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης κυστατίνης C. (α) Αμυλοειδή ινίδια της ανθρώπινης κυστατίνης C, φυσικού τύπου. (β) Αμυλοειδή ινίδια της μεταλλαγμένης (L68Q) ανθρώπινης κυστατίνης C. (γ)(δ) Ολιγομερή αμυλοειδών ινιδίων της ανθρώπινης κυστατίνης C φυσικού τύπου σχήματος ντόνατ (*donut-shaped oligomers*). (Προσαρμογή από (Wahlbom *et al.*, 2007)) (Ράβδοι 100nm).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

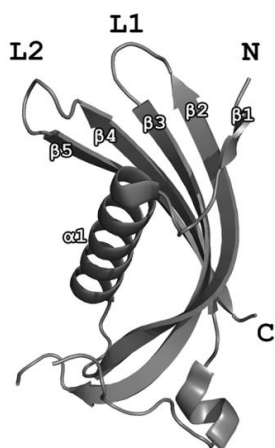
Η στερεοδιαταξική αλλαγή της L1 λούπας μεταξύ των συμμετρικών β2 και β3 κλώνων οδηγεί στη δημιουργία μίας νέας β-πτυχωτής επιφάνειας και αλλάζει τη λειτουργία της κυστατίνης, καθώς το διμερές χάνει δια παντός την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τις κυστεϊνικές πρωτεάσες (αλλαγή του επιτόπου αναστολής αμινοτελικό άκρο – L 1 λούπα – L2 λούπα) (Εικόνα 42α). Έτσι κατά τη συγκρότηση του διμερούς, παρουσιάζεται ένα νέο δομικό στοιχείο· η δημιουργία μιας εκτεταμένης β-πτυχωτής επιφάνεια βL-βL, η οποία σχηματίζει μία εκτεθειμένη περιοχή αλληλεπίδρασης (*open interface*) που σταθεροποιείται με 34 διαδοχικούς δεσμούς υδρογόνου (Janowski *et al.*, 2001) (Εικόνα 42γ). Κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο ολιγομερισμός της ανθρώπινης κυστατίνης C, που ακολουθεί την παραπάνω διαδικασία, δεν σταματά στη δημιουργία του διμερούς αλλά συνεχίζει προς το σχηματισμό τετραμερών (Εικόνα 42δ) και τελικά οκταμερών (Εικόνα 42ε) (Janowski *et al.*, 2004).

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το αμινοτελικό τμήμα της κυστατίνης C υπόκειται σε πρωτεολυτική δράση εξειδικευμένων λευκοκυτταρικών ενζύμων που δρουν φυσιολογικά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Janowski *et al.*, 2004). Αυτή η αμινοξική ‘περικοπή’ συναντάται τόσο σε αμυλοειδή ινίδια που απομονώνονται από ασθενείς, όσο και σε *in vitro* πειράματα που αποδεικνύουν την απουσία συμμετοχής της περιοχής αυτής στο διμερισμό ή τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης και προτείνουν πως είναι μία διαδικασία που έπεται του σχηματισμού των αμυλοειδών ινιδίων (Gerhartz and Abrahamson, 2002).

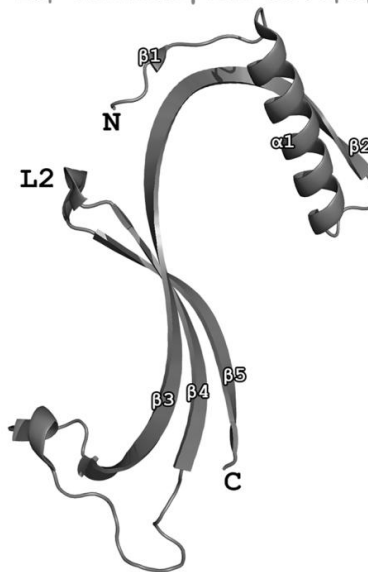
Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης ολιγομερών κυστατίνης C φυσικού τύπου απέδειξαν την εμφάνιση συσσωματωμάτων σχήματος ντόνατ (*donut-shaped oligomers*) (Εικόνα 41γ, Εικόνα 41δ), τα οποία παραπέμπουν στην οκταμερή ολιγομερισμένη δομή και επιβεβαιώνουν τα πειράματα κρυσταλλογραφίας. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και από πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού, καθώς βρέθηκε ότι τα σφαιρικά ολιγομερή συγκροτούνται από αμυλοειδή ινίδια που έχουν χαρακτηριστικά β-πτυχωτών επιφανειών σε μικρότερα ποσοστά, συγκρινόμενα με τη μονομερή κυστατίνη C και τα ώριμα αμυλοειδή ινίδια αυτής (Wahlbom *et al.*, 2007).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

[α] Φυσιολογικό Μονομερές

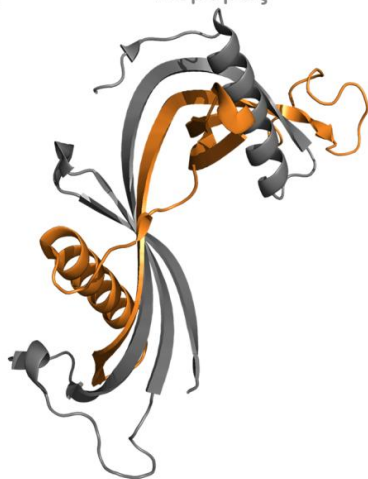


[β] Μη-φυσιολογικό Μονομερές



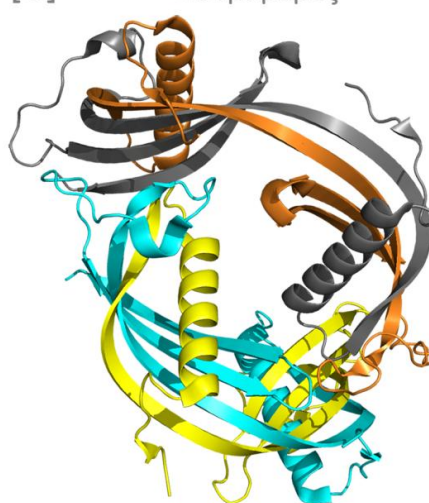
[γ]

Διμερές



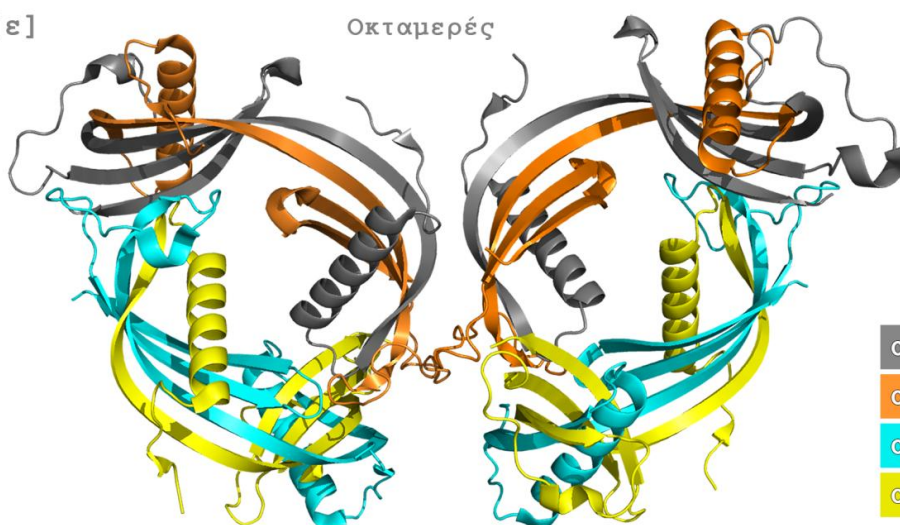
[δ]

Τετραμερές



[ε]

Οκταμερές



Εικόνα 42. Κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές της ανθρώπινης κυστατίνης C. Οι δομές παρουσιάζονται σε αναπαράσταση cartoon με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). (α) Φυσιολογικό μονομερές (κωδικός 3GAX στη βάση PDB) (Kolodziejczyk *et al.*, 2010). (β) Μη-φυσιολογικό μονομερές, (γ) διμερές, (δ) τετραμερές, (ε) οκταμερές (κωδικός 1R4C στη βάση PDB) (Janowski *et al.*, 2004).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.2.1.2. Στεφίνη Α

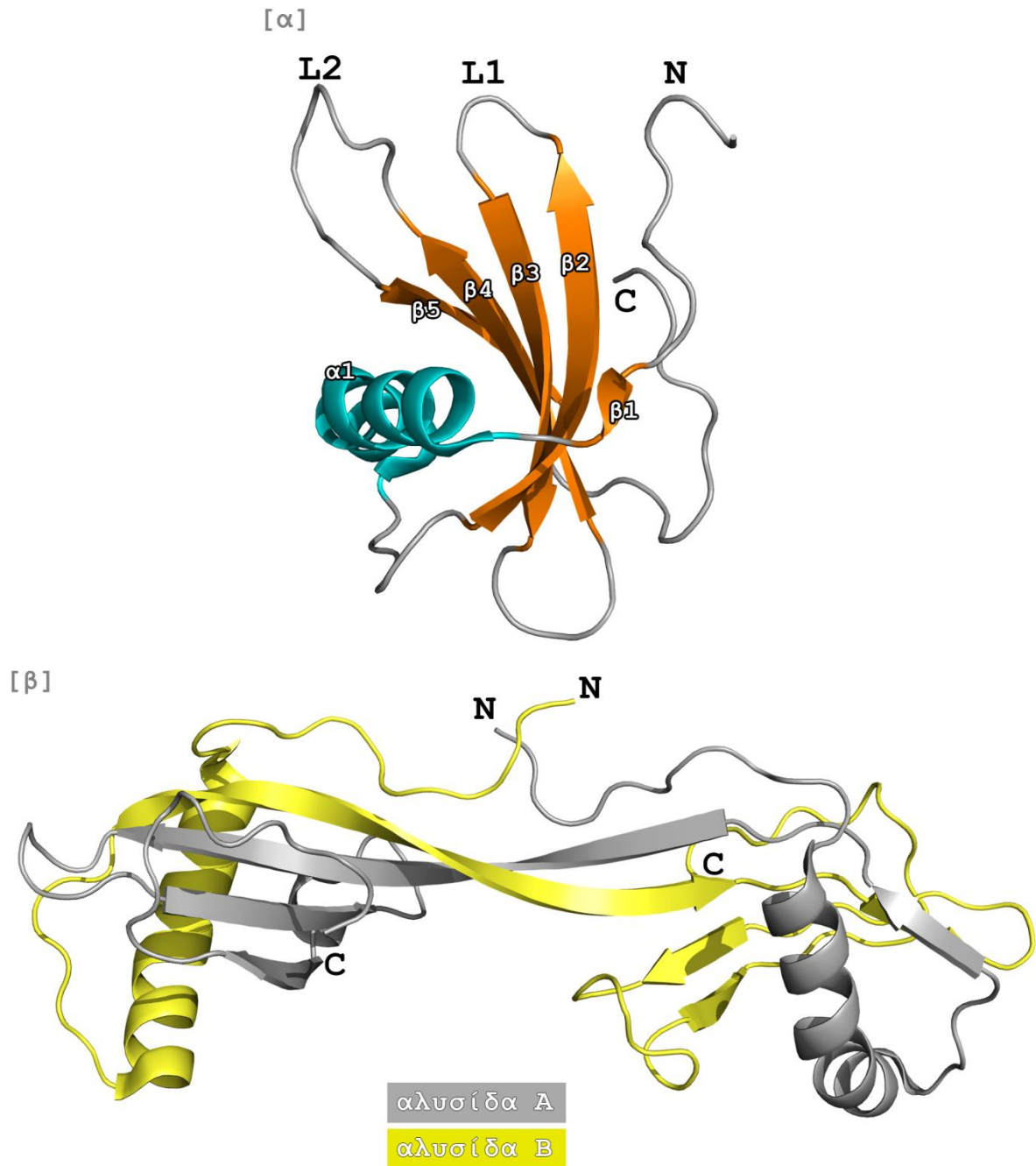
Η ανθρώπινη στεφίνη Α, είναι μέλος της υπερικογένειας των κυστατινών και συγκεκριμένα ανήκει στην οικογένεια των στεφινών. Οι στεφίνες είναι ενδοκυτταρικές κυστατίνες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα πολλών κυτταρικών τύπων, ενώ εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση και στα σωματικά υγρά. Η οικογένεια των στεφινών αποτελείται από πρωτεΐνες χωρίς σηματοδοτικά πεπτίδια, χωρίς δισουλφιδικούς δεσμούς και με μοριακά βάρη ~11kDa (Jenko *et al.*, 2003; Staniforth *et al.*, 2001).

Η ανθρώπινη στεφίνη Α (ή κυστατίνη Α ή *SH-epidermal inhibitor* ή *epidermal TPI* ή *ACPI* ή *CPI-A*) αποτελείται από 98 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 11kDa. Όπως πιθανά αποδεικνύουν και τα εναλλακτικά της ονόματα, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε πρωταρχικά σε πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα του αίματος (Davies and Barrett, 1984). Παράλληλα, όμως, βρίσκεται στον οισοφάγο, στον κόλπο (Rinne *et al.*, 1978) και στο κυτταρόπλασμα της έξω στιβάδας της επιδερμίδας (Rasanen *et al.*, 1978). Αυτή η επιλεκτική κατανομή ενός αναστολέα, όπως είναι η στεφίνη Α, υποδηλώνει τη **συσχέτιση της πρωτεΐνης με ιστούς που αποτελούν την ‘πρώτη γραμμή άμυνας’**, ενάντια στην εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών.

Σε αντίθεση με τη δράση της στεφίνης Α σε φυσιολογικές καταστάσεις, βιβλιογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν την εμπλοκή της και σε έναν αριθμό ασθενειών. Η πρωτεΐνη, έχει εντοπιστεί σε πολλές μορφές καρκίνου, όπως στον καρκίνο του πνεύμονα, του δέρματος ή του οισοφάγου, κάτι που έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η στεφίνη Α παίζει ρόλο στην διεύδυση των όγκων (μετάσταση), μέσω της μεταβολής της έκφρασής της σε παθολογικές καταστάσεις (Lah *et al.*, 1990). Παράλληλα τα επίπεδα της στεφίνης Α, φαίνεται να αυξάνονται σημαντικά σε ασθενείς με καρδιαγγειακές επιπλοκές, καθώς και σε ψωριασικά κύτταρα της επιδερμίδας (Horsu-Havu *et al.*, 1983), κανένα δεδομένο όμως δεν συσχετίζει την πρωτεΐνη με την εμφάνιση συγκεκριμένης αμυλοείδωσης.

Η δομή του φυσιολογικού μονομερούς της στεφίνης Α προέκυψε έπειτα από συν-κρυστάλλωσή της με την πρωτεάση καθεψίνη Β (Renko *et al.*, 2010). Το δίπλωμα της στεφίνης Α στο χώρο υιοθετεί τη χαρακτηριστική τοπολογία των κυστατινών (Εικόνα 38), δηλαδή διπλώνεται σε μία β-πτυχωτή επιφάνεια πέντε αντιπαράλληλων β-κλώνων, η οποία περιβάλλει μία κεντρική α-έλικα (Εικόνα 43α). Το αμινοτελικό άκρο της κυστατίνης σε συνδυασμό με τις L1 και L2 λούπες δημιουργούν τον επίτοπο αναστολής στο άκρο της πρωτεΐνης.

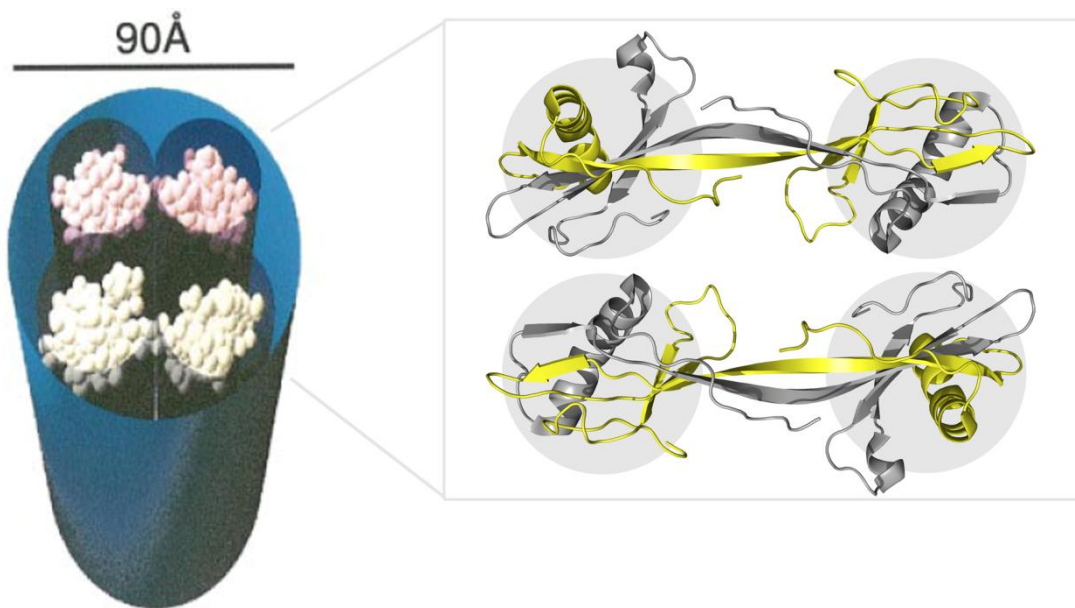
Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι



Εικόνα 43. Κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές της ανθρώπινης στεφίνης Α. (α) Το μονομερές της ανθρώπινης στεφίνης Α ακολουθεί την τοπολογία του διπλώματος των κυστατινών (Εικόνα 38). Η δομή έχει συνκρυσταλλωθεί με την πρωτεάση καθεψίνη Β και παρουσιάζει τη στεφίνη Α στην φυσιολογική ενεργή της στερεοδιάταξη (κωδικός 3K9M στη βάση PDB) (Renko *et al.*, 2010). Η πρωτεΐνη χρωματίζεται με βάση τα στοιχεία δευτεροτατούς δομής. Η β-πτυχωτή επιφάνεια των πέντε αντιπαράλληλων β-κλώνων χρωματίζεται με πορτοκαλί, ενώ η κεντρική α-έλικα χρωματίζεται με κυανό (β: οι β-κλώνοι, α: α-έλικα, L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο). (β) Η διμερισμένη δομή της ανθρώπινης στεφίνης Α (κωδικός 1N9J στη βάση PDB) (Staniforth *et al.*, 2001) προκύπτει με το μηχανισμό της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. Οι Α και Β αλυσίδες σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα. Οι δομές παρουσιάζονται σε αναπαράσταση cartoon με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Παρόλο που η στεφίνη A εμφανίζει χαμηλή ομολογία με την κυστατίνη C (Εικόνα 37), και οι δύο αναστολείς φαίνεται να διμερίζονται ακολουθώντας τον ίδιο μηχανισμό. Η τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών που απαντάται και στην περίπτωση της στεφίνης A, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση ολιγομερών της πρωτεΐνης. Η Staniforth και οι συνεργάτες της, πραγματοποιώντας δομικές μελέτες σε ολιγομερή της στεφίνης A, πρότειναν ότι, μετρήσεις μεταξύ των ακραίων τμημάτων των διμερών της στεφίνης A παραπέμπουν στο πάχος ινιδιακών δομών, γι' αυτό και κατασκεύασαν μία πιθανή διευθέτηση των διμερών σε ένα ινίδιο πάχους $\sim 90 \text{ \AA}$ (Staniforth *et al.*, 2001). Έτσι, αντίστοιχα με τα ευρήματα στην περίπτωση της κυστατίνης C, ο ολιγομερισμός της στεφίνης A πιστεύεται ότι σχετίζεται με την ανώτερη οργάνωση ολιγομερισμένων μορφών της πρωτεΐνης που εμπλέκουν τον μηχανισμό της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών, ένα εύρημα που μέχρι σήμερα δεν έχει συσχετιστεί με κάποια συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση (Εικόνα 44).



Εικόνα 44. Πιθανή αναπαράσταση ολιγομερισμένων μορφών της ανθρώπινης στεφίνης A. Η πρόταση δημιουργίας ινιδιακών δομών της στεφίνης A εμπλέκει το μηχανισμό της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. Παρουσιάζεται το πιθανό μοντέλο 'στοίβαξης' διμερών στεφίνης A, όπως έχει προταθεί από τη Staniforth και τους συνεργάτες της (Προσαρμογή από (Staniforth *et al.*, 2001)).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.2.2. Αμυλίνη

Η ανθρώπινη αμυλίνη γνωστή και με το όνομα IAPP (*Islet Amyloid Polypeptide*) είναι μία πεπτιδική ορμόνη 37 αμινοξικών καταλοίπων με έναν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των κυστεϊνών 2 και 7 και ένα αμιδιωμένο καρβοξυτελικό άκρο. Ανήκει στην οικογένεια των CGRP πρωτεϊνών (*Calcitonin Gene Related Peptides*), στην οποία κατατάσσονται πολλές γνωστές ορμόνες, όπως η καλσιτονίνη, τα πεπτίδια αCGRP και βCGRP, η ιντερμεδίνη και η αδρενομεντουλίνη (Cooper *et al.*, 1989).

Φυσιολογικά, παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, όπου συντίθεται, αποθηκεύεται και συνεκκρίνεται μαζί με την ινσουλίνη ακολουθώντας την ίδια πορεία ωρίμανσης (2.2.4). Η πρόδρομη μορφή της αμυλίνης είναι η προ-προαμυλίνη, μία πρωτεΐνη 89 αμινοξικών καταλοίπων, η οποία συγκροτείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (22 αμινοξικών καταλοίπων) και την προαμυλίνη (67 αμινοξικών καταλοίπων). Η προαμυλίνη επεξεργάζεται στο σύστημα Golgi από τις κονβερτάσες PC2 και PC1/3, όπου δρουν αποσπώντας τα άκρα του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού τμήματος. Κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από το καρβοξυτελικό τμήμα το τριπεπτίδιο γλυκίνη – λυσίνη – αργινίνη που παραμένει αποτελεί το υπόστρωμα για τη δράση δύο ακόμα ενζύμων, τα οποία συμβάλλουν στην ωρίμανση της ορμόνης. Η καρβοξυπεπτιδάση E αποσπά τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα λυσίνη – αργινίνη, ενώ το κατάλοιπο γλυκίνης υποβοηθά το ένζυμο PAM (*peptidyl amydating mono-oxygenase complex*) να αμιδιώσει το καρβοξυτελικό άκρο της αμυλίνης (Betsholtz *et al.*, 1989a; Cao *et al.*, 2013).



Εικόνα 45. Η διαδικασία ωρίμανσης της προ-προαμυλίνης σε ώριμη αμυλίνη. (α) Η πρωτοταγής ακολουθία της προ-προαμυλίνης, (β) της προαμυλίνης και της (γ) ώριμης αμυλίνης (Προσαρμογή από (Cao *et al.*, 2013)).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

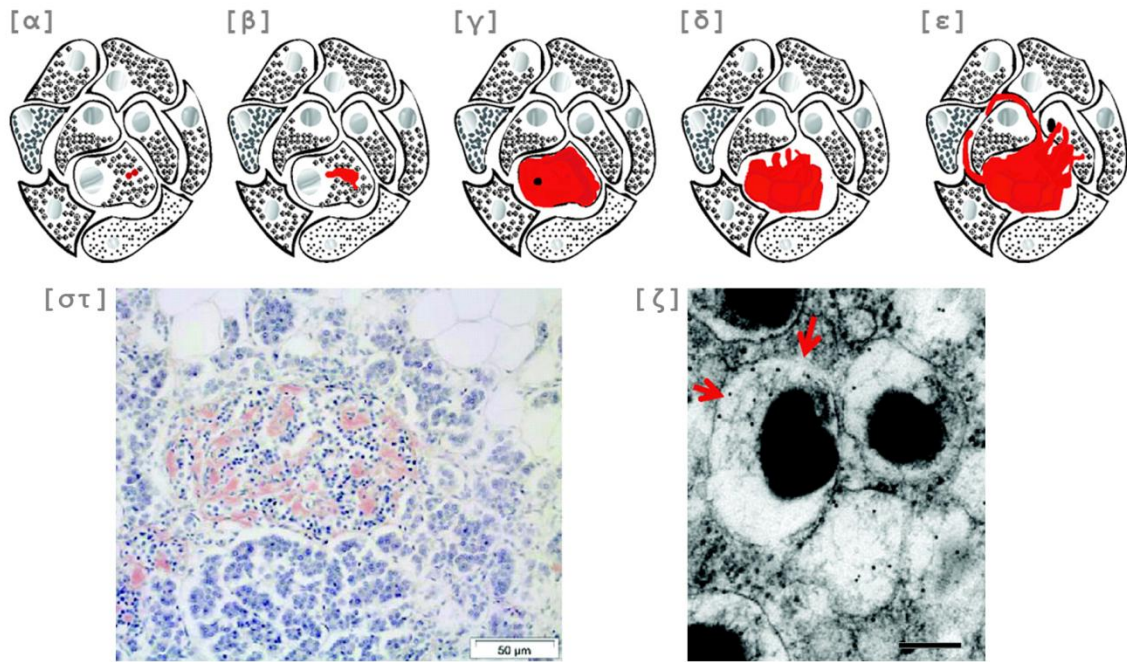
Η αμυλίνη είναι υψηλά συντηρημένη και εκφράζεται στα θηλαστικά (Betsholtz *et al.*, 1989a; Nishi *et al.*, 1989), στα πτηνά (Fan *et al.*, 1994), στα ψάρια (Westermarck *et al.*, 2002) και στα ερπετά. Η βασική λειτουργία της είναι η δράση της ως πεπτιδική ορμόνη που ρυθμίζει τον μεταβολισμό και την ομοιόσταση της γλυκόζης (Cooper, 1994; Young *et al.*, 1995).

	1	10	20	30
Human	KCNTATCATQRLANFLVHS		SNNFGAILSS	TNVGSNTYG
Macaque	KCNTATCATQRLANFLVRS		SNNFGTILSS	TNVGSDTYG
Baboon	ICNTATCATQRLANFLVRS		SNNFGTILSS	TNVGSDTYG
Cat	KCNTATCATQRLANFLIRS		SNNLGAILSP	TNVGSNTYG
Dog	KCNTATCATQRLANFLVRT		SNNLGAILSP	TNVGSNTYG
Rat	KCNTATCATQRLANFLVRS		SNNLGPVLP	TNVGSNTYG
Mouse	KCNTATCATQRLANFLVRS		SNNLGPVLP	TNVGSNTYG
Hamster	KCNTATCATQRLANFLVHS		NNNLGPVLS	TNVGSNTYG
Guinea p.	KCNTATCATQRLTNFLVRS		SHNLGAALLP	TDVGSNTYG
Deagu	KCNTATCATQRLTNFLVRS		SHNLGAALPP	TKVGSNTYG
Cow	KCGTATCETQRLANFLAPS		SNKLGAI FSP	TKMGSNTYG

Εικόνα 46. Η αμινοξική σύσταση της ώριμης αμυλίνης των θηλαστικών. Ακολουθείται η αρίθμηση της ανθρώπινης ακολουθίας. Η αμυλίνη είναι υψηλά συντηρημένη αλλά εμφανίζει σημαντικές αλλαγές στην περιοχή 20-29 (σημειώνεται με κόκκινο κουτί) μεταξύ των οργανισμών. Τα κατάλοιπα προλίνης στις θέσεις 25, 28 και 29, που συναντώνται στα τρωκτικά, θεωρήθηκαν σημαντικά για την αναστολή της αμυλοειδογονικότητας (Προσαρμογή από (Westermarck *et al.*, 2011)).

Αρχικά απομονώθηκε από εναποθέσεις στα νησίδα του Langerhans σε άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 (Cooper *et al.*, 1987) και λίγα χρόνια αργότερα αποδείχθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη τόσο του διαβήτη τύπου 1 όσο και του διαβήτη τύπου 2 (Verchere *et al.*, 1996). Ο μόνος γνωστός πολυμορφισμός στον άνθρωπο είναι η αλλαγή της σερίνης 20 σε γλυκίνη, που συναντάται σε ασιατικούς πληθυσμούς και δημιουργεί ένα υψηλά αμυλοειδογόνο ανάλογο της πρωτεΐνης (Westermarck *et al.*, 2011). *In vitro* πειράματα, όμως, αποδεικνύουν πως οι εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων της ανθρώπινης αμυλίνης παρουσιάζουν έντονη τοξικότητα και καταστρέφουν τα β-κύτταρα του παγκρέατος (Lorenzo *et al.*, 1994; Paulsson *et al.*, 2006), επηρεάζοντας τα διαθέσιμα επίπεδα γλυκόζης και τελικά, τον μεταβολισμό των ασθενών. Στην Εικόνα 47 παρουσιάζεται η εμφάνιση των εναποθέσεων στα β-κύτταρα που παγκρέατος, καθώς και ένα πιθανό μονοπάτι της πορείας εναπόθεσης της πεπτιδικής ορμόνης.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι



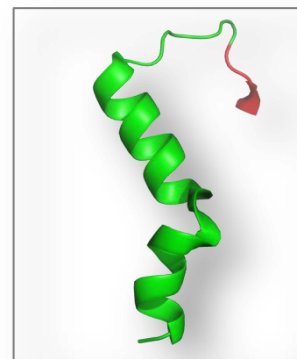
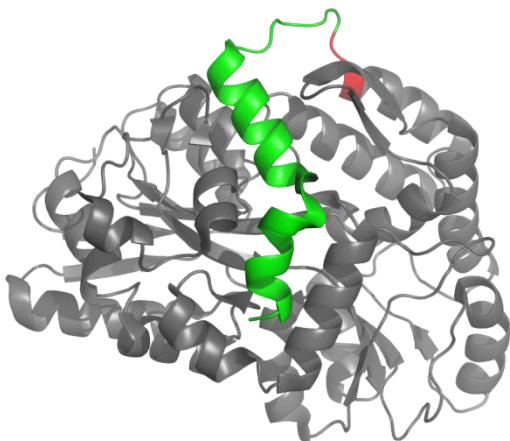
Εικόνα 47. Η εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων αμυλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος. (α-ε) Η αρχική εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων πραγματοποιείται στο εσωτερικό των β-κυττάρων. Η αλληλουχία των γεγονότων περιλαμβάνει αρχικά τη σύντηξη του πρόδρομου μορίου της αμυλίνης (προαμυλίνη) με μακρομόρια στο εσωτερικό των β-κυττάρων και τη σταδιακή αύξηση της μάζας των εναποθέσεων, η οποία αντικαθιστά τον κυτταροπλασματικό χώρο του β-κυττάρου και επάγει τη δράση των αποπτωτικών μηχανισμών. Μετά την καταστροφή του β-κυττάρου οι εναποθέσεις, που τώρα αποτελούνται από την ώριμη μορφή του πεπτιδίου, μεταφέρονται εξωκυτταρικά, όπου και λειτουργούν ως ‘εστίες πυρήνωσης’ για την εξάπλωση του φαινομένου (Προσαρμογή από (Paulsson *et al.*, 2006)). (στ) Ανθρώπινο παγκρεατικό νησίδιο, όπου παρατηρούνται εξωκυτταρικές εναποθέσεις αμυλοειδών ινιδίων αμυλίνης, έπειτα από χρώση με Congo Red (Προσαρμογή από (Westermarck *et al.*, 2011)). (ζ) Ηλεκτρονιογραφία κυστιδίων των β-κυττάρων του παγκρέατος διαγονιδιακού ποντικού που εκφράζει την ανθρώπινη αμυλίνη. Παρατηρούνται ινιδιακές εναποθέσεις εσωτερικά των κυστιδίων σημασμένες με ειδικό αντίσωμα (κόκκινα βέλη) (Προσαρμογή από (Westermarck *et al.*, 2011)).

Η εμφάνιση του διαβήτη δεν είναι αποκλειστικό φαινόμενο του ανθρώπινου οργανισμού, αλλά συναντάται και σε άλλα θηλαστικά. Το γεγονός αυτό φαίνεται ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτοταγή δομή της αμυλίνης, καθώς υπάρχει **σαφής σχέση της αμινοξικής σύστασής της με την τάση της να σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια**. Για παράδειγμα, σε αντίθεση με την ανθρώπινη ορμόνη, η αμυλίνη των τρωκτικών και του χοίρου, με μερικές μόνο αλλαγές στην αμινοξική της ακολουθία, είναι μη αμυλοειδογόνος (Wu and Shea, 2013) (Εικόνα 46). Η ιδέα ότι αμινοξικές αλλαγές μπορούν να τροποποιούν το αμυλοειδογόνο προφίλ της ορμόνης οδήγησε στο σχεδιασμό ενός πεπτιδικού φαρμάκου (εμπορική ονομασία *Pramlintide*) που δρα ως υποκατάστατο της αμυλίνης και έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς μαζί με την ινσουλίνη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 και διαβήτη τύπου 2 (Ratner *et al.*, 2004).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Στο μοριακό μηχανισμό συσσωμάτωσης της αμυλίνης αποκαλύφθηκε, ήδη από το 1990, από την ερευνητική ομάδα του P. Westermark, στο Uppsala University της Σουηδίας. Η ιδέα που υλοποίησε ήταν η σύνθεση τμημάτων της αμυλίνης από συγγενικά με τον άνθρωπο είδη και η συστηματική μελέτη τους. Η δημοσίευση αυτή ήταν η πρώτη εργασία η οποία επιχείρησε να ανάγει την αμυλοειδογονικότητα της αμυλίνης σε τμήματα και όχι σε ολόκληρη την πεπτιδική ορμόνη, γι' αυτό και προτάθηκε ότι το τμήμα $^{20}\text{SNNFGAILSS}^{29}$ έχει την τάση να 'οδηγεί' τη δημιουργία ινιδίων στην ανθρώπινη αμυλίνη (Westermark *et al.*, 1990). Λίγο αργότερα, μελέτες των Nilsson και Raleigh έδειξαν ότι εκτός από το τμήμα 20-29 και άλλα πεπτίδια-ανάλογα περιοχών της αμυλίνης είναι ικανά να σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια ($^{17}\text{SNNFGAILSS}^{37}$, $^{24}\text{GAILSST}^{30}$, $^{31}\text{NVGSNTY}^{37}$). Σήμερα είναι γνωστό ότι σχεδόν όλο το μήκος της ακολουθίας της αμυλίνης έχει περιοχές με αμυλοειδογόνο δυναμικό (Azriel and Gazit, 2001; Fox *et al.*, 2010; Lutz, 2010; Marek *et al.*, 2007).

[α]



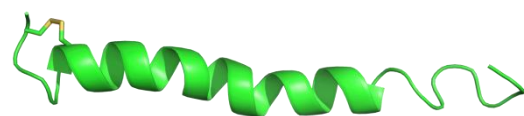
3G7V

[β]



2L86

[γ]



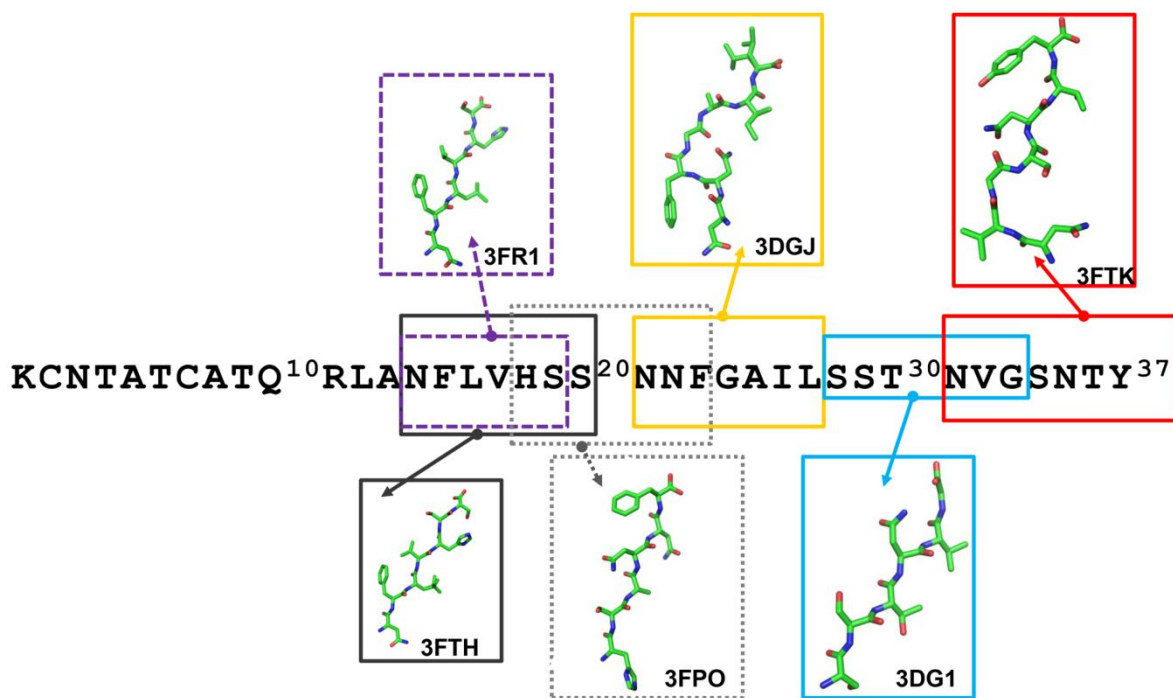
2KB8

Εικόνα 48. Προσδιορισμένες πειραματικά δομές της ανθρώπινης αμυλίνης. (α) Η ανθρώπινη αμυλίνη συν-κρυσταλλωμένη με την MBP (maltose binding protein –γκρι χρώμα) (Wiltzius *et al.*, 2008). Με κόκκινο παρουσιάζεται ο πεπτιδικός συνδέτης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. (β),(γ) Η δομή της αμυλίνης προσδιορισμένη σε διάλυμα με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) σε φυσιολογικό pH (β) (Nanga *et al.*, 2011) και σε όξινο pH (γ) (Patil *et al.*, 2009). Η δισουλφιδική γέφυρα παρουσιάζεται με κίτρινες ράβδους.

Οι κλασικές τεχνικές προσδιορισμού της δομής, δηλαδή ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός και η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, δεν έχουν μέχρι σήμερα καταφέρει να

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

προσδιορίσουν σε ατομική διακριτικότητα τη δομή και τη στερεοδιάταξη ολόκληρης της ώριμης αμυλίνης, πιθανά λόγω της έντονης τάσης της πρωτεΐνης να αυτοσυγκροτείται σε αμυλοειδή ινίδια, σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Στην Εικόνα 48 συγκεντρώνονται οι διαθέσιμες δομές της φυσιολογικής στερεοδιάταξης τμημάτων της αμυλίνης στη βάση PDB. Πολλά δομικά δεδομένα προτείνουν ότι η αμυλίνη έχει στερεοδιάταξη εγγενώς μη δομημένη ή και α-ελικοειδή στη φυσιολογική και λειτουργική της μορφή (Nanga *et al.*, 2011; Williamson and Miranker, 2007), ωστόσο η δομή της πρωτεΐνης κατά στο σχηματισμό των ινιδίων δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι κρυσταλλογραφία ακτίνων-X σε μικροκρυστάλλους πεπτιδικών τμημάτων της αμυλίνης έφερε στο φως την τρισδιάστατη δομή 6 επικαλυπτόμενων πεπτιδίων που ανήκουν στο τμήμα 13-37 της πρωτεΐνης και προτείνεται ότι σχηματίζουν συμπαγή στερεοδιαταξικά φερμουάρ (1.3.2), με καλά πακεταρισμένες πλευρικές αλυσίδες (Nelson *et al.*, 2005) (Εικόνα 49).

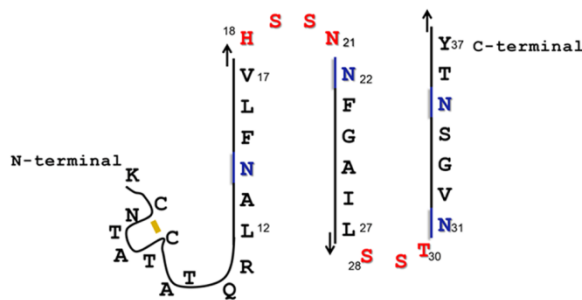


Εικόνα 49. Κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένα πεπτίδια-ανάλογα της ανθρώπινης αμυλίνης. Παρουσιάζονται οι κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές 6 αλληλοεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων της περιοχής 13-37 της ανθρώπινης αμυλίνης των πεπτιδίων ¹³NFLVHS¹⁸, ¹³NFLVHSS¹⁹, ¹⁸HSSNNE²³, ²¹NNEFGAIL²⁷, ²⁸SSTNVG³³, ³¹NVGSNTY³⁷ (Wiltzius *et al.*, 2008).

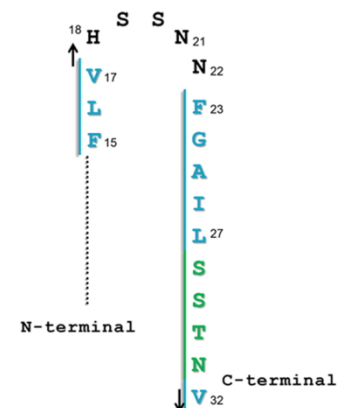
Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Πληθώρα θεωρητικών και πειραματικών μελετών έχει επιχειρήσει να εξάγει συμπεράσματα σχετικά με τη δομή της ορμόνης στην ινιδιακή κατάσταση. Το πρώτο μοντέλο που προτάθηκε είχε τη μορφή ‘σερπαντίνας’ (*parallel superpleated*) και πρότεινε ότι η αμυλίνη συγκροτείται σε 3 ανεξάρτητους β-κλώνους παίρνοντας τη μορφή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 50α (Kajava *et al.*, 2005). Στη συνέχεια, πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στερεάς φάσης (ssNMR) και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης-διέλευσης (STEM) πρότειναν ότι ο πυρήνας της ινιδιακής δομής της αμυλίνης αποτελείται από μία δομή φουρκέτας, στην οποία η αμυλίνη φέρει δύο β-κλώνους μεταξύ των καταλοίπων 8-17 και 28-37 (Luca *et al.*, 2007), μοντέλο που υποστηρίχθηκε αργότερα και από πειράματα διδιάστατης φασματοσκοπίας υπερερυθρού (2D-IR) (Shim *et al.*, 2009) (Εικόνα 50β). Τέλος, ένα τρίτο μοντέλο βασίστηκε στις δομές των τμημάτων 21-27 και 28-33 οι οποίες προτάθηκε ότι αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας ένα στερεοδιαταξικό φερμουάρ (Wiltzius *et al.*, 2008) (Εικόνα 50γ).

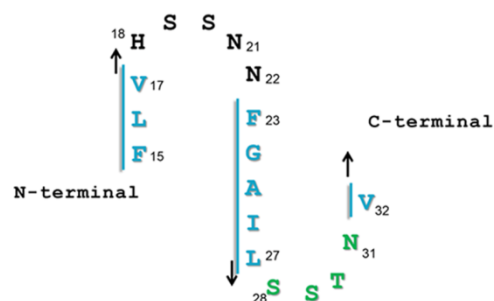
[α]



[β]



[γ]

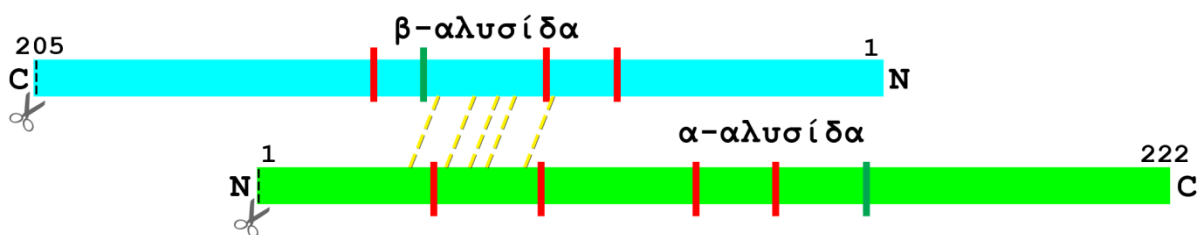


Εικόνα 50. Πιθανά μοντέλα διπλώματος της ανθρώπινης αμυλίνης στην ινιδιακή κατάσταση. Τα μοντέλα κατασκευάστηκαν με βάση τα πειραματικά και θεωρητικά αποτελέσματα των (Kajava *et al.*, 2005) (α), (Luca *et al.*, 2007) (β) και (Wiltzius *et al.*, 2008) (γ).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.2.3. Κλαστερίνη

Η κλαστερίνη είναι μία ετεροδιμερής πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των απολιποπρωτεϊνών. Ανακαλύφθηκε πρώτη φορά σε ιστούς κριαριού το 1983, όπου και βρέθηκε να ενισχύει τη συσσωμάτωση πρωτεϊνών *in vitro* (Blaschuk *et al.*, 1983). Το όνομα κλαστερίνη (*clusterin*), που καθιερώθηκε μετά τον πρώτο εντοπισμό της, διαφοροποιείται αρκετά για την ομόλογη πρωτεΐνη στον άνθρωπο (Burkey *et al.*, 1991; Burkey *et al.*, 1992), καθώς τα εναλλακτικά της ονόματα είναι πρωτεΐνη CLI, SP-40,40 ή απολιποπρωτεΐνη J (*ApoJ*) (Trogakos and Gonos, 2002). Η συγκριτική μελέτη των πρωτεϊνικών ακολουθιών της κλαστερίνης στα θηλαστικά αποκαλύπτει ποσοστό συντήρησης της τάξης των 70-85%, παρότι η ίδια πρωτεΐνη φαίνεται να εμφανίζει γενικά μεγάλες αποκλίσεις στα σπονδυλωτά (Tycko *et al.*, 1996).



Εικόνα 51. Σχηματική αναπαράσταση της ώριμη κλαστερίνης του ανθρώπου. Στο σχήμα παρουσιάζεται σε απλοποιημένη μορφή, υπό κλίμακα η α -αλυσίδα (ανοιχτό πράσινο) και η β -αλυσίδα (γαλάζιο) της ανθρώπινης κλαστερίνης (UniProtKB AC P10909) (UniProt, 2014; UniProt, 2015). Οι θέσεις γλυκοζυλίωσης σημειώνονται με κόκκινο, οι θέσεις των φωσφοσερινών σημειώνονται με πράσινο και οι πέντε δισουλφιδικές γέφυρες εμφανίζονται με κίτρινες στικτές γραμμές. Οι θέσεις της πρωτεολυτικής αποκοπής μεταξύ των δύο αλυσίδων εμφανίζονται με το σχήμα του ψαλιδιού.

Το γονίδιο της κλαστερίνης στον άνθρωπο κωδικοποιεί μία εκκριτική γλυκοπρωτεΐνη, πρόσφατα δεδομένα όμως αποδεικνύουν την ύπαρξη τόσο ενδοκυτταρικών όσο και πυρηνικών ισομορφών της πρωτεΐνης (Calero *et al.*, 2000). Η πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης αποτελείται από 449 αμινοξικά κατάλοιπα, όμως μετά από την πρωτεολυτική αποκοπή του σηματοδοτικού πεπτιδίου η εκκριτική κλαστερίνη κόβεται περαιτέρω προς το σχηματισμό δύο αλυσίδων, των α - και β -αλυσίδων της κλαστερίνης (Fink *et al.*, 1993). Η κυρίαρχη εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένη, έχει μέγεθος ~80 kDa και σταθεροποιείται ομοιοπολικά από 5 δισουλφιδικές γέφυρες (de Silva *et al.*, 1990) (Εικόνα 51).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

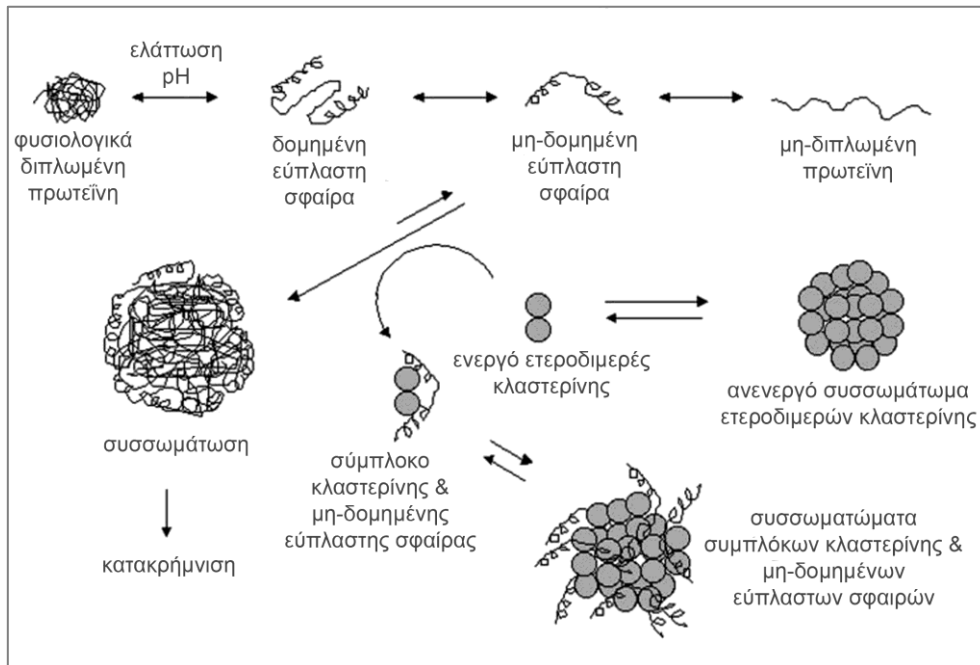
Βιβλιογραφικά δεδομένα αποκαλύπτουν μία πληθώρα λειτουργιών για το μόριο της κλαστερίνης (Trougakos and Gonos, 2009), με βασική τη **δράση της ως εξωκυτταρική πρωτεΐνη-συνοδό**. Η δράση αυτή φαίνεται πως παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την δράση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (*small heat shock proteins*) (Lakins *et al.*, 2002). Ως πρωτεΐνη-συνοδός, η κλαστερίνη δεσμεύει ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών μορίων-προσδετών, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, άλλων απολιποπρωτεϊνών και πολλών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Calero *et al.*, 2005; Trougakos and Gonos, 2002), καθώς εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς (Aronow *et al.*, 1993; French *et al.*, 1993).

Παρόλο που μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμες πειραματικά προσδιορισμένες δομές της κλαστερίνης, πολλές βιοπληροφορικές προσεγγίσεις φέρνουν στο φώς ενδιαφέροντα δομικά χαρακτηριστικά για το μόριο αυτό. Η κλαστερίνη είναι η πρώτη πρωτεΐνη-συνοδός που ενεργοποιείται κατά τη μείωση του pH, ενώ πιστεύεται ότι η έκθεση υδρόφοβων τμημάτων της στο διαλύτη είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με μη-φυσιολογικά διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια (Roop *et al.*, 2002) (Εικόνα 52). Σε μία προσπάθεια να εντοπίσει και να ταυτοποιήσει όλους τους λειτουργικούς επιτόπους της κλαστερίνης, ο Lakins και οι συνεργάτες του μελέτησαν ενδεδειγμένα τμήματα της πρωτεΐνης, συμπεραίνοντας ότι **η κλαστερίνη φέρει 3 ξεχωριστούς επιτόπους με τους οποίους δύναται να αλληλεπιδρά με προσδέτες**, μεταξύ των οποίων και το Αβ πεπτιδίο (Lakins *et al.*, 2002). Συνολικά, η πειραματική προσέγγιση σε συνδυασμό με την βιοπληροφορική ανάλυση απέδειξαν ότι οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης μορίων στην κλαστερίνη βρίσκονται τόσο στο καρβοξυτελικό άκρο της β-αλυσίδας, όσο και στο αμινοτελικό άκρο της α-αλυσίδας.

Η αύξηση της έκφρασης της κλαστερίνης παρατηρείται σε μία πληθώρα νευροεκφυλιστικών διαταραχών, στην αρτηριοσκλήρυνση και στον καρκίνο (Choi-Miura and Oda, 1996; Rosenberg and Silkensen, 1995; Tenniswood *et al.*, 1992). Ισχυρά εγκεφαλικά ισχαιμικά γεγονότα, για παράδειγμα, μπορεί να οδηγήσουν στη συσσωμάτωση της κλαστερίνης στα νευρικά κύτταρα και στην εμφάνιση εξωκυτταρικών εναποθέσεων στα αγγεία του εγκεφάλου ασθενών (Calero *et al.*, 2000). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι, αύξηση στην έκφραση του mRNA αναφέρεται στην νόσο του Alzheimer (Choi-Miura *et al.*, 1992), στην εγκεφαλική αμυλοείδωση Ολλανδικού τύπου (*HCHWA - Dutch type*) (Maat-Schieman *et al.*, 1996) και στην κληρονομούμενη Βρετανική άνοια (*familial British dementia*) (Matsubara *et al.*, 1995), όλες εκτενώς μελετημένες αμυλοειδώσεις. Ένας

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

αναλυτικός κατάλογος της εμπλοκής του πεπτιδίου σε παθολογικές καταστάσεις συνοψίζεται από τον Calero και του συνεργάτες του στο άρθρο (Calero *et al.*, 2000).



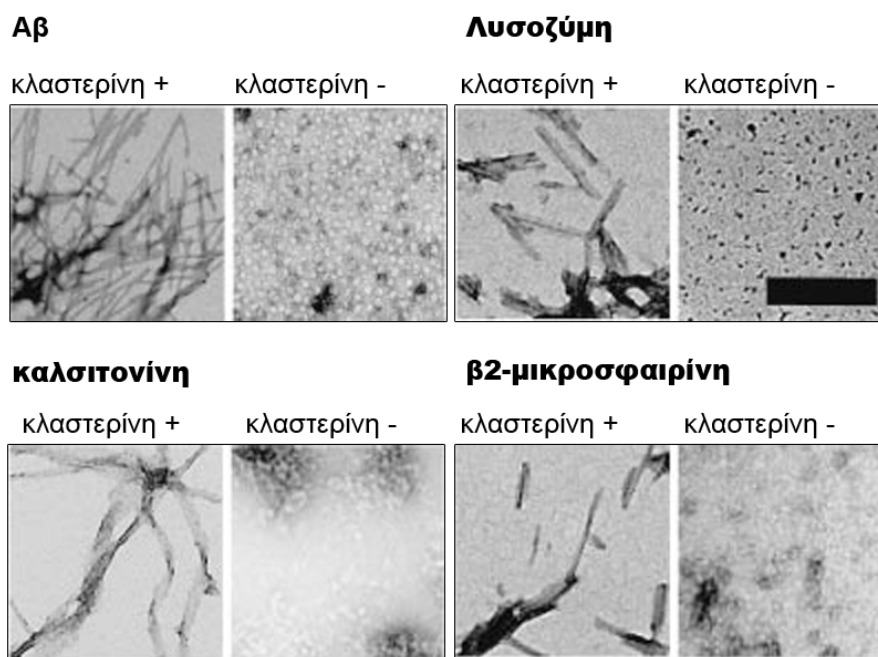
Εικόνα 52. Σχηματική αναπαράσταση του πιθανού μηχανισμού δράσης της κλαστερίνης. Σε συνθήκες στρες και συγκεκριμένα κατά την ελάττωση του pH, οι φυσιολογικές πρωτεΐνες υποβάλλονται σε μία διαδικασία ‘ξεδιπλώματος’, κατά την οποία από τη φυσιολογικά διπλωμένη κατάσταση θα βρεθούν σε ενδιάμεσες καταστάσεις – κατάσταση της δομημένης εύπλαστης σφαίρας (*ordered molten globule*) ή κατάσταση της μη-δομημένης εύπλαστης σφαίρας (*disordered molten globule*) –, πριν καταλήξει στη μη-διπλωμένη της μορφή. Οι ενδιάμεσες καταστάσεις της μη-δομημένης εύπλαστης σφαίρας εκθέτουν συνήθως υδρόφοβα τμήματα και για το λόγο αυτό μπορεί να συσσωματωθούν και να κατακρημνιστούν, μη-αναστρέψιμα. Στην πορεία αυτή επεμβαίνει η ετεροδιμερής κλαστερίνη, η οποία αλληλεπιδρά με τις ενδιάμεσες αυτές καταστάσεις και οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων συμπλόκων κλαστερίνης και μη-δομημένων εύπλαστων σφαιρών, ‘διασώζοντας’ τη μη-φυσιολογικά διπλωμένη πρωτεΐνη. Η μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ της συσσωματωμένης και της μη-συσσωματωμένης κλαστερίνης ενισχύεται σε όξινο pH προς τη μη-συσσωματωμένη μορφή, επιτρέποντάς της να δρα ως μόριο-συνοδός (Προσαρμογή από (Roop *et al.*, 2002)).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, η πιθανή εμπλοκή της κλαστερίνης στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων *in vivo* εξαρτάται από τη σχετική αφθονία της, καθώς η εκκριτική κλαστερίνη ασκεί διαφορετική δράση ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Για παράδειγμα, η κλαστερίνη του πλάσματος απαντάται σε συγκεντρώσεις 100 μg/ml (Morrissey *et al.*, 2001), σε αντίθεση με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό όπου συναντάται σε συγκεντρώσεις 2 μg/ml (Calero *et al.*, 2000). Έτσι, στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) η

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

μικρές συγκεντρώσεις κλαστερίνης ενισχύουν την αμυλοειδογένεση, ενώ στο πλάσμα του αίματος η άφθονη κλαστερίνη αναστέλλει την αμυλοειδογένεση (DeMattos *et al.*, 2002).

Τουλάχιστον *in vitro* η κλαστερίνη δεν φαίνεται να εμφανίζει κάποια προτίμηση ως προς το πρωτεϊνικό μόριο με το οποίο θα αλληλεπιδράσει. Τα σχετικά χαμηλά επίπεδα εξειδίκευσης της κλαστερίνης ως προς την αλληλεπίδρασή της με το υπόστρωμα υποδηλώνουν ότι **η κλαστερίνη αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά**, όπως για παράδειγμα οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες ή οι απολιποπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, *in vitro* πειράματα αποδεικνύουν ότι η κλαστερίνη σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με προϊνδιακά συσσωματώματα γνωστών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και μειώνει την ικανότητά τους να συσσωματώνονται σε διαλύματα (Kumita *et al.*, 2007; Yerbury *et al.*, 2007). Η ένδειξη ότι η κλαστερίνη δεν προσδένεται σε ώριμα ινίδια αλλά σχετίζεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις με ‘αμυλοειδογόνο υλικό’ μπορεί να παρέχει βάσιμη εξήγηση για την εμφάνιση της κλαστερίνης σε μία ποικιλία ασθενειών που σχετίζονται με την εναπόθεση αμυλοειδών *in vivo*.

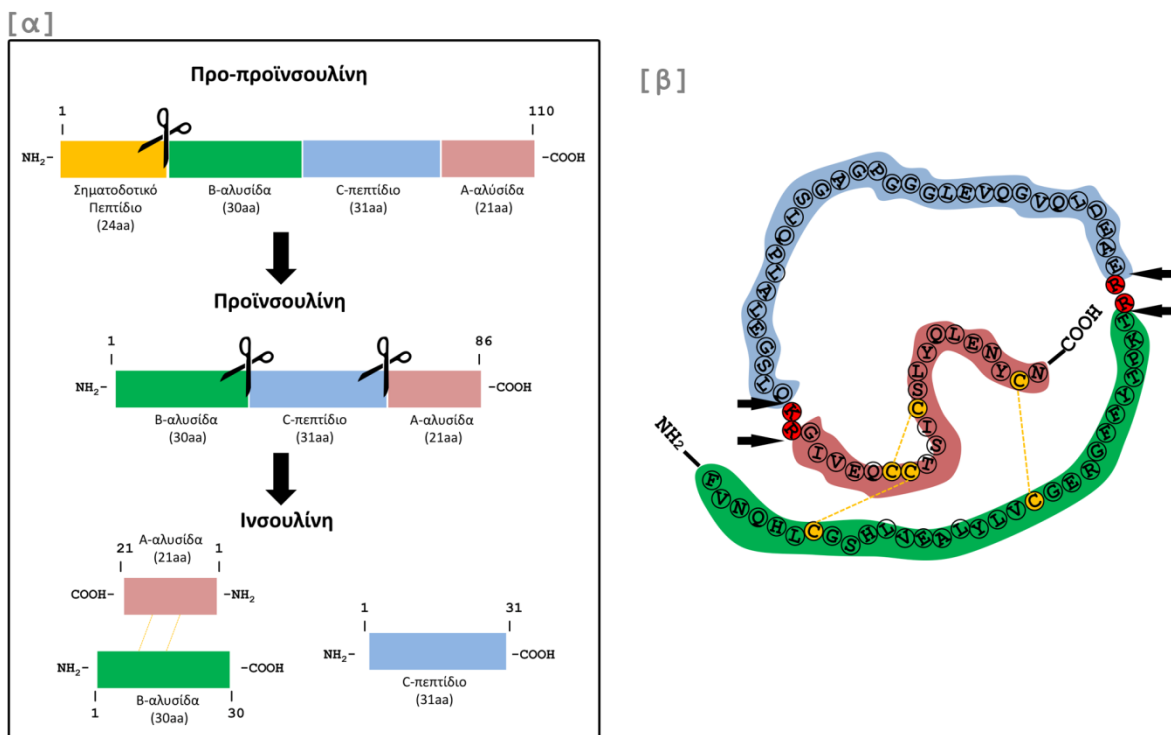


Εικόνα 53. Επίδραση της κλαστερίνης στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων *in vitro*. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης ινιδίων υπο την επίδραση (κλαστερίνη +) και χωρίς την επίδραση (κλαστερίνη -) της κλαστερίνης σε γνωστές αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Προσαρμογή από (Yerbury *et al.*, 2007)).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.2.4. C-πεπτίδιο της προϊνσουλίνης

Το C-πεπτίδιο της προϊνσουλίνης ή C-πεπτίδιο ήταν για πολλά χρόνια μία ξεχασμένη παράμετρος στις μελέτες που αφορούσαν την ινσουλίνη, ωστόσο σύγχρονες προσεγγίσεις το φέρνουν στην επιφάνεια αποδεικνύοντας τη σημασία του σε ένα πλήθος βιολογικών διεργασιών. Κατά την πρώτη ανακάλυψη του το 1967 (Steiner and Oyer, 1967), το 31 καταλοίπων πεπτίδιο θεωρήθηκε παραπροϊόν στην πορεία βιοσύνθεσης της ινσουλίνης, σήμερα όμως είναι γνωστό ότι συμμετέχει ως μία βιολογικά δραστική ορμόνη σε διαδικασίες όπως η φλεγμονή, η μικροαγγειακή κυκλοφορία ή η ορθή λειτουργία των νευρώνων (Wahren *et al.*, 2007).



Εικόνα 54. Σχηματική αναπαράσταση των μοριακών διεργασιών ωρίμανσης της προ-προϊνσουλίνης (α) και της δομής της προϊνσουλίνης στο χώρο (β). (α) Η αλληλουχία των μοριακών διεργασιών μετατροπής της προ-προϊνσουλίνης σε ώριμη ινσουλίνη και C-πεπτίδιο. (β) Στο σχήμα παρουσιάζεται η ανθρώπινη προϊνσουλίνη, όπου με κόκκινο φαίνεται η A αλυσίδα και με πράσινο η B αλυσίδα, ενώ το C-πεπτίδιο -πεπτίδιο γέφυρα-παρουσιάζεται με μπλε. Τα κατάλοιπα κυστεϊνών που συμβάλλουν στη δημιουργία δύο διαμοριακών και ενός ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού απεικονίζονται με κίτρινο και ενώνονται με κίτρινη στικτή γραμμή. Τα βέλη εκατέρωθεν της προϊνσουλίνης σημαίνουν τα σημεία δράσης της καρβοξυπεπτιδάσης.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Η φυσιολογική βιοσύνθεση της ινσουλίνης πραγματοποιείται στα β-κύτταρα του παγκρέατος και περιλαμβάνει μία αλληλουχία καλά προγραμματισμένων γεγονότων, όπου η προ-προϊνσουλίνη μετατρέπεται σε ινσουλίνη, με τελικό σκοπό τη δημιουργία ώριμων κυστιδίων (Εικόνα 54). Η ωρίμανση των κυστιδίων ολοκληρώνεται περίπου 2 ώρες μετά την αρχική σύνθεση της προ-προορμόνης και λαμβάνει χώρα σε ένα όξινο περιβάλλον, που κυμαίνεται από pH 5 έως pH 5.5 (Muller and Lindberg, 1999; Seidah and Chretien, 1999; Zhou *et al.*, 1999).

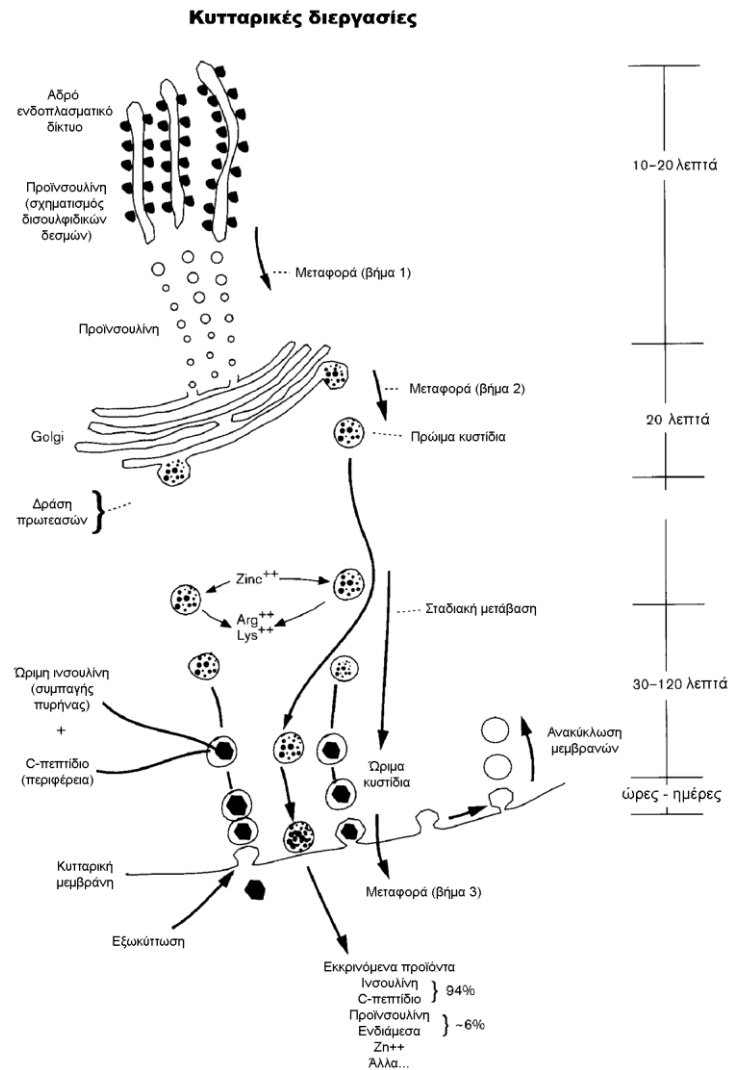
Η πρόδρομη μορφή της ινσουλίνης είναι η προ-προϊνσουλίνη, μία πρωτεΐνη 110 αμινοξικών καταλοίπων, η οποία συγκροτείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 24 αμινοξικών καταλοίπων, την Β αλυσίδα της ινσουλίνης (30 αμινοξικά κατάλοιπα), την Α αλυσίδα της ινσουλίνης (21 αμινοξικά κατάλοιπα) και τέλος, το C-πεπτίδιο, μία ‘πεπτιδική γέφυρα’ 31 αμινοξικών καταλοίπων μεταξύ των Α και Β αλυσίδων (Dodson and Steiner, 1998; Steiner, 1969; Steiner and Oyer, 1967) (Εικόνα 54α).

Η πρωτεολυτική αποκοπή του σηματοδοτικού πεπτιδίου της προ-προϊνσουλίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγεί στη δημιουργία της προϊνσουλίνης, η οποία μεταφέρεται σε ανώριμα εκκριτικά κυστίδια κλαθρίνης στο σύμπλεγμα Golgi, όπου επιτρέπει το σχηματισμό των πρώιμων κυστιδίων (*early granules*) (Steiner *et al.*, 2001). Η ενδιάμεση αυτή μορφή της ινσουλίνης μπορεί να διπλωθεί στη φυσιολογική της στερεοδιάταξη με τη συνεισφορά 3 δισουλφιδικών δεσμών (δύο διαμοριακών και ενός ενδομοριακού), ο σχηματισμός των οποίων ευνοείται στις συνθήκες pH που επικρατούν στα πρώιμα κυστίδια, κατά τη βιοσύνθεση (Dodson and Steiner, 1998) (Εικόνα 54β, Εικόνα 55).

Η σημαντική αλλαγή του pH ευνοεί ακόμα τη δράση ειδικών κονβερτασών που συμβάλλουν στην ωρίμανση της ορμόνης. Οι κονβερτάσες PC2 και PC1/3, δρουν αποσπώντας το C-πεπτίδιο, δηλαδή την πεπτιδική γέφυρα που ενώνει τις αλυσίδες Α και Β, ενώ η καρβοξυπεπτιδάση-Ε (CPE) απομακρύνει τα εναπομείναντα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα από τα καρβοξυτελικά άκρα των αλυσίδων Α και Β, συμβάλλοντας στην ωρίμανση της ορμόνης (Fricker *et al.*, 1986; Muller and Lindberg, 1999; Seidah and Chretien, 1999; Zhou *et al.*, 1999) (Εικόνα 54β, κατάλοιπα με κόκκινο χρώμα). Η παραπάνω διαδικασία ωρίμανσης οδηγεί στην αποθήκευση τόσο της ινσουλίνης όσο και του C-πεπτιδίου σε ισομοριακές ποσότητες στα ώριμα κυστίδια (Steiner and Philipson, 2000). Η τελική απελευθέρωση της ινσουλίνης είναι μία διαδικασία εξωκύττωσης από τα β-κύτταρα στην κυκλοφορία, ως απόκριση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Seino and Bell, 2008). Όπως είναι προφανές, τόσο η ώριμη ινσουλίνη, όσο και το C-πεπτίδιο

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

απελευθερώνονται σε ισομοριακές ποσότητες στην κυκλοφορία (Steiner and Philipson, 2000). Η Εικόνα 55 παρουσιάζει μία απλοποιημένη αναπαράσταση της βιοσύνθεσης της ινσουλίνης.

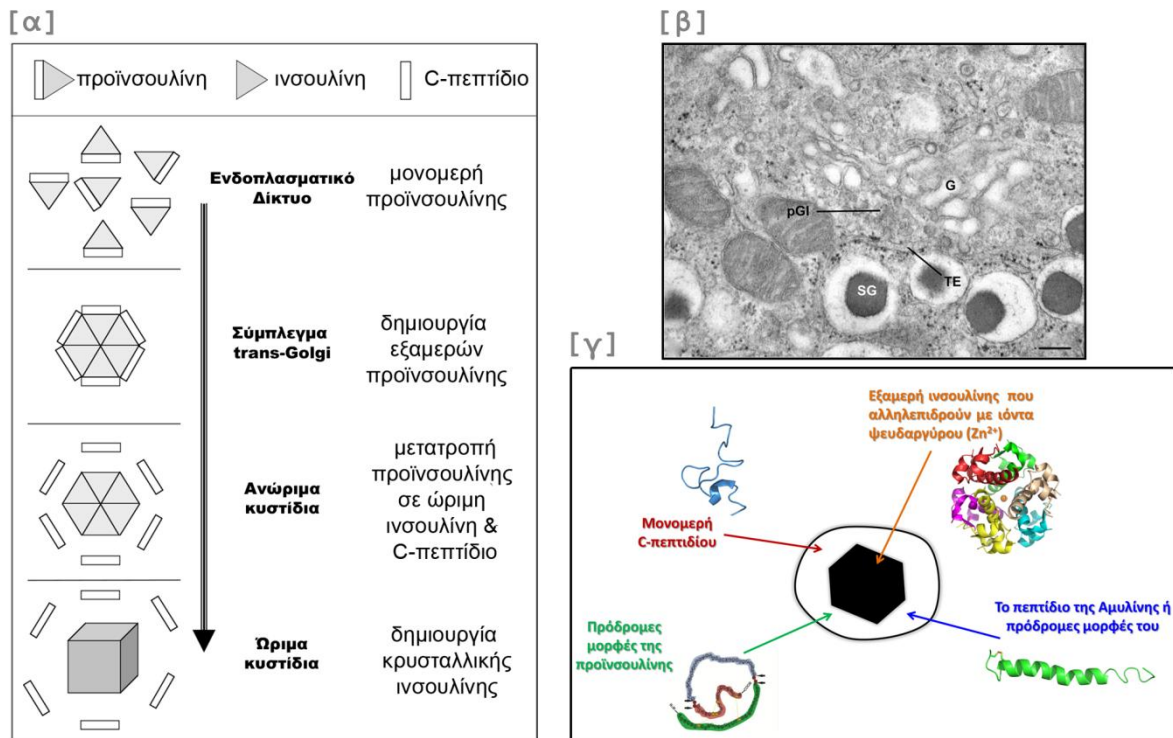


Εικόνα 55. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας των κυτταρικών διεργασιών κατά τη βιοσύνθεση της ινσουλίνης (Προσαρμογή από (Dodson and Steiner, 1998)).

Η βιογένεση των ώριμων κυστιδίων στα β-κύτταρα του παγκρέατος ταξινομείται σε 3 διακριτά στάδια, λαμβάνοντας υπόψη τις μεταβάσεις των συστατικών που τα αποτελούν (Εικόνα 56α). Η αρχική διαλογή των συστατικών των ανώριμων κυστιδίων ξεκινά στο σύμπλεγμα trans-Golgi (TGN), ακολουθεί η διαδικασία ‘εκκόλαψης’ σε καλυμμένα με κλαθρίνη ανώριμα κυστίδια που αποκολλώνται από το σύμπλεγμα Golgi και τέλος πραγματοποιείται η ωρίμανση των ανώριμων κυστιδίων ως αποτέλεσμα της διαδικασίας

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

ωρίμανσης των συστατικών που τα αποτελούν (Molinete *et al.*, 2000), δηλαδή της αποκοπής του C-πεπτιδίου και της δημιουργίας κρυσταλλικής ινσουλίνης (Εικόνα 56α).



Εικόνα 56. Τα ώριμα κυστιδία της προΐνσουλίνης. (α) Η δημιουργία των ώριμων κυστιδίων ινσουλίνης περιλαμβάνει την ωρίμανση της προ-προΐνσουλίνης σε ινσουλίνη, μία διαμερισματοποιημένη διαδικασία, η οποία χωρίζεται 3 διακριτά στάδια. Η αρχική δημιουργία εξαμερών προΐνσουλίνης ξεκινά στο σύμπλεγμα trans-Golgi (TGN), ακολουθεί η μετατροπή της προΐνσουλίνης σε ώριμη ινσουλίνη και C-πεπτίδιο στα ανώριμα κυστιδία, ενώ τέλος πραγματοποιείται η δημιουργία ενός συμπαγούς πυρήνα κρυσταλλικής ινσουλίνης με την αποκοπή του C-πεπτιδίου, που οδηγεί στην τελική ωρίμανση των κυστιδίων (Προσαρμογή από (Molinete *et al.*, 2000)). (β) Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης β-κυττάρων του παγκρέατος από ιστό υγιούς ποντικού, όπου παρουσιάζεται ένα τμήμα του κυτταροπλάσματος. Παρατηρούμε το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (RER), μεταφραστικά στοιχεία (TE), ένα προ-κυστίδιο του συμπλέγματος Golgi (pGI), το σύμπλεγμα Golgi (G) και ώριμα εκκριτικά κυστιδία ινσουλίνης (SG) (Προσαρμογή από (Zuber *et al.*, 2004)) (Ράβδος 0.17μm). (γ) Σχηματική αναπαράσταση ενός ώριμου κυστιδίου ινσουλίνης, όπου καταγράφονται τα συστατικά του συμπαγούς πυρήνα (εξαμερή ινσουλίνης) αλλά και της περιφέρειας του (προΐνσουλίνη, αμυλίνη, προαμυλίνη, C-πεπτίδιο).

Οι διεργασίες ωρίμανσης των κυστιδίων σε μοριακό επίπεδο οδηγούν στη δημιουργία δύο διακριτών περιοχών στο εσωτερικό τους, του συμπαγούς πυρήνα (*'dense core'*) που αποτελείται από κρυσταλλική ινσουλίνη και της περιφέρειας (*'halo'*) του κυστιδίου, όπου αποθηκεύεται το C-πεπτίδιο, σε ισομοριακή ποσότητα με την ινσουλίνη (Εικόνα 56β, Εικόνα 56γ). Η μη αναμενόμενη εμφάνιση της κρυσταλλικής κατάστασης σε μία βιολογική διεργασία είναι εύλογη, αν αναλογιστεί κανείς τους ρόλους που εξυπηρετεί, μιας και η

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

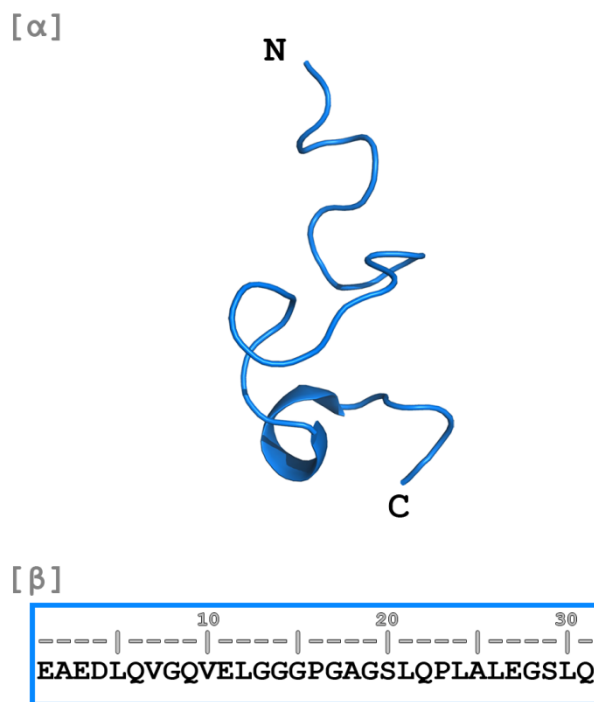
πακεταρισμένη ινσουλίνη στον συμπαγή πυρήνα μπορεί να προστατεύεται από την ανεπιθύμητη πρωτεόλυση. Η περιφέρεια των ώριμων κυστιδίων ινσουλίνης, βέβαια, συγκροτείται και από μία πληθώρα άλλων πεπτιδίων, όπως είναι η αμυλίνη, η πρόδρομη μορφή της αμυλίνης (προαμυλίνη), ποσότητες προΐνσουλίνης καθώς και άλλων μακρομορίων (Lukinius *et al.*, 1989; Steiner and Philipson, 2000; Steiner *et al.*, 2001)

Σε αντίθεση με το C-πεπτίδιο, η δομή του οποίου είναι πεδίο επιστημονικών αντιπαραθέσεων, η τρισδιάστατη δομή της ώριμης ινσουλίνης έχει προσδιοριστεί πειραματικά με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, σε πληθώρα συνθηκών και διαφορετικά κρυσταλλικά συστήματα. Πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) προσδιόρισαν σε διαλύματα τη στερεοδιάταξη της προΐνσουλίνης και του C-πεπτιδίου (Munte *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010) και έδειξαν ότι τα πεπτίδια υιοθετούν μη-κανονικές δομές (Weiss *et al.*, 1990) (Εικόνα 57).

Παρότι η πλειοψηφία των πειραμάτων συγκλίνει στη μη-κανονική δομή (*random coil*), στοχευμένες μελέτες αποκαλύπτουν ότι το C-πεπτίδιο μπορεί να έχει ανιχνεύσιμα δομημένα τμήματα τόσο όταν είναι ελεύθερο, όσο και όταν είναι προσκολλημένο στην ινσουλίνη (Brems *et al.*, 1990). Συγκεκριμένα, το αμινοτελικό άκρο του C-πεπτιδίου (¹EAEDLQVGQVE¹¹) μπορεί να αποκτά α-ελικοειδή στερεοδιάταξη σε υψηλές συγκεντρώσεις τριφλουροαιθανόλης (*TFE*) (Henriksson *et al.*, 2000), ενώ προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής προτείνουν μοτίβα στροφών τόσο στο μέσο τμήμα όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου (Mares-Guia *et al.*, 2006).

Τα δομημένα τμήματα του C-πεπτιδίου φαίνεται ότι σχετίζονται άμεσα με τις λειτουργίες που επιτελεί το πεπτίδιο. Το αμινοτελικό άκρο του έχει δράση μοριακής συνοδού και συνεισφέρει στο σωστό δίπλωμα της ινσουλίνης, αποτρέποντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων ινσουλίνης (Chen *et al.*, 2002; Jornvall *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2003). Το καρβοξυτελικό άκρο φέρει έναν επίτοπο για την εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με έναν συζευγμένο με G πρωτεΐνες υποδοχέα (*GPCR146*) (Yosten *et al.*, 2013), ενώ συγκεκριμένα το καρβοξυτελικό πενταπεπτίδιο ²⁷EGSLQ³¹ μπορεί από μόνο του να προσομοιώνει τον τρόπο με τον οποίο το 31 καταλοίπων πεπτίδιο προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια (Rigler *et al.*, 1999). Τέλος το κεντρικό τμήμα του πεπτιδίου (¹⁶PGAGSLQPLAL²⁶), μία περιοχή με υψηλή τάση προς το σχηματισμό στροφών, φαίνεται να είναι ευέλικτο λόγω της αμινοξικής του σύστασης και προτείνεται ότι μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις C-πεπτιδίου – μεμβρανών σε χαμηλό pH (Mares-Guia *et al.*, 2006; Unnerstale and Maler, 2012).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι



Εικόνα 57. Η δομή και η αμινοξική σύσταση του C-πεπτιδίου. (α) Η δομή του C-πεπτιδίου σε διάλυμα, όπως προέκυψε από πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (εγγραφή 1T0C στη βάση PDB, N: αμινοτελικό άκρο, C: καρβόξυτελικό άκρο) (Munte *et al.*, 2005). (β) Η αμινοξική σύσταση του 31 αμινοξικών καταλοίπων C-πεπτιδίου (Uniprot AC: P01308).

Οι μελέτες που σχετίζονται με τη λειτουργία του C-πεπτιδίου εμπλουτίζονται διαρκώς (Steiner, 2004), καθώς ήδη από το 1990 επανεξετάστηκε η πιθανότητα το πεπτίδιο να δρα αυτόνομα σε φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Έτσι, κατά τη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας ένας αυξανόμενος αριθμός εργασιών δίνει νέες διαστάσεις στη φυσιολογία και τη δράση του C-πεπτιδίου. Διαγραμματικά, οι πιο πρόσφατες αναφορές εστιάζουν στη συμμετοχή του C-πεπτιδίου στην κυτταρική σηματοδότηση, στην αλληλεπίδρασή του με τις μεμβράνες, στην ενδοκύττωσή του σε εξωσώματα ή στον πυρήνα, στη δράση του στα ερυθροκύτταρα, καθώς και στην ιδιαίτερη αλληλεπίδρασή του με την ινσουλίνη (Hills and Brunskill, 2008; Johansson *et al.*, 2002; Landreh and Jornvall, 2015; Wahren *et al.*, 2004), καθώς και στις σημαντικές επιδράσεις του σε ασθενείς με διαβήτη (Landreh and Jornvall, 2015).

Μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του C-πεπτιδίου φαίνεται πως είναι η **συνεισφορά του στη βιοσύνθεση της ινσουλίνης**, καθώς, όπως έχει περιγραφεί, είναι ο

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

πεπτιδικός συνδέτης μεταξύ των A και B αλυσίδων, στην πρόδρομη μορφή της ινσουλίνης (Εικόνα 55β). Φυσιολογικά, το C-πεπτιδίο συμμετέχει στο σχηματισμό των σταθερών εξαμερών ινσουλίνης στα β-κύτταρα του παγκρέατος (Εικόνα 56α) και αποτρέπει την ώριμη ινσουλίνη από το μη φυσιολογικό δίπλωμα, διασφαλίζοντας την ακεραιότητα των β-κυττάρων του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, η συνεισφορά του στη δομή της προϊνσουλίνης έχει χαρακτήρα πρωτεΐνης-συνοδού και βοηθά στην αποφυγή δημιουργίας ανεπιθύμητων συσσωμάτωμάτων (Shafqat *et al.*, 2006; Steiner, 1969).

Η ισομοριακή αποθήκευση και έκκριση του C-πεπτιδίου και της ινσουλίνης, ήταν η αφορμή για τη χρήση του ως ανεξάρτητο βιοδείκτη μέτρησης του βαθμού έκκρισης της ινσουλίνης ήδη από το 1969 (Polonsky *et al.*, 1986; Rubenstein *et al.*, 1969) και ως διαγνωστικού εργαλείου (Kahn, 2003; Seino and Bell, 2008). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες, αναφέρουν την ευεργετική δράση του C-πεπτιδίου στο διαβήτη όταν συνδυάζεται με τις καθιερωμένες υποδόριες ενέσεις ινσουλίνης. Συγκεκριμένα εκτεταμένες μελέτες σε ζωικά μοντέλα του διαβήτη και πρώιμες κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 αποδεικνύουν ότι, η αντικατάσταση του C-πεπτιδίου έχει ευεργετικές συνέπειες στις λειτουργικές και δομικές δυσλειτουργίες που προκαλούνται από το διαβήτη στους περιφερειακούς νευρώνες, στους νεφρούς και στον εγκέφαλο (Wahren and Larsson, 2015).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3. Δομικές Μελέτες σε Αμυλοειδογόνες Πρωτεΐνες του Ανθρώπου

2.3.1. Σύνθεση πεπτιδίων-αναλόγων

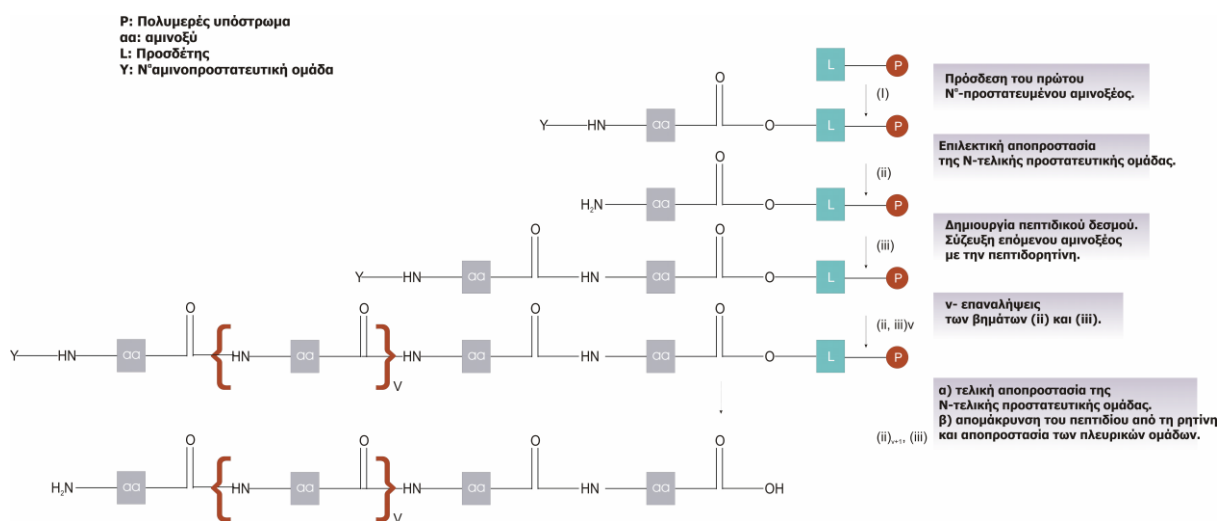
Η χημική σύνθεση των πεπτιδίων είναι μία διαδικασία στην οποία πραγματοποιείται βήμα προς βήμα η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας, με την προσθήκη αμινοξέων. Η ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στη φύση, μπορεί να ξεκινήσει είτε από το αμινοτελικό είτε από το καρβοξυτελικό άκρο. Στην οργανική χημεία η σύνθεση πεπτιδίων είναι μία καθόλου αυθόρμητη διαδικασία κατά την οποία λαμβάνονται ιδιαίτερες προφυλάξεις για την επιλεκτική αντίδραση των διαθέσιμων ομάδων. Έτσι, εκτός από την προστασία των καρβοξυτελικών και των αμινοτελικών ομάδων των αμινοξέων, κατά τη χημική σύνθεση πραγματοποιείται προστασία όλων των πλευρικών αλυσίδων τους με κατάλληλες χημικές ομάδες, η οποίες απομακρύνονται στρατηγικά στη συνέχεια. **Πεπτίδια που σχεδιάζονται έτσι ώστε να ομοιάζουν/αντιστοιχούν σε περιοχές φυσικά απαντώμενων πρωτεϊνικών μορίων και δημιουργούνται με μεθόδους χημικής σύνθεσης, θα ονομάζονται στο εξής και πεπτίδια-ανάλογα.**

Στην περίπτωση των πεπτιδίων-αναλόγων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε ανοικοδόμηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ύστερα από τη σύνδεση του καρβοξυτελικού αμινοξέος με ομοιοπολικό δεσμό (εστερικός ή αμιδικός δεσμός) σε μία χαρακτηριστική ομάδα (προσδέτη) ενός αδιάλυτου στις συνθήκες της σύνθεσης στερεού υποστρώματος πολυμερούς ρητίνης. Ειδικότερα, **η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε στερεά φάση με χρήση της μεθοδολογίας Fmoc/tBu (9-φλουορενυλο-μεθοξυκαρβονυλ-ομάδα/ t-βουτυλομάδα) σε κλίμακα 100 mg.** Η αλληλουχία των κυκλικών γεγονότων που ακολούθησε για τη σύνθεση του πεπτιδίου περιλαμβάνει: 1) επιλεκτική αποπροστασία της αμινοτελικής προστατευτικής ομάδας του πρώτου αμινοξέος, 2) σύζευξη του επόμενου αμινοξέος με την πεπτιδορητίνη, 3) πολλαπλές επαναλήψεις των βημάτων 1) και 2) (Εικόνα 58). Μεταξύ των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκαν πλύσεις με οργανικούς διαλύτες που απομακρύνουν τόσο τα παραπροϊόντα όσο και την περίσσεια των αντιδραστηρίων, ενώ προετοιμάζουν τη ρητίνη για τα επόμενα στάδια.

Ο πρωταρχικός καθαρισμός των νεοσυνθεθειμένων πεπτιδίων έγινε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, με υλικό πλήρωσης Sephadex (δεξατράνη) τύπου G (G-5 έως 25 ανάλογα με το μοριακό βάρος του πεπτιδίου) και εκλούτη υδατικό διάλυμα οξικού οξέος. Ο πλήρης καθαρισμός των πεπτιδίων επιτυγχάνεται με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) σε κολώνες πολυμερών silica, που δεσμεύουν αλυσίδες 8 με 18 ατόμων άνθρακα. Η έκλυση των πεπτιδίων πραγματοποιείται με εκλούτη σύστημα διαλυτών ακετονιτριλίου/νερό (AcCN/H₂O, 0,1% TFA). Ανάλογα με την αμινοξική σύνθεση του πεπτιδίου προστίθεται κατάλληλος δεσμευτής κατιόντων (ή μίγμα δεσμευτών), καθώς κατά την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων σε όξινες συνθήκες παράγονται μία σειρά κατιόντων που μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικό αριθμό παραπροϊόντων. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη, καθώς και η απομάκρυνση των πλάγιων προστατευτικών ομάδων, πραγματοποιήθηκε με την επίδραση διαλύματος οργανικών διαλυτών οι οποίοι μειώνουν την πολικότητα του πεπτιδίου και ως εκ τούτου ελαττώνουν την συγκράτηση των πεπτιδίων. (Π.χ. TFA/TIS/1,2-αιθανοδιθειόλης/νερό -95:2:1,5:1,5, v/v/v/v ανά 15 ml/g πεπτιδορητίνης). **Τη χημική σύνθεση ακολουθεί η διαδικασία της κρυοξήρανσης ή λυοφιλίωσης (freeze drying ή lyophilization)** που περιλαμβάνει την ψήξη των πεπτιδίων σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια την απομάκρυνση του νερού με εξάχνωση.



Εικόνα 58. Συνοπτική παρουσίαση της σύνθεσης (n+1)-πεπτιδίου σε στερεά φάση.

Αποτέλεσμα των παραπάνω διαδικασιών ήταν η παραγωγή λυοφιλιωμένων πεπτιδίων-αναλόγων με υψηλή καθαρότητα (τουλάχιστον 95%), όπως επιβεβαιώνουν και τα σχετικά πειράματα φασματοσκοπίας μάζας. Στα συντεθειμένα πεπτιδία-ανάλογα δημιουργήθηκαν κατά περίπτωση συγκεκριμένες χημικές τροποποιήσεις, για αποφυγή ανεπιθύμητων αντιδράσεων ή για την προσομοίωση χαρακτηριστικών των πρωτεϊνικών μορίων στην *in vivo* κατάσταση. Έτσι, στη μελέτη της ανθρώπινης αμυλίνης

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

πραγματοποιήθηκε αμιδίωση του καρβοξυτελικού άκρου (προσθήκη της ομάδας $-NH_2$), ενώ στα υπόλοιπα συστήματα τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο παρέμειναν ελεύθερα. Αξίζει να σημειωθεί ότι πεπτίδια με μοναδιαία κατάλοιπα κυστεΐνης είτε τροποποιήθηκαν χημικά με την προσθήκη μεθυλομάδας στην $-SH$ ομάδα της πλευρικής αλυσίδας τους, είτε μεταλλάχθηκαν σε κατάλοιπο αλανίνης. Η τελευταία μεταλλαγή της κυστεΐνης σε αλανίνη συνηθίζεται στη βιβλιογραφία να γίνεται και σε κατάλοιπο σερίνης. Ωστόσο, η αντικατάσταση της κυστεΐνης με αλανίνη θεωρείται πιο ήπια, καθώς πιστεύεται ότι διατηρεί τον υδρόφοβο χαρακτήρα της κυστεΐνης και ταυτόχρονα δεν προσδίδει στο υπό μελέτη πεπτίδιο επιπρόσθετες δυνατότητες αλληλεπίδρασης (δημιουργία γεφυρών άλατος ή δεσμών υδρογόνου), όπως συμβαίνει με την προσθήκη σερίνης (Goldschmidt *et al.*, 2010).

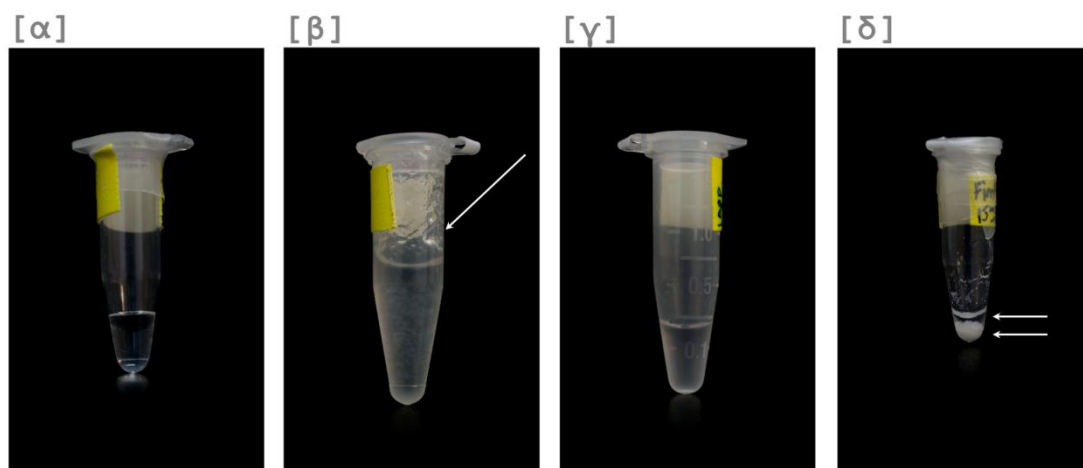
Η παραπάνω μεθοδολογία υλοποιήθηκε έπειτα από συνεργασία στο **Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών** και μας παρείχε ένα μεγάλο αριθμό πεπτιδίων-αναλόγων. Παράλληλα, η εταιρεία σύνθεσης πεπτιδίων **GeneCust[®] Europe με έδρα το Λουξεμβούργο** παρείχε τα πεπτίδια-ανάλογα που μελετήθηκαν σε άλλα συστήματα. Η προέλευση των υπό μελέτη πεπτιδίων-αναλόγων περιγράφεται σε κάθε περίπτωση, στην αρχική περιγραφή της διεξαγωγής των δομικών μελετών στην ενότητα 3.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.2. Δομικές μελέτες πεπτιδίων

2.3.2.1. Παρασκευή πηκτωμάτων αμυλοειδών ινιδίων

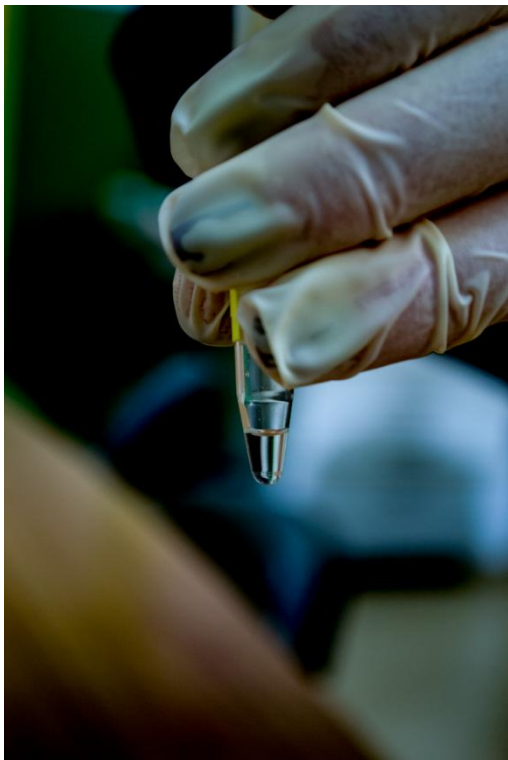
Τα πεπτίδια-ανάλογα των υπο μελέτη πρωτεϊνικών μορίων που λαμβάνονται από χημική σύνθεση διαλυτοποιούνται σε ποικιλία διαλυτών. Συνηθέστερα στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε καθαρό απεσταγμένο νερό με pH 5.75, καθώς όλα τα πεπτίδια-ανάλογα που μελετήθηκαν ήταν διαλυτά στις συνθήκες αυτές. Σε κάθε περίπτωση, ο διαλύτης προστέθηκε στο λυοφιλωμένο πεπτίδιο-άναλογο σε συγκεντρώσεις που διαφοροποιούνται στα συστήματα μελέτης και μπορεί να κυμαίνονται από 0.5 mg ml^{-1} έως 15 mg ml^{-1} , ενώ η επώαση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις των πεπτιδίων-αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν συχνά για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και τη δημιουργία υμενίων κατάλληλων για χρώση με Congo Red, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις των πεπτιδίων ήταν πολλές φορές αναγκαίες για τη δημιουργία ίνας στα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην εκάστοτε δομική μελέτη περιγράφονται στην ενότητα 3.



Εικόνα 59. Μακροσκοπική εμφάνιση πηκτωμάτων διαφορετικών πεπτιδίων-αναλόγων, συγκέντρωσης 10 mg ml^{-1} , έπειτα από επώαση ~ 30 ημερών σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούμε ότι η διαφορετική αμινοξική σύσταση των πεπτιδίων-αναλόγων επηρεάζει την εμφάνιση των πηκτωμάτων. Τα πηκτώματα μπορεί να είναι διαυγή (α) ή ‘θολά’ (β), (γ), ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται η δημιουργία διακριτών φάσεων (δ, βέλη). Συχνά, διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης εμφανίζουν την τάση να προσκολλώνται στα τοιχώματα των σωληναρίων erpendorf (β, βέλος).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Η αμινοξική σύσταση των πεπτιδίων-αναλόγων, καθώς και η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση επηρεάζει την ταχύτητα σχηματισμού, αλλά και τη μορφολογία των πηκτωμάτων (*gel*) που δημιουργούνται, έπειτα από επώαση των πεπτιδίων σε θερμοκρασία δωματίου. Η Εικόνα 59 παρουσιάζει την μακροσκοπική εμφάνιση πηκτωμάτων διαφορετικών πεπτιδίων-αναλόγων όμοιας συγκέντρωσης, έπειτα από επώαση ~30 ημερών. **Η ρευστότητα και η θολότητα των διαλυμάτων είναι χαρακτηριστική της μορφολογίας των ολιγομερών που εμπεριέχει κάθε διάλυμα**, όπως περιγράφεται και στην ενότητα των αποτελεσμάτων (3). Συχνά, διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης δημιουργούν πηκτώματα που προσκολλώνται στα τοιχώματα των σωληναρίων erpendorf (Εικόνα 59β). Η πλειοψηφία των πηκτωμάτων εμφανίζει χαμηλή ρευστότητα (Εικόνα 60).



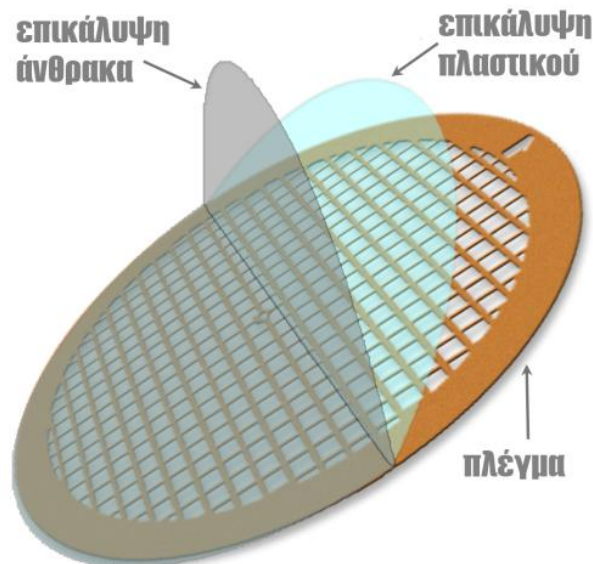
Εικόνα 60. Διαυγές πήκτωμα πεπτιδίου-αναλόγου, που προκύπτει από την αυτοσυγκρότηση αμυλοειδών ινιδίων, με χαμηλή ρευστότητα.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.2.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Η παρατήρηση της μορφολογίας των πηκτωμάτων, καθώς και η ταχύτητα σχηματισμού των πεπτιδίων-αναλόγων πραγματοποιείται με τη χρήση της **ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης** (*transmission electron microscopy*), έπειτα από την **εφαρμογή της μεθόδου της αρνητικής χρώσης** (*negative staining*). Για την παρασκευή κατάλληλων δειγμάτων απαιτούνται ειδικά πλέγματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, τα οποία κατασκευάζονται συνήθως από χαλκό, έχουν διάμετρο ~3 mm (*grids*) και όπως φαίνεται στην Εικόνα 61 αποτελούνται από δύο επιπρόσθετες επικαλύψεις. Η πρώτη επικάλυψη είναι μία λεπτή μεμβράνη πλαστικού με συνηθέστερη τη χρήση πολυμερούς ρητίνης, με την εμπορική ονομασία Formvar. Η δεύτερη στρώση είναι μία εξαιρετικά λεπτή επικάλυψη άνθρακα που δημιουργείται από εξάχνωση άνθρακα στην επιφάνεια του πλέγματος και εξυπηρετεί στη μέγιστη δυνατή απορρόφηση του δείγματος, καθώς και στην αγωγιμότητα αυτού.

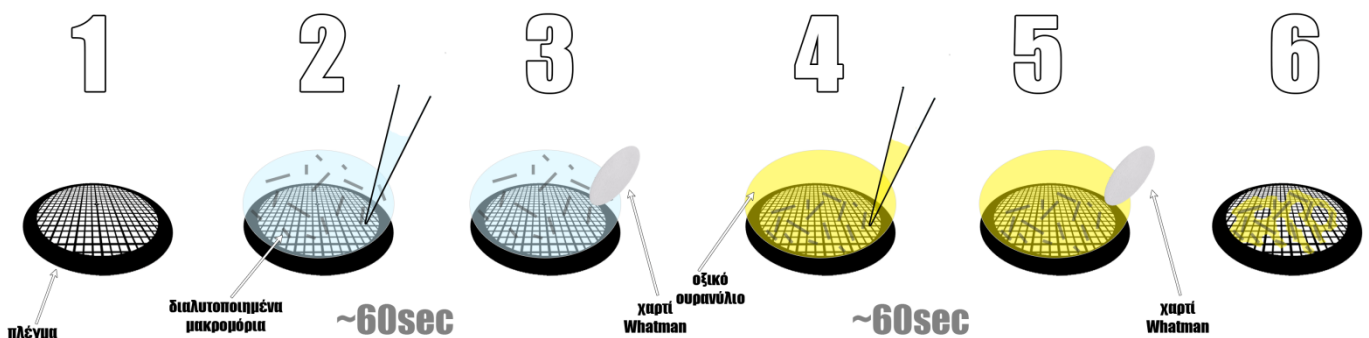
Η κατανομή και η προσρόφηση του δείγματος στην επιφάνεια του πλέγματος εξαρτώνται από τις ιδιότητες του δείγματος και από την υδροφιλικότητα της επιφάνειας του πλέγματος. Έτσι, τα πλέγματα πριν την προετοιμασία των δειγμάτων τοποθετούνται σε θερμοκρασία ~4 °C, για να εξασφαλιστεί στην επιφάνειά τους συμπύκνωση υδρατμών και να αυξηθεί η υδροφιλικότητα τους.



Εικόνα 61. Αρχιτεκτονική του πλέγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Η προετοιμασία των δειγμάτων για παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 62. Συγκεκριμένα, σταγόνα ~5 μl από το διάλυμα (εναιώρημα) του υπο μελέτη πεπτιδίου αφήνεται στην επιφάνεια του πλέγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για διάστημα 60-120 s (Εικόνα 62, στάδιο 2), οπότε τα μόρια, που βρίσκονται διαλυτοποιημένα στο διάλυμα, κατακάθονται στο πλέγμα. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύτη με τη χρήση διηθητικού χαρτιού κυτταρίνης τύπου Whatman, που εφαρμόζεται στην περιφέρεια του πλέγματος (Εικόνα 62, στάδιο 3). Πριν το δείγμα στεγνώσει τελείως προστίθεται σταγόνα ~5 μl υδατικού διαλύματος οξικού ουρανυλίου (*uranyl acetate*) συγκέντρωσης 1-2% (w/v), για διάστημα 45-60 s (Εικόνα 62, στάδιο 4). Αντίστοιχα, η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με τη χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman και το πλέγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει (Εικόνα 62, στάδια 5 & 6).

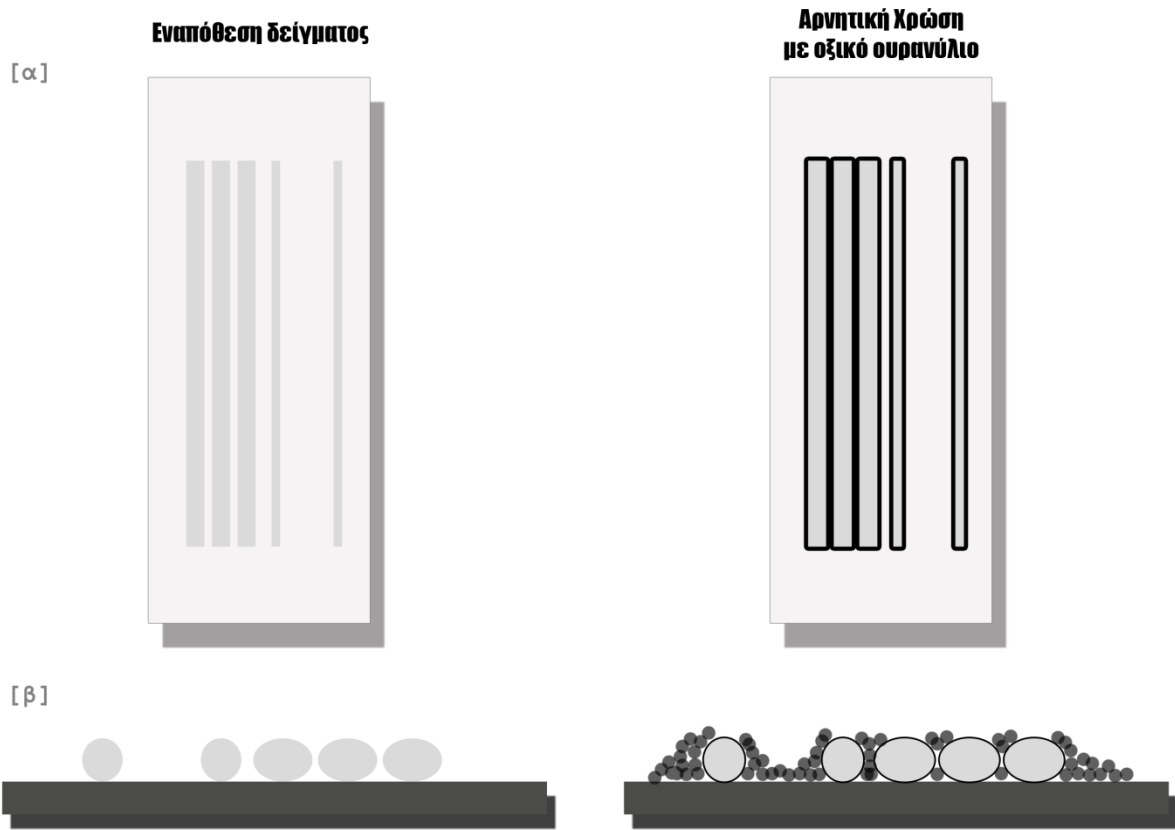


Εικόνα 62. Τα στάδια προετοιμασίας δειγμάτων κατάλληλα για παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.

Η αρνητική χρώση στην πραγματικότητα είναι μία ψευδοχρώση. Η τεχνική της στηρίζεται στις αντιθέσεις που δημιουργούνται όταν υδατικά διαλύματα βαρέων μετάλλων προσροφώνται στο υπόβαθρο των πλεγμάτων και αφήνουν ενέπαφο και άρα, ορατό το υπό παρατήρηση δείγμα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το βαρύ μέταλλο ουρανύλιο, το οποίο λόγω του μεγάλου ατομικού αριθμού του σκεδάζει τη δέσμη ηλεκτρονίων που προσπίπτει στο δείγμα σκιαγραφώντας τα περιγράμματα των μακρομορίων που έχουν εναποτεθεί στο πλέγμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τα μόρια της χρωστικής προσροφώνται από τις δομές του πλέγματος, ενώ η απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής επιτρέπει

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

την απόθεση λεπτού στρώματος της χρωστικής στις κοιλότητες και στα περιγράμματα των δομών.



Εικόνα 63. Τεχνική προσρόφησης του διαλύματος οξικού ουρανυλίου σε δείγμα. Παρουσιάζεται η πλευρική όψη (β) και η κάτοψη (α) του ίδιου δείγματος πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την εφαρμογή της αρνητικής χρώσης.

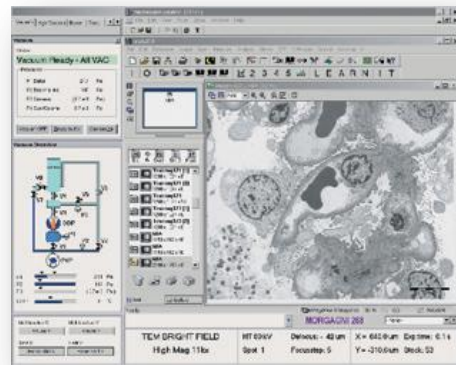
Η παρατήρηση των δειγμάτων της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης Morgagni™ 268, που λειτουργεί στα 80 kV και είναι διαθέσιμο στο Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ψηφιακή απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με εισελκόμενη, ενσωματωμένη πλευρικά MORADA CCD κάμερα, ανάλυσης 11 Mpixel και με τη βοήθεια του λογισμικού iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Muenster, Germany). Εξάιρεση αποτελεί το πεπτίδιο-ανάλογο της ανθρώπινης κυστατίνης C ⁴⁷LQVVR⁵¹, για το οποίο χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Philips CM120 BioTWIN (FEI, Eindhoven, The Netherlands) που

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

λειτουργεί στα 100kV και ενσωματώνει την **Keen View CCD κάμερα, 1K (Soft Imaging System, Muenster, Germany)**. Το τελευταίο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης είναι διαθέσιμο στο **Ευρωπαϊκό Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Χαϊδελβέργης (European Molecular Biology Laboratory – EMBL Heidelberg)**.



Λογισμικό iTEM

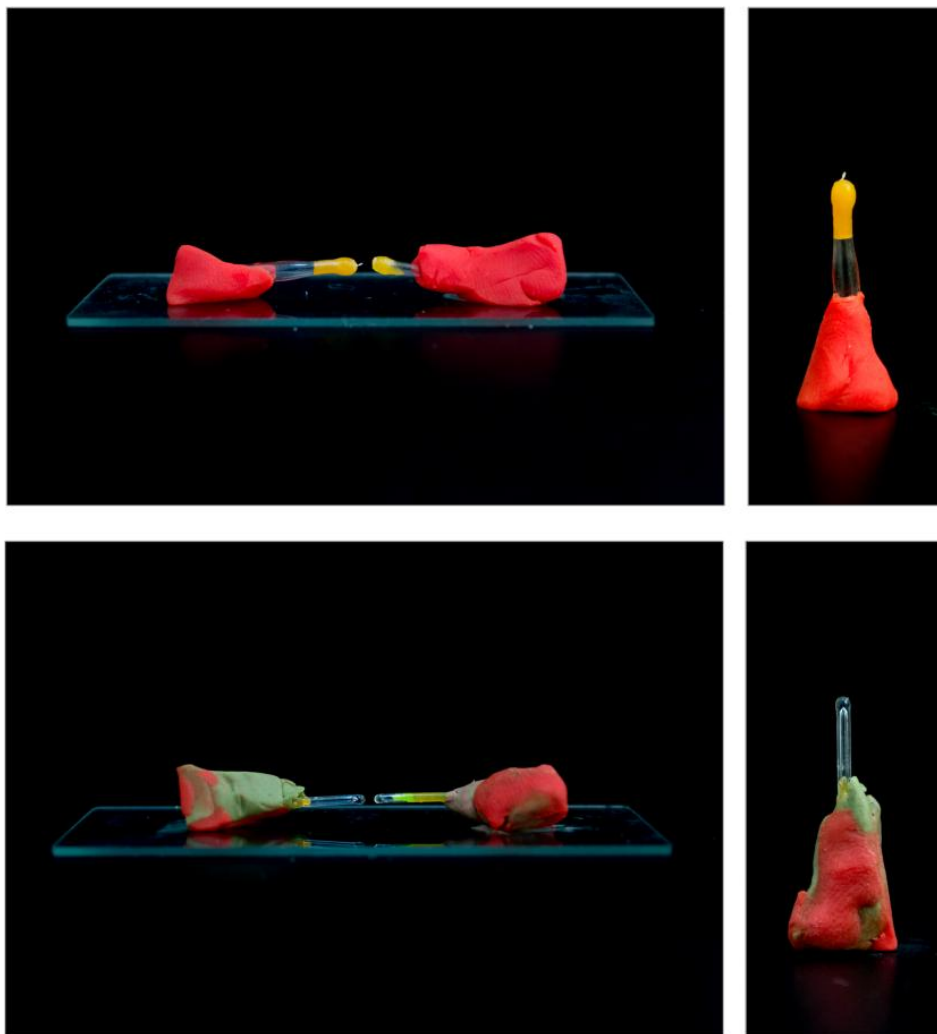


Εικόνα 64. Διάταξη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης Morgagni™ 268.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.2.3. Περίθλαση ακτίνων-X από ίνες

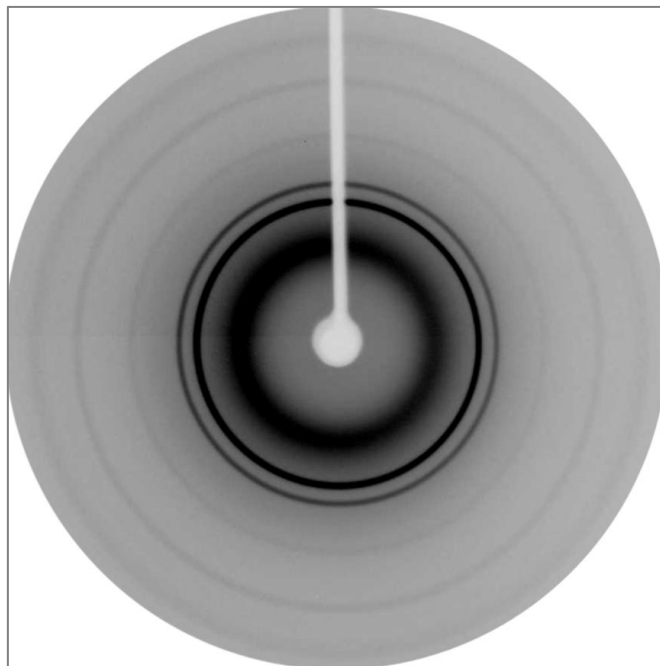
Η εγγενής τάση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών να αυτοσυγκροτούνται προς το σχηματισμό οργανωμένων συσσωματωμάτων καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό της δομής των ινιδίων σε ατομικό επίπεδο με τις παραδοσιακές τεχνικές προσδιορισμού της δομής [κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (*Crystal X-ray Diffraction*) ή πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (*Nuclear Magnetic Resonance*)]. Έτσι, η **περίθλαση ακτίνων-X από ίνες** (*X-ray Fiber Diffraction*) είναι η επικρατέστερη σήμερα μεθοδολογία για τον προσδιορισμό της αρχιτεκτονικής των αμυλοειδών ινιδίων.



Εικόνα 65. Διάταξη ευθυγραμμισμένων ράβδων για τη δημιουργία προσανατολισμένων ινών αμυλοειδών ινιδίων. Τριχοειδείς γυάλινοι σωλήνες με επικάλυψη κεριού (επάνω), γυάλινες ράβδοι με επικάλυψη σιλικόνης (κάτω).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Η διεξαγωγή της περίθλασης ακτίνων-X σε αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες **απαιτεί την δημιουργία προσανατολισμένης ίνας από ευθυγραμμισμένα αμυλοειδή ινίδια**. Για να επιτευχθεί αυτό δημιουργείται διάταξη δύο ράβδων, η οποία σταθεροποιείται με τη χρήση πλαστελίνης σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι ράβδοι τοποθετούνται έτσι ώστε να απέχουν 1.5-2 mm. Δύο τύποι ράβδων χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων: 1) υάλινοι ράβδοι με επικάλυψη σιλικόνης και 2) τριχοειδείς γυάλινοι σωλήνες κρυστάλλωσης με επικάλυψη καθαρού κεριού χαμηλού σημείου τήξεως (*low melting point wax*) (Εικόνα 65). Το υλικό των ράβδων και στις δύο περιπτώσεις δεν περιθλά, ενώ οι επικαλύψεις της σιλικόνης και του κεριού καθιστούν τις κεφαλές των ράβδων υδρόφοβες. Σημειώνεται ότι σε διατάξεις που περιλαμβάνουν ράβδους κεριού πραγματοποιείται πείραμα ελέγχου για την καταγραφή των ανακλάσεων του κεριού. Στην Εικόνα 66 δίνεται το περιθλασίγραμμα ελέγχου του καθαρού κεριού.

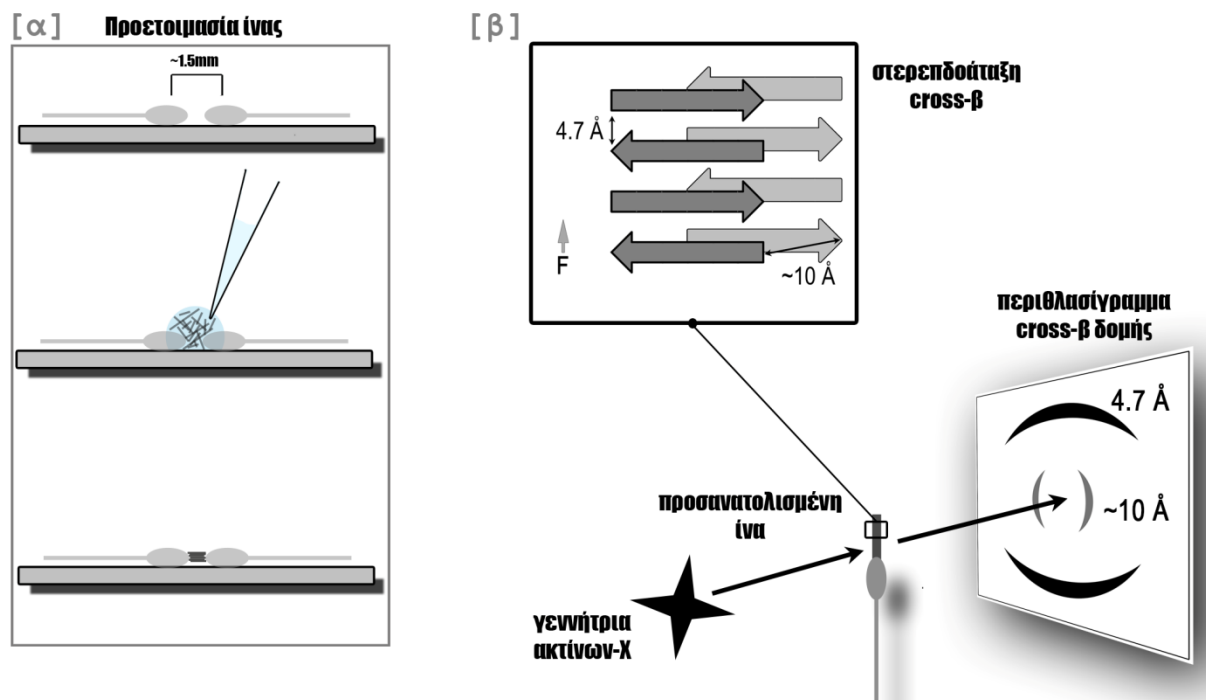


Εικόνα 66. Περιθλασίγραμμα-ελέγχου του καθαρού κεριού που επικαλύπτει τις ράβδους δημιουργίας ινών αμυλοειδών ινιδίων.

Για την απόκτηση προσανατολισμένης ίνας, σταγόνα εναιωρήματος διαλυτοποιημένου πεπτιδίου ~10 μl τοποθετείται μεταξύ των ευθυγραμμισμένων ράβδων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 67 και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο από 30 min. Στις συνθήκες αυτές, με την πραγμάτωση φαινομένων επιφανειακής τάσης, πραγματοποιείται αργή εξάτμιση του διαλύτη, η οποία ‘εξαναγκάζει’ τα αμυλοειδή ινίδια του εναιωρήματος να

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

οργανωθούν και να ευθυγραμμιστούν, προς το σχηματισμό μίας συμπαγούς ίνας (Εικόνα 67α). Στη βέλτιστη περίπτωση η οργάνωση των αμυλοειδών ινιδίων οδηγεί στην δημιουργία περιθλασιγραμμάτων με χαρακτηριστικό προσανατολισμό. Προσανατολισμένα θεωρούνται περιθλασιγράμματα όπου οι ανακλάσεις έχουν την μορφή τόξων (Εικόνα 67β). Μη-κανονικός προσανατολισμός των ινιδίων στην προς μελέτη ίνα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανακλάσεων με τη μορφή δακτυλίων.

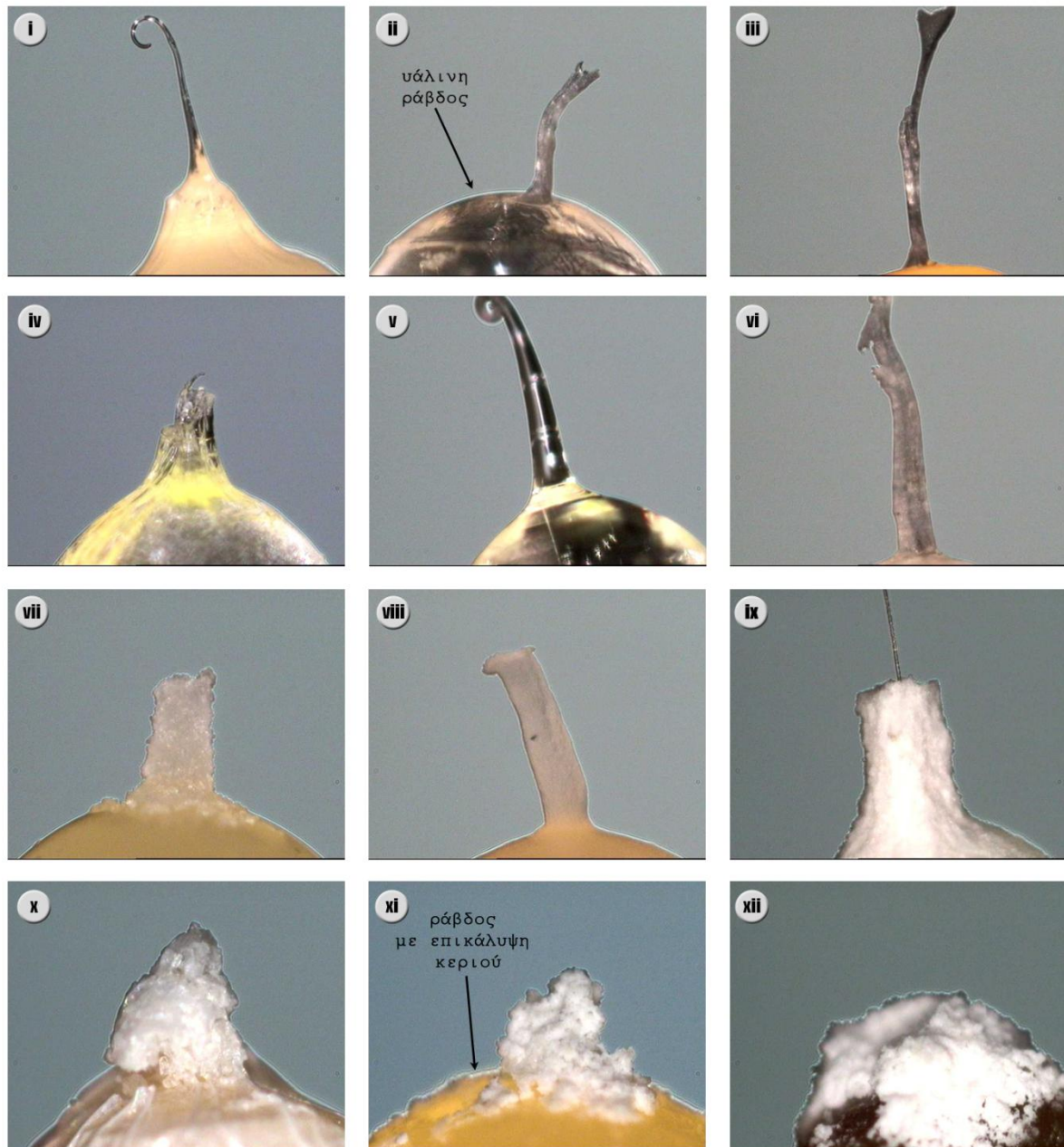


Εικόνα 67. Μεθοδολογίας περίθλασης ακτίνων-X από ίνες. Σχηματική αναπαράσταση της προετοιμασίας του δείγματος (α) και της λήψης περιθλασιγραμμάτων cross-β δομής (β).

Η μορφολογία διαφορετικών ινών απεικονίζεται στην Εικόνα 68. Οι ράβδοι που φέρουν τις ίνες μπορεί να είναι γυάλινες (Εικόνα 68, ii) ή ράβδοι με επικάλυψη κεριού (Εικόνα 68, xi), όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 65. Οι ίνες εμφανίζονται ως καλοσχηματισμένες οξείες δομές με γυαλιστερή (Εικόνα 68, i, ii, iii, iv, v, vi) ή κρυσταλλική μορφή (Εικόνα 68, vii, viii, ix). Σπανιότερα, υλικά που δεν καταφέρνουν να σχηματίσουν επιμηκυσμένες ίνες κατακάθονται ως κοκκιώδεις νιφάδες (*flakes*) στην επιφάνεια της ράβδου (Εικόνα 68, x, xi, xii). Η αδυναμία απόκτησης επιμηκυσμένης ίνας σε ράβδους με επικάλυψη κεριού συχνά επηρεάζει τη λήψη περιθλασιγραμμάτων, καθώς από την ακτινοβολία κοντά στην κεφαλή της ράβδου μπορεί να προκύψει περιθλασίγραμμα με συνδυασμό ανακλάσεων του δείγματος και του κεριού. Επιπρόσθετα ίνες με πολύ λεπτή

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

διάμετρο (Εικόνα 68, ix – επάνω άκρο) μπορεί να δώσουν περιθλασιγράμματα με θόρυβο, καθώς το υλικό δεν καλύπτει ολόκληρο το πεδίο ακτινοβολήσης. Το περιθλασιγράμμα-ελέγχου του καθαρού κεριού χρησιμοποιείται για την ανάλυση (Εικόνα 66).



Εικόνα 68. Μορφολογία ιών που προκύπτουν από την ευθυγράμμιση αμυλοειδών ινιδίων σε κατάλληλα κατασκευασμένη διάταξη.

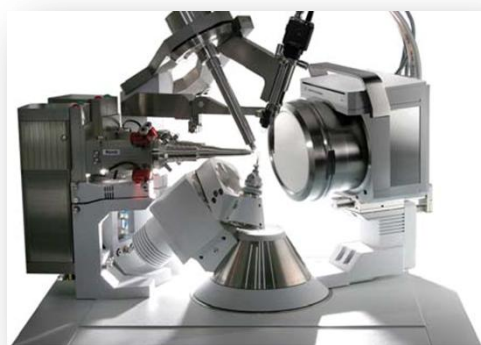
Για την παραγωγή δέσμης ακτίνων-X χρησιμοποιήθηκε η γεννήτρια **SuperNova-Agilent Technologies X-ray**, που διαθέτει τον ανιχνευτή **135-mm ATLAS CCD detector** και ένα γωνιομετρική κεφαλή **4-circle kappa**. Η γεννήτρια χρησιμοποιήθηκε στα 50 kV και

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

στα 0.8 mA (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) (Εικόνα 69). Η απόσταση κάθε δείγματος από τον ανιχνευτή ορίστηκε σταθερά στα 52 mm, ενώ ο χρόνος έκθεσης κυμάνθηκε μεταξύ των δειγμάτων από 100 έως 500s. Η αρχική επεξεργασία των περιθλασιγραμμάτων έγινε με χρήση του συμβατού για τη γεννήτρια προγράμματος CrysAlisPro (CrysAlis^{PRO}, 2014), ενώ περαιτέρω επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα iMosFLM (Leslie and Powell, 2007) του λογισμικού CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994). Η γεννήτρια παραγωγής ακτίνων-X είναι διαθέσιμη στο **Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.**



Εσωτερική διάταξη γεννήτριας με ανιχνευτή 135-mm ATLAS CCD detector και γωνιομετρική κεφαλή 4-circle kappa.

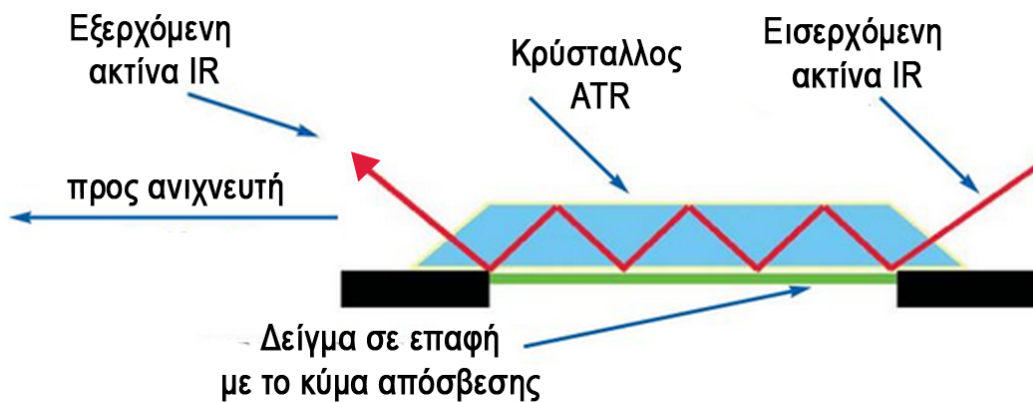


Εικόνα 69. Διάταξη γεννήτριας ακτίνων-X SuperNova- Agilent Technologies X-ray.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.2.4. Φασματοσκοπία υπερερυθρού ATR-IR

Η απόκτηση πληροφορίας σχετικά με τη δευτεροταγή δομή των αμυλοειδών ινιδίων επιτυγχάνεται και με τη φασματοσκοπία υπερερυθρού. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνικών μορίων, καθώς συμβάλει στην εύρεση της φασματικής ‘υπογραφής’ κάθε πρωτεϊνικού ή πεπτιδικού δείγματος. Για τις πειραματικές μετρήσεις των δειγμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής με τη φασματοσκοπία υπερερυθρού χρησιμοποιήθηκε **μικροσκόπιο υπερερυθρού της εταιρείας Bruker (IRScope II, BrukerOPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany)**, εξοπλισμένο με αντικειμενικό φακό **αποσβεννύμενης ολικής ανάκλασης γερμανίου - Ge-ATR (20x)**, που βρίσκεται **στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών**. Το μικροσκόπιο συνδέεται με **φασματοσκόπιο μετασχηματισμού Fourier της εταιρείας Bruker (Equinox 55, BrukerOPTICS)**.

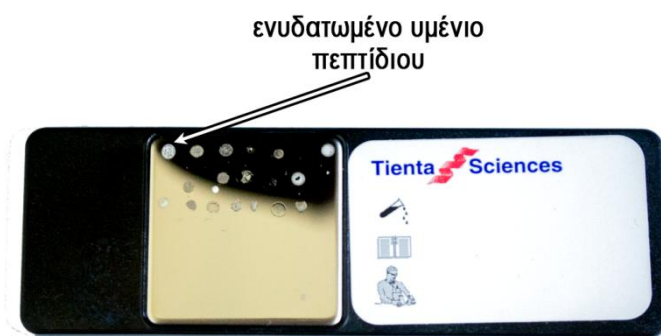


Εικόνα 70. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου αποσβεννύμενης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance - ATR).

Η τεχνική της αποσβεννύμενης ολικής ανάκλασης (*Attenuated Total Reflectance - ATR*) εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα και προσαρμόζεται στις απαιτήσεις που παρουσιάζονται κατά τη συλλογή δεδομένων από ευαίσθητα δείγματα, όπως είναι τα ενυδατωμένα υμένια των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 70). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις ιδιότητες της ολικής ανάκλασης και απαιτεί τη χρήση ενός κρυστάλλου με υψηλό δείκτη

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

διάθλασης, ο οποίος όμως δεν απορροφά στο υπέρυθρο. Στην περίπτωση μας αντικειμενικός φακός Ge-ATR προσαρτάται στο μικροσκόπιο και χρησιμοποιείται για την παρατήρηση των υμενίων και τη λήψη φασμάτων. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 70, ο κρύσταλλος γερμανίου έρχεται σε επαφή με το δείγμα και η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που εκπέμπει η πηγή IR διαπερνά τον κρύσταλλο περισσότερες από μία φορές. Οι διαδοχικές ανακλάσεις της ακτίνας στο υλικό δημιουργούν κύμα απόσβεσης, το οποίο διεισδύει στο υλικό με το οποίο έρχεται σε επαφή. Το βάθος διείσδυσης της ακτίνας (d_p) εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της ακτίνας, το δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου του φακού, καθώς και το μήκος κύματος της ακτίνας, ενώ οι τυπικές τιμές του κυμαίνονται μεταξύ 0.5-2 μm . Μετά από τη διαδρομή που περιγράφεται παραπάνω, η τελική εξερχόμενη ακτίνα ανιχνεύεται από ειδικό ανιχνευτή και οδηγεί στη δημιουργία γραφημάτων απορρόφησης (Εικόνα 70).

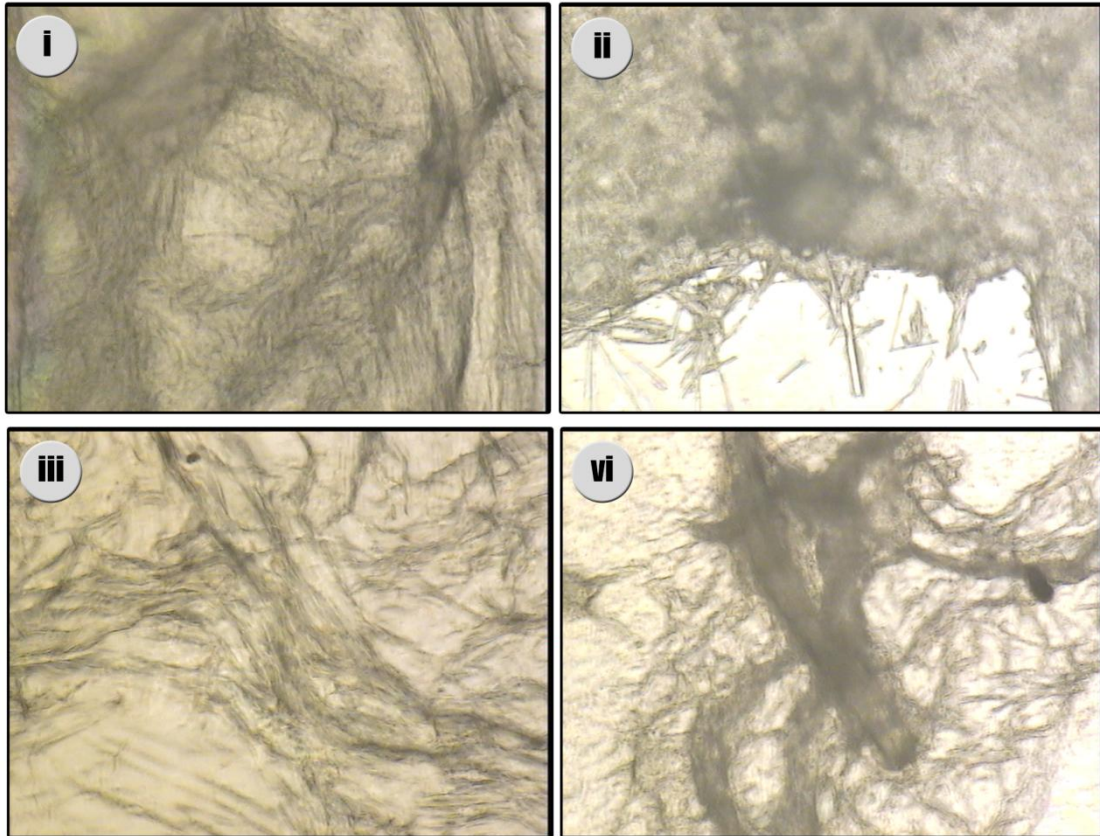


Εικόνα 71. Υμένια διαφορετικών αμυλοειδογόνων πεπτιδίων-αναλόγων που έχουν δημιουργηθεί από την τοποθέτηση εναιωρήματος τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα τύπου Tienta.

Η προετοιμασία των δειγμάτων προαπαιτεί τη δημιουργία υμενίων για τα υπο μελέτη πεπτιδία-ανάλογα. Τα υμένια δημιουργούνται σε μεταλλική επιφάνεια που είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο ασάλι και καλύπτεται από ένα πολύ λεπτό υδρόφοβο υπόστρωμα. Η εμπορική ονομασία των αντικειμενοφόρων αυτών πλακών είναι Tienta SpectRIM. Το δείγμα προετοιμάζεται με τοποθέτηση σταγόνας ~5 μl από το εναιώρημα του πεπτιδίου-αναλόγου στην μεταλλική αντικειμενοφόρο πλάκα Tienta, η οποία αφήνεται σε ηρεμία (Εικόνα 71). Η αργή εξάτμιση που πραγματοποιείται σε κανονικές συνθήκες (~25° C) οδηγεί στη δημιουργία λεπτού (κατά περίπτωση) ενυδατωμένου υμενίου, που περιέχει

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

αμυλοειδή ινίδια. Η ενδεικτική μορφολογία των υμενίων διαφορετικών αμυλοειδογόνων πεπτιδίων-αναλόγων στο οπτικό μικροσκόπιο παρουσιάζεται στην Εικόνα 72.



Εικόνα 72. Παρατήρηση ενυδατωμένων υμενίων πεπτιδίων-αναλόγων που έχουν σχηματιστεί σε ειδική μεταλλική αντικειμενοφόρο πλάκα, καλυμμένη με λεπτό υδρόφοβο υπόστρωμα.

Τα φάσματα που αποκτήθηκαν στην παρούσα διατριβή έχουν διακριτικότητα 4 cm^{-1} , ενώ με στόχο τη βελτίωση του λόγου σήμα/θόρυβος (S/N ratio), για κάθε δείγμα συλλέχθηκαν δέκα φάσματα 32-σαρώσεων το καθένα (32-scan) και υπολογίστηκε το μέσο φάσμα (*averaging*). Ακολούθησε υπολογισμός των δεύτερων παραγώγων των φασμάτων, μετά την εξομάλυνση τους με τον αλγόριθμο Savitsky-Golay, με κυματαρίθμους που κυμαίνονταν από $\pm 8-12 \text{ cm}^{-1}$, γύρω από κάθε σημείο (Savitsky and Golay, 1964). Εξομάλυνση σε στενότερο εύρος τιμών είχε ως αποτέλεσμα την επιδείνωση του λόγου S/N, ενώ ταυτόχρονα δεν αυξήθηκε ο αριθμός των ελαχίστων που μπορούσαν να προσδιοριστούν με βεβαιότητα. Η απεικόνιση των φασμάτων έγινε με τη μορφή απορρόφησης μετά από αναγωγή σε σταθερό βάθος διεύθυνσης (d_p), συναρτήσεως του μήκους κύματος (d_p/λ), ενώ τα ελάχιστα της δεύτερης παραγώγου χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση για τον ακριβή

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

προσδιορισμό των μεγίστων των ταινιών απορρόφησης. Σημειώνεται ότι ιόντα του τριφωσφορικού οξέος (*Trifluoroacetic acid – TFA*), που απορροφούν στις περιοχές 1100-1210 cm^{-1} και 1600-1700 cm^{-1} , εντοπίζονται συχνά ως παραπροϊόντα στα φάσματα, λόγω της χρήσης τους κατά την χημική σύνθεση των πεπτιδίων-αναλόγων (2.3.1). Όλες οι παραπάνω επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν με διαθέσιμες ρουτίνες του προγράμματος OPUS/OS2.

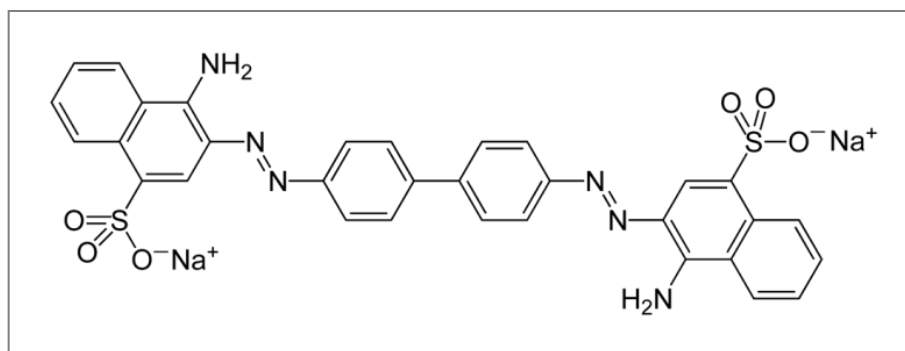


Εικόνα 73. Μικροσκοπίο υπερερυθρού IRScope II (BrukerOPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) συνδεδεμένο με φασματοσκόπιο μετασχηματισμού Fourier Equinox 55 (BrukerOPTICS), στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.2.5. Πολωτική μικροσκοπία και διαγνωστική χρώση με Congo Red

Η διπλοθλαστικότητα που εμφανίζουν τα υμένια των αμυλοειδών ινιδίων έπειτα από την πρόσδεση της χρωστικής Congo Red χρησιμοποιείται ως κριτήριο για τον εντοπισμό αμυλοειδών ινιδίων τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*. Παρότι, η εμφάνιση της διπλοθλαστικότητας παραμένει μία κρίσιμη και διαγνωστική ιδιότητα για την ανίχνευση του αμυλοειδογόνου υλικού, πολλά προβλήματα συναντώνται συχνά στην απεικόνισή της, καθώς κατά την προετοιμασία του υλικού δημιουργούνται παχιά στρώματα αμυλοειδών ινιδίων που αποτρέπουν την ευθυγράμμιση των μορίων της χρωστικής (Cooper, 1969; Elghetany *et al.*, 1989). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης της χρωστικής και των αμυλοειδών ινιδίων δεν είναι σήμερα σαφώς καθορισμένος, παρότι το 2003 αποδείχθηκε ότι, ο πυρήνας των ινιδίων δεν επιδεικνύει διπλοθλαστικότητα, κάτι που σημαίνει ότι η χρωστική προσδένεται στην επιφάνεια των ινιδίων (Jin *et al.*, 2003). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η χρωστική μπορεί να προσδένεται και στις σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (Khurana *et al.*, 2001) και έτσι το υλικό με το οποίο αλληλεπιδρά παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς τα μόρια της χρωστικής μπορεί να έχουν μεγαλύτερη ή μικρότερη συνάφεια για διαφορετικά δείγματα, ενώ ακόμα, διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να υιοθετούνται σε διαφορετικά υλικά (Nilsson, 2004).

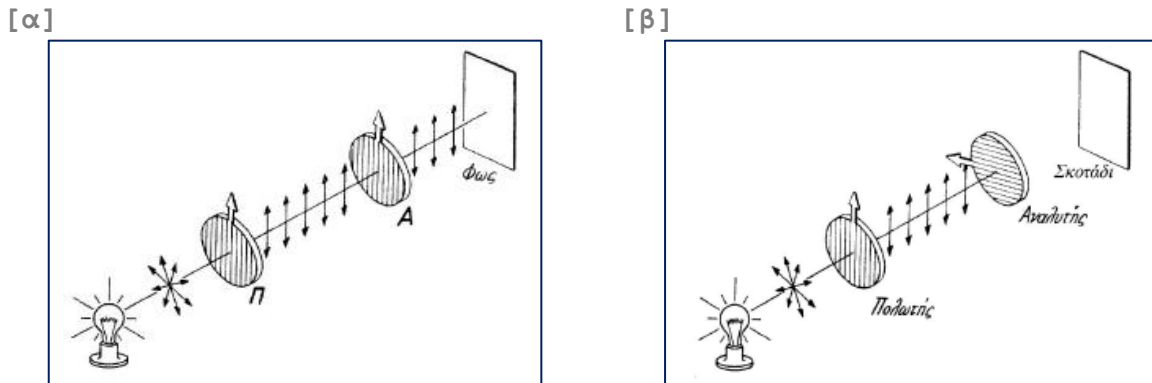


Εικόνα 74. Χημικός τύπος της χρωστικής Congo Red.

Διπλοθλαστικότητα ή διπλή διάθλαση (*birefringence*) ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μια φωτεινή ακτίνα που προσπίπτει σε ένα διαθλαστικό σώμα διασπάται σε δύο ακτίνες, την τακτική διαθλώμενη ακτίνα και την έκτακτη διαθλώμενη ακτίνα, με το επίπεδο ταλάντωσης της μίας να είναι κάθετο στο επίπεδο ταλάντωσης της άλλης. Το φαινόμενο της διπλοθλαστικότητας παρατηρείται σε οπτικώς ανισότροπα μέσα, δηλαδή σε μέσα των οποίων οι οπτικές ιδιότητες μεταβάλλονται (π.χ. ο δείκτης διάθλασης). Τέτοια

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

διαθλαστικά διαπερατά σώματα, που ονομάζονται και διπλοθλαστικά, είναι όλοι οι κρύσταλλοι, τα ινίδια των μυϊκών ινών, η διάταξη των αλυσίδων των πρωτεϊνών του κρυσταλλοειδούς φακού του οφθαλμού και τα αμυλοειδή ινίδια. Η **πολωτική μικροσκοπία** χρησιμοποιείται για την απεικόνιση τέτοιων ανισότροπων δομών και συγκεκριμένα για την παρατήρηση της διπλοθλαστικότητας τους.



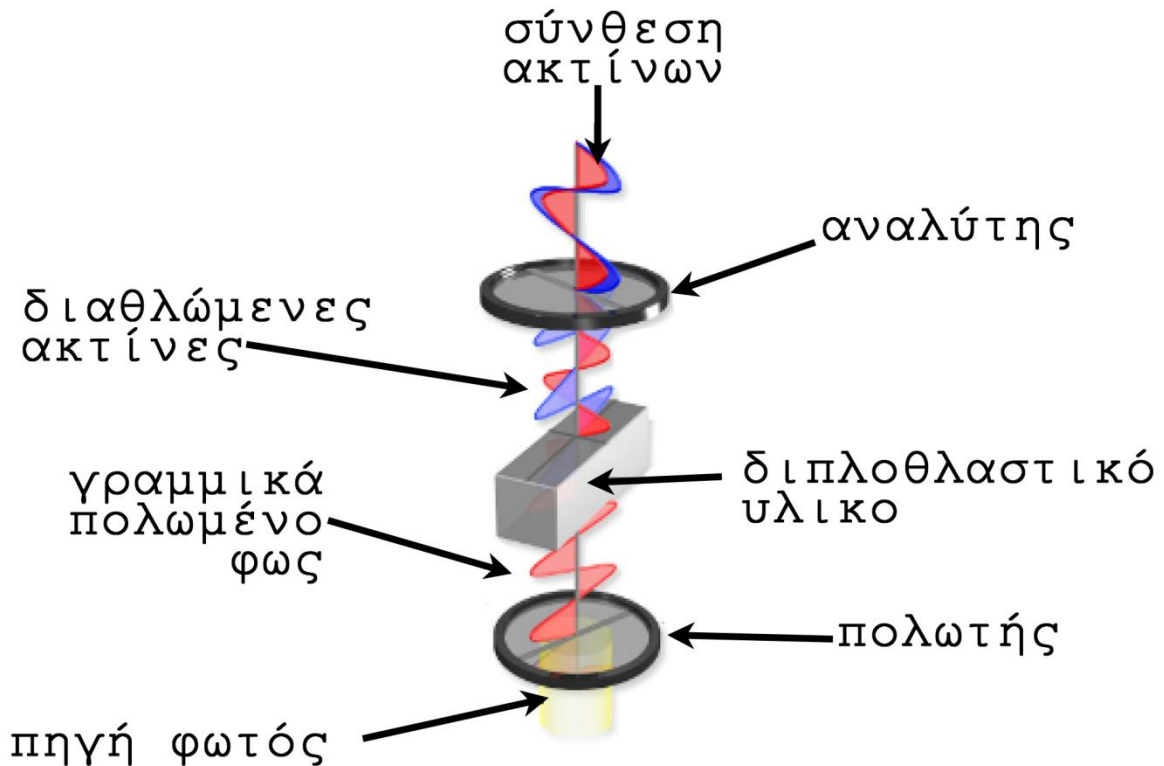
Εικόνα 75. Απεικόνιση πορείας του στοιχειώδους ηλεκτρομαγνητικού κύματος που διαπερνά σύστημα πολωτών, σε πολωτικό μικροσκόπιο. Παράλληλα επίπεδα πολωτών (α), κάθετα επίπεδα πολωτών (β).

Ένα πολωτικό μικροσκόπιο διαθέτει κατάλληλο σύστημα φακών (πολωτών) ικανών να πολώνουν το φυσικό φως που εκπέμπει μία φωτεινή πηγή (λαμπτήρας μικροσκοπίου). Ο κάθε πολωτής του μικροσκοπίου έχει την ικανότητα να δημιουργεί γραμμικά πολωμένο φως, δηλαδή επιτρέπει τη διέλευση μίας μόνο συνιστώσας από κάθε στοιχειώδες ηλεκτρομαγνητικό κύμα¹ που τον διαπερνά. Η διάταξη δύο πολωτών στη σειρά διαφοροποιεί την παρατήρηση σε ένα πολωτικό μικροσκόπιο ανάλογα με τα χαρακτηριστικά επίπεδα μεταξύ των δύο πολωτών (Εικόνα 75). Έτσι, πολωτές με παράλληλα επίπεδα επιτρέπουν τη διέλευση της συνιστώσας του στοιχειώδους ηλεκτρομαγνητικού κύματος (Εικόνα 75α, φως), ενώ πολωτές με κάθετα μεταξύ τους επίπεδα ανακόπτουν τη διέλευση της (Εικόνα 75β, σκοτάδι). Παραδοσιακά στα πολωτικά μικροσκόπια **ο πρώτος φακός ονομάζεται πολωτής και ο δεύτερος αναλύτης**, παρά το γεγονός ότι έχουν πανομοιότυπη κατασκευή. Είναι εύλογο ότι, η τοποθέτηση ενός υλικού μεταξύ του πολωτή και του αναλύτη θα προκαλέσει κάποια απώλεια της πόλωσης του εξερχόμενου προς τον ανιχνευτή φωτός, ανάλογα με τις ιδιότητες του υλικού που παρεμβάλλεται. Συγκεκριμένα η παρατήρηση διπλοθλαστικού υλικού με τοποθετημένους κάθετα τον πολωτή – φακό και τον

¹ Κάθε στοιχειώδες κύμα αποτελείται από ένα εγκάρσιο ηλεκτρικό κύμα και ένα εγκάρσιο μαγνητικό κύμα που είναι κάθετα μεταξύ τους.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

αναλύτη – φακό επιτρέπει τη σύνθεση των διαθλώμενων ακτίνων και άρα, τη φωτεινή απεικόνιση του υλικού σε ορισμένα μήκη κύματος (Εικόνα 76).

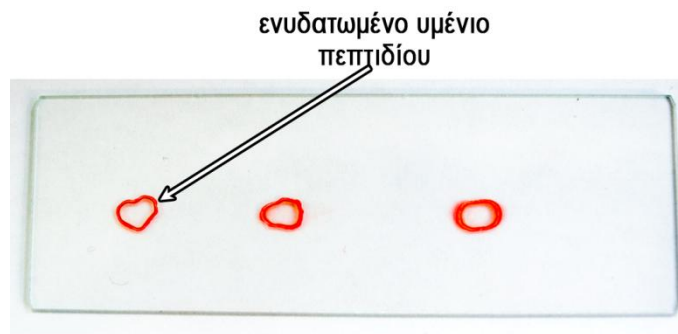


Εικόνα 76. Απλοποιημένη διάταξη πολωτικού μικροσκοπίου.

Τα χρώματα της απεικόνισης του υλικού στον ανιχνευτή εξαρτώνται από το μέγιστο απορρόφησης του δείγματος που παρατηρείται. Η χρήση της διαγνωστικής για τα αμυλοειδή ινίδια χρωστική Congo Red εμφανίζει αποχρώσεις του κόκκινου, όταν παρατηρείται με γραμμικά πολωμένο φως (μη διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη). Οι κόκκινες αποχρώσεις καταγράφονται καθώς το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής στο ορατό είναι τα 500nm (βλέπε Εικόνα 79) μήκος κύματος που αντιστοιχεί κοντά στο πράσινο. Επομένως, όταν λευκό φως από το λαμπτήρα του μικροσκοπίου διέλθει από το δείγμα απορροφά τις πράσινες αποχρώσεις και εκπέμπει κόκκινο χρώμα. Ανισότροπα υλικά που απορροφούν πολωμένο φως, όπως τα βαμμένα με Congo Red αμυλοειδή ινίδια, μεταβάλλουν ανώμαλα το δείκτη διάθλασής τους στην περιοχή του φάσματος όπου πραγματοποιείται έντονη απορρόφηση (~500nm) και άρα μεταβάλλουν τη διπλοθλαστικότητά τους σε εκείνη την περιοχή (μεταβολή διαθλώμενων ακτίνων). Όταν ο πολωτής – φακός και αναλύτης – φακός τοποθετούνται κάθετα, το ανισότροπο βαμμένο με Congo Red αμυλοειδογόνο υλικό

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

στρέφει το επίπεδο πόλωσης του φωτός στη περιοχή του πράσινου και άρα από τον αναλύτη περνούν οι αποχρώσεις του πράσινου σε μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ το υπόβαθρο παραμένει μαύρο.



Εικόνα 77. Ενυδατωμένα υμένια πεπτιδίων-αναλόγων σε κοινή αντικειμενοφόρο πλάκα, έπειτα από χρώση με Congo Red.

Η προετοιμασία του διαλύματος της χρωστικής Congo Red πραγματοποιείται είτε με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (phosphate buffer saline - PBS) με pH 7.4 σε τελική συγκέντρωση 10 mM, είτε με την προσθήκη απεσταγμένου νερού και τελική συγκέντρωση 1% (w/v). **Για την μελέτη της πιθανής διπλοθλάστικότητας στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση δύο πρωτόκολλα.** Στο πρώτο, σταγόνα 5 μl από εναιώρημα διαλυτοποιημένου πεπτιδίου-αναλόγου τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφέθηκε σε εξατμιστεί αργά, σε ηρεμία και σε σταθερή θερμοκρασία ~25° C. Η εξατμηση του διαλύτη οδηγεί στο σχηματισμό ενυδατωμένου υμενίου στο οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε ισόποση σταγόνα χρωστικής Congo red συγκέντρωσης 10 mM, η οποία με τη σειρά της αφέθηκε για διάστημα 20-30 min, σε σταθερή θερμοκρασία ~25° C. Η περίσσεια της χρωστικής αφαιρέθηκε με διαδοχικές πλύσεις του υμενίου με διάλυμα αιθανόλης 90% (Divry and Florkin, 1927). Στο δεύτερο τροποποιημένο πρωτόκολλο ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται χρωστική διαλυτοποιημένη σε απεσταγμένο νερό (Bely and Makovitzky, 2006; Romhanyi, 1971). Συχνά το δεύτερο πρωτόκολλο πλεονεκτεί του πρώτου, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε σχηματισμός κρυστάλλων του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών που αλλοίωσε το αποτέλεσμα στο πολωτικό μικροσκόπιο.

Η παρατήρηση των ενυδατωμένων υμενίων των πεπτιδίων, έπειτα από χρώση με Congo Red στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολωτικού

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

στερεομικροσκοπίου **Leica MZ7₅**, κάτω από διασταυρωμένους και μη διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη (Εικόνα 78). Οι ψηφιακές απεικονίσεις των αποτελεσμάτων αποκτήθηκαν με τη χρήση κάμερας **BMS_CMOS_3.0C USB2.0 Camera** (Breukhoven Systems), ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε σώμα **DSLR κάμερας Nikon D3100**. Το πολωτικό μικροσκόπιο βρίσκεται στον **Τομέα Βιολογίας Κυντάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών**.

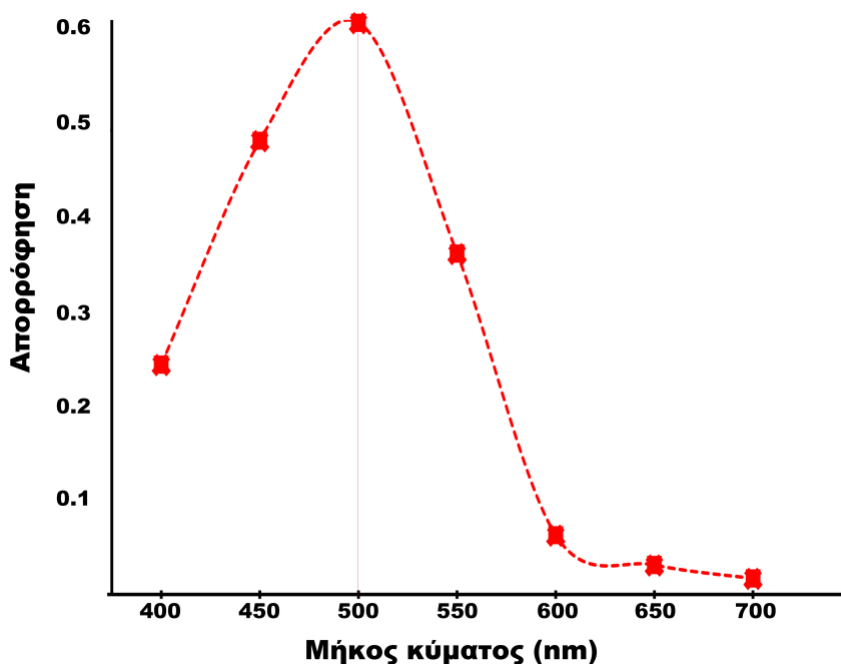


Εικόνα 78. Διάταξη πολωτικού στερεομικροσκοπίου Leica MZ7₅.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.2.6. Φασματοσκοπία ορατού και διαγνωστική χρώση με Congo Red

Η φασματοσκοπική μελέτη της δέσμευσης της χρωστικής Congo Red σε συνάρτηση με το χρόνο είναι μία ακριβής μέθοδος για την κινητική καταγραφή της δημιουργίας των αμυλοειδών ινιδίων. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η ικανότητα της ποσοτικοποίησης των αλληλεπιδράσεων χρωστικής – αμυλοειδών ινιδίων σε πραγματικό χρόνο, με την βήμα προς βήμα καταγραφή της εξέλιξης του φαινομένου. Η αρχή της μεθόδου οφείλεται στην **ικανότητα της χρωστικής Congo Red να μετατοπίζει την απορρόφησή της από τα 500 nm στα 540 nm όταν προσδένεται στα αμυλοειδή ινίδια** (Εικόνα 79). Η φασματική αυτή μετατόπιση είναι χαρακτηριστική για την ύπαρξη αμυλοειδών ινιδίων ή πρώιμων μορφών τους.

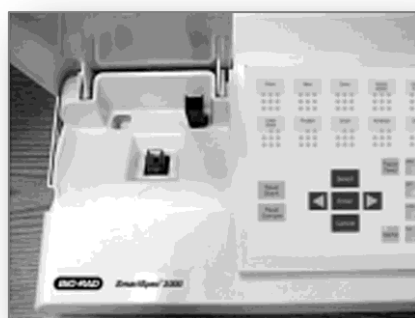


Εικόνα 79. Φάσμα απορρόφησης της χρωστικής Congo Red.

Σταγόνες του εναιωρήματος πεπτιδίου ~10 μl, συγκέντρωσης συνήθως 10 mg ml⁻¹, χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή φάσματος στο ορατό (μεταξύ 400-700 nm) σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 7 ημερών. Για την εφαρμογή της μεθόδου διάλυμα της χρωστικής παρασκευάστηκε με τη διαλυτοποίησή της σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2.5 (Nilsson, 2004). 10 μl πεπτιδίου προστέθηκαν σε πλαστική κυβέτα μίας χρήσης (οπτικού μήκους 1 cm), η οποία περιείχε 10 μl χρωστικής διαλυτοποιημένα σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Με την προσθήκη του

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

εναιωρήματος η κιουβέτα αφήνεται σε ηρεμία, σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα ~30 min, μέχρι να πραγματοποιηθεί δέσμευση της ισόποσης ποσότητας χρωστικής στα ολιγομερή ή αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου. Η δέσμευση της χρωστικής εμφανίζεται με τη δημιουργία κόκκινου ιζήματος που κατακάθεται ή αιωρείται στην κυβέτα. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό, ενώ κιουβέτα με χρωστική χωρίς την ύπαρξη πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η καταγραφή των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο **BIO-RAD SmartSpec™ 3000 (170-2501)** (Εικόνα 80), του **Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.**



Εικόνα 80. Φασματοφωτόμετρο ορατού-UV της BIO-RAD SmartSpec™ 3000 (170-2501).

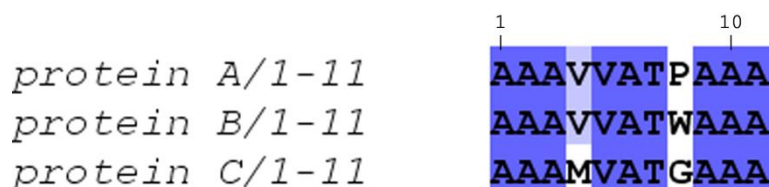
Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.3. Ανάλυση της ακολουθίας και τη δομής

Η ανάλυση της παρούσας διατριβής σε επίπεδο ακολουθίας πραγματοποιήθηκε σε καλά χαρακτηρισμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών που ‘ανασύρθηκαν’ από τη βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών UniProtKB (UniProt, 2014; UniProt, 2015). Αντίστοιχα, η ανάλυση των δομών πραγματοποιήθηκε σε πειραματικά προσδιορισμένες εγγραφές από τη βάση πειραματικά προσδιορισμένων δομών RCSB PDB (www.rcsb.org) (Berman *et al.*, 2000).

2.3.3.1. Στοιχισή πρωτεϊνικών ακολουθιών

Η πολλαπλή στοιχισή ακολουθιών είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται ευρύτατα, για τον εντοπισμό εξελικτικά συντηρημένων τμημάτων σε πρωτεϊνικά μόρια, την εύρεση λειτουργικών περιοχών σε οικογένειες πρωτεϊνών ή ακόμα και κατά την ομόλογη προτυποποίηση για την εύρεση της άγνωστης δομής μιας πρωτεΐνης. Πολλαπλή στοιχισή εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή κατά περίπτωση με τη χρήση των αλγορίθμων ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) και T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) στις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις των αλγορίθμων (*default settings*). Τα αρχεία εξόδου των αλγορίθμων εξετάστηκαν με βάση τα προεπιλεγμένα κατώφλια (*default threshold*). Η ανάλυση και η οπτικοποίηση των πολλαπλών στοιχίσεων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) και BioEdit (Hall, 1999). Στην Εικόνα 81 παρουσιάζεται μία απλοποιημένη πολλαπλή στοιχισή μεταξύ συντηρημένων πρωτεϊνικών μορίων. Η απεικόνιση της μεταξύ τους σχέσης γίνεται με βάση το ποσοστό ομοιότητας σε επίπεδο αμινοξικού καταλοίπου (*percentage identity*) ανά πρωτεϊνικό μόριο, σε αποχρώσεις του μπλε. Κατώφλι ομοιότητας ορίζεται το 30%.



Εικόνα 81. Απλοποιημένη πολλαπλή στοιχισή μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.3.2. Ανάλυση του αμυλοειδογόνου προφίλ πρωτεϊνικών ακολουθιών

Θεωρητικές και πειραματικές ενδείξεις αποδεικνύουν ότι μικρά τμήματα των πρωτεϊνικών μορίων μπορούν να οδηγούν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων (Esteras-Chopo *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2006; Lopez de la Paz and Serrano, 2004; Teng and Eisenberg, 2009). Βασισμένες σε αυτή τη θεωρία πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν στραφεί εδώ και μία δεκαπενταετία στην ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων, σε μία προσπάθεια να προγνώσουν με βάση την ακολουθία αμυλοειδογόνα τμήματα ή περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση ή αμυλοειδογόνους καθοριστές. Η ιδέα ότι η **αμυλοειδογονικότητα των πρωτεϊνών βρίσκεται ‘κρυμμένη’ στην ακολουθία** οδήγησε στην ανάπτυξη αλγορίθμων που εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες των πρωτεϊνών σε επίπεδο ακολουθίας (Hamodrakas, 2011). Ο Πίνακας 11 συνοψίζει του διαθέσιμους αλγορίθμους πρόγνωσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση και καταγράφει την προσέγγιση κάθε μεθόδου για την εύρεση σημαντικών αμυλοειδογόνων περιοχών.

Η **ανάλυση του αμυλοειδογόνου προφίλ των πρωτεϊνικών ακολουθιών** της παρούσας διατριβής **πραγματοποιήθηκε με τους αλγορίθμους AMYLPRED** (Frousios *et al.*, 2009) και **AMYLPRED2** (Tsolis *et al.*, 2013), που βρίσκονται ελεύθερα διαθέσιμοι για την ακαδημαϊκή κοινότητα στον εξυπηρετητή του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοπληροφορικής, του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μέθοδος AMYLPRED υπήρξε πρωτοποριακή με μελέτη περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση, καθώς υπήρξε η πρώτη προσπάθεια δημιουργία συναινετικής μεθόδου στον τομέα της πρωτεϊνική συσσωμάτωσης. Η πρώτη έκδοση του αλγορίθμου που αναπτύχθηκε το 2009 ονομάστηκε AMYLPRED, ενώ η δεύτερη βελτιωμένη έκδοσή του το 2013 ονομάστηκε AMYLPRED2. Οι αλγόριθμοι AMYLPRED και AMYLPRED2 συνδυάζουν 5 και 11 ανεξάρτητες μεθόδους, αντίστοιχα και σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση σε ένα σύνολο 33 αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών αποδίδουν με μεγαλύτερη ακρίβεια, σε σύγκριση με τις ανεξάρτητες μεθόδους (Tsolis *et al.*, 2013). Η απεικόνιση του αμυλοειδογόνου προφίλ των πρωτεϊνικών μορίων της παρούσας διατριβής πραγματοποιείται σε δισδιάστατα ιστογράμματα, όπου στον άξονα x καταγράφεται η ακολουθία και στον άξονα y καταγράφεται η ανά κατάλοιπο συναινετική πρόγνωση της αμυλοειδογονικότητας.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

Πίνακας 11. Συγκεντρωτική καταγραφή των αλγορίθμων πρόγνωσης περιοχών με ‘τάση προς συσσωμάτωση’. Καταγράφεται η προσέγγιση κάθε αλγορίθμου, ο ιστότοπος διαθεσιμότητας του εξυπηρετητή του (*server link*), καθώς και η πρώτη του αναφορά στη βιβλιογραφία.

Αλγόριθμος	Προσέγγιση αλγορίθμου	Ιστότοπος εξυπηρετητή	Αναφορά
Net-CSSP	Εύρεση ακολουθίας-χαιμαιλέων	http://cssp2.sookmyung.ac.kr/	(Yoon and Welsh, 2004)
TANGO	Ιδιότητες στεροδιάταξης β-δομής	http://tango.crg.es/	(Fernandez-Escamilla <i>et al.</i> , 2004)
3D profile	Προσδιορισμένες κρυσταλλογραφικά αμυλοειδογόνες δομές μικρών πεπτιδίων	Μη διαθέσιμο	(Thompson <i>et al.</i> , 2006)
PASTA	Κατά ζεύγη αλληλεπιδράσεις μεταξύ β-φύλλων	http://biocomp.bio.unipd.it/pasta	(Trovato <i>et al.</i> , 2007)
FoldAmyloid	Αμινοξική σύσταση	http://bioinfo.protres.ru/fold-amyloid/oga.cgi	(Galzitskaya <i>et al.</i> , 2006)
AGGRESKAN	Αμινοξική σύσταση	http://bioinf.uab.es/aggrescan/	(Conchillo-Sole <i>et al.</i> , 2007; Zibae <i>et al.</i> , 2007)
Zygggregator	Αμυλοειδογονικότητα καταλοίπων και ιδιότητες στεροδιάταξης β-δομής	http://www-vendruscolo.ch.cam.ac.uk/zygggregator.php	(Tartaglia and Vendruscolo, 2008)
AMYPRED	Εύρεση ακολουθίας-χαιμαιλέων - Συναινετικός αλγόριθμος 5 μεθόδων	http://aias.biol.uoa.gr/AMYPRED/	(Frousios <i>et al.</i> , 2009)
Pafig	Μέθοδοι μηχανικής μάθησης	http://www.mobioinform.cn/pafig/	(Tian <i>et al.</i> , 2009)
BETASCAN	Κατά ζεύγη αλληλεπιδράσεις μεταξύ β-φύλλων	http://groups.csail.mit.edu/cb/betascan/betascan.html	(Bryan <i>et al.</i> , 2009)
Waltz	Προσδιορισμένες κρυσταλλογραφικά αμυλοειδογόνες δομές μικρών πεπτιδίων	http://www.switchlab.org/bioinformatics/waltz	(Maurer-Stroh <i>et al.</i> , 2010)
AmyloidMutants	Στατιστική μέθοδος υπολογισμού του ενεργειακού προφίλ πρωτεϊνών	http://amyloid.csail.mit.edu/	(O'Donnell <i>et al.</i> , 2011)

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

AMYLPRED2	Εύρεση ακολουθίας χαμαιλέων - Συναινετικός αλγόριθμος 11 μεθόδων	http://aias.biol.uoa.gr/AM YLPRED2/	(Tsolis <i>et al.</i> , 2013)
MetAmyl	Περιοχές με τάση για συσσωμάτωση - Συναινετικός αλγόριθμος	http://metamyl.genouest.org/	(Emily <i>et al.</i> , 2013)
PASTA 2.0	Κατά ζεύγη αλληλεπιδράσεις μεταξύ β-φύλλων	http://protein.bio.unipd.it/pasta2/index.html	(Walsh <i>et al.</i> , 2014)
FISH	Μέθοδοι μηχανικής μάθησης	http://www.comprec.pwr.wroc.pl/fish/fish.php	(Gasior and Kotulska, 2014)
GAP	Μέθοδοι μηχανικής μάθησης	http://www.iitm.ac.in/bioinfo/GAP/	(Thangakani <i>et al.</i> , 2014)
PrionW	Αμινοξική σύσταση πλούσια σε γλουταμίνη και ασπαραγίνη	http://bioinf.uab.cat/prionw/	(Zambrano <i>et al.</i> , 2015)
SEMBA	Ενεργειακοί υπολογισμοί	http://amyloid.cs.mcgill.ca/semba.php	(Smaoui <i>et al.</i> , 2015)
Fibpredictor	Προτυποποίηση β-δομής βασισμένη σε στατιστική συνάρτηση βαθμονόμησης	http://nanohub.org/resources/fibpredictor	(Tabatabaei Ghomi <i>et al.</i> , 2016)

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.3.3. Εύρεση περιοχών με ιδιότητες αλληλουχιών-‘χαμαιλέοντα’

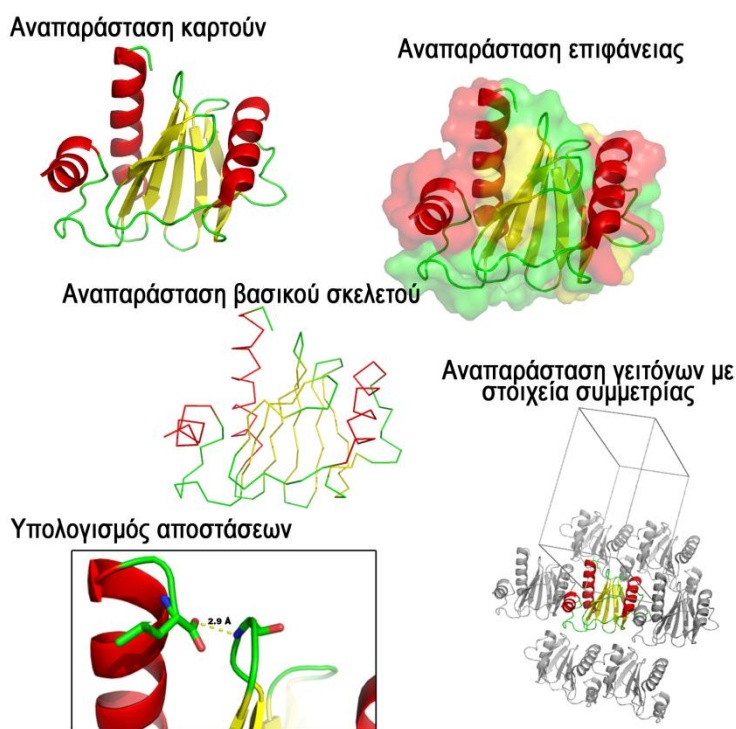
Οι περιορισμοί που θέτουν οι πειραματικές διαδικασίες κατά τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής αποτέλεσαν το έναυσμα για την **ανάπτυξη μεθόδων πρόγνωσης της δομής από την ακολουθία**. Στην περίπτωση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών η ετερογένεια τους, τόσο σε επίπεδο δομής, όσο και σε επίπεδο ακολουθίας, καθώς και η αδυναμία πειραματικού προσδιορισμού της δομής τους στην ινδιακή κατάσταση, ανάγει τις μεθόδους πρόγνωσης δευτεροταγούς δομής σε ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο. Σημειώνεται ότι σημαντικές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί στον προσδιορισμό της δομής των αμυλοειδών ινιδίων, από δομές που αγγίζουν τα όρια ατομικής διακριτικότητας με χρήση εναλλακτικών τεχνικών, όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός στερεάς κατάστασης (ssNMR) (Fitzpatrick *et al.*, 2017) ή κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-EM) (Madine *et al.*, 2008), ωστόσο **αδιευκρίνιστος παραμένει ακόμα ο μηχανισμός της δομικής μετάβασης των πρωτεϊνών από τη φυσιολογική στην ινδιακή κατάσταση**.

Ένα ισχυρό παράδειγμα αποτελούν οι all-α αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες της οικογένειας των απολιποπρωτεϊνών, οι οποίες αυτοσυγκροτούνται υιοθετώντας στην ινδιακή τους κατάσταση την cross-β αρχιτεκτονική (Mangione *et al.*, 2001). Πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν την ύπαρξη περιοχών με ιδιότητες αλληλουχιών-‘χαμαιλέοντα’ στις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες, μία ιδιότητα κατά την οποία πεπτιδικά τμήματα εμφανίζουν την τάση να τροποποιούν τη δομή τους από μη-κανονική ή ελικοειδή (α-έλικα) σε εκτεταμένη (β-κλώνος). Τα τμήματα αυτά ονομάζονται εναλλακτικά ‘στερεοδιαταξικοί διακόπτες’ (Hamodrakas *et al.*, 2007). Η **εύρεση περιοχών με ιδιότητες αλληλουχιών-‘χαμαιλέοντα’** στις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες της παρούσας διατριβής **πραγματοποιήθηκε με τον συναινετικό αλγόριθμο SecStr**, έναν αλγόριθμο πρόγνωσης της δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών που βρίσκεται διαθέσιμος για την ακαδημαϊκή κοινότητα στον εξυπηρετητή του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοπληροφορικής, του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μέθοδος συνδυάζει τα αποτελέσματα 6 ανεξάρτητων μεθόδων και αναλύει την ανα κατάλοιπο ικανότητα για σχηματισμό α-έλικας, β-κλώνου ή στροφής. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων στην παρούσα διατριβή πραγματοποιείται σε δισδιάστατα ιστογράμματα, όπου στον άξονα x καταγράφεται η ακολουθία και στον άξονα y καταγράφεται η ανά κατάλοιπο συναινετική πρόγνωση της δευτεροταγούς δομής.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.3.4. Οπτικοποίηση πρωτεϊνικών δομών

Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών δομών της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). Το λογισμικό PyMol παρέχει μία φιλική πλατφόρμα διαχείρισης δομών με μία πλούσια λίστα από διαθέσιμες λειτουργικότητες, καθώς αποτελεί λογισμικό ανοιχτού κώδικα (*open-source software*). Οι αναπαραστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ανα περίπτωση είναι αναπαράσταση cartoon ή αναπαράσταση με βάση τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής (*cartoon representation*), η αναπαράσταση ράβδων (*sticks representation*), η αναπαράσταση του κύριου σκελετού της αλυσίδας (*backbone representation*), όπου για λόγους απλότητας αναπαρίστανται μόνο οι C_{α} (τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα) των αμινοξικών καταλοίπων και τέλος η αναπαράσταση επιφάνειας ή μοντέλο χωροπληρωτικής αναπαράστασης, στο οποίο τα άτομα αναπαρίστανται με σφαίρες, οι ακτίνες των οποίων είναι ανάλογες με την ακτίνα van der Waals του κάθε ατόμου. Σημαντικές λειτουργικότητες του λογισμικού PyMol που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο υπολογισμός αποστάσεων μεταξύ ασύμμετρων ατόμων άνθρακα αμινοξικών καταλοίπων (υπολογισμός σε Å) και η κατασκευή γειτόνων με στοιχεία συμμετρίας στον κρύσταλλο (*symmetry equivalent molecules*) (Εικόνα 82).

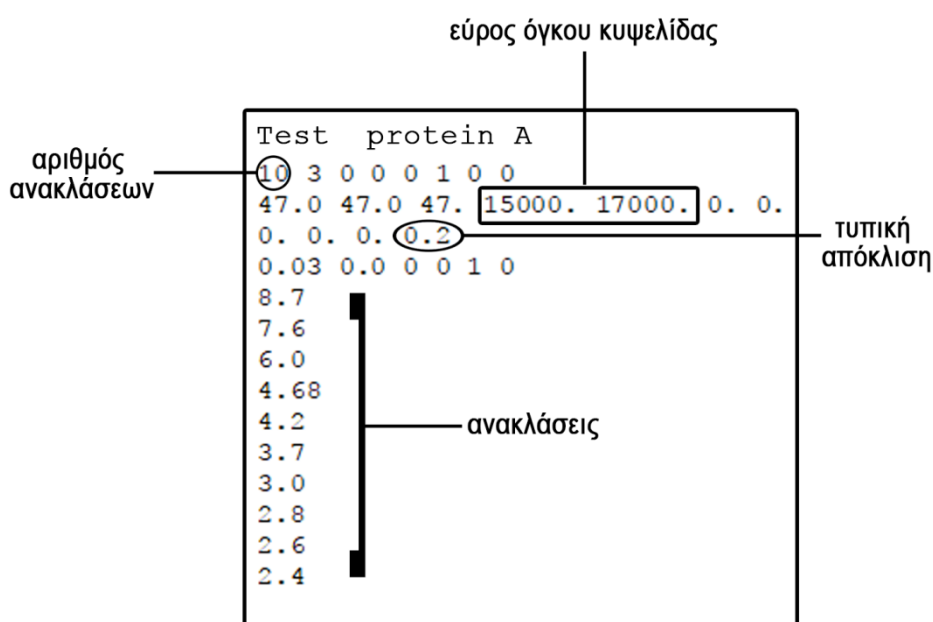


Εικόνα 82. Βασικές λειτουργικότητες του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005).

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

2.3.3.5. Δεικτοδότηση ανακλάσεων σε περιθλασιγράμματα ακτίνων-X

Η κρυσταλλικότητα που καταγράφεται σε περιθλασιγράμματα από προσανατολισμένες ίνες που δημιουργούνται από αμυλοειδή ινίδια μελετήθηκε περαιτέρω με τον **αλγόριθμο DICVOL06** (Boultif and Louër, 2004). Η μέθοδος αποτελεί μία αυτοματοποιημένη διαδικασία δεικτοδότησης περιθλασιγραμμάτων πολυκρυσταλλικών υλικών, δηλαδή ερμηνείας των διαφόρων επιπέδων οργάνωσης του υπό μελέτη υλικού, στον τρισδιάστατο χώρο. Το αρχείο εισόδου του αλγορίθμου είναι ένα απλό αρχείο κειμένου (.txt) στο οποίο καταγράφονται το κρυσταλλικό σύστημα μελέτης, το εύρος του επιθυμητού όγκου της κυψελίδας και οι ανακλάσεις. Η Εικόνα 83 παρουσιάζει ένα αρχείο εισόδου και καταγράφει τις βασικές παραμέτρους που εισάγει ο χρήστης. Συνολικά οι ανακλάσεις των περιθλασιγραμμάτων καταγράφονται με το εργαλείο iMosFLM (Leslie and Powell, 2007).



Εικόνα 83. Αρχείο εισόδου του προγράμματος αυτοματοποιημένη δεικτοδότησης DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004).

Αντίστοιχα, το αρχείο εξόδου του αλγορίθμου περιλαμβάνει πολλαπλές λύσεις οι οποίες αποδίδουν συγκεκριμένα hkl σε κάθε ανάκλαση, για το κρυσταλλικό σύστημα που καταγράφεται στο αρχείο εισόδου. Συγκεκριμένα σε κάθε λύση καταγράφονται το μέγεθος (a, b, c), οι γωνίες (α , β , γ), ο όγκος της κυψελίδας και η τυπική απόκλιση των τιμών (Εικόνα 84). Επίσης περιλαμβάνονται οι τιμές των ανακλάσεων που εισάγει ο χρήστης, καθώς και οι τιμές των υπολογισμένων ανακλάσεων από το πρόγραμμα.

Κεφάλαιο II – Υλικά & Μέθοδοι

όγκος κυψελίδας

ORTHORHOMBIC SYSTEM

DIRECT PARAMETERS : A= 26.10003 B= 24.79337 C= 23.95695 VOLUME=15502.73
 STANDARD DEVIATIONS : 0.00561 0.00418 0.00759
 REFINED ZERO-POINT SHIFT :-0.0007 deg. 2-theta

H	K	L	DOBS	DCAL	DOBS-DCAL	2TH.OBS	2TH.CAL	DIF.2TH.
3	0	0	8.70000	8.69942	0.00058	10.159	10.160	-0.001
0	1	3	7.60000	7.60065	-0.00065	11.634	11.633	0.001
0	0	4	6.00000	5.98856	0.01104	14.752	14.780	-0.027
0	4	1	6.00047	6.00047	-0.00047		14.751	0.001
3	3	0	5.99164	5.99164	0.00836		14.773	-0.021
4	2	3	4.68000	4.67887	0.00113	18.947	18.952	-0.005
5	2	3	4.12000	4.12073	-0.00073	21.552	21.548	0.004
0	6	3	3.67000	3.66989	0.00011	24.232	24.233	-0.001
2	5	4	3.66560	3.66560	0.00439		24.261	-0.029
6	3	2	3.66466	3.66466	0.00534		24.268	-0.036
1	4	7	2.98000	2.97644	0.00356	29.961	29.998	-0.037
1	8	2	2.98068	2.98068	-0.00068		29.954	0.007
7	5	0	2.98003	2.98003	-0.00003		29.961	0.000
1	3	8	2.80000	2.79919	0.00081	31.927	31.946	-0.010
1	5	7	2.80036	2.80036	-0.00036		31.923	0.004
4	8	0	2.79939	2.79939	0.00061		31.944	-0.007
9	1	2	2.80048	2.80048	-0.00048		31.931	0.006

ανακλάσεων hkl

ανακλάσεις χρήστη

ανακλάσεις DICVOL06

* NUMBER OF LINES
 .- LINES INPUT = 8
 .- LINES INDEXED = 8
 .- LINES CALCULATED = 476
 * MEAN ABSOLUTE DISCREPANCIES
 <Q> =0.1142E-04
 <DELTA(2-THETA)> =0.2071E-02
 MAX. ERROR ACCEPTED (DEG. 2-THETA) =0.4500E-01

Εικόνα 84. Αρχείο εξόδου μίας πιθανής λύσης στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα.

2.3.3.6. Μελέτη μοντέλων πεπτιδίων-αναλόγων

Η ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων των πεπτιδίων αναλόγων επιβεβαιώθηκε, κατά περίπτωση, από τη βάση δεδομένων ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Η βάση αυτή περιλαμβάνει τρισδιάστατες πρότυπες δομές εξαπεπτιδίων με τάση να σχηματίζουν στερεοδιαταξικά φερμουάρ, που προκύπτουν με εφαρμογή της μεθόδου της ύφανσης ακολουθιών (*threading*). Ως πρότυπη δομή για τη δημιουργία των μοντέλων χρησιμοποιείται η κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή του πεπτιδίου-αναλόγου της ζύμης NNQQNY (Nelson *et al.*, 2005), ενώ οι αυτοματοποιημένοι ενεργειακοί υπολογισμοί πραγματοποιούνται με τη βοήθεια του προγράμματος Rosetta-Design (Leaver-Fay *et al.*, 2011).

Κεφάλαιο ΙΙΙ – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Κεφάλαιο III

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής που παρουσιάζονται ακολούθως χωρίζονται σε 6 διακριτές ενότητες. Η 1^η ενότητα αφορά μία συστηματική προσέγγιση με την οποία κατευθύναμε τη **δημιουργία του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**. Οι ενότητες 2 – 6 αφορούν την πειραματική μελέτη της δομής και της αυτοσυγκρότησης διαφορετικών πρωτεϊνικών συστημάτων με μία ποικιλία Βιοφυσικών και Βιοχημικών μεθοδολογιών, όπως 1) Περίθλαση ακτίνων-X, 2) Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης, 3) Φασματοσκοπία Υπερερύθρου, 4) Πολωτική Μικροσκοπία, 5) Αλλαγές στο pH, τη θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ, το διαλύτη κ.α. Ωστόσο, όπως αναφέρεται και στην Ενότητα 1, η ομάδα των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων αποτελείται από πρωτεΐνες που διαφέρουν τόσο σε επίπεδο ακολουθίας όσο και σε επίπεδο δομής. Έτσι σημειώνεται ότι, κατά την πειραματική προσέγγιση των παραπάνω συστημάτων λήφθηκαν υπόψη οι ιδιαιτερότητες του κάθε πρωτεϊνικού μορίου και επομένως χρησιμοποιήθηκε διαφορετική στρατηγική αντιμετώπισης των ερευνητικών ερωτημάτων, παρότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν – σε γενικές γραμμές – κοινή.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1. Δίκτυο Αλληλεπιδράσεων των Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών

Τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων είναι μία συστηματική προσέγγιση που χρησιμοποιείται ευρέως, σε μία προσπάθεια μακροσκοπικής παρατήρησης της βιολογικής πολυπλοκότητας (Bader *et al.*, 2008; Cusick *et al.*, 2005; Vidal, 2005). Η εφαρμογή της θεωρίας γράφων και συγκεκριμένα τα δίκτυα αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, μπορούν να αποκαλύψουν τον τρόπο με τον οποίο διαφορετικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν για την πραγματοποίηση βιολογικών διεργασιών στο εσωτερικό του κυττάρου και να αποτελέσουν μια πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργικής οργάνωσης του πρωτεώματος. Συνάμα, είναι σημαντικά συμπληρώματα στην πρωτεωμική, καθώς η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων έχει συνεισφέρει σημαντικά στην επίλυση πολλών προβλημάτων στη βιολογική και ιατρική έρευνα (Gunsalus *et al.*, 2005; Rhodes and Chinnaiyan, 2005; Stelzl *et al.*, 2005), έχει ήδη χρησιμοποιηθεί ως οδηγός επιπλέον στοχευμένων πειραμάτων (Rual *et al.*, 2005), ενώ ειδικότερα, συμβάλλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που πυροδοτούν την εμφάνιση διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών (Ge *et al.*, 2003; Petta *et al.*, 2016).

Ένα θέμα ελλιπώς μελετημένο είναι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών που σχετίζονται με τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες, καθώς και με τις παθολογικές καταστάσεις στις οποίες αυτές εμπλέκονται. Σήμερα, μερικές μόνο μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τη θεωρία γράφων για να μελετήσουν συστηματικά τη νόσο του Alzheimer (Chen *et al.*, 2006; Goni *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2014), τη νόσο του Huntington (Tourette *et al.*, 2014) και για να κατασκευάσουν το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της προδρομίου αμυλοειδογόνου πρωτεΐνης (*Amyloid precursor protein – APP*) (Bai *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2015; Virok *et al.*, 2011).

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την συν-εναπόθεση περισσότερων του ενός αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στην εξέλιξη διαφορετικών αμυλοειδώσεων. Ο βαθμός, όμως, στον οποίο η συνεύρεση των πρωτεϊνικών συστατικών στις αμυλοειδείς πλάκες επηρεάζει την εξέλιξη κάθε αμυλοείδωσης, με τη συμμετοχή των ‘φαινομενικά’ μη-συσχετιζόμενων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, παραμένει άγνωστος. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας αποδεικνύουν ότι μαζί με τα αμυλοειδή ινίδια του Αβ πεπτιδίου, που είναι το κύριο συστατικό που συναθροίζεται στον εγκέφαλο των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer, **συν-εναποτίθενται και άλλες πρωτεΐνες**, ως δευτερεύοντα αλλά σαφώς μετρήσιμα ‘συστατικά’ των αμυλοειδών πλακών. Ακόμα, στη συστημική αμυλοείδωση της τρίτης ηλικίας (*Senile Systemic Amyloidosis*) καταγράφεται η συνεργατική δράση πολλών απολιποπρωτεϊνών, καθώς και της τρανσθυρετίνης (Bergstrom *et al.*, 2004; de Sousa *et al.*,

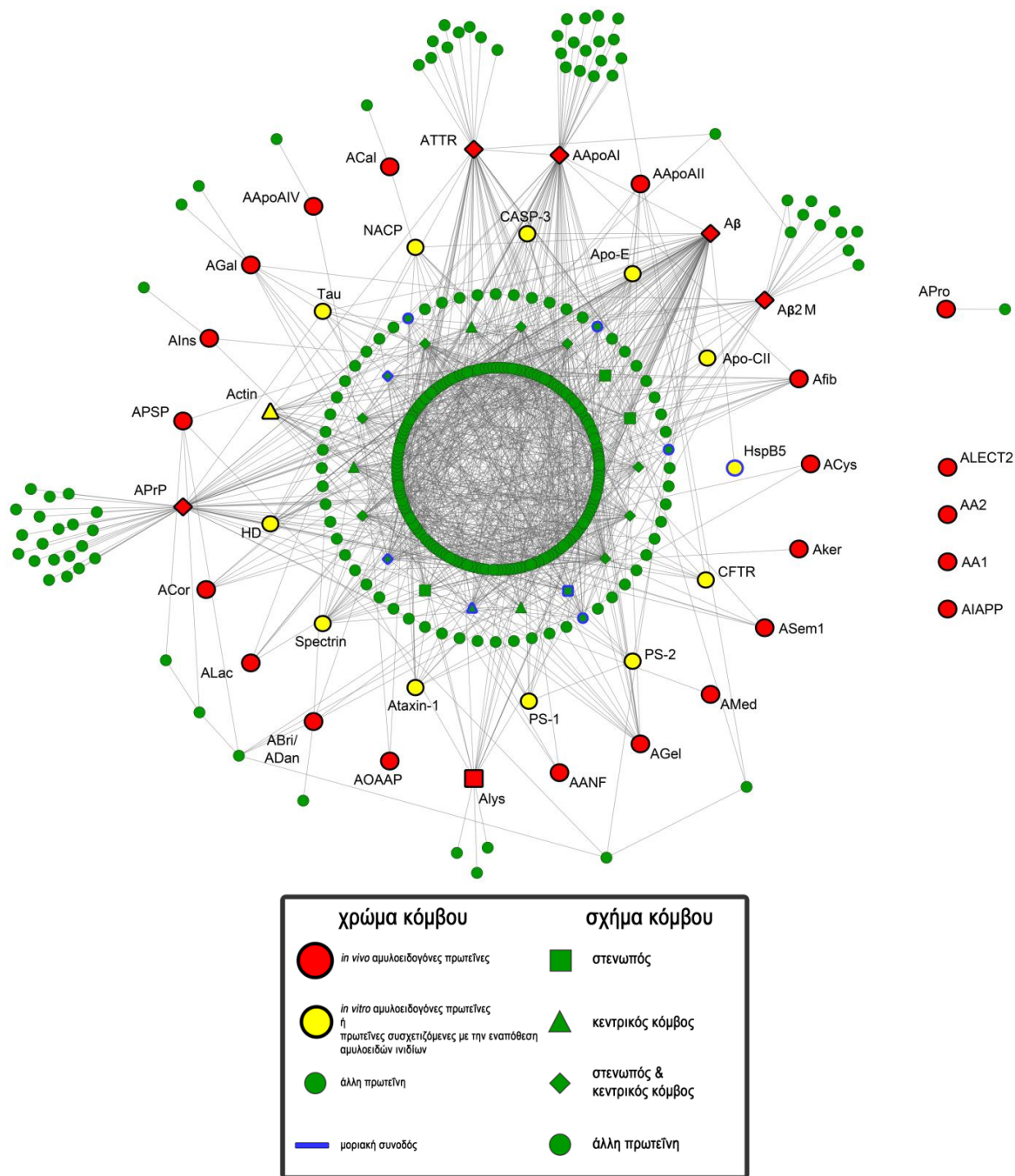
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

2000), ενώ εκτός από την εναπόθεση του συσσωματωμένου Αβ πεπτιδίου στην ασθένεια του Alzheimer, κυριαρχούν και άλλα αμυλοειδογόνα πρωτεϊνικά συστατικά, όπως η κυστατίνη C, η τρανσθυρετίνη και η γκελσολίνη (Levy *et al.*, 2001). Πειραματικές μελέτες τα τελευταία δέκα χρόνια επιχειρούν να διερευνήσουν και να εξηγήσουν το συνεργατικό αυτό φαινόμενο μεταξύ των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Morales *et al.*, 2013). *In vitro* πειράματα αποδεικνύουν την ικανότητα π.χ. του Αβ πεπτιδίου να συμβάλλει στην πυρήνωση της α-συνουκλείνης (Tsigelny *et al.*, 2008), της πρωτεΐνης tau (Guo *et al.*, 2006) ή των prion (Morales *et al.*, 2010), ενώ αντίστοιχα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλές καλά χαρακτηρισμένες αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Ulbrich *et al.*, 2014; Westermarck and Westermarck, 2008; Yan *et al.*, 2007). Εκτός από τα *in vitro* πειράματα, δοκιμές σε διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα απέδειξαν τη συν-εναπόθεση του Αβ πεπτιδίου με τις πρωτεΐνες tau (Gotz *et al.*, 2001) ή τα prion (Morales *et al.*, 2010).

Ο ρόλος των συναθροιζόμενων αυτών πρωτεϊνών δεν έχει αποσαφηνιστεί, **με βεβαιότητα όμως σήμερα μπορεί κανείς να υποστηρίξει ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν**. Επομένως, μία κρυφή προοπτική προβάλλει από αυτή τη μοριακή συσχέτιση: **η τάση πυρήνωσης μεταξύ διαφορετικών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών μπορεί να εξηγήσει μηχανιστικά τον τρόπο με τον οποίο μη-φυσιολογικά διπλωμένες πρωτεΐνες συνεπαποτίθενται και να προτείνει πιθανούς, ελκυστικούς υποψηφίους για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών τακτικών**. Συγκεκριμένα, παράδειγμα αποτελεί ο λειτουργικός χαρακτήρας της συν-εναπόθεσης της αμυλοειδογόνου Κυστατίνης C σε ασθενείς με Alzheimer's, καθώς η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση της με το πεπτίδιο Αβ βρέθηκε να αναστέλλει τον ολιγομερισμό της δεύτερης προστατεύοντας τον εγκέφαλο από την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (Levy, 2008; Levy *et al.*, 2001).

Στις παρακάτω ενότητες παρουσιάζεται μία συστηματική προσέγγιση στη μελέτη της αμυλοειδογονικότητας η οποία οδήγησε **στη δημιουργία του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών** (Εικόνα 85). Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων κατασκευάζεται και αξιολογείται με βάση τη θεωρία γράφων, ενώ παρουσιάζει μακροσκοπικά την αλληλεπίδραση μεταξύ 'φαινομενικά' μη-συσχετιζόμενων πρωτεϊνικών μορίων που εμφανίζουν την τάση να δημιουργούν αμυλοειδή ινίδια, κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 85. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Το δίκτυο αποτελείται από 353 κόμβους, συνδεδεμένους με 1178 ακμές και 4 μη-συνδεδεμένους κόμβους. Τα δεδομένα αλληλεπιδράσεων συγκεντρώθηκαν από τη βάση δεδομένων IntAct (Hermjakob *et al.*, 2004) και οπτικοποιήθηκαν με το εργαλείο Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003). Οι πρωτεΐνες παρουσιάζονται ως κόμβοι και οι αλληλεπιδράσεις ως ακμές. Οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων παρουσιάζονται με κόκκινους μεγάλους κόμβους, ενώ οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων ή οι πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων άλλων πρόδρομων μορίων παρουσιάζονται με κίτρινους -μεσαίου μεγέθους- κόμβους. Οι πρωτεΐνες-συνοδοί σημαίνονται με μπλε γραμμή. Τα σχήματα των κόμβων αλλάζουν για την περιγραφή στενωπών (τετράγωνος κόμβος), κεντρικών κόμβων (τρίγωνος κόμβος), κόμβων με ταυτόχρονα χαρακτηριστικά στενωπού και κεντρικού κόμβου (κόμβος διαμάντι).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1.1. Κατασκευή του δικτύου αλληλεπιδράσεων

Για την κατασκευή του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, συγκεντρώθηκαν **καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων από τη λίστα πρωτεϊνών που δημοσιεύθηκε το 2014** (Sipe *et al.*, 2014). Από τη λίστα αυτή εξαιρέθηκαν το πεπτιδικό αντιρετροϊκό φάρμακο *Enfuvirtide* (D'Souza *et al.*, 2014), καθώς και οι ελαφριές και βαριές αλυσίδες της ανοσοσφαιρίνης. Συγκεκριμένα, η εξαίρεση των ανοσοσφαιρινών (Isobe, 1993) πραγματοποιήθηκε λόγω της ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν στον ανθρώπινο πληθυσμό και τις πολλαπλές εγγραφές που συναντάμε στη βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών UniProtKB (UniProt, 2015). **Το τελικό σύνολο δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε 28 πρωτεΐνες**, για τις οποίες συγκεντρώθηκαν δεδομένα αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων πειραματικά προσδιορισμένων αλληλεπιδράσεων IntAct (Hermjakob *et al.*, 2004). Ο Πίνακας 12 παρουσιάζει το σύνολο δεδομένων, και συγκεκριμένα, τα ονόματα της πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης που σχετίζεται με την εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων, σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, τις συντομογραφίες τους σύμφωνα με τη δημοσίευση της (Sipe *et al.*, 2014), καθώς και τους κωδικούς των εγγραφών στη βάση πρωτεϊνικών αλληλουχιών UniProtKB.

Από τη συλλογή των αλληλεπιδράσεων προέκυψε το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, **το οποίο συνολικά αποτελείται από 353 συνδεδεμένους κόμβους με 1178 ακμές και 4 μη-συνδεδεμένους κόμβους** (Εικόνα 85). Το δίκτυο αποτελεί έναν απλό, μη κατευθυνόμενο γράφο, καθώς στην περίπτωση των πειραματικών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών που συλλέχθηκαν δεν υπάρχει κατεύθυνση. Οι κόμβοι αφορούν 357 διαφορετικές πρωτεΐνες και οι ακμές αναπαριστούν τις αλληλεπιδράσεις τους. Οι 23 από τις 28 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες του αρχικού συνόλου δεδομένων βρίσκονται στο δίκτυο και **δομούν ένα ενιαίο συνδεδεμένο στοιχείο** (giant connected component) (Εικόνα 85, κόκκινοι κόμβοι), ενώ εντοπίζονται και 13 πρωτεΐνες που σχετίζονται είτε με την *in vitro* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων, είτε είναι πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων άλλων πρόδρομων μορίων (Εικόνα 85, κίτρινοι κόμβοι). Μεταξύ αυτών βρίσκονται πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δημιουργία ενδοκυτταρικών εγκλείστων (*Tau*, *Actin*, *NACP*, *HD*) (Sipe *et al.*, 2014), καθώς και πρωτεΐνες άμεσα συσχετιζόμενες με την εμφάνιση της νόσου του Alzheimer (*Apo-E*, *PS-1*, *PS-2*, *Tau*) (Carter, 2005). Ο Πίνακας 13 παρουσιάζει τα ονόματα των πρόδρομων μορφών 13 πρωτεϊνών.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πίνακας 12. Το σύνολο δεδομένων καλά χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων όπως περιγράφονται στη λίστα πρωτεϊνών της Διεθνούς Ένωσης Αμυλοειδώσεων, που δημοσιεύθηκε το 2014 (Sipe *et al.*, 2014).

Όνομα πρόδρομης πρωτεΐνης	Συντομογραφίες	UniProt AC
Amyloid beta A4 protein	Aβ	P05067
Apolipoprotein A-I	AApoAI	P02647
Apolipoprotein A-II	AApoAII	P02652
Apolipoprotein A-IV	AApoAIV	P06727
Beta-2-microglobulin	Aβ2M	P61769
Calcitonin	ACal	P01258
Corneodesmosin	ACor	Q15517
Cystatin-C	ACys	P01034
Fibrinogen alpha chain	Afib	P02671
Galectin 7	AGal	P47929
Gelsolin	AGel	P06396
Insulin	AIns	P01308
Integral membrane protein 2B	ABri/ ADan	Q9Y287
Islet Amyloid Polypeptide	AIAPP	P10997
Kerato-epithelin	Aker	Q15582
Lactadherin	AMed	Q08431
Lactoferrin	ALac	P02788
Leukocyte cell-derived chemotaxin-2	ALECT2	O14960
Lysozyme C	Alys	P61626
Major prion protein	APrP	P04156
Natriuretic peptides A	AANF	P01160
Odontogenic Ameloblast-Associated	AOAAP	A1E959
Prolactin	APro	P01236
Pulmonary surfactant associated	APSP	P11686
Semenogelin-1	ASem1	P04279
Serum amyloid A-1	AA1	P0DJI8
Serum amyloid A-2	AA2	P0DJI9
Transthyretin	ATTR	P02766

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πίνακας 13. Το σύνολο των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την *in vitro* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων που εντοπίστηκαν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.

Όνομα πρόδρομης πρωτεΐνης	Συντομογραφίες	UniProt AC
<i>Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την in vitro εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων</i>		
alpha beta Crystallin (ABC)	HspB5	P02511
alpha-Synuclein	NACP	P37840
Apolipoprotein C-II	Apo-CII	P02655
Caspase-3 precursor	CASP-3	P42574
Cystic fibrosis transmembrane	CFTR	P13569
Huntingtin (Polyq expanded)	HD	P42858
Presenilin 1	PS-1	P49768
Presenilin 2	PS-2	P49810
Spectrin SH3	Spectrin	Q13813
Tau	Tau	P10636
<i>Πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με την in vivo εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων άλλων αμυλοειδογόνων μορίων</i>		
Actin, cytoplasmic 1	Actin	P60709
Apolipoprotein E	Apo-E	P02649
Ataxin 1	Ataxin-1	P54253

Σημειώνεται ότι η προλακτίνη (*APro*) μία ορμόνη του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, γνωστή για την εναπόθεσή της με τη μορφή αμυλοειδών ινιδίων (Westermarck *et al.*, 1997), δεν κατόρθωσε να ενταχθεί στο δίκτυο, ενώ η μόνη αλληλεπίδραση που εντοπίστηκε ήταν εκείνη με τον υποδοχέα της (Εικόνα 85, δεξιά). Αυτή η ‘απομόνωση’ μίας τόσο σημαντικής ορμόνης, μαζί με την ανικανότητα της αμυλίνης (*AIAPP*) να ενταχθεί στο ενιαίο συνδεδεμένο στοιχείο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών είναι αξιοσημείωτη (Maji *et al.*, 2009). Ειδικότερα, η αδυναμία ένταξης της αμυλίνης (*AIAPP*) στο δίκτυο επιβεβαιώνει τα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει καταγραφεί πειραματικά κάποια συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μεταξύ της αμυλίνης και άλλου πρωτεϊνικού μορίου, παρότι αποτελεί μία εκτενώς μελετημένη πεπτιδική ορμόνη. Από την άλλη μεριά τόσο η αμυλοειδής πρωτεΐνη του πλάσματος 1 (*AA1*) όσο και η αμυλοειδής πρωτεΐνη του πλάσματος 2 (*AA2*), παρότι είναι σημαντικά συστατικά των συμπλεγμάτων λιποπρωτεϊνών υψηλής

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

πυκνότητας (HDL -High Density Lipoprotein) και είναι πρωτεΐνες που αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια έπειτα από μερική πρωτεόλυση (Lu *et al.*, 2014), δεν έχουν καταγεγραμμένη καμία άμεση αλληλεπίδραση στη βάση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων IntAct. Επομένως, εκ πρώτης όψεως το δίκτυο που προέκυψε **αποδεικνύει τη συσχέτιση μεταξύ της πλειοψηφίας των προηγούμενων μη συσχετιζόμενων *in vivo* αλλά και *in vitro* αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.**

3.1.2. Ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων με τη θεωρία γράφων

Μία από τις πιο αποδοτικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, αλλά και για την εξαγωγή σημαντικών βιολογικών συμπερασμάτων από τη δομή του δικτύου είναι ο υπολογιστικός υπολογισμός των τοπολογικών παραμέτρων, που βασίζονται στη θεωρία γράφων. Για τη μελέτη του δικτύου υπολογίστηκαν αρχικά απλές παράμετροι όπως ο **συντελεστής ομαδοποίησης** (*clustering coefficient* - *CC*), το **μέσο μήκος μονοπατιού** (*average path length* - *CPL*), η **πυκνότητα** (*network density*) και η **κεντρικότητα του δικτύου** (*network centralization*). Ένας τυχαίος γράφος με τον ίδιο αριθμό κόμβων και ακμών χρησιμοποιήθηκε ως ‘μοντέλο ελέγχου’ για να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με συγκεκριμένα τοπολογικά γνωρίσματα του δικτύου μας.

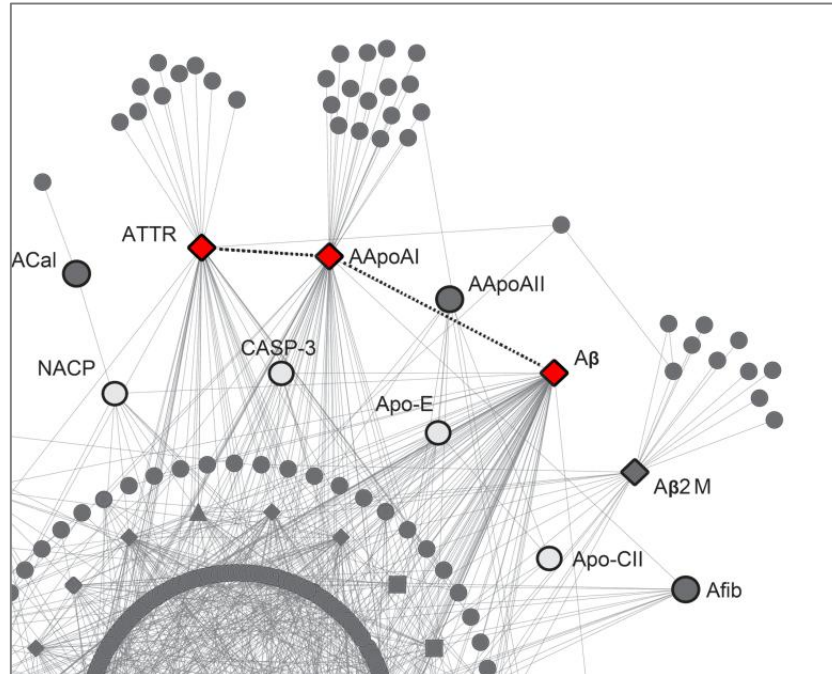
Σε γενικές γραμμές, στα βιολογικά συστήματα συναντώνται **τα δίκτυα μικρού κόσμου** (*small-world graphs*) που περιγράφουν δίκτυα στα οποία μπορούμε να φτάσουμε σε έναν κόμβο διασχίζοντας ένα μικρό αριθμό ακμών. Η ιδιότητα συναντάται σε δίκτυα με μικρό μέσο μήκος μονοπατιού και υψηλό συντελεστή ομαδοποίησης, όταν αυτά συγκρίνονται με έναν τυχαίο γράφο (Fronczak *et al.*, 2004). Ακόμα, ένα σημαντικό στοιχείο των βιολογικών δικτύων είναι ότι είναι **δίκτυα ανεξάρτητα-κλίμακας**, δηλαδή η πιθανότητα ένας κόμβος στο δίκτυο να αλληλεπιδρά με k άλλους κόμβους ακολουθεί το νόμο της δύναμης $P(k) \sim k^{-\gamma}$, όπου γ είναι μία πραγματική σταθερά (Li *et al.*, 2007).

Συνολικά, η ανάλυση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με τη θεωρία γράφων αποκαλύπτει τη σημαντική συνεισφορά των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στο δίκτυο.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1.2.1. Απλές τοπολογικές παράμετροι

Στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με κεντρικότητα κοντά στο 0 (0.219), τόσο ο συντελεστής ομαδοποίησης ($CC = 0.185$), όσο και το χαρακτηριστικό μήκος μονοπατιού ($CPL = 3.083$) πληρούν τα χαρακτηριστικά των δικτύων μικρού κόσμου, συγκρινόμενα πάντα με το 'μοντέλο ελέγχου' ($CC = 0.003$, $CPL = 3.290$), σηματοδοτώντας ότι απαιτείται μικρός αριθμός βημάτων (περίπου 3 βήματα) για να φτάσουμε από τη μία αμυλοειδογόνο πρωτεΐνη στην επόμενη (Εικόνα 86). Ακόμα, κατά τη μέτρηση της πυκνότητας του δικτύου ($D = 0.019$) η τιμή βρέθηκε μικρότερη από 0.1, ένα αποτέλεσμα που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αραιά συνδεδεμένα βιολογικά δίκτυα (Leclerc, 2008; Pavlopoulos *et al.*, 2011a). Επομένως, το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της αμυλοειδογονικότητας υπακούει στις ιδιότητες των δικτύων μικρού κόσμου (Xiao Fan and Guanrong, 2003) (μικρό μέσο μήκος μονοπατιού και υψηλός συντελεστή ομαδοποίησης). Σημαντικοί κόμβοι που εμπλέκονται σε έναν μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων, ονομάζονται κεντρικοί κόμβοι και είναι πρωτεΐνες που επηρεάζουν την ακεραιότητα του δικτύου. Ο Πίνακας 14 καταγράφει τις 20 πρώτες πρωτεΐνες - κεντρικούς κόμβους του δικτύου.



Εικόνα 86. Τμήμα του δικτύου αλληλεπιδράσεων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με έμφαση στην αλληλεπίδραση $A\beta - ATTR - AApoAI$. Το πεπτιδίο $A\beta$ μπορεί να συσχετιστεί με την τρανσθυρετίνη ($ATTR$), διασχίζοντας την απολιποπρωτεΐνη AI ($AApoAI$) σε μόνο δύο βήματα, επιβεβαιώνοντας πειραματικά δεδομένα, που υποδεικνύουν τη σημαντική δράση της τρανσθυρετίνης ως βιοδείκτη της νόσου του Alzheimer (Velayudhan *et al.*, 2012).

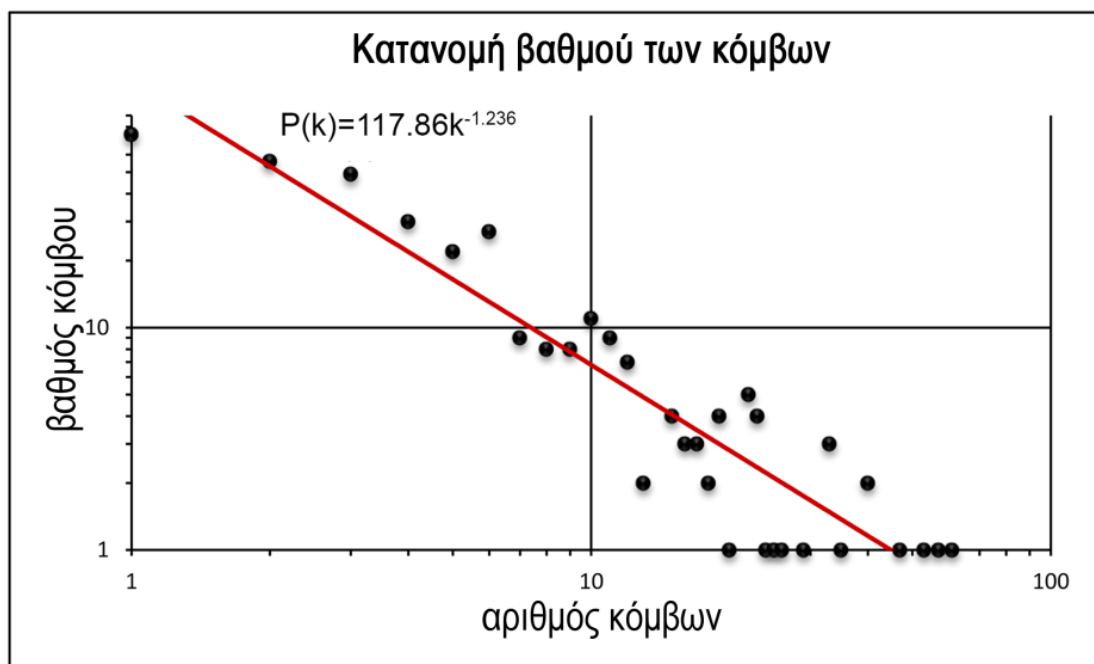
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1.2.2. Σύνθετες τοπολογικές παράμετροι

Η κατανομή βαθμού των κόμβων (*node degree distribution*) είναι η πιο σημαντική παράμετρος των δικτύων ανεξάρτητων κλίμακας (Barabasi and Albert, 1999). Στην περίπτωση μας, η κατανομή βρέθηκε να είναι της μορφής:

$$P(k) = 117.86 k^{-1.236}$$

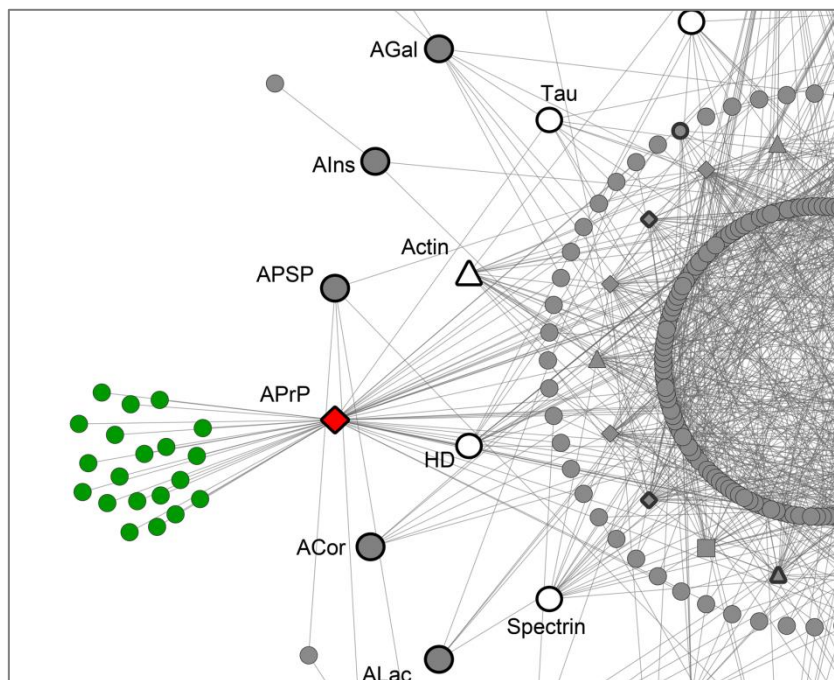
Σύμφωνα με αυτό το εύρημα, **το δίκτυο έχει ιδιότητες δικτύου ανεξάρτητου κλίμακας** και ειδικότερα αποτελείται από λίγους κεντρικούς κόμβους (*hubs*) (Εικόνα 85, κόμβοι τρίγωνα και διαμάντια) που διασυνδέονται με πολλούς απλούς κόμβους (Εικόνα 87, επάνω αριστερά τεταρτημόριο). Οι κεντρικοί κόμβοι φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στο δίκτυο, καθώς η τιμή του γ είναι μικρότερη του δύο ($\gamma < 2$) (Barabasi and Oltvai, 2004). Έτσι, πιθανή καταστροφή των κεντρικών κόμβων μπορεί να οδηγήσει σε κατάρρευση του δικτύου (Zotenko *et al.*, 2008).



Εικόνα 87. Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομή του βαθμού κόμβου (*node degree*) για το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η κατανομή ακολουθεί το νόμο δύναμης και υποδηλώνει ότι το δίκτυο έχει χαρακτηριστικά δικτύου ανεξάρτητο από κλίμακα (*scale-free network*).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Γενικά, δίκτυα που εμπλουτίζονται από πολλούς κεντρικούς κόμβους εμφανίζονται ισχυρά, στην τυχαία απαλοιφή κόμβων και οι παρεμβάσεις αυτές δύσκολα διαταράσσουν το μέσο μήκος μονοπατιού (*CPL*). Ωστόσο, η απομάκρυνση συγκεκριμένων κεντρικών κόμβων μπορεί να είναι μοιραία για την ευρωστία του δικτύου. Παράδειγμα αποτελεί το η *priion* πρωτεΐνη (*APrP*) στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, η απαλοιφή της οποίας μπορεί να αλλάξει δραστικά το μέσο μήκος μονοπατιού του δικτύου (Εικόνα 88).

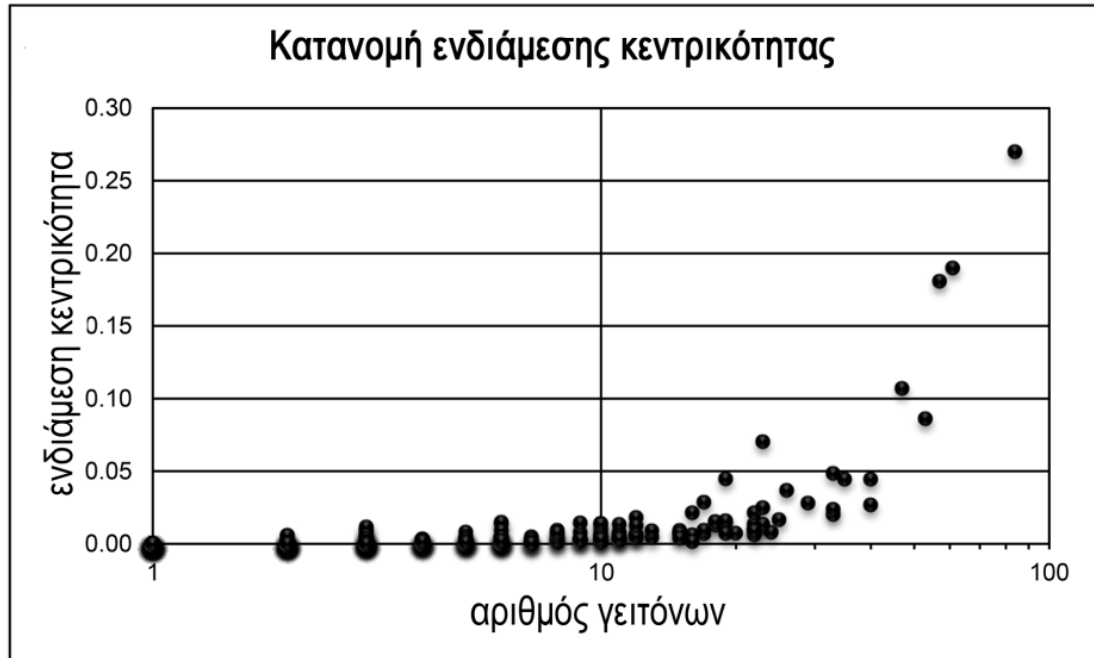


Εικόνα 88. Τμήμα του δικτύου αλληλεπιδράσεων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με έμφαση στις αλληλεπιδράσεις της *APrP*.

Σε ένα δίκτυο εκτός από τους κεντρικούς κόμβους, μεγάλη σημασία έχουν και οι ενδιάμεσοι κόμβοι που συνδέουν τους κεντρικούς κόμβους και ονομάζονται στενωποί ή *bottlenecks*. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 85 πολλές πρωτεΐνες δρουν ως γέφυρες, συνδέοντας άμεσα πολλές –άλλοτε– μη συσχετιζόμενες πρωτεΐνες στο δίκτυο, αυξάνοντας έτσι τη συνδεσιμότητα του δικτύου. Το διάγραμμα στην Εικόνα 89 αποδεικνύει ότι λίγοι κόμβοι του δικτύου με ενδιάμεση κεντρικότητα > 0.05 εμφανίζουν μεγάλο αριθμό γειτόνων. Η επίδραση αυτών των πρωτεϊνών - ‘μεσολαβητών’ εκφράζεται με τον υψηλό βαθμό ενδιάμεσης κεντρικότητας (*betweenness centrality*), σηματοδοτώντας το ρόλο τους ως στενωπούς, δηλαδή ως σημαντικά συνδετικά σημεία για την επικοινωνία άλλων σημαντικών

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

πρωτεϊνών στο δίκτυο, όπως είναι οι κεντρικοί κόμβοι (Jalili *et al.*, 2015; Joy *et al.*, 2005). Ο Πίνακας 15 καταγράφει τις 20 πρωτεΐνες-στενωπούς του δικτύου.



Εικόνα 89. Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομή της ενδιάμεσης κεντρικότητας (betweenness centrality) για το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες-στενωποί εντοπίζονται στο επάνω δεξιά τεταρτημόριο του διαγράμματος.

Ανάμεσα στις τοπολογικές παραμέτρους που επισημάνθηκαν παραπάνω, ο βαθμός κόμβου και η ενδιάμεση κεντρικότητα μελετήθηκαν εκτενώς και έγινε μία προσπάθεια συσχέτισής τους με την τοπολογική θέση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στο δίκτυο (Εικόνα 85). Συνολικά, 15 πρωτεΐνες εντοπίστηκαν τόσο με χαρακτηριστικά κεντρικού κόμβου όσο και με χαρακτηριστικά στενωπού (Εικόνα 85, τετράγωνος κόμβος, τρίγωνος κόμβος, κόμβος διαμάντι). Από αυτές, 5 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες εντοπίστηκαν ως κεντρικοί κόμβοι και 5 ως στενωποί (Πίνακας 14 & Πίνακας 15). Εντυπωσιακό ήταν το εύρημα ότι 6 από τις 23 *in vivo* αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Αβ πεπτίδιο, απολιποπρωτεΐνη ΑΙ, prion, τρανσθυρετίνη, β₂-μικροσφαιρίνη, λυσοζύμη C) εντοπίζονται με τα παραπάνω χαρακτηριστικά και έτσι αποδεικνύεται ότι, παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ευρωστία του δικτύου, καθώς μία πιθανή απομάκρυνσή τους θα οδηγούσε σε κατάρρευση του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Πίνακας 14 & Πίνακας 15).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πίνακας 14. Οι 20 πρωτεΐνες με τον υψηλότερο βαθμό κόμβου (πρωτεΐνες κεντρικοί κόμβοι) του δικτύου των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.

Όνομα πρωτεΐνης	Βαθμός
Amyloid beta A4 protein	84
Apolipoprotein A-I	61
Major prion protein	57
Transcription factor AP-1	53
Transthyretin	47
Epidermal growth factor receptor	40
14-3-3 protein zeta/delta	40
Growth factor receptor-bound protein 2	35
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	33
Serum albumin	33
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	33
NF-kappa-B essential modulator	29
Fibronectin	26
Vimentin	25
Heat shock cognate 71 kDa protein	24
Beta-arrestin-1	23
Myosin-9	23
Hsp90 co-chaperone Cdc37	23
Beta-2-microglobulin	23
Actin, cytoplasmic 1	22

* Τονίζονται οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πίνακας 15. Οι 20 πρωτεΐνες με την υψηλότερη ενδιάμεση κεντρικότητα (πρωτεΐνες στενωποί) του δικτύου των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.

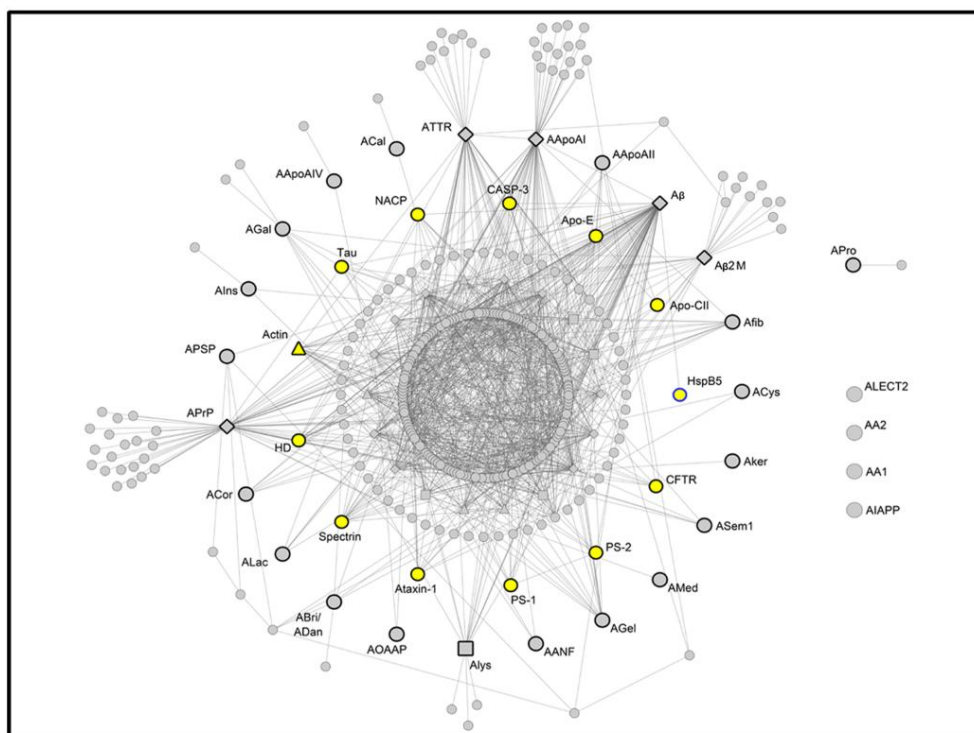
Όνομα πρωτεΐνης	Ενδιάμεση κεντρικότητα
Amyloid beta A4 protein	0.26989904
Apolipoprotein A-I	0.18986417
Major prion protein	0.18065884
Transthyretin	0.10686298
Transcription factor AP-1	0.08605723
Beta-2-microglobulin	0.07022626
Serum albumin	0.0484804
Large proline-rich protein BAG6	0.0446524
Growth factor receptor-bound protein 2	0.04446241
Epidermal growth factor receptor	0.04438062
Fibronectin	0.03676366
Lysozyme C	0.0286479
NF-kappa-B essential modulator	0.02801342
14-3-3 protein zeta/delta	0.02671415
Hsp90 co-chaperone Cdc37	0.02489765
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	0.02366865
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	0.02137914
Myc proto-oncogene protein	0.02129564
Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	0.02022756
Mitogen-activated protein kinase 6	0.01801841

* Τονίζονται οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1.3. Συσχετίσεις μεταξύ των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών

Η αλληλεπίδραση καλά χαρακτηρισμένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Εικόνα 85, κόκκινοι κόμβοι) με μία ετερογενή συλλογή πρωτεϊνών που σχετίζονται με την πρωτεϊνική συσσωμάτωση (Εικόνα 85, κίτρινοι κόμβοι) αποκαλύπτει τις πολύπλοκες συσχετίσεις που διέπουν την αμυλοειδογονικότητα. Παρατηρήθηκε ότι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων, όπως η tau (*Tau*), η α-συνουκλεΐνη (*NACP*) ή η χαντικτίνη (*HD*), οι οποίες εξαιρέθηκαν από το αρχικό σύνολο δεδομένων του δικτύου, ‘ανακτήθηκαν’ τελικά κατά την κατασκευή του και συμμετέχουν ενεργά στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (Εικόνα 90). Η συσχέτιση αυτή δεν είναι τυχαία καθώς υποστηρίζεται βιβλιογραφικά ότι στα δίκτυα αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών εμφανίζουν μεγαλύτερη συνάφεια από απλές - τυχαίες πρωτεΐνες (Goh *et al.*, 2007). Ωστόσο, είναι εύλογο το γεγονός ότι όλες οι πρωτεΐνες μπορεί να μην συσχετίζονται με άμεσες αλλά με έμμεσες συσχετίσεις.

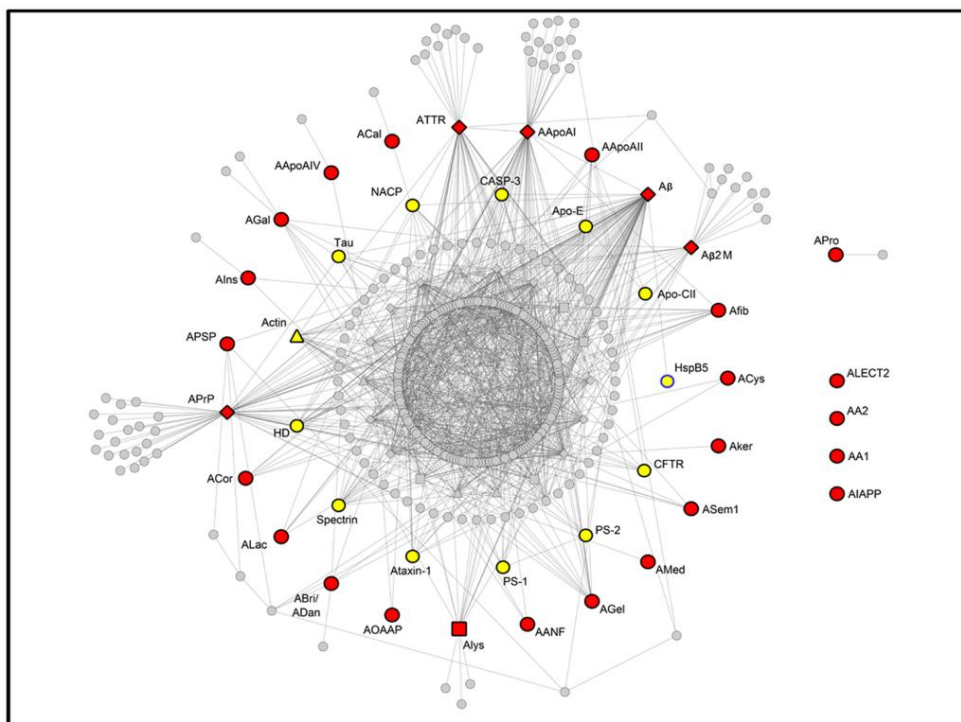


Εικόνα 90. Η θέση της ομάδας των *in vitro* αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επισημαίνονται μόνο οι κίτρινοι κόμβοι του δικτύου.

Η εντυπωσιακή εκπροσώπηση των ανθρώπινων πρωτεϊνών, που σχετίζονται με τον *in vitro* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων, επισημαίνει τη

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

σημαντική διασύνδεση μεταξύ πρωτεϊνών που σχετίζονται με την *in vivo* και την *in vitro* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 91). Ωστόσο, οι *in vitro* μελέτες προσεγγίζουν συνήθως το ‘λανθασμένο’ δίπλωμα των πρωτεϊνικών μορίων από διαφορετικές σκοπιές και για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες που καταγράφονται να αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια είναι ιδιαίτερες ετερογενείς. Συχνά, τα πειράματα της *in vitro* συσσωμάτωσης, όπως αποδεικνύεται και από το πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής, προσανατολίζονται σε μικρά αμυλοειδογόνα τμήματα που οδηγούν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών από τη φυσιολογική στην ινιδιακή κατάσταση (Lopez de la Paz and Serrano, 2004). Η τάση αυτή των *in vitro* μελετών πρωτεϊνικών τμημάτων καταγράφεται στο πρωτεϊνικό χάρτη του δικτύου των αλληλεπιδράσεων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, καθώς ενεργό ρόλο στο δίκτυο φαίνεται να διαδραματίζουν πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν βρεθεί να αυτοσυγκροτούνται σε επίπεδο πεπτιδικού-τμήματος και όχι ώριμης πρωτεΐνης (alpha beta Crystallin, Caspase-3 precursor, Cystic fibrosis transmembrane, Spectrin SH3).

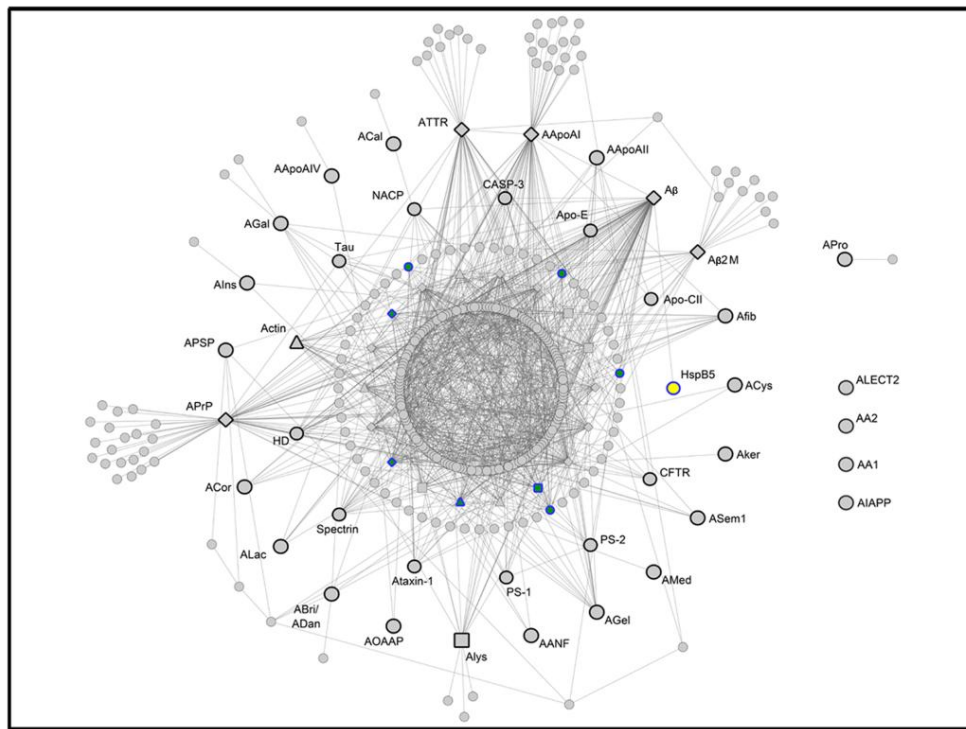


Εικόνα 91. Η θέση της ομάδας των *in vitro* αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και των *in vivo* αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επισημαίνονται οι κόκκινοι και οι κίτρινοι κόμβοι του δικτύου.

Αναλύοντας περαιτέρω την πυκνή τοπογραφία του δικτύου, εντοπίζεται μία μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών γνωστών για την πρόσδεσή τους στα αμυλοειδή. Αυτά τα εξειδικευμένα

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

μόρια αποτελούν μία λίστα ετερογενών πρωτεϊνικών μορίων που είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα που σχηματίζονται από τις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Calero *et al.*, 2012; Gunawardana *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015). Για παράδειγμα, ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών - ‘συνεργών’ του πεπτιδίου Αβ περιλαμβάνει πρωτεΐνες-συνοδούς, απολιποπρωτεΐνες ή άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με το σχηματισμό αμυλιδών ινιδίων και παρουσιάζουν πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών.



Εικόνα 92. Η θέση της ομάδας των πρωτεϊνών-συνοδών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επισημαίνονται οι κόμβοι του δικτύου με μπλε περίγραμμα.

Η πιο άφθονη αλληλεπίδραση που έχει καταγραφεί είναι η αλληλεπίδραση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών με γνωστές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, τις πρωτεΐνες-συνοδούς (*chaperones*). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 85, οι πρωτεΐνες-συνοδοί μαζί με τα μόρια που τις βοηθούν (*co-chaperones*) συμμετέχουν δυναμικά στο δίκτυο (κόμβοι με μπλε περίγραμμα). Το εύρημα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς οι συνοδοί πρωτεΐνες είναι μόρια που συχνά έχουν μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων (Ellis and van der Vies, 1991) και φυσιολογικά δρουν αποτρέποντας την πρωτεϊνική συσσωμάτωση (Carver *et al.*, 2003; Landreh *et al.*, 2015). Ωστόσο, αντικρουόμενες θεωρίες σχετικά με την ενοχή των συνοδών αυτών μορίων κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης χρήζουν περαιτέρω

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

διερεύνησης. Ειδικότερα, πειραματικές μελέτες αποκαλύπτουν την ανασταλτική δράση των μορίων-συνοδών, όταν χρησιμοποιούνται σε πειράματα ινιδογένεσης (Arimon *et al.*, 2008; Kudva *et al.*, 1997; Yerbury *et al.*, 2007) σε αξιοσημείωτα χαμηλή συγκέντρωση (Lee *et al.*, 2006), ενώ την ίδια στιγμή πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν την συν-εναπόθεση τους μαζί με γνωστές αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Sherman and Goldberg, 2001; Wilhelmus *et al.*, 2009; Yerbury and Kumita, 2010).

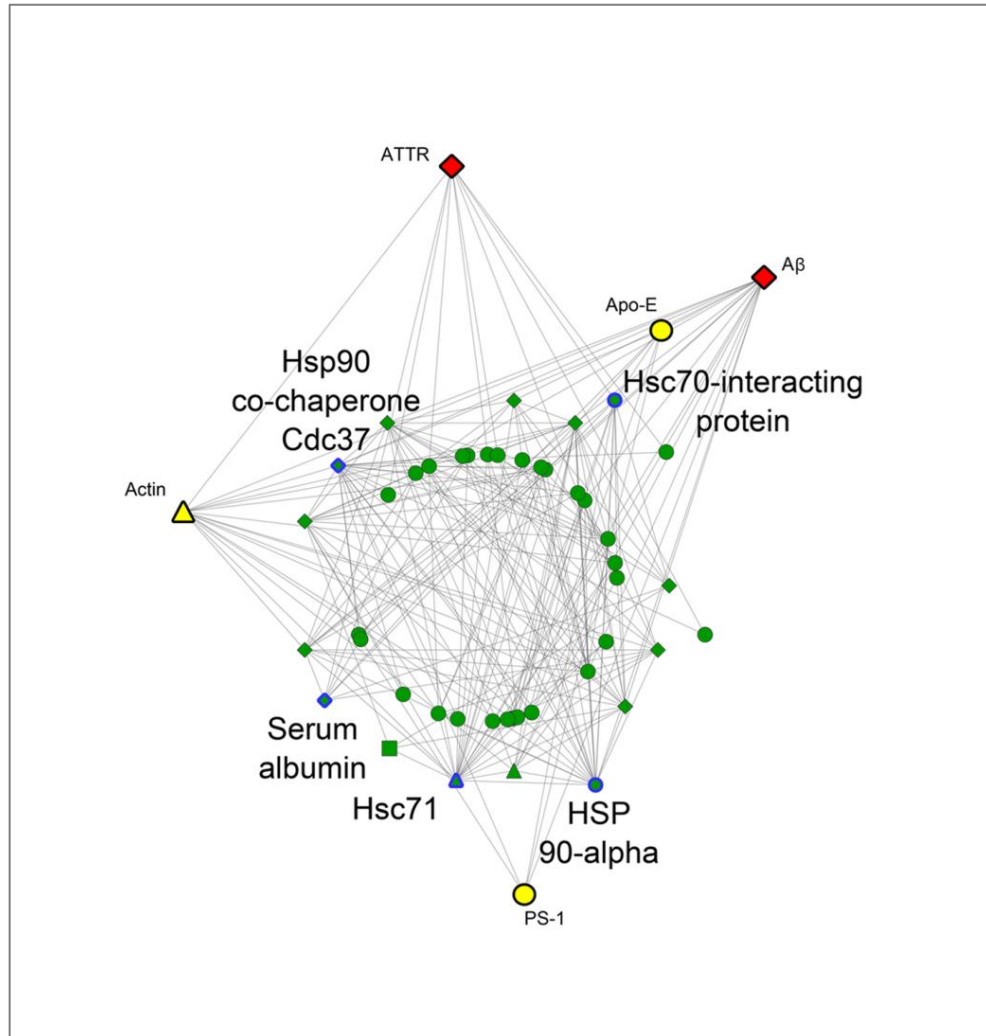
Πηγαίνοντας ένα βήμα παραπέρα ήταν πολύ ενδιαφέρον να ερευνήσουμε τη συσχέτιση μεταξύ των βιολογικών παραγόντων που συμμετέχουν στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών που μπορεί να επιδρούν στην αμυλοειδογονικότητα. Για να διερευνήσουμε το θέμα αυτό στραφήκαμε σε σημαντικά συστατικά του δικτύου, όπως είναι οι κεντρικοί κόμβοι και οι στενωποί. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών αποδεικνύει ότι **οι πρωτεΐνες-συνοδοί είναι τόσο κεντρικοί κόμβοι, όσο και στενωποί, καθώς εμφανίζουν υψηλό βαθμό κόμβου και την ίδια στιγμή υψηλή ενδιάμεση κεντρικότητα**, σηματοδοτώντας ότι μία ξαφνική αφαίρεση ενός από αυτούς θα καταστρέψει πολλές από τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις του δικτύου. Ειδικότερα 4 από 9 πρωτεΐνες-συνοδούς έχουν καταγραφεί ως κεντρικοί κόμβοι και στενωποί στο δίκτυο (Εικόνα 92).

Για τη διερεύνηση της σημασίας των πρωτεϊνών-συνοδών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών απομονώθηκαν υποδίκτυα που αφορούν τα μόρια πρωτεϊνών-συνοδών και των βοηθών τους (Hsc90-interacting protein, Hsp-90 co-chaperon Cdc37, Hsc71, HSP90-alpha) και μετρήθηκαν για αυτά τα χαρακτηριστικά μήκη μονοπατιών. Η Εικόνα 93 και η Εικόνα 94 παρουσιάζουν τις αλληλεπιδράσεις των επιλεγμένων μορίων-συνοδών (κόμβοι με μπλε περιγράμματα) με αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες του δικτύου (κόκκινοι κόμβοι) ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων ή πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων άλλων πρόδρομων μορίων (κίτρινοι κόμβοι).

Σημαντικό εύρημα είναι ότι το μέσο μήκος μονοπατιού του υποδικτύου που παρουσιάζεται στην Εικόνα 93 μειώνεται περίπου κατά μία μονάδα (CPL ~ 2.4), σε σύγκριση με το μήκος μονοπατιού του δικτύου των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών (CPL ~ 3), επισημαίνοντας ότι **οι πρωτεΐνες-συνοδοί συμμετέχουν στις έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών**. Έτσι, το αποτέλεσμα αυτό ποσοτικοποιεί τη σημασία των πρωτεϊνών-συνοδών ως διαμεσολαβητών της επικοινωνίας μεταξύ γειτονικών

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και οπτικοποιεί μόρια με πολλά υποσχόμενες ιδιότητες στο λογικό σχεδιασμό αναστολέων της συσσώματωσης.

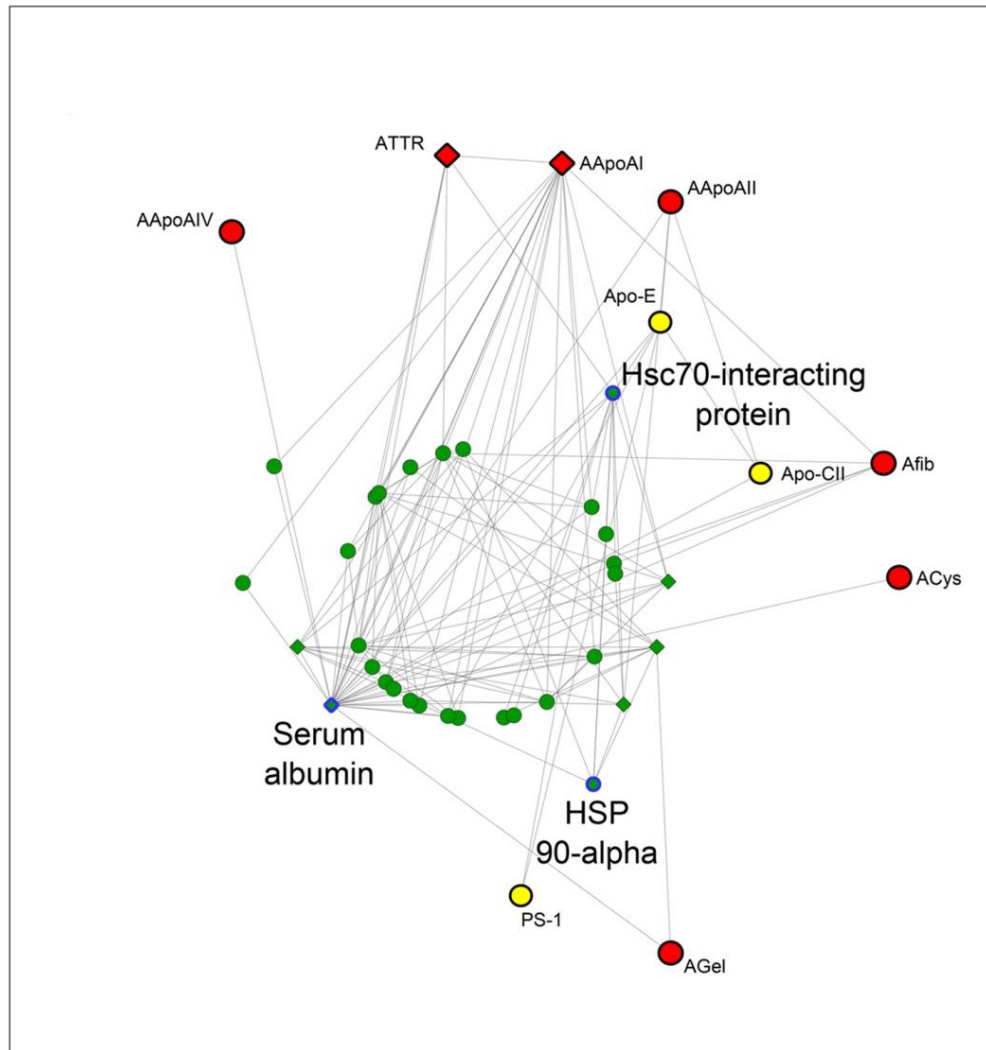


Εικόνα 93. Υποδίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών-συνοδών και αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Ποσοτικοποίηση της σημασίας των πρωτεϊνών συνοδών στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών.

Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μία ακόμη πολλά υποσχόμενη ομάδα πρωτεϊνικών μορίων-στόχων, λαμβάνοντας υπόψη ότι περιλαμβάνει πρωτεΐνες με πολλές αλληλεπιδράσεις και μεγάλη εκπροσώπηση στις φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα αυτών των πρωτεϊνών περιλαμβάνει σημαντικά αμυλοειδογόνα συστατικά του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, όπως την τρανσθυρετίνη (*ATTR*) και τη β₂-μικροσφαιρίνη (*Aβ2M*). Μεταξύ αυτών, η **αλβουμίνη του πλάσματος (*Serum albumin*)** είναι ένα μόριο-βοηθός των πρωτεϊνών-

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

συνοδών (co-chaperone) με σημαντικά τοπολογικά χαρακτηριστικά στο δίκτυο των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, καθώς εμφανίζει τόσο ιδιότητες κεντρικού κόμβου όσο και ιδιότητες στενωπού. Όπως παρουσιάζεται στο υποδίκτυο στην Εικόνα 94 η αλβουμίνη του πλάσματος αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με 6 αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες και 2 πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων.



Εικόνα 94. Υποδίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ της αλβουμίνης του πλάσματος και των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η Hsc70-interacting protein φαίνεται να είναι σημαντικό στοιχείο του υποδικτύου καθώς συμμετέχει στις έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμυλοειδογόνων απολιποπρωτεϊνών, της κυστατίνης C, της τρανσθυρετίνης και της γκελσολίνης.

Φυσιολογικά, η αλβουμίνη είναι ένας μεταφορέας στο ανθρώπινο πλάσμα, γνωστός για τη μετακίνηση ενός ευρέως φάσματος μορίων. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες *in vitro* έχει βρεθεί να αυτοσυγκροτείται σε τυπικά

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

αμυλοειδή ινίδια (Taboada *et al.*, 2006). Ωστόσο, η πρωτεΐνη αυτή δεν βρίσκονταν στο αρχικό μας σύνολο δεδομένων, καθώς δεν υπήρχε καταγεγραμμένη στα σύνολα δεδομένων στα οποία ανατρέξαμε, για τη συλλογή των δεδομένων μας (2.1.1). Παρόλο το αμυλοειδογόνο προφίλ της αλβουμίνης, η παρουσία της στο πλάσμα προωθεί τη βιωσιμότητα των νευρώνων (Vega *et al.*, 2009) ή αναστέλλει το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων σε κατάλληλα σχεδιασμένα πειράματα *in vitro* (Dominguez-Prieto *et al.*, 2016), ενώ τέλος σύμφωνα με την πρωτεωμική ανάλυση του Hye και των συνεργατών του, είναι ένας ικανός βιοδείκτης για τη νόσο του Alzheimer (Hye *et al.*, 2006). Επομένως, ο σημαντικός της ρόλος στο δίκτυο και η πρότερη γνώση μας ό,τι αποτελεί ικανό αναστολέα της ινιδογένεσης, καθιστά την αλβουμίνη του πλάσματος ένα μόριο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον το οποίο μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για στοχευμένο σχεδιασμό φαρμάκων.

Συνοπτικά, το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών **συσχετίζει ένα σύνολο από λειτουργικά μη-συσχετιζόμενες πρωτεΐνες σε ένα κοινό δίκτυο**, το οποίο αποκάλυψε για πρώτη φορά **σημαντικές άμεσες και έμμεσες συσχετίσεις** μεταξύ αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, **ενσωματώνει έναν αριθμό αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών που είναι γνωστό ότι δημιουργούν αμυλοειδή ινίδια *in vitro* και αναδεικνύει τη συμμετοχή των πρωτεϊνών-συνοδών** ως σημαντικούς διαμεσολαβητές μεταξύ, προηγουμένως, μη-συσχετιζόμενων πρωτεϊνών. Τέλος, το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών δημιουργήθηκε για να συνεισφέρει στη συστηματική μελέτη των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και να αποτελέσει κίνητρο για νέες πειραματικές προσεγγίσεις στις μελέτες της αμυλοειδογονικότητας.

Κεφάλαιο ΙΙΙ – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.2. Κυστατίνη C

Τα αμυλοειδή ινίδια που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης κυστατίνης C σχετίζονται με μία σπάνια μορφή αμυλοείδωσης που εμφανίζεται σε νεαρά άτομα (Gudmundsson *et al.*, 1972), ταυτόχρονα όμως ευθύνονται και για θανατηφόρες εγκεφαλικές αιμορραγίες που παρατηρούνται σε ηλικιωμένους ασθενείς (Revesz *et al.*, 2009). Ευρήματα στις παθολογικές αυτές καταστάσεις εμπλέκουν τόσο την κυστατίνη C φυσικού τύπου, όσο και την κυστατίνη C που φέρει μία σημειακή μεταλλαγή στη θέση 68 (L68Q) (Olafsson and Grubb, 2000; Rostagno *et al.*, 2010). Η ακολουθία των γεγονότων πίσω από το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων της κυστατίνης C δεν έχει σαφώς καθοριστεί, παρόλο που μεγάλο μέρος της ερευνητικής κοινότητας μελετά εντατικά τα φαινόμενα πολυμερισμού της. Δομικά, βιοχημικά και κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι ολιγομερισμένες μορφές της πρωτεΐνης συμμετέχουν ως ενδιάμεσα στην ινιδιογένεσή της, ενώ καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει ο μηχανισμός της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών.

Η ενδεδειγμένη μελέτη της ακολουθίας αλλά και της δομής της ανθρώπινης κυστατίνης C οδήγησε στον καθορισμό σημαντικών περιοχών με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της φυσικού τύπου πρωτεΐνης. Οι περιοχές που εντοπίστηκαν μελετήθηκαν πειραματικά και αποκάλυψαν, για πρώτη φορά, πεπτιδικά τμήματα της κυστατίνης C με ιδιότητες αυτοσυγκρότησης και με θεμελιώδη συνεισφορά στο σχηματισμό του αμυλοειδογόνου πυρήνα της ανθρώπινης κυστατίνης C.

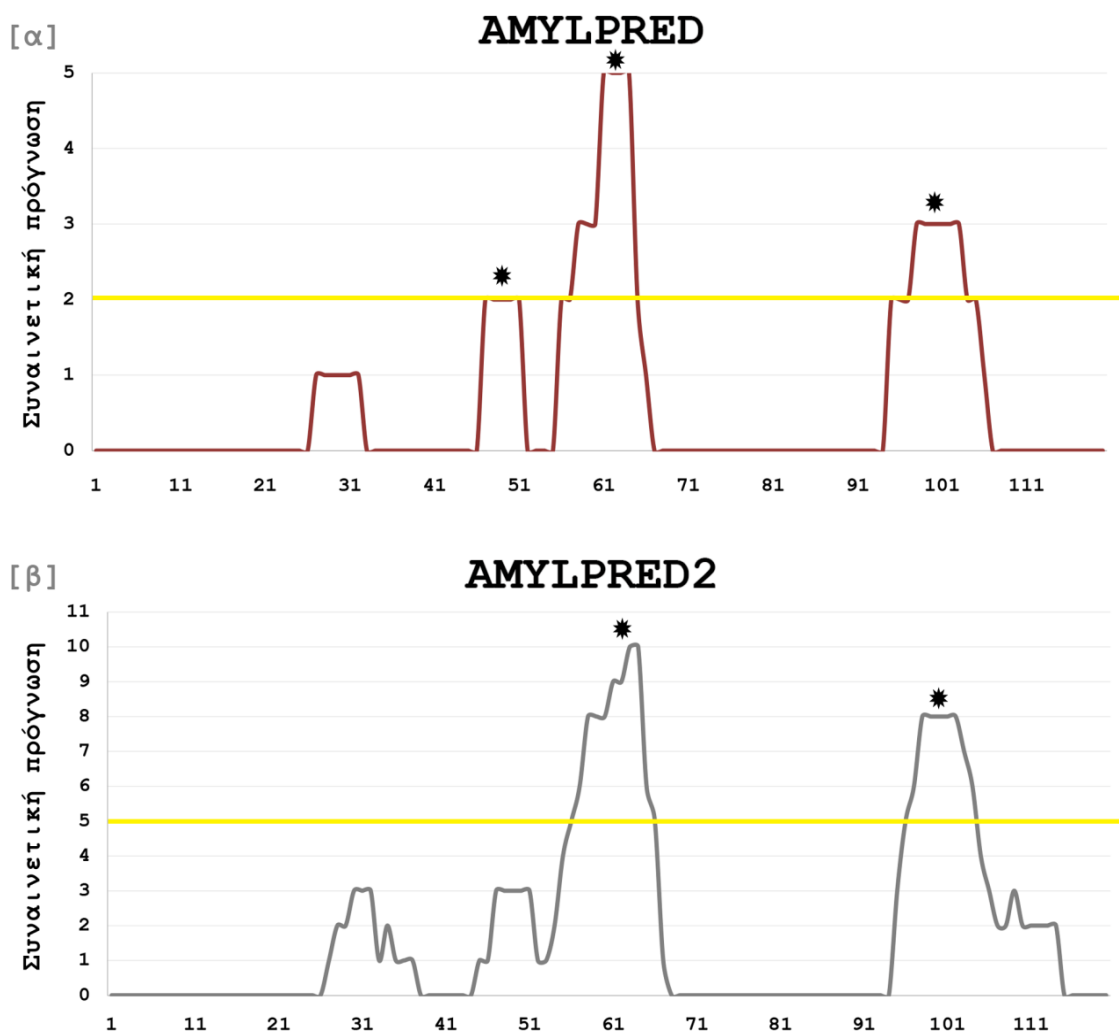
3.2.1. Ανάλυση της ακολουθίας και της δομής της κυστατίνης C

Για την ανάλυση της ακολουθίας της ανθρώπινης κυστατίνης C (Uniprot AC: P01034) χρησιμοποιήθηκαν οι δύο εκδόσεις του συναινετικού αλγορίθμου πρόγνωσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013).

Η ανάλυση του αμυλοειδογόνου δυναμικού της ανθρώπινης κυστατίνης C αποκάλυψε, **τρία πεπτιδικά τμήματα με υψηλή ‘τάση προς συσσωμάτωση’**, όπως φαίνεται και στα ιστογράμματα στην Εικόνα 95. Τόσο ο αλγόριθμος AMYLPRED, όσο και το αλγόριθμος AMYLPRED2 αποκάλυψαν – σε γενικές γραμμές – αντίστοιχο αμυλοειδογόνο προφίλ για

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

την πολυπεπτιδική αλυσίδα της κυστατίνης C. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος AMYLPRED, βασισμένος σε 5 ανεξάρτητες μεθόδους προέβλεψε 3 περιοχές με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ και συγκεκριμένα τα πεπτιδικά τμήματα $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFCSFQIYAVP}^{105}$. Όμοια, ο αλγόριθμος AMYLPRED2, βασισμένος σε 11 ανεξάρτητες μεθόδους προέβλεψε 2 περιοχές με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ και συγκεκριμένα τα πεπτιδικά τμήματα $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFCSFQIYAVP}^{105}$. Η κοινή συναινετική πρόβλεψη των τμημάτων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFCSFQIYAVP}^{105}$ αποδεικνύει την έντονη ‘τάση προς συσσωμάτωση’ των πεπτιδίων (Εικόνα 95).



Εικόνα 95. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ανθρώπινης κυστατίνης C, όπως προβλέπεται από τους αλγορίθμους AMYLPRED (Frousios et al., 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis et al., 2013). Η συναινετική πρόγνωση των αλγορίθμων αποκάλυψε, τρία πεπτιδικά τμήματα με υψηλή ‘τάση προς συσσωμάτωση’ (τα πεπτιδικά τμήματα $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFCSFQIYAVP}^{105}$). Το αστέρι σημειώνει τα τμήματα με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ και η κίτρινη γραμμή το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι κάθε αλγορίθμου (*consensus threshold*).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Το πενταπεπτίδιο ⁴⁷LQVVR⁵¹ βρίσκεται στον β2-κλώνο του μονομερούς, ενώ συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι προηγείται της περιοχής που αλλάζει στερεοδιαταξικά κατά την τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών (Εικόνα 96γ). Το δεκαπεπτίδιο ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ ξεκινάει από την περιοχή της L1 λούπας και συνεχίζει στον β3-κλώνο του μονομερούς, ενώ τέλος, το εντεκαπεπτίδιο ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵ βρίσκεται στον β4-κλώνο του μονομερούς. Σημειώνεται ότι το κατάλοιπο της κυστεΐνης 97, που περιλαμβάνεται στην πρόβλεψη του εντεκαπεπτιδίου, σχηματίζει δισουλφιδική γέφυρα με το κατάλοιπο της κυστεΐνης 117. Η δισουλφιδική αυτή γέφυρα αποτελεί μία εκ των δύο συντηρημένων δισουλφιδικών δεσμών της οικογένειας των κυστατινών, οι οποίες γνωρίζουμε ότι διατηρούν τη στερεοδιάταξή τους κατά την ανταλλαγή του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου στο μηχανισμό της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών (Rawlings and Barrett, 1990) (Εικόνα 96α).

3.2.2. Δομικές μελέτες της ανθρώπινης κυστατίνης C

Τα πεπτιδικά τμήματα που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση της ακολουθίας και της δομής της ανθρώπινης κυστατίνης C συντέθηκαν χημικά (GeneCust© - Europe, Luxembourg), με ελεύθερο τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο, καθαρότητα >98% και μελετήθηκαν ως πιθανοί ‘αμυλοειδογόνοι καθοριστές’.

Στην περίπτωση του πεπτιδίου-αναλόγου της περιοχής ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵ σχεδιάστηκε το δεκαπεπτίδιο-ανάλογο ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ με αντικατάσταση της κυστεΐνης 97 με μία αλανίνη, έτσι ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητοι διαμοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των κυστεϊνών, ενώ το κατάλοιπο προλίνης στη θέση 105 παραλήφθηκε για να αποφευχθούν πιθανά ‘τσακίσματα’ στις δομές. Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι το πεπτιδίο-ανάλογο ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ εξακολουθεί να είναι πεπτιδικό τμήμα με ‘τάση προς συσσωμάτωση’, σύμφωνα με τον αλγόριθμο AMYLPRED.

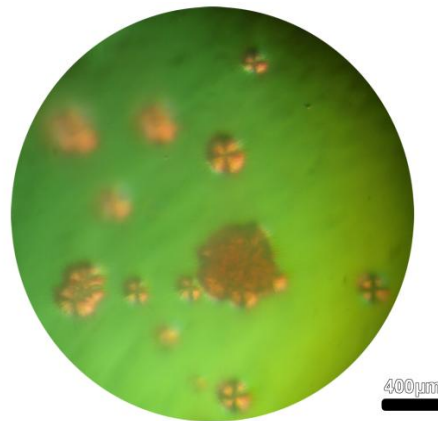
Τα χημικά συντεθειμένα πεπτιδία-ανάλογα των τμημάτων της ανθρώπινης κυστατίνης C διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 5 mg ml⁻¹ έως 10 mg ml⁻¹ και αφήθηκαν προς επώαση για διάστημα τουλάχιστον μιας εβδομάδας. Σε όλες τις περιπτώσεις τα διαλύματα των πεπτιδίων-αναλόγων βρέθηκε να δημιουργούν πηκτώματα σε χρόνους που διέφεραν ανά πεπτιδίο-ανάλογο. Τα αποτελέσματα

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

παρουσιάζονται ακολούθως ανά πεπτιδίο-ανάλογο, ενώ τέλος συζητάτε η εμπλοκή τους στον πολυμερισμό της ανθρώπινης κυστατίνης C.

3.2.2.1. Αποτελέσματα πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$

Υπερμοριακές οργανωμένες σφαιρικές δομές του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, γνωστές και ως σφαιρουλίτες, σχηματίζονται έπειτα από μία ημέρα επώασης του πεπτιδίου σε ένα εύρος συνθηκών (Εικόνα 97). Οι πρωτεϊνικοί σφαιρουλίτες είναι σφαιρικές οργανωμένες δομές πρωτοϊνιδίων που εμφανίζουν τον χαρακτηριστικό ‘σταυρό της Μάλτας’ (*maltese cross*) όταν παρατηρούνται με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη, πολωτικού μικροσκοπίου (Shtukenberg *et al.*, 2012). Προηγούμενες πειραματικές προσεγγίσεις του εργαστηρίου είχαν αποδείξει ότι το πρώτο κομβικό βήμα κατά τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων είναι ο σχηματισμός πυρήνων υγροκρυσταλλικής φύσης, που ονομάζονται σφαιρουλίτες (Hamodrakas *et al.*, 2004; Iconomidou *et al.*, 2013). Διαφορετικά μονοπάτια πολυμερισμού πεπτιδίων ή πρωτεϊνών έχουν προταθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών για τον *in vitro* ή τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών πρωτοϊνιδίων και ινιδίων (Chiti and Dobson, 2009; Chiti *et al.*, 1999; Kelly, 2000; Rochet and Lansbury, 2000).

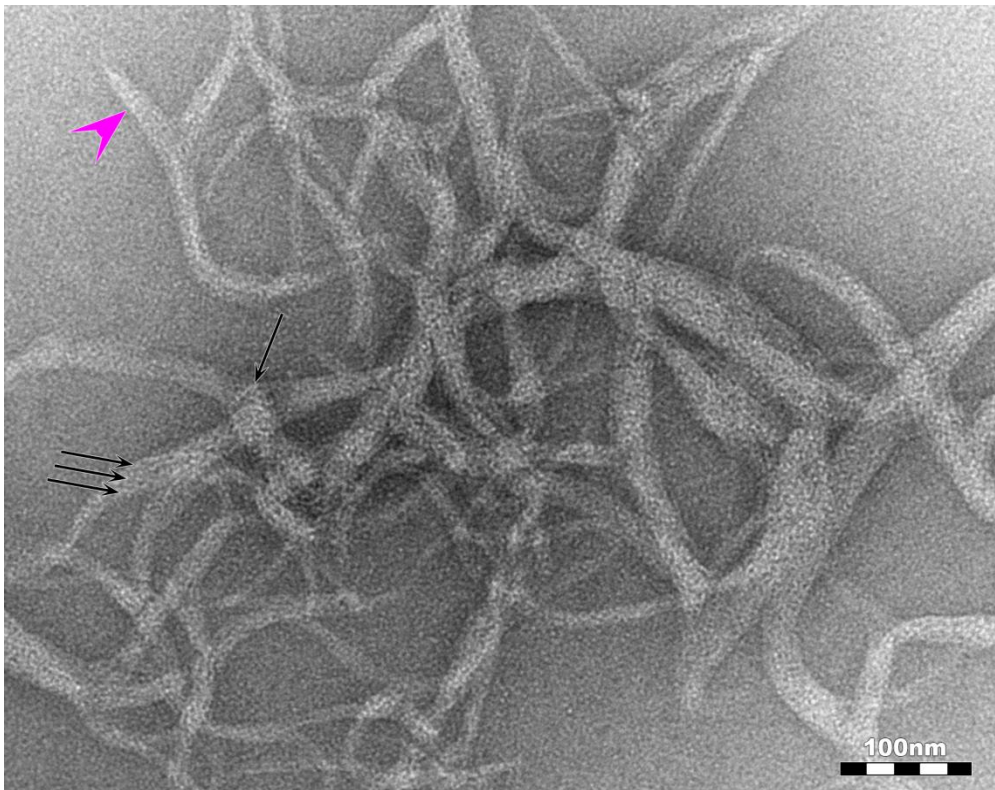


Εικόνα 97. Φωτομικρογραφία σφαιρουλιτών του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, όπως παρατηρούνται σε πολωτικό μικροσκόπιο, κάτω από διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη. Οι υπερμοριακές σφαιρικές δομές σχηματίζονται έπειτα από μία μέρα επώασης του πεπτιδίου-αναλόγου σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών. Οι διάμετρος των σφαιρουλιτών κυμαίνεται από 100 έως 300 μm . Παρατηρούμε τους χαρακτηριστικούς για τους σφαιρουλίτες ‘σταυρούς της Μάλτας’.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε κατάλληλα παρασκευάσματα/δείγματα από διαλύματα του $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, έπειτα από αρνητική χρώση, υποδεικνύουν την τάση του

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

πεπτιδίου να αυτοσυγκροτείται, σχηματίζοντας πυκνά δίκτυα ινιδίων, μία εβδομάδα μετά τη διάλυσή τους σε απεσταγμένο νερό. Παρατηρούνται πρωτοϊνίδια που πεπτιδίου-αναλόγου, διαμέτρου $\sim 30 \text{ \AA}$ (Εικόνα 98, λεπτά μαύρα βέλη), τα οποία εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν πλευρικά προς το σχηματισμό ταινιών (Εικόνα 98, φούξια αιχμή βέλους). Η παρατήρηση της διαμέτρου των λεπτών πρωτοϊνιδίων βρίσκεται στα όρια του παρατήρησης του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

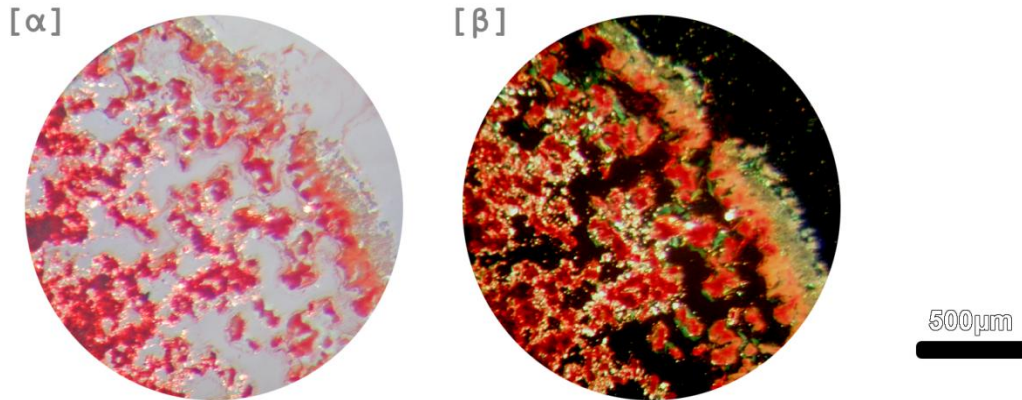


Εικόνα 98. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ πεπτιδίου-αναλόγου (10 mg ml^{-1}) σε απεσταγμένο νερό. Την 7^η ημέρα επώασης παρατηρούνται ταινίες ινιδίων (φούξια αιχμή βέλους). Λεπτομέρεια των μοναδιαίων πρωτοϊνιδίων του πεπτιδίου (διάμετρος $\sim 30 \text{ \AA}$) σημειώνεται με μικρό μαύρο βέλος.

Τα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας επιβεβαίωσαν την ιδιότητα του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ να αυτοσυγκροτείται σε αμυλοειδή ινίδια (Εικόνα 98), ενώ η εμφάνιση των σφαιρουλιτών πρότεινε το σχηματισμό πολυμερών υγροκρυσταλλικής φύσης ως ενδιάμεσο στάδιο κατά το μετασχηματισμό του πεπτιδίου-αναλόγου σε ινίδια με αμυλοειδογόνες ιδιότητες (Εικόνα 97). Χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ (συγκέντρωσης 10 mg ml^{-1} και επώασης 7 ημερών) κατέγραψε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red (Εικόνα 99α)

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

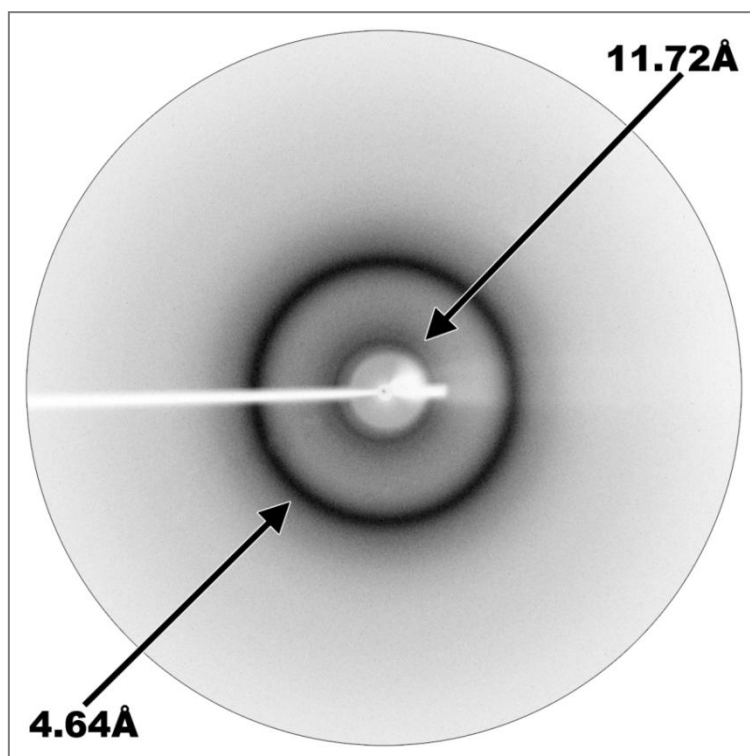
και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 99β).



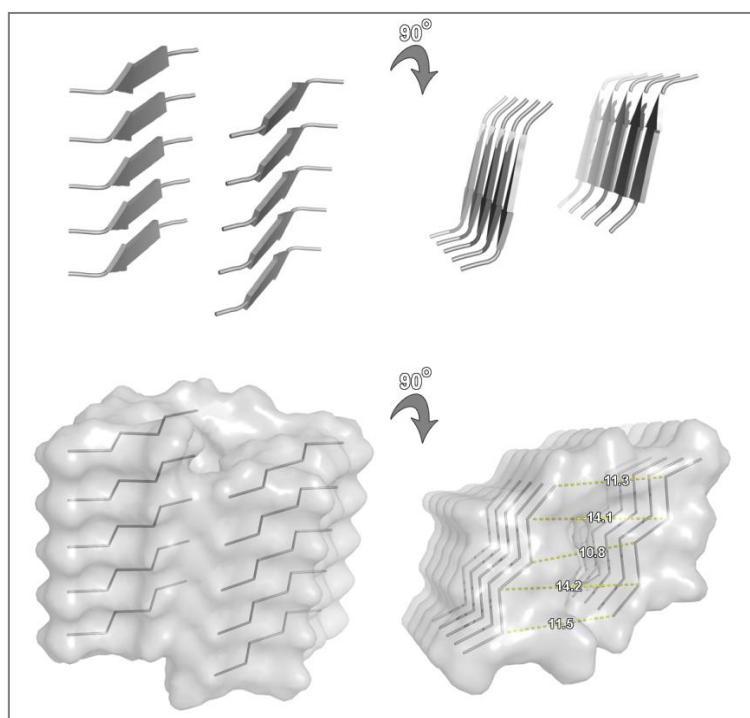
Εικόνα 99. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ της ανθρώπινης κυστατίνης C, έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Η παρατήρηση με πολωμένο φως δείχνει τη δέσμευση της χρωστικής στο υμένιο των ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου, ενώ (β) η παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου αποκαλύπτει την κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β).

Περίθλαση ακτίνων-X από ίνες προσανατολισμένων ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ αποκάλυψαν δύο ισχυρές ανακλάσεις στα 4.64 \AA και στα 11.72 \AA (Εικόνα 100). Οι ανακλάσεις αυτές εμφανίζονται ως δακτύλιοι εξαιτίας της έλλειψης προσανατολισμού των ινιδίων στην ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος. Οι τυχαίοι προσανατολισμοί των ινιδίων επιβεβαιώνονται και από τα πυκνά δίκτυα ινιδίων που παρατηρούμε και στις ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης (Εικόνα 98). Η ισχυρή ανάκλαση στα 4.64 \AA προτείνει την παρουσία β-πτυχωτών επιφανειών, καθώς αποδίδεται στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων. Η ασθενέστερη ανάκλαση στα 11.72 \AA πιθανότατα αποδίδεται στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών. Οι δύο ανακλάσεις υποδεικνύουν την ύπαρξη β-πτυχωτών επιφανειών και είναι χαρακτηριστικές της cross-β στερεοδιάταξης που συναντάται στα αμυλοειδή ινίδια (Sunde and Blake, 1997). Το μοντέλο του εξαπεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{52}$, που βρίσκεται κατατεθειμένο στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010), επιβεβαιώνει την ανάκλαση στα 11.72 \AA που αποδίδεται στο πακετάρισμα των β-πτυχωτών επιφανειών (Εικόνα 101).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



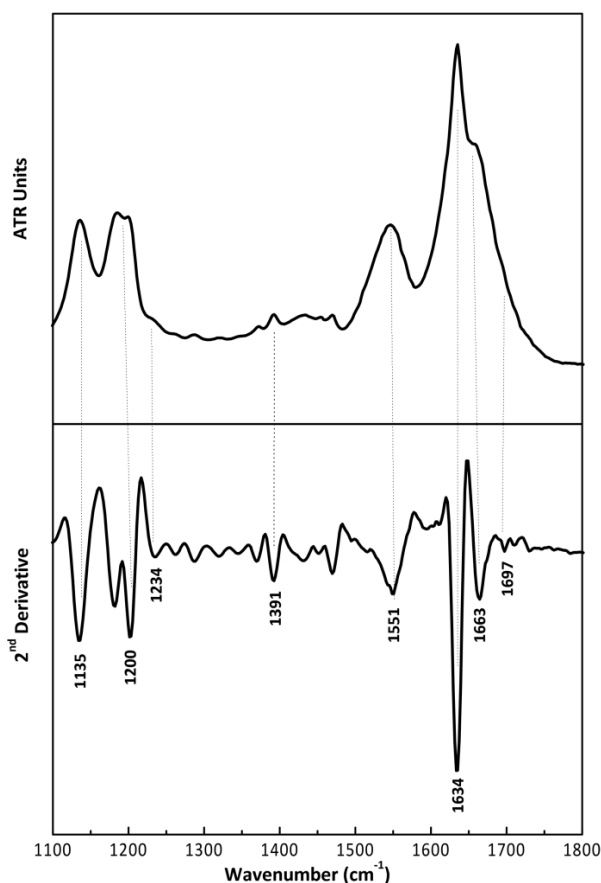
Εικόνα 100. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ της ανθρώπινης κυστατίνης C. Το περιθλασίγραμμα είναι ενδεικτικό της cross-β δομής. Σημειώνονται οι χαρακτηριστικές ανακλάσεις στα 4.62 Å και στα 11.72 Å.



Εικόνα 101. Μοντέλο του εξαπεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{52}$ που βρίσκεται κατατεθειμένο στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Παρουσιάζεται το στερεοδιαταξικό φερμουάρ του πεπτιδίου στις 0 και 90°. Η μέση απόσταση των C_α ανθράκων των καταλοίπων είναι 12.38 Å. Οι αναπαραστάσεις καρτούν (επάνω) και χωροπληρωτικών μοντέλων (κάτω) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Το φάσμα υπερερυθρού σε λεπτό ενυδατωμένο υμένιο που δημιουργείται από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ εμφανίζει μία οξεία κορυφή στα 1634 cm^{-1} στην περιοχή της Αμιδικής I και ένα ώμο στα 1697 cm^{-1} , ταινίες οι οποίες αναμφίβολα οφείλονται στη στερεοδιάταξη αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών (Haris and Charman, 1995; Jackson and Mantsch, 1995; Krimm and Bandekar, 1986; Surewicz *et al.*, 1993) (Εικόνα 102). Τα ελάχιστα της δεύτερης παραγώγου, χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβή προσδιορισμό των αντίστοιχων μεγίστων των ταινιών απορρόφησης. Έτσι, **τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρού που παρουσιάζονται στο φάσμα** (Εικόνα 102) **υποστηρίζουν τα ευρήματα της περίθλασης ακτίνων-X για το διαλυτοποιημένο πεπτιδίο-ανάλογο $^{47}\text{LQVVR}^{51}$.**



Εικόνα 102. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ της ανθρώπινης κυστατίνης C. Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση ταινιών στην αμιδική I. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Οι ταινίες του φάσματος, καθώς και οι αποδόσεις τους παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα (Caswell and Spiro, 1986; Johnston and Krimm, 1971; Krimm and Bandekar, 1986) (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Ταινίες όπως καταγράφονται στο ATR FT-IR (1100-1800 cm^{-1}) φάσμα ενυδατωμένου υμενίου του αμυλοειδογόνου πεπτιδίου-αναλόγου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ της κυστατίνης C, μετά την αυτοσυγκρότησή του σε αμυλοειδή ινίδια (Εικόνα 98). Δίνονται οι επικρατέστερες αποδόσεις τους.

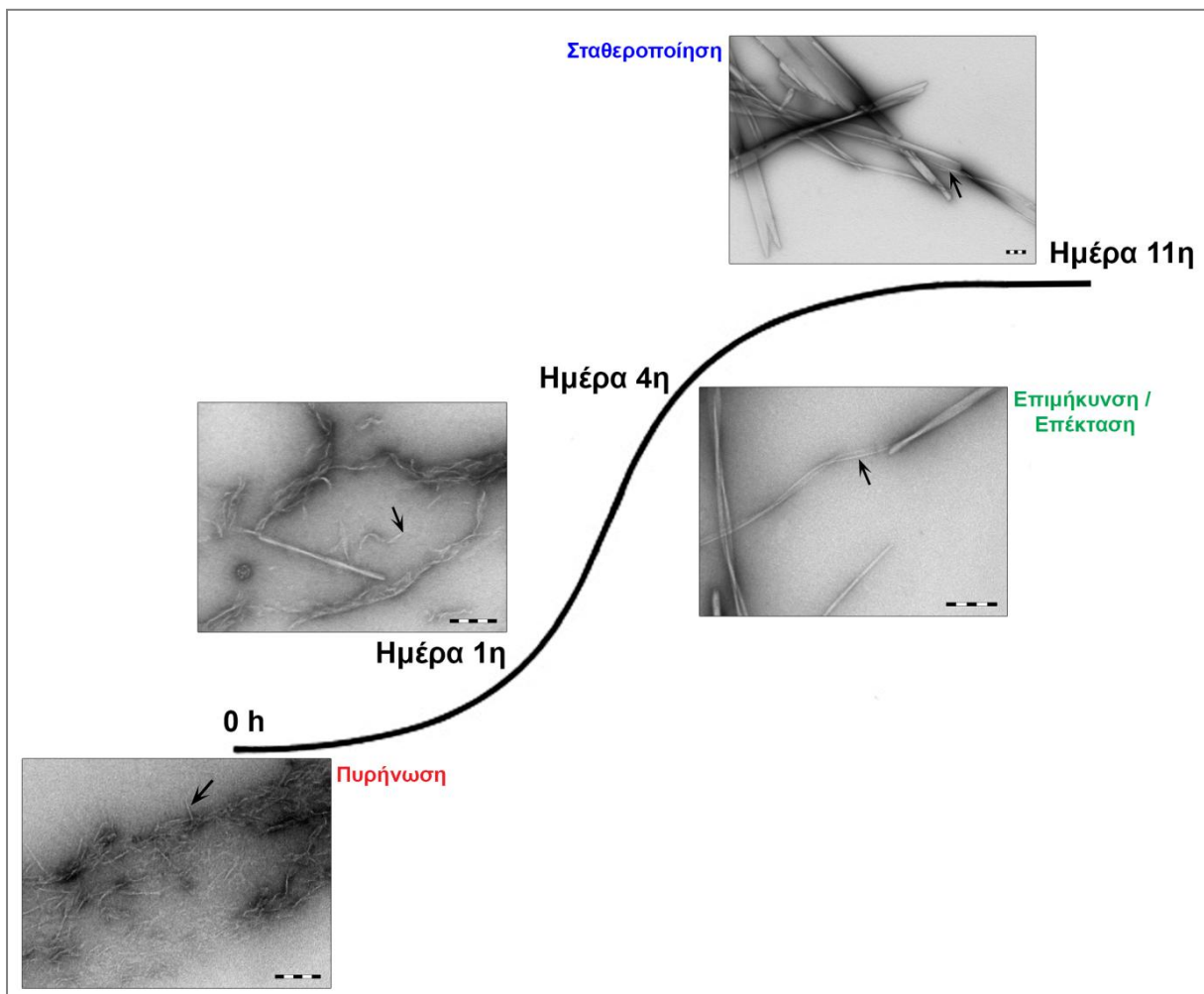
Ταινίες (cm^{-1})	Αποδόσεις
1135	TFA
1200	TFA
1234	Αμιδική III (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1551	Αμιδική II (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1634	Αμιδική I (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1663	TFA
1697	Αμιδική I (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες)

3.2.2.2. Αποτελέσματα πεπτιδίου-αναλόγου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$

Ποσότητες του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, συγκέντρωσης 5 mg ml^{-1} , χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δειγμάτων σε ημερήσια βάση. Τα δείγματα μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, έπειτα από αρνητική χρώση. Σε παρασκεύασμα του διαλύματος παρατηρήθηκε η δημιουργία λεπτών μοναδιαίων ινιδίων με διάμετρο 100 Å, αμέσως μετά τη διάλυση του πεπτιδίου σε απεσταγμένο νερό (Εικόνα 103, φάση πυρήνωσης). Τα ινίδια αυτά εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν πλευρικά σχηματίζοντας συσσωματώματα που μπορεί να φτάσουν σε μέγεθος μέχρι και μερικά μm . Κατά την πρώτη μέρα επώασης (24 ώρες μετά τη διαλυτοποίηση) οι ινιδιακές μορφές των πρώτων σταδίων της διαλυτοποίησης συνυπάρχουν όχι μόνο με κορδέλες ινιδίων, αλλά και με μικροκρυστάλλους διαμέτρου ~ 200 Å (Εικόνα 103, Ημέρα 1^η). Παρόλα αυτά, την τέταρτη μέρα της διαλυτοποίησης ο αριθμός μικροκρυστάλλων σε σχέση με το αριθμό

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

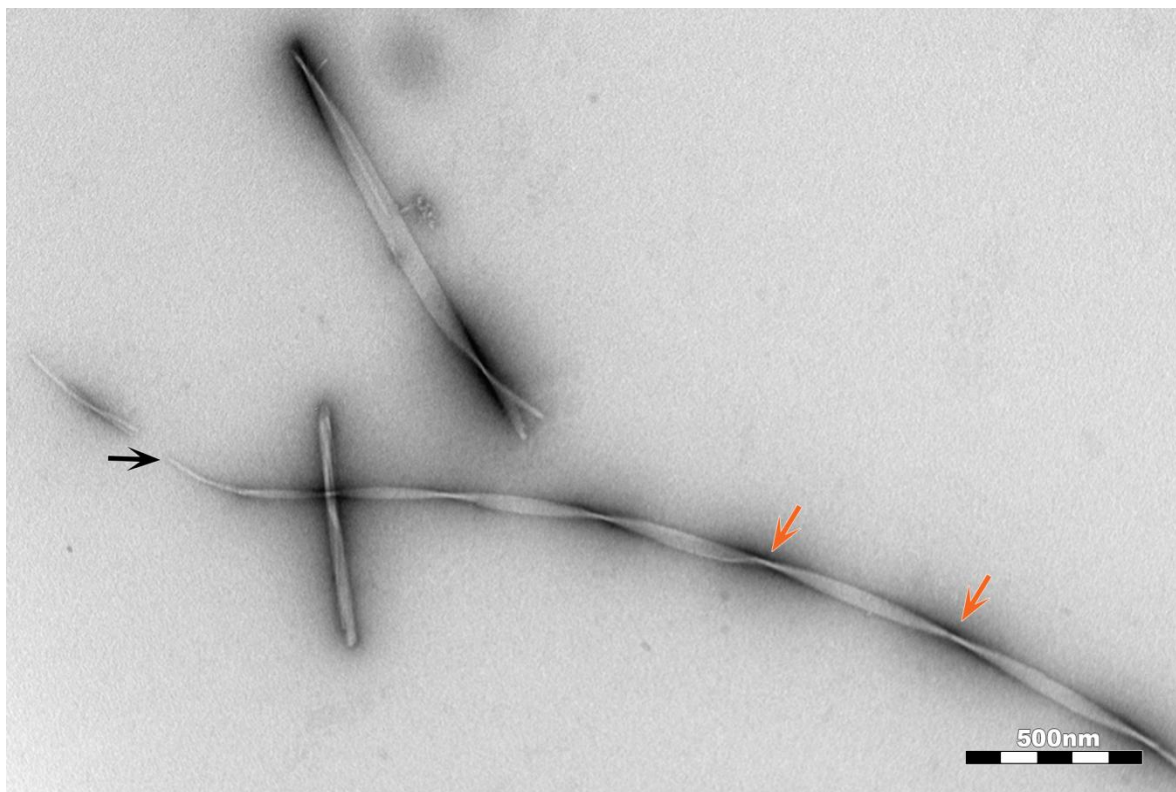
ινιδίων αυξάνεται σημαντικά (Εικόνα 103, Ημέρα 4^η). Πράγματι, λεπτομερής παρατήρηση αποκαλύπτει ότι οι μικροκρύσταλλοι συγκροτούνται από ινίδια, τα οποία αλληλεπιδρούν και με περιέλιξη οδηγούν στο σχηματισμό μεγάλων ελικοειδών μικροκρυστάλλων (φάση επιμήκυνσης/επέκτασης). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 104, ένας στραμμένος μικροκρύσταλλος (*twisted microcrystal*) αποτελείται από περιελιγμένα ινίδια διαμέτρου 100 Å. Οι ελικοειδείς αυτές δομές, δίνουν γένεση σε μονοδιάστατους κρυστάλλους, ένα φαινόμενο που συναντάται συχνά σε αμυλοειδογόνα πεπτιδία (Sawaya *et al.*, 2007).



Εικόνα 103. Κινητική της αυτοσυγκρότησης του πεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ σε μονοδιάστατους μικροκρυστάλλους. Η παρακολούθηση του φαινομένου της αυτοσυγκρότησης του πεπτιδίου αποκάλυψε την αυτοοργάνωση λεπτών αμυλοειδών ινιδίων (μαύρα βέλη) σε μονοδιάστατους μικροκρυστάλλους, μέσα σε διάστημα μόλις 10 ημερών. Παρατηρούμε τη φάση πυρήνωσης (0h), τη φάση επιμήκυνσης/επέκτασης (ημέρα 1^η & ημέρα 4^η) και τέλος της φάση σταθεροποίησης (ημέρα 11^η) (Ράβδοι 200nm).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

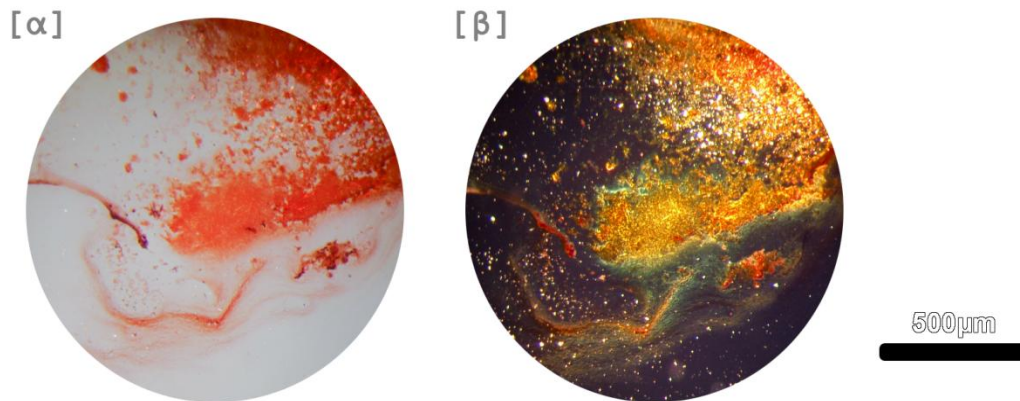
Πολλές μελέτες έχουν καταγράψει τις ομοιότητες μεταξύ κρυστάλλων και ινιδίων (Diaz-Avalos *et al.*, 2003; Sawaya *et al.*, 2007) και σύμφωνα με τον Marshall και τους συνεργάτες του η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού μορίου στο διάλυμα μπορεί να οδηγήσει τη δομική ‘αναδιάταξη’ από την ινιδιακή κατάσταση στο σχηματισμό κρυστάλλων (Marshall *et al.*, 2010). Στην πραγματικότητα, οι κρύσταλλοι που παρατηρούμε σε αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες ή πεπτίδια είναι μικροκρύσταλλοι με διάμετρο ~200nm, οι οποίοι υιοθετούν μία ‘βελονοειδή’ μορφολογία (*needle-shaped morphology*) (Nelson *et al.*, 2005; Sawaya *et al.*, 2007). Στην περίπτωση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ της ανθρώπινης κυστατίνης C, κινητική μελέτη αποδεικνύει ότι **το δεκαπεπτίδιο ακολουθεί ένα *in vitro* μονοπάτι αυτοσυγκρότησης, στο οποίο λεπτά μοναδιαία ινίδια (διαμέτρου 100 Å) οργανώνονται σε μονοδιάστατους μικροκρυστάλλους μέσα σε ~10 ημέρες από την αρχική τους διαλυτοποίηση** (Εικόνα 103, Εικόνα 104)



Εικόνα 104. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης μικροκρυστάλλων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ πεπτιδίου-αναλόγου (5 mg ml^{-1}) σε απεσταγμένο νερό. Την 4^η ημέρα επώασης παρατηρούνται στραμμένοι μικροκρύσταλλοι του πεπτιδίου (*twisted microcrystals*), οι οποίοι αποτελούνται από περιελιγμένα ινίδια διαμέτρου 100 Å. Το μαύρο βέλος σημειώνει ένα μοναδιαίο ινίδιο. Τα πορτοκαλί βέλη σημειώνουν το μισό του βήματος της περιέλιξης του μικροκρυστάλλου (200-300 nm κατά μήκος του άξονα του).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

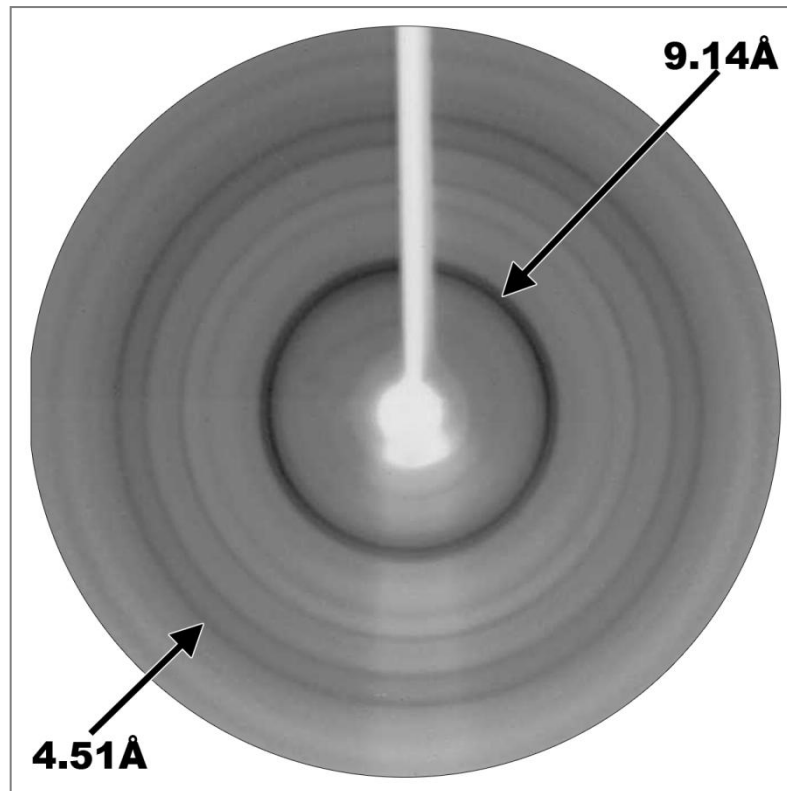
Χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ (συγκέντρωσης 5mg ml^{-1} και επώασης 7 ημερών) κατέγραψε **την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red** (Εικόνα 105α) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 105β).



Εικόνα 105. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β).

Τα περιθλασιγράμματα που προέκυψαν από την έκθεση ινών προσανατολισμένων ινιδίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ αποκάλυψαν **την πολυκρυσταλλική φύση του πεπτιδίου**. Το εύρημα αυτό μπορεί εύκολα να ερμηνευτεί σε συνδυασμό με την εμφάνιση μικροκρυστάλλων του πεπτιδίου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Εικόνα 103, Εικόνα 104). Οι ανακλάσεις παρουσιάζονται ως δακτύλιοι, πιθανά λόγω της έλλειψης προσανατολισμού των ινιδίων στην ίνα, που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία. Οι έντονες ανακλάσεις αντιστοιχούν σε περιοδικότητες των 4.51 \AA και 9.14 \AA και μπορούν να αποδοθούν στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων και στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών, αντίστοιχα (Εικόνα 106). Οι ανακλάσεις αυτές είναι χαρακτηριστικές της “cross-β” στερεοδιάταξης (Geddes *et al.*, 1968), και παρατηρούνται σε πολλές αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Sunde and Blake, 1997). Έτσι, εκτός από τις ανακλάσεις που αντιστοιχούν κυρίων στην cross-β στερεοδιάταξη, οι ανακλάσεις που συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) θεωρείται ότι προέρχονται από την πολυκρυσταλλική φύση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 106. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Το περιθλασίγραμμα είναι χαρακτηριστικό της cross- β δομής και παρουσιάζει μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.51 Å και μία ισημερινή ανάκλαση στα 9.14 Å.

Ένας κατάλογος των ανακλάσεων που παρατηρήθηκαν στο περιθλασίγραμμα ακτίνων-X των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ (Εικόνα 106) δίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17). Η δεικτοδότηση των ανακλάσεων πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004), ένα εργαλείο αυτοματοποιημένης ερμηνείας περιθλασιγραμμάτων πολυκρυσταλλικών υλικών. Ο Πίνακας 17 συνοψίζει και εξηγεί το περιθλασίγραμμα, δίνοντας μία λίστα των ανακλάσεων και προτείνοντας μία μοναδιαία κυψελίδα για τους μικροκρυστάλλους που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Στο αρχείο εισόδου του αλγορίθμου χρησιμοποιήθηκε μοναδιαία κυψελίδα του ορθορομβικού κρυσταλλικού συστήματος (μέγιστο κατώφλι $a=36$ Å, $b=36$ Å, $c=36$ Å), όγκος κυψελίδας μεταξύ $5,800 - 6,200$ Å³, συντελεστή ποιότητας 10 και τυπική απόκλιση 0.02. Συνολικά 9 ανακλάσεις μετρήθηκαν με το εργαλείο iMosFLM (Leslie and Powell, 2007) (Πίνακας 17, στήλη d_{obs}).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πίνακας 17. Ανακλάσεις (d_{obs}) που έχουν καταγραφεί από περιθλασιγράμματα ίνας προσανατολισμένων ινιδίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$.

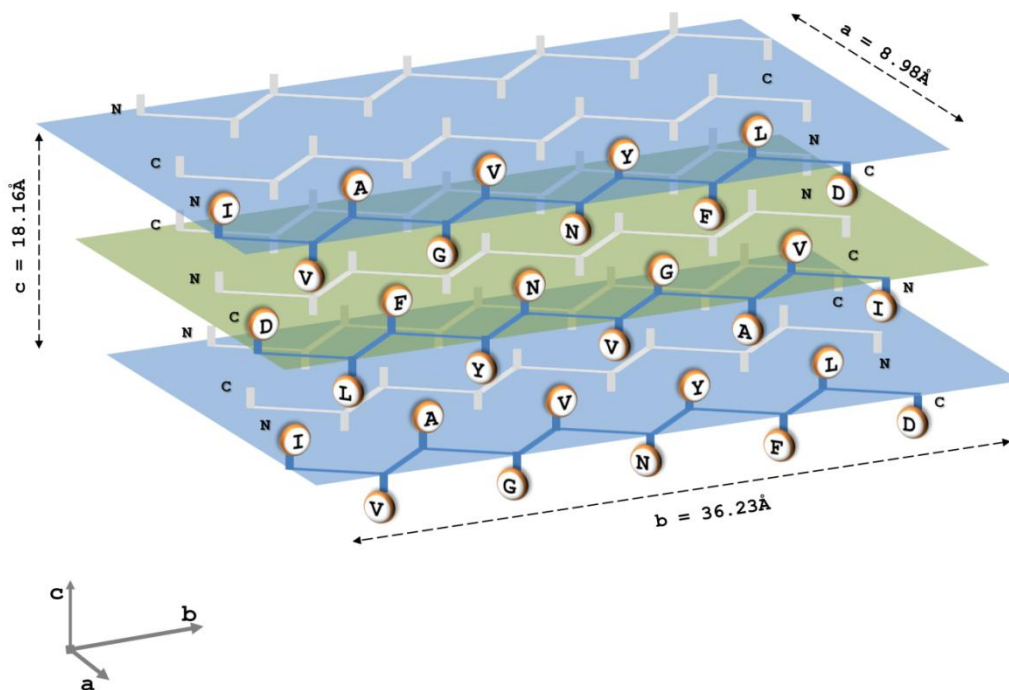
h	k	l	d_{obs} (Å)	d_{calc} (Å)
0	0	2	9.14	9.13
1	3	0	7.24	7.24
0	0	3	6.07	6.08
1	0	3	5.04	5.04
2	0	0	4.51	4.50
2	2	2	3.94	3.94
2	0	3	3.61	3.62
1	10	1	3.31	3.31
1	5	5	3.06	3.06

Το αρχείο εξόδου περιελάμβανε τα hkl κάθε ανάκλασης (Πίνακας 17). Η ευνοϊκότερη λύση στο αρχείο εξόδου είχε κυψελίδα με παραμέτρους $a = 8.98 \pm 0.02$ Å, $b = 36.23 \pm 0.01$ Å, $c = 18.16 \pm 0.01$ Å και γωνίες $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Ο όγκος της κυψελίδας υπολογίστηκε στα $5,912.75$ Å³ και έτσι εκτιμάται ότι κάθε μία από τις κυψελίδες περιέχει 9 μόρια του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Τα αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μοντέλου των πιθανών αλληλεπιδράσεων και της πιθανής οργάνωσης του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ σε ορθορομβική μοναδιαία κυψελίδα (Fraser *et al.*, 1965) (Εικόνα 107). Το προτεινόμενο μοντέλο ανήκει στην 7^η κλάση των στερεοδιαταξικών φερμουάρ (*up-up arrangement*, 1.3.2), όπως αυτά έχουν περιγραφεί από τον Sawaya και τους συνεργάτες του (Sawaya *et al.*, 2007).

Η διαγραμματική αναπαράσταση των μορίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ σε εκτεταμένη στερεοδιάταξη παρουσιάζεται στην Εικόνα 107. Οι β-κλώνοι παρουσιάζονται με ράβδους και οι β-πτυχωτές επιφάνειες με μπλε και πράσινα διαφανή παραλληλόγραμμα. Το προτεινόμενο κρυσταλλικό πακετάρισμα υπαγορεύει την διαδοχική οργάνωση καταλοίπων φαινυλαλανίνης, γλυκίνης και ασπαραγίνης στο ένα επίπεδο και την διαδοχική οργάνωση τυροσίνης, αλανίνης και βαλίνης στο άλλο επίπεδο. Ανάλυση μοντέλων εξαπεπτιδίων της ZipperDB (Goldsbury *et al.*, 1997) επιβεβαιώνει ότι το

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

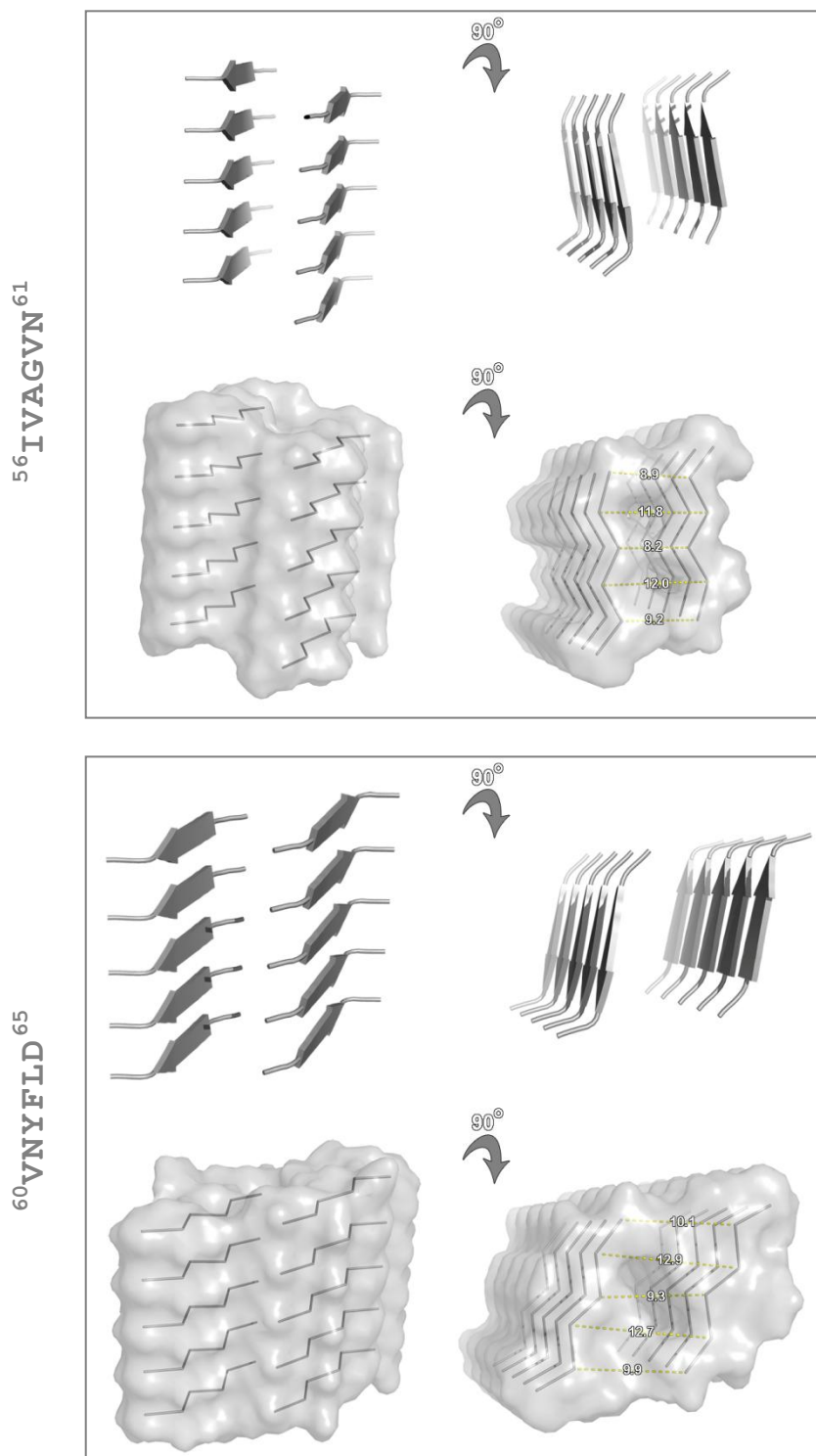
πακετάρισμα απόστασης $\sim 9 \text{ \AA}$ μπορεί να ικανοποιήσει στερεοδιαταξικά το πακετάρισμα των παραπάνω καταλοίπων.



Εικόνα 107. Διαγραμματική αναπαράσταση των μορίων του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ σε εκτεταμένη στερεοδιάταξη, σε ορθορομβική μοναδιαία κυψελίδα. Η δεικτοδότηση πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004). Το μοντέλο πακεταρίσματος προτείνεται κατά αναλογία με το μοντέλο του Fraser και των συνεργατών του (Fraser *et al.*, 1965).

Συγκεκριμένα, ο άξονας a αντιστοιχεί στο πακετάρισμα ευθυγραμμισμένων αντιπαράλληλων β -κλώνων που αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου και δομούν β -πτυχωτές επιφάνειες. Η δεικτοδότηση αυτή είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X, όπου παρουσιάζεται η απόσταση μεταξύ διαδοχικών β -κλώνων στα 4.51 \AA . Επομένως, η απόσταση των 8.98 \AA παραπέμπει στην διεύθυνση 3 διαδοχικών και ευθυγραμμισμένων αντιπαράλληλων β -κλώνων ($4.51 \text{ \AA} \times 2 = 9.02 \text{ \AA}$). Ο άξονας b αντιστοιχεί στο μήκος της εκτεταμένης στερεοδιάταξης του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Τέλος, ο άξονας c αντιστοιχεί στο πακετάρισμα 3 διαδοχικών β -πτυχωτών επιφανειών. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από μελέτες σε διαδοχικά εξαπεπτίδια του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ που εξάχθηκαν από τη ZipperDB (Goldsbury *et al.*, 1997). Σε συμφωνία με το παραπάνω μοντέλο (Εικόνα 107) βρέθηκε ότι η τιμή του μέσου πακεταρίσματος των πλευρικών αλυσίδων που συγκροτούν τα δεκαπεπτίδια προσεγγίζει την τιμή $\sim 10 \text{ \AA}$.

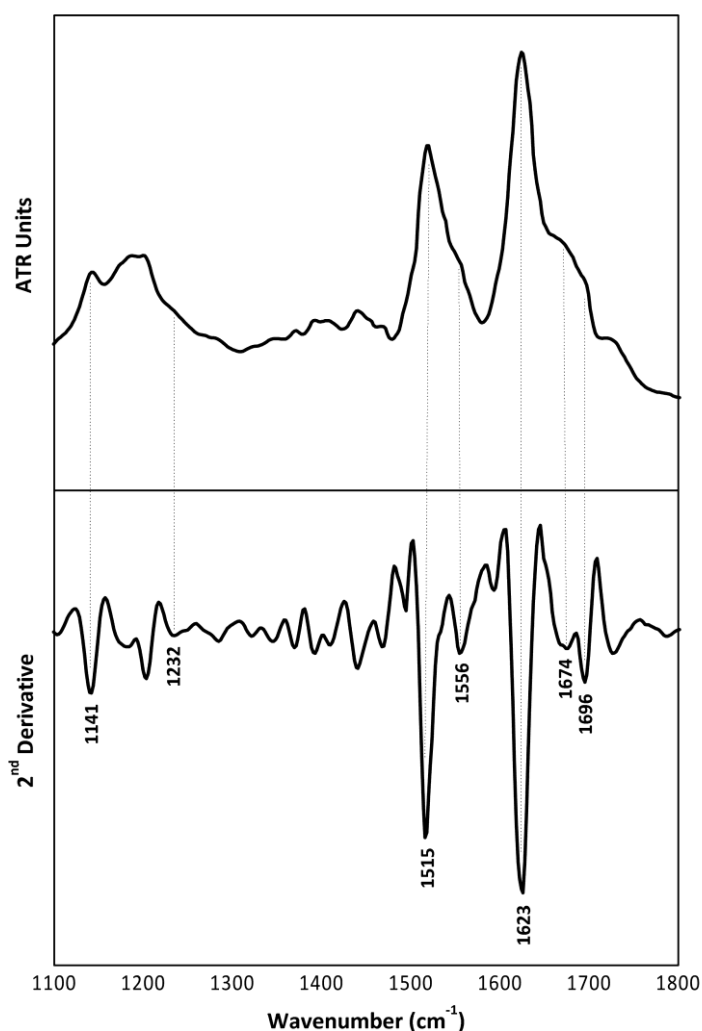
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 108. Διαδοχικά μοντέλα του δεκαπεπτιδίου ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Παρουσιάζονται τα διαδοχικά στερεοδιαταξικά φερμουάρ του πεπτιδίου στις 0 και 90°. Οι αναπαραστάσεις καρτούν (επάνω) και χωροπληρωτικών μοντέλων (κάτω) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρου υποστηρίζουν τα ευρήματα της περίθλασης ακτίνων-X για το διαλυτοποιημένο πεπτιδίο $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Τα ελάχιστα της δεύτερης παραγώγου, χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβή προσδιορισμό των αντίστοιχων μεγίστων των ταινιών απορρόφησης. Το φάσμα υπερερυθρου σε λεπτό ενυδατωμένο υμένιο που δημιουργείται από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου εμφανίζει μία οξεία κορυφή στα 1623 cm^{-1} στην περιοχή της Αμιδικής I και μία ταινία στα 1556 cm^{-1} και στην περιοχή της Αμιδικής II, οι οποίες αναμφίβολα οφείλονται στη στερεοδιάταξη των β-πτυχωτών επιφανειών (Surewicz *et al.*, 1993). Η οξεία ταινία στα 1515 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική της ύπαρξης τυροσίνης, ενώ ο κυματάριθος στα 1697 cm^{-1} είναι ένδειξη αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών (Haris and Chapman, 1995; Jackson and Mantsch, 1995; Krimm and Bandekar, 1986)



Εικόνα 109. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2^{nd} derivative).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Οι ταινίες του φάσματος, καθώς και οι αποδόσεις τους παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18) (Caswell and Spiro, 1986; Johnston and Krimm, 1971; Krimm and Bandekar, 1986).

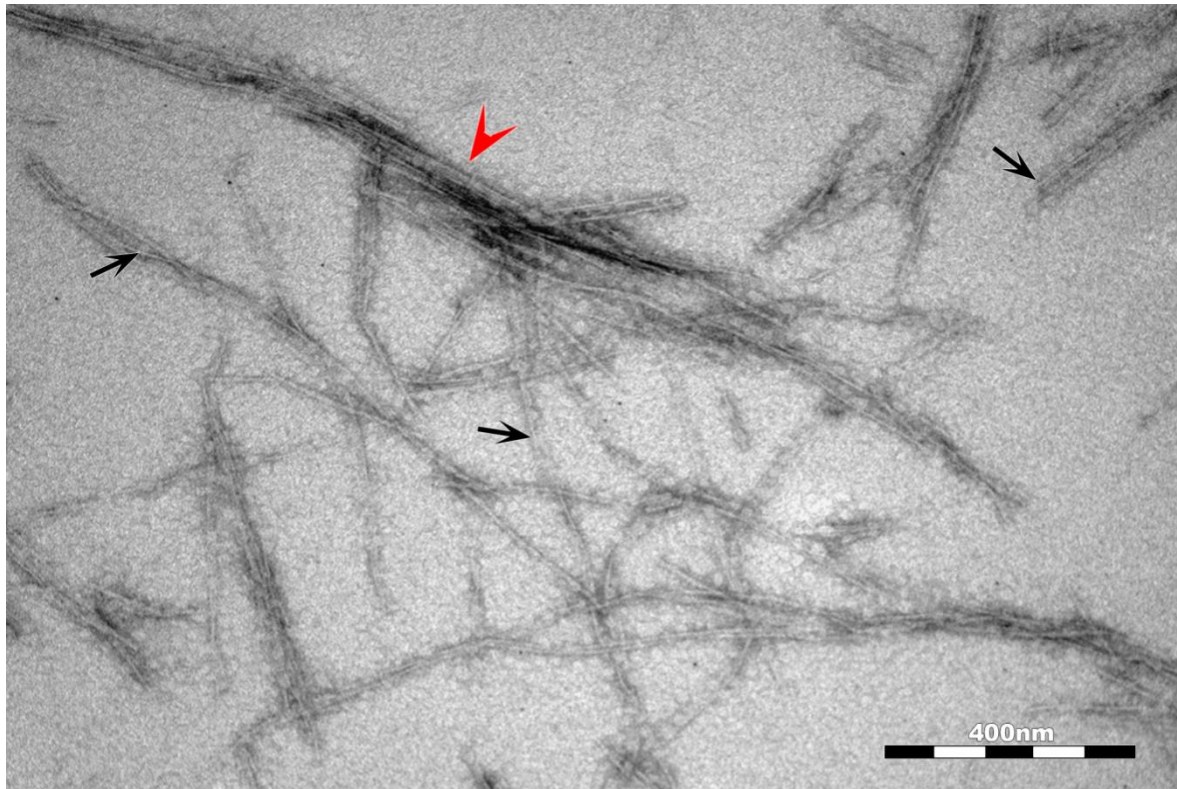
Πίνακας 18. Ταινίες όπως καταγράφονται στο ATR FT-IR (1100-1800 cm^{-1}) φάσμα ενυδατωμένου υμενίου του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, μετά την αυτοσυγκρότησή του σε μικροκρυστάλλους (Εικόνα 104). Δίνονται οι επικρατέστερες αποδόσεις τους.

Ταινίες (cm^{-1})	Αποδόσεις
1141	TFA
1232	Αμιδική III (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1515	Τυροσίνη
1556	Αμιδική II (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1623	Αμιδική I (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1674	TFA
1696	Αμιδική I (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες)

3.2.2.3. Αποτελέσματα πεπτιδίου-αναλόγου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{104}$

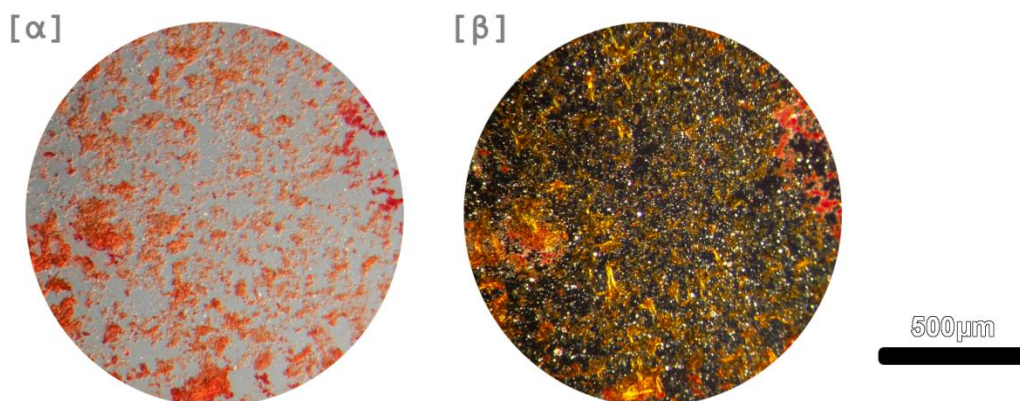
Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε δείγματα που πεπτιδίου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{104}$ αποκάλυψε της αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου σε **ινίδια ευθύγραμμα, αδιακλάδιστα με απροσδιόριστο μήκος και διάμετρο περίπου 100 Å**. Τα ινίδια είναι ομοιόμορφα, εμφανίζουν όμως έντονο πολυμορφισμό, όπως συμβαίνει σε πολλές αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Goldsbury *et al.*, 1997). Συγκεκριμένα παρατηρούμε την τάση των ινιδίων να αλληλεπιδρούν πλευρικά και να σχηματίζουν δεμάτια ινιδίων (Εικόνα 110, κόκκινη αιχμή βέλους).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 110. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{104}$ (10 mg ml^{-1}) σε απεσταγμένο νερό. Την 7^η ημέρα επώασης παρατηρούνται δεμάτια ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους). Το μαύρο βέλος σημειώνει ένα μοναδιαίο ινίδιο διαμέτρου 100 Å.

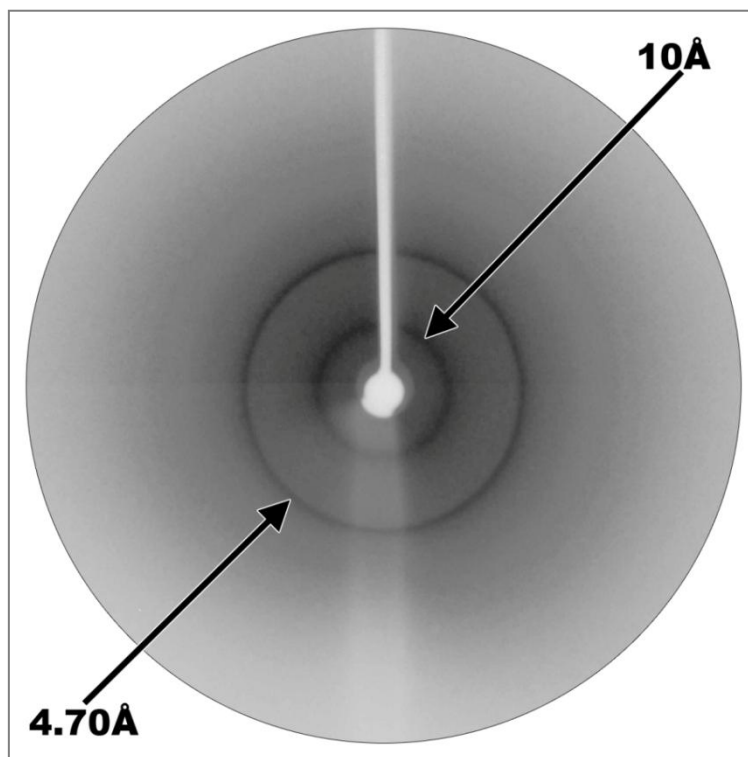
Υμένια των παραπάνω αμυλοειδών ινιδίων, δεσμεύουν ειδικά τη χρωστική Congo red (Εικόνα 111α) και εμφανίζουν τη χαρακτηριστική για τις αμυλοειδείς εναποθέσεις κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (Εικόνα 111β), όταν παρατηρηθούν σε πολωτικό μικροσκόπιο, με διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη.



Εικόνα 111. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{104}$ έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την κίτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Περίθλαση ακτίνων-X από ίνες προσανατολισμένων ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ αποκάλυψαν δύο ισχυρές ανακλάσεις στα 4.7 Å και στα 10 Å (Εικόνα 112). Οι ανακλάσεις αυτές εμφανίζονται ως δακτύλιοι εξαιτίας της έλλειψης προσανατολισμού των ινιδίων στην ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος. Η ανάκλαση στα 4.7 Å προτείνει την παρουσία β-πτυχωτών επιφανειών, καθώς αποδίδεται στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων, ενώ η ανάκλαση στα 10 Å αποδίδεται στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών. **Οι δύο ανακλάσεις υποδεικνύουν την ύπαρξη β-πτυχωτών επιφανειών και είναι χαρακτηριστικές της cross-β στερεοδιάταξης που συναντάται στα αμυλοειδή ινίδια** (Sunde and Blake, 1997).

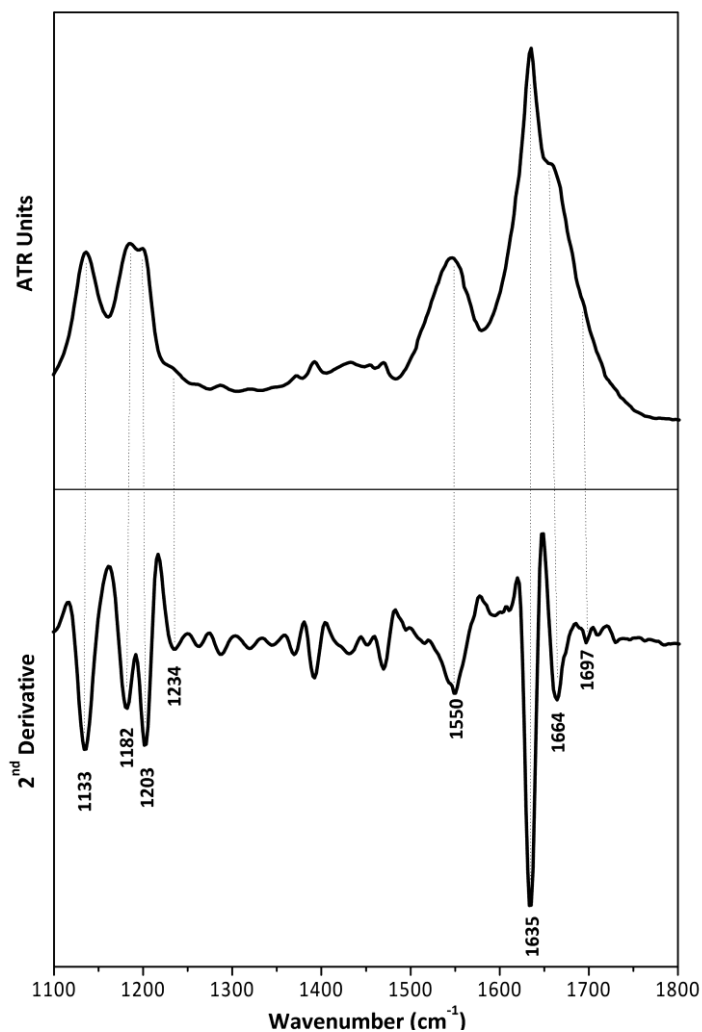


Εικόνα 112. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴. Το περιθλασίγραμμα είναι χαρακτηριστικό της cross-β δομής και παρουσιάζει μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.7Å και μία ισημερινή ανάκλαση στα 10Å.

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρου υποστηρίζουν τα παραπάνω ευρήματα της περίθλασης ακτίνων-X για το διαλυτοποιημένο πεπτιδίον ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴. Το φάσμα υπερερυθρου σε λεπτό ενυδατωμένο υμένιο που δημιουργείται από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου εμφανίζει μία οξεία κορυφή στα 1635 cm⁻¹ στην περιοχή της Αμιδικής I και μία ταινία στα 1550 cm⁻¹ και στην περιοχή της

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Αμιδικής II, οι οποίες αναμφίβολα οφείλονται στη στερεοδιάταξη των β-πτυχωτών επιφανειών (Surewicz *et al.*, 1993). Η ταινία στα 1697 cm^{-1} είναι ένδειξη ότι οι β-πτυχωτές επιφάνειες έχουν αντιπαράλληλη διεύθυνση (Haris and Chapman, 1995; Jackson and Mantsch, 1995; Krimm and Bandekar, 1986). Τα ελάχιστα της δεύτερης παραγώγου, χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβή προσδιορισμό των αντίστοιχων μεγίστων των ταινιών απορρόφησης.



Εικόνα 113. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴. Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.2.3. Συνεισφορά των πεπτιδίων-αναλόγων στον πολυμερισμό της κυστατίνης C

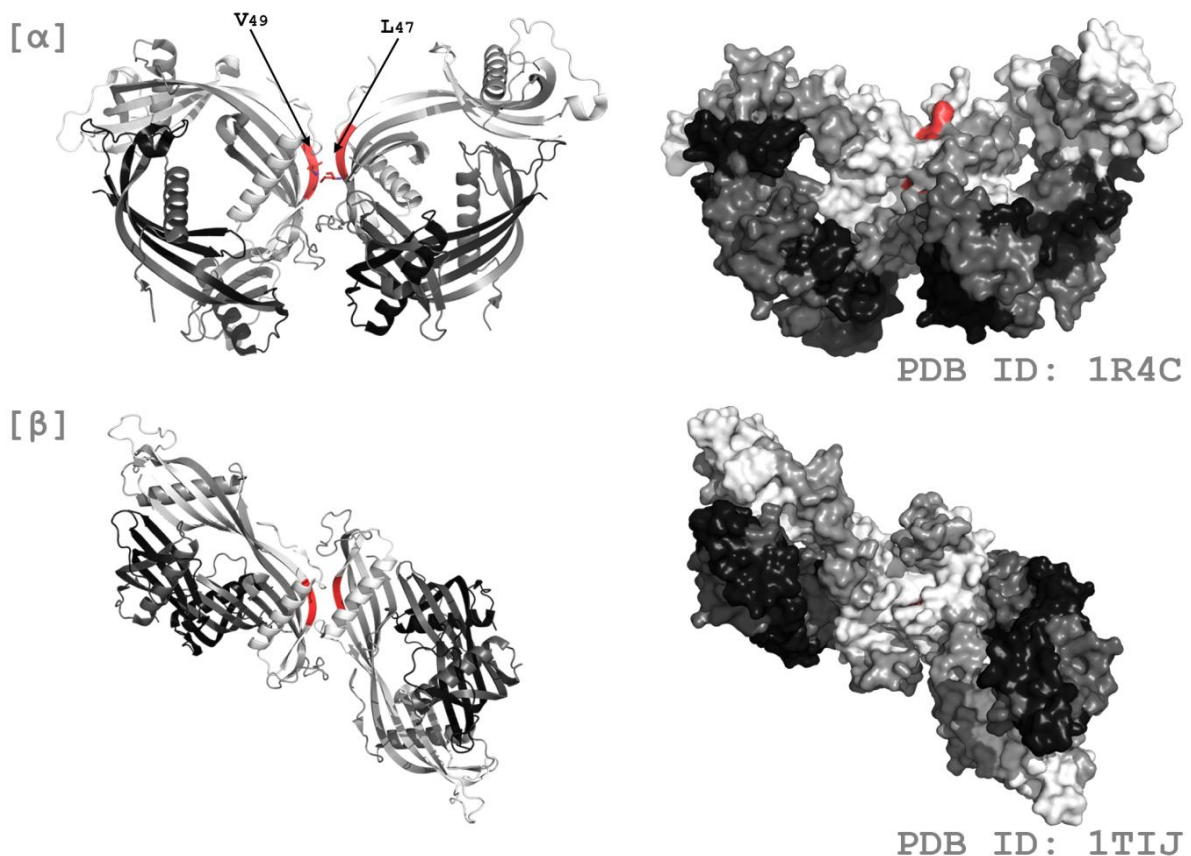
Οι *in vitro* προσεγγίσεις της ανθρώπινης κυστατίνης C υπήρξαν πρότυπες μελέτες στη διαλεύκανση του πολυμερισμού και της δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων, μέσω του μηχανισμού της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών. Μελέτες που προηγήθηκαν της παρούσας διατριβής αποδείκνυαν την σημαντική συνεισφορά των πεπτιδίων ⁴⁷LQVVR⁵¹, ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ και ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁴, ως κρίσιμους επιτόπους της ανθρώπινης κυστατίνης C, χωρίς όμως να δίνεται έμφαση στις αμυλοειδογόνες ιδιότητές τους.

Συγκεκριμένα, το πεπτίδιο ⁴⁷LQVVR⁵¹ περιλαμβάνει το κατάλοιπο της λευκίνης 47, ένα κατάλοιπο που τροποποιήθηκε τεχνητά κατά την πειραματική λύση της δομής του φυσιολογικού μονομερούς της ανθρώπινης κυστατίνης C (σχηματισμός τεχνητής δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ των καταλοίπων (L47C)–(G69C)), με την αμινοξική αυτή τροποποίηση να αποδεικνύεται ικανή να αναστείλει τον διμερισμό και τελικά το ολιγομερισμό της πρωτεΐνης (Kolodziejczyk *et al.*, 2010). Το δεκαπεπτίδιο ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, από την άλλη μεριά, είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό τμήμα της κυστατίνης C, καθώς περιλαμβάνει την περιοχή της L1 λούπας, δηλαδή την περιοχή ‘αρμό’ μεταξύ των β-κλώνων β2 και β3 (Εικόνα 42), οι οποίοι συμμετέχουν στο διμερισμό της πρωτεΐνης (Szymanska *et al.*, 2009). Κομβικό αμινοξικό κατάλοιπο του πεπτιδίου φαίνεται να είναι η βαλίνη 57, καθώς πειράματα στοχευμένων μεταλλάξεων απέδειξαν ότι αλλαγές στη θέση αυτή μπορεί να περιορίσουν την τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών και, άρα, να ανακόψουν τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης (Orlikowska *et al.*, 2011a; Orlikowska *et al.*, 2011b). Με τη σειρά του, το πεπτίδιο ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁴ φαίνεται να είναι ένα ακόμα τμήμα της κυστατίνης C με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ειδικότερα, μελέτες φασματοσκοπίας μάζας υψηλής διακριτικότητας (Juszczak *et al.*, 2009; Maftei *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2007) που στόχευαν στην εύρεση κρίσιμων περιοχών αλληλεπίδρασης της κυστατίνης με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη νόσο του Alzheimer (Bokarewa *et al.*, 2007; Sastre *et al.*, 2004), αποκάλυψαν τα τμήματα ¹⁰¹IYAVPWQGMTLSKSTC¹¹⁷ και ⁹⁶FCSFQIY¹⁰² ως σημαντικούς επιτόπους αλληλεπίδρασης της κυστατίνης με το Αβ πεπτίδιο και την πρωτεΐνη SAA, αντίστοιχα (Spodzieja *et al.*, 2013; Spodzieja *et al.*, 2012).

Η θεωρητική προσέγγιση σε ένα σύνολο 12 αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών απέδειξε ότι τμήματα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που έχουν προβλεφθεί ως περιοχές με ‘τάση προς

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

συσσωμάτωση' βρίσκονται συνήθως εκτεθειμένα στην επιφάνεια των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και όχι θαμμένα στον υδρόφοβο πυρήνα τους (Frousios *et al.*, 2009). Όμοια, μία σημαντική προσθήκη σ' αυτή την κατεύθυνση υπήρξε η υπολογιστική ανάλυση των Castillo και Ventura το 2009, οι οποίοι αποκάλυψαν ότι στην ομο-ολιγομερή κατάσταση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών οι περιοχές με 'τάση προς συσσωμάτωση' συμπίπτουν με διεπιφάνειες αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (Castillo and Ventura, 2009).



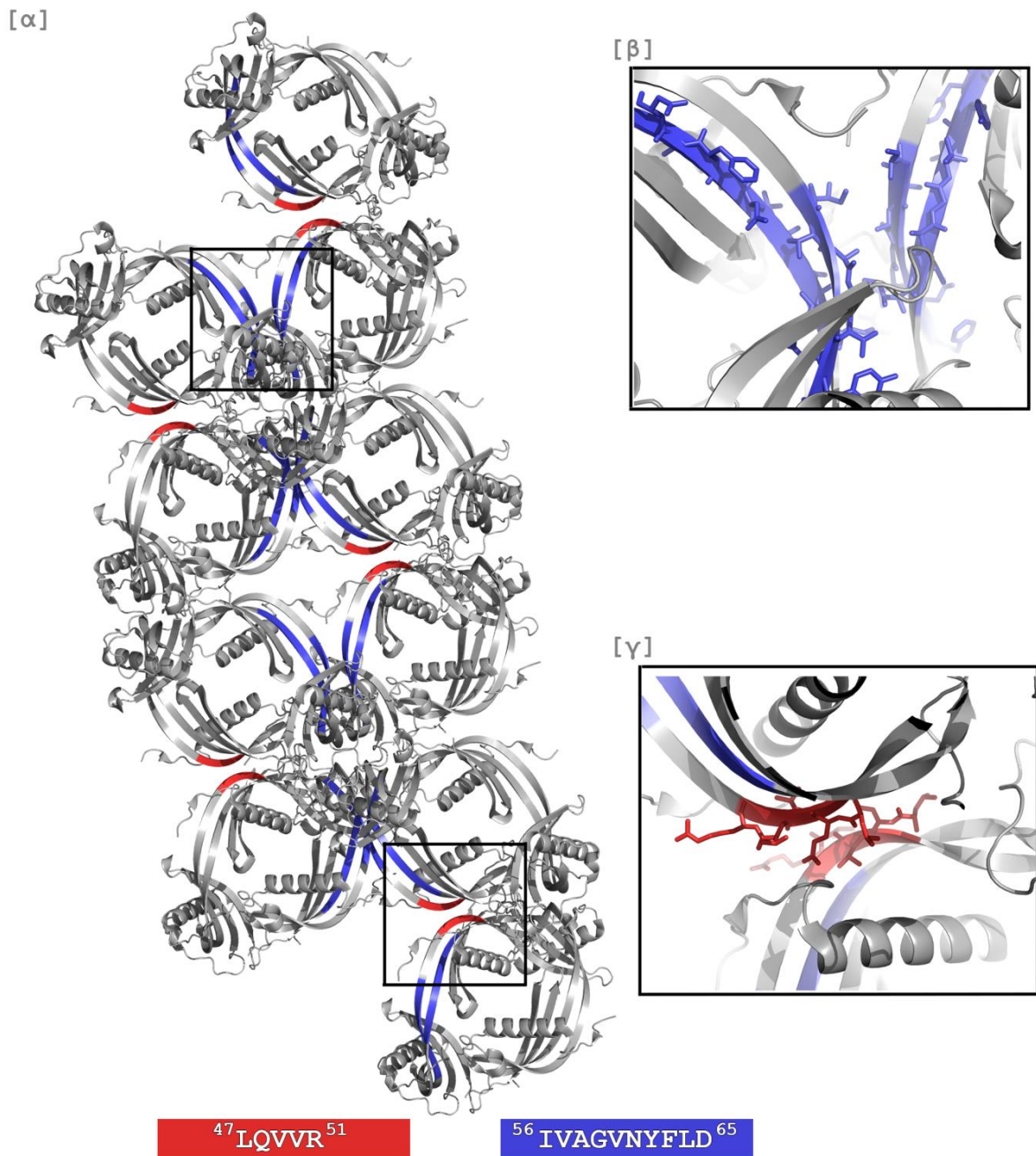
Εικόνα 114. Αλληλεπίδραση τετραμερών της ανθρώπινης κυστατίνης C. Γειτονικά τετραμερή της ανθρώπινης κυστατίνης C αλληλεπιδρούν μέσω του πενταπεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ (κόκκινο χρώμα) τόσο στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα (α), όσο και στο τετραγωνικό κρυσταλλικό σύστημα (β). Οι αλυσίδες κάθε τετραμερούς χρωματίζονται με λευκό, ανοιχτό γκρι, σκούρο γκρι και μαύρο, αντίστοιχα. Τα διμερή (λευκό-ανοιχτό γκρι & σκούρο γκρι-μαύρο) που προκύπτουν από την τρισδιάστατη ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών στη δομή 1R4C (Janowski *et al.*, 2004) (α), αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν τετραμερή και έπειτα οκταμερή, ενώ ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μέσω της αλληλεπίδρασης των καταλοίπων λευκίνη 47 και βαλίνη 49 (ράβδοι) σταθεροποιεί το οκταμερές. Όμοια η αλληλεπίδραση στη δομή 1TIJ (Janowski *et al.*, 2005) (β), διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση των πενταπεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, χωρίς την δημιουργία δεσμού υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων 47 και 49. Οι αναπαραστάσεις των δομών (καρτούν αριστερά και χωροπληρωτικό μοντέλο δεξιά), έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση του PyMol (Delano, 2005).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ο κρυσταλλογραφικός προσδιορισμός της πολυμερισμένης μορφής της ανθρώπινης κυστατίνης C το 2004 πρότεινε αυτομάτως και έναν μηχανισμό, για την πιθανή αυτοσυγκρότηση αμυλοειδών ινιδίων στην περίπτωση της πρωτεΐνης αυτής (Janowski *et al.*, 2004). Συγκεκριμένα ο μηχανισμός περιελάμβανε το σχηματισμό διμερών μέσω της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών και κατ' επέκταση το σχηματισμό τετραμερών και οκταμερών, που σχηματίζονται ακολουθώντας τον ίδιο μηχανισμό (Εικόνα 42). Μελετώντας τις προσδιορισμένες πειραματικά δομές σημαντικό εύρημα υπήρξε η **συμμετοχή του πεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ στο σχηματισμό των ομο-οκταμερών της ανθρώπινης κυστατίνης C**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι γειτονικά τετραμερή στον κρύσταλλο της πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν μέσω του ισχυρά αμυλοειδογόνου πενταπεπτιδίου, το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των γειτονικών oligομερών (Εικόνα 114α). Την ίδια στιγμή, η θέση του πεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, μαζί με τις αμυλοειδογόνες ιδιότητές του, επιβεβαιώνει την θεωρητική υπολογιστική ανάλυση που υποστηρίζει την σύμπτωση περιοχών αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-πρωτεϊνών και περιοχών με 'τάση προς συσσωμάτωση', καθώς το πεπτιδιο αποδεικνύεται να είναι τόσο αμυλοειδογόνος καθοριστής της ανθρώπινης κυστατίνης C, όσο και κρυσταλλική επαφή στη δομή του οκταμερούς (Janin, 1997). Τέλος, η παρατήρηση αυτή φαίνεται να ισχύει τόσο στην κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή στο ορθορομβικό σύστημα (PDB ID: 1R4C) (Janowski *et al.*, 2004), όσο και στη δομή του τετραγωνικού συστήματος (PDB ID: 1TIJ) (Janowski *et al.*, 2005), παρόλο που το συνολικό σχήμα των πολυμερών στο χώρο διαφέρει σημαντικά (Εικόνα 114).

Όμοια με το πενταπεπτιδιο $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, το δεκαπεπτιδιο $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ συμμετέχει, όπως είδαμε, σε αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την εκτεταμένη β-πτυχωτή επιφάνεια μεταξύ των διμερών της ανθρώπινης κυστατίνης C, με το σχηματισμό ενός πλούσιου δικτύου αλληλεπιδράσεων των συμμετρικά σχετιζόμενων μορίων (Janowski *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2005). Παραδόξως, εκτός από τις αναμενόμενες αλληλεπιδράσεις των κυστατινών μεταξύ διμερών, εντοπίζονται και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών oligομερών, που πακετάρονται κανονικά στον κρύσταλλο της δομής του οκταμερούς της ανθρώπινης κυστατίνης C. Έτσι, σε αντίθεση με το τετραγωνικό κρυσταλλικό σύστημα, όπου εντοπίζουμε μόνο την αλληλεπίδραση μεταξύ πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ (Εικόνα 114), **στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα παρατηρούμε ότι η επανάληψη των αλληλεπιδράσεων του πεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, οδηγεί στη δημιουργία μιας μεγάλης οργανωμένης επίπεδης δομής, που συγκροτείται από οκταμερή της ανθρώπινης κυστατίνης C** (Εικόνα 115).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 115. Ένα πιθανό μοντέλο πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C βασισμένο στην κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή 1R4C (Janowski *et al.*, 2004). Το προτεινόμενο μοντέλο εμπλέκει τόσο το πεπτίδιο ⁴⁷LQVVR⁵¹ όσο και το πεπτίδιο ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, καθώς η επανάληψη της αλληλεπίδρασης τους οδηγεί στη δημιουργία μιας μεγάλης οργανωμένης ινδιακής δομής ‘στοιβαγμένων’ οκταμερών της ανθρώπινης κυστατίνης C (α). Το πεπτίδιο ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (μπλε) συμμετέχει τόσο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μη-φυσιολογικών μονομερών που συγκροτούν τα διμερή κυστατίνης C, όσο και σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών οκταμερών της κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένης δομής (γ). Το πεπτίδιο ⁴⁷LQVVR⁵¹ συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών τετραμερών, που αλληλεπιδρούν και συγκροτούν τα οκταμερή (β).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Έτσι, ο μηχανισμός της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών μπορεί να συνεισφέρει στο σχηματισμό της κάθε ‘υπομονάδας’ ολιγομερούς, αλλά όχι απαραίτητα στην τελική στοίβαξη των ‘υπομονάδων’ κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν το παραπάνω μοντέλο (Εικόνα 115) προτείνοντας ότι τα σχήματος-ντόνατ ολιγομερή της κυστατίνης C (Εικόνα 41γ, Εικόνα 41δ) μπορούν να προσαρτώνται / τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο προς το σχηματισμό ‘κούφιών’ πρωτοϊνιδίων ή ώριμων αμυλοειδών ινιδίων, σε συμφωνία και με μοντέλα άλλων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών για τα οποία αποδεικνύεται η δημιουργία ‘κούφιών’ ινιδίων με αμυλοειδογόνες ιδιότητες (Jimenez *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 1995).

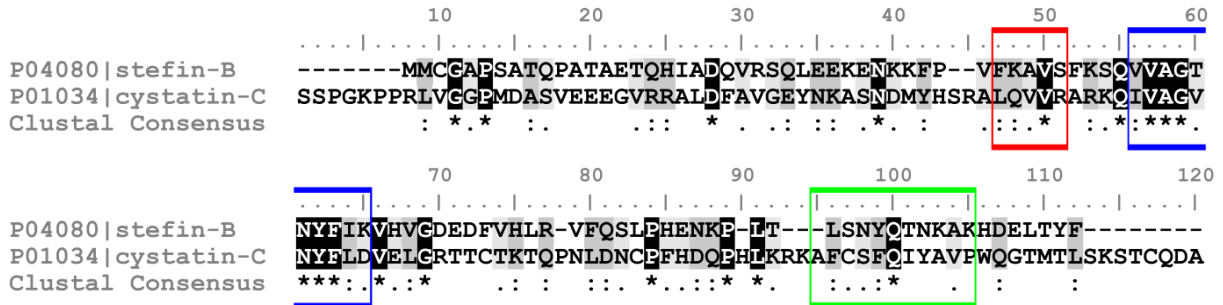
3.2.4. Ο αμυλοειδογόνος πυρήνας της ανθρώπινης κυστατίνης C

Ο μηχανισμός της δομικής μετάβασης σφαιρικών υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στην ινιδιακή κατάσταση παραμένει μέχρι και σήμερα ελλιπής, καθώς η φυσιολογική στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών που οδηγούνται στη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων δεν είναι ομοιόμορφη. Παρότι στην περίπτωση των all-β πρωτεϊνών η ερμηνεία της απόκτησης της cross-β στερεοδιάταξης είναι σχετικά απλή (Blake and Serpell, 1996), στην περίπτωση των all-α πρωτεϊνών οι μηχανισμοί είναι στην πραγματικότητα άγνωστοι και μόνο υποθέσεις μπορούν να προβλέψουν τη ‘μοίρα’ των πρωτεϊνών αυτών. Στην κατηγορία των α/β πρωτεϊνών, στην οποία επικρατούν τόσο α όσο και β στοιχεία δευτεροταγούς δομής, **οι πρωτεΐνες είναι αναγκαίο να υποστούν μία καθοριστική στερεοδιαταξική αλλαγή ώστε να μεταβούν στην ινιδιακή κατάσταση** (Zerovnik *et al.*, 2011). Έτσι, το προτεινόμενο μοντέλο στην Εικόνα 115 μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τον πολυμερισμό της κυστατίνης C, παρόλο που πειραματικά και βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την εγκυρότητά του.

Το 2008 έγιναν σημαντικές προσπάθειες να μελετηθεί το μοντέλο πολυμερισμού μίας κυστατίνης της οικογένειας των στεφινών, της ανθρώπινης στεφίνης B (Morgan *et al.*, 2008). Η πρωτεΐνη αυτή μοιράζεται υψηλή ομολογία με την ανθρώπινη κυστατίνη C (Εικόνα 116) και διπλώνεται στο χώρο υιοθετώντας το χαρακτηριστικό δίπλωμα των κυστατινών (Jenko Kokalj *et al.*, 2007) (Εικόνα 38). Κατά το σχεδιασμό του πειράματος, ο Morgan και οι συνεργάτες του με τη χρήση ανταλλαγής υδρογόνου/δευτερίου και μετρήσεις με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) κατόρθωσαν να προσδιορίσουν σε επίπεδο αμινοξικών

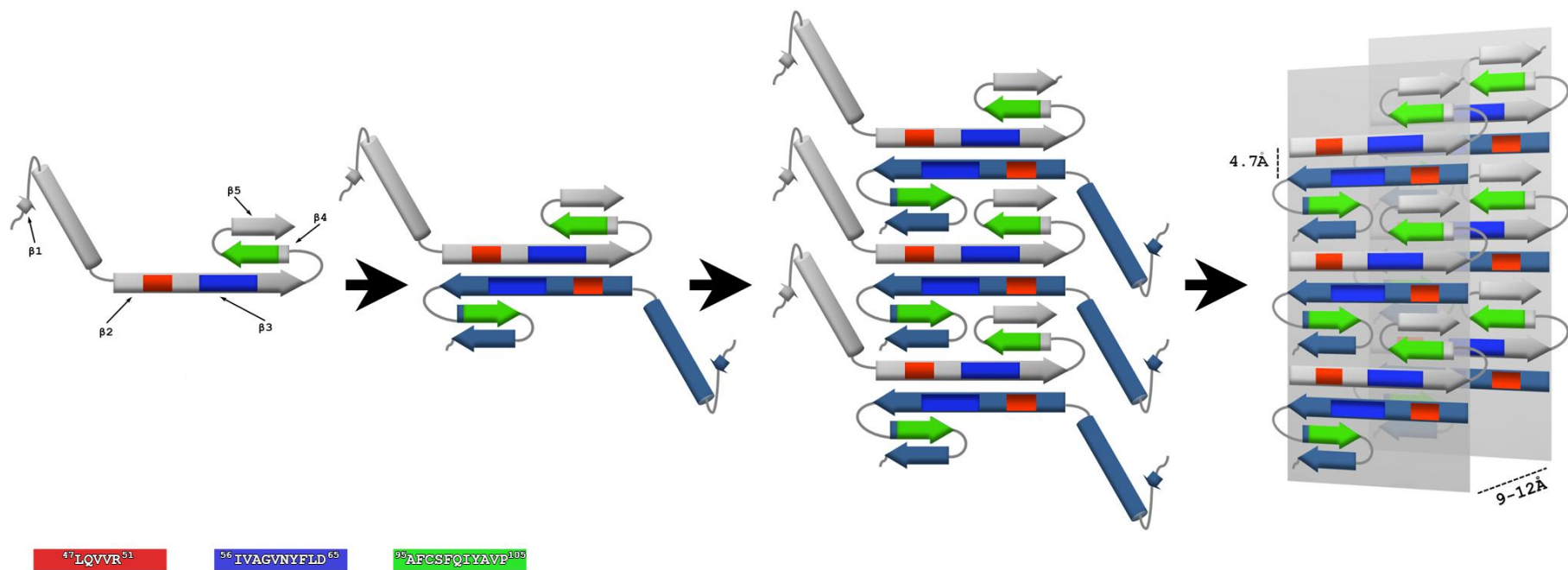
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

καταλοίπων τα τμήματα εκείνα της στεφίνης B, τα οποία και αποτελούν τον πυρήνα της ινδιακής κατάστασης της πρωτεΐνης (Morgan *et al.*, 2008).



Εικόνα 116. Στοίχιση ακολουθιών μεταξύ της ανθρώπινης κυστατίνης C και της ανθρώπινης στεφίνης B. Η στοίχιση αποδεικνύει την υψηλή ομολογία μεταξύ των δύο εκκριτικών πρωτεϊνών. Τα χρωματιστά πλαίσια σημειώνουν τα πεπτίδια που μελετήθηκαν πειραματικά στην περίπτωση της ανθρώπινης κυστατίνης C (κόκκινο - ⁴⁷LQVVVR⁵¹, μπλε - ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, πράσινο - ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵) και τα ομόλογα πεπτίδια στην ακολουθία της στεφίνης B. Οι μαύρες περιοχές που σημειώνονται με αστερίσκο (*) δηλώνουν κατάλοιπα που ταυτίζονται, οι σκούρες γκρι περιοχές που σημειώνονται με άνω-κάτω τελείες (:) δηλώνουν κατάλοιπα με σημαντική ομοιότητα στις ιδιότητές τους, οι ανοιχτές γκρι περιοχές που σημειώνονται με τελεία (.) δηλώνουν κατάλοιπα με ασθενή ομοιότητα στις ιδιότητές τους. Οι ακολουθίες έχουν αποσπαστεί από τη βάση UniProt (UniProt, 2015) (στεφίνη B - Uniprot AC: P04080, κυστατίνη C - Uniprot AC: P01034). Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007) και η οπτικοποίηση έγινε με τη χρήση του λογισμικού BioEdit (Hall, 1999).

Στην Εικόνα 117 προτείνεται ένα πιθανό μονοπάτι του πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C σε αναλογία με το μοντέλο του Morgan. Με χρήση της ομολογίας -σε επίπεδο ακολουθίας- μεταξύ της κυστατίνης C και της στεφίνης B, επιχειρήσαμε να τοποθετήσουμε τα πεπτίδια ⁴⁷LQVVVR⁵¹, ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ και ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁴ αναπαριστώντας ένα μοντέλο πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C. Προς έκπληξή μας, και τα τρία πεπτίδια, με τις αξιοσημείωτες ιδιότητες πολυμερισμού συμμετέχουν στον πυρήνα της β-στερεοδιάταξης του μοντέλου, προτείνοντας την πιθανή σημαντική συνεισφορά τους στην συγκρότηση του αμυλοειδογόνου πυρήνα της πρωτεΐνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ομόλογα πεπτίδια των ⁴⁷LQVVVR⁵¹, ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ και ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁴ στην ακολουθία της στεφίνης B παρουσιάζουν παρόμοιο αμυλοειδογόνο προφίλ, αν και η οικογένεια των στεφινών, διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες κυστατίνες, λόγω της απουσίας δισουλφιδικών δεσμών (Zerovnik *et al.*, 2010), γεγονός που τις καθιστά περισσότερο επιρρεπείς στις στερεοδιαταξικές αλλαγές και στο λανθασμένο δίπλωμα (Grana-Montes *et al.*, 2012).

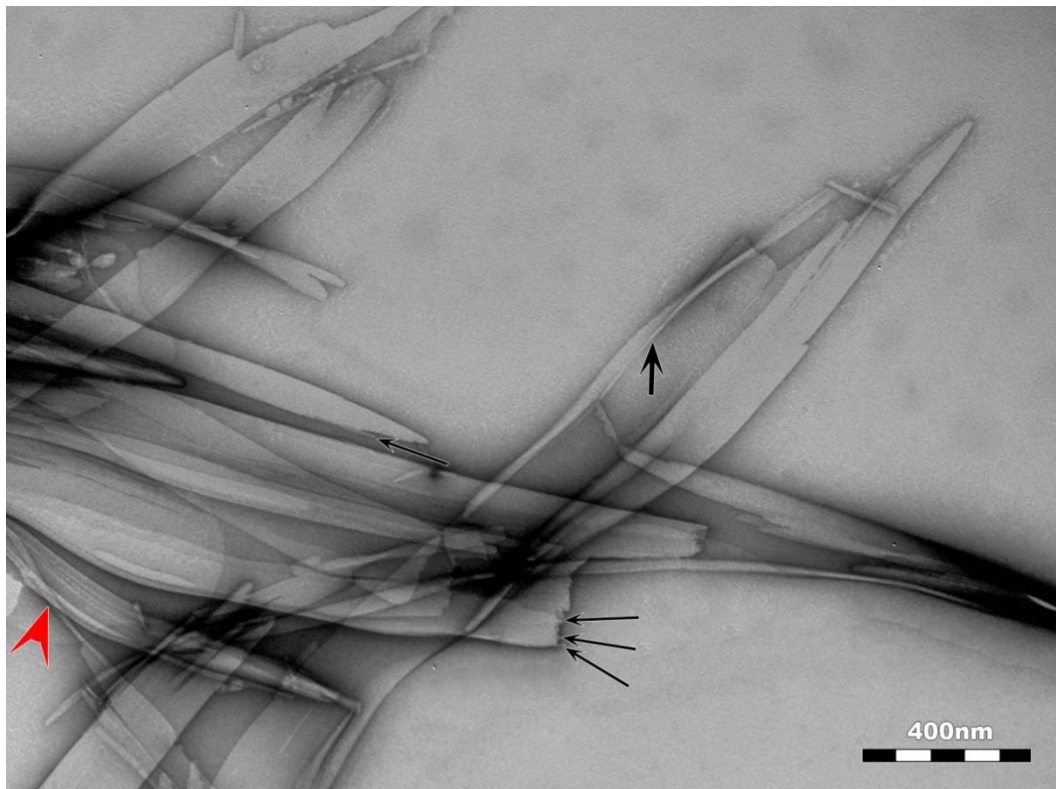


Εικόνα 117. Αναπαράσταση του πιθανού μονοπατιού πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C. Το προτεινόμενο μονοπάτι ακολουθεί το παράδειγμα της στεφίνης B (Morgan *et al.*, 2008). Η α -έλικες αναπαρίστανται ως κύλινδροι και οι β -κλώνοι ως βέλη. Μετά τον διμερισμό και τον αποκλεισμό των α -ελίκων, δημιουργείται το τετραμερές της κυστατίνης C από την αλληλεπίδραση δύο διμερών, ενώ στοίβαξη πολλών διμερών δημιουργεί τον πυρήνα του ινιδίου. Ο αμυλοειδογόνος πυρήνας εμπλέκει τους β -κλώνους $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ και $\beta 5$, καθώς και τις λούπες μεταξύ των κλώνων 2 και 3 (L1 λούπα), που περιλαμβάνουν τα πεπτιδία ⁴⁷LQVVR⁵¹ (κόκκινο), ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (μπλε) και ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁴ (πράσινο). Η επανάληψη των υπο-μελέτη πεπτιδίων-αναλόγων φαίνεται να συγκροτεί τον αμυλοειδογόνο πυρήνα των ινιδίων της ανθρώπινης κυστατίνης C.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.2.5. Αλληλεπιδράσεις των πεπτιδίων-αναλόγων της κυστατίνης C

Πειράματα συνεπώασης των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFCSFQIYAVP}^{104}$ εμπνευσμένα από το παραπάνω μοντέλο, αποδεικνύουν εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ τους και ενισχύουν την υπόθεση του μονοπατιού πολυμερισμού (Εικόνα 117). Ειδικότερα, ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε δείγματα συγκέντρωσης ισομοριακής ποσότητας (1:1) των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$, $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$, έπειτα από αρνητική χρώση και επώαση 15 ημερών, υποδεικνύουν την τάση όλων των συνδυασμών πεπτιδίων-αναλόγων να αυτοσυγκροτούνται, σχηματίζοντας πήκτωμα, όπως παρατηρήθηκε και για τα μεμονωμένα πεπτίδια-ανάλογα.

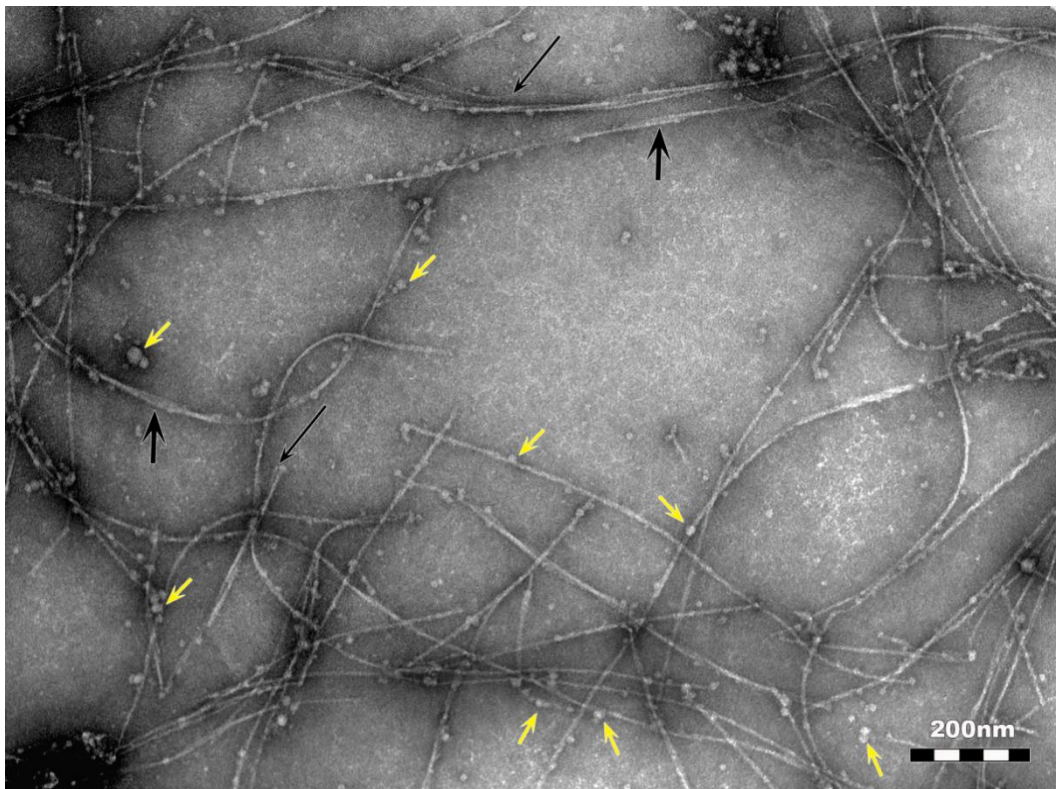


Εικόνα 118. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης των μικροκρυσταλλιτών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 1:1 και ο χρόνος επώασης είναι 15 ημέρες. Παρατηρώντας λεπτομερώς τους μικροκρυσταλλίτες διακρίνουμε πρωτοϊνίδια διαμέτρου $\sim 50\text{-}60\text{\AA}$ (λεπτά μαύρα βέλη), ώριμα ινίδια (μαύρο βέλος), καθώς και δεμάτι πολλών ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους).

Στο διάλυμα συνεπώασης των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ (Εικόνα 118) παρατηρούνται μικροκρύσταλλοι αντίστοιχοι εκείνων που εντοπίστηκαν κατά την

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ (Εικόνα 104). Η λεπτομερής παρατήρηση αποδεικνύει ότι οι μικροκρύσταλλοι συγκροτούνται από οργανωμένα πρωτοϊνίδια διαμέτρου $\sim 50\text{-}60 \text{ \AA}$ (Εικόνα 118, λεπτά μαύρα βέλη), είτε ώριμα αμυλοειδή ινίδια $\sim 100 \text{ \AA}$ (Εικόνα 118, μαύρο βέλος), είτε δεμάτια πρωτοϊνιδίων (Εικόνα 118, κόκκινη αιχμή βέλους). Η εμφάνιση των δεματιών και συγκεκριμένα η τάση των ινιδίων σε αυτό το δείγμα να αλληλεπιδρούν πλευρικά σχηματίζοντας επίπεδες ταινίες πρωτοϊνιδίων, πιθανά παραπέμπει στις ιδιότητες που εμφάνισε μεμονωμένο το πεπτίδιο $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ (Εικόνα 98). Εντούτοις, στην συνεπώαση των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ καταγράφεται η επικράτηση της μορφολογίας του δεύτερου πεπτιδίου.

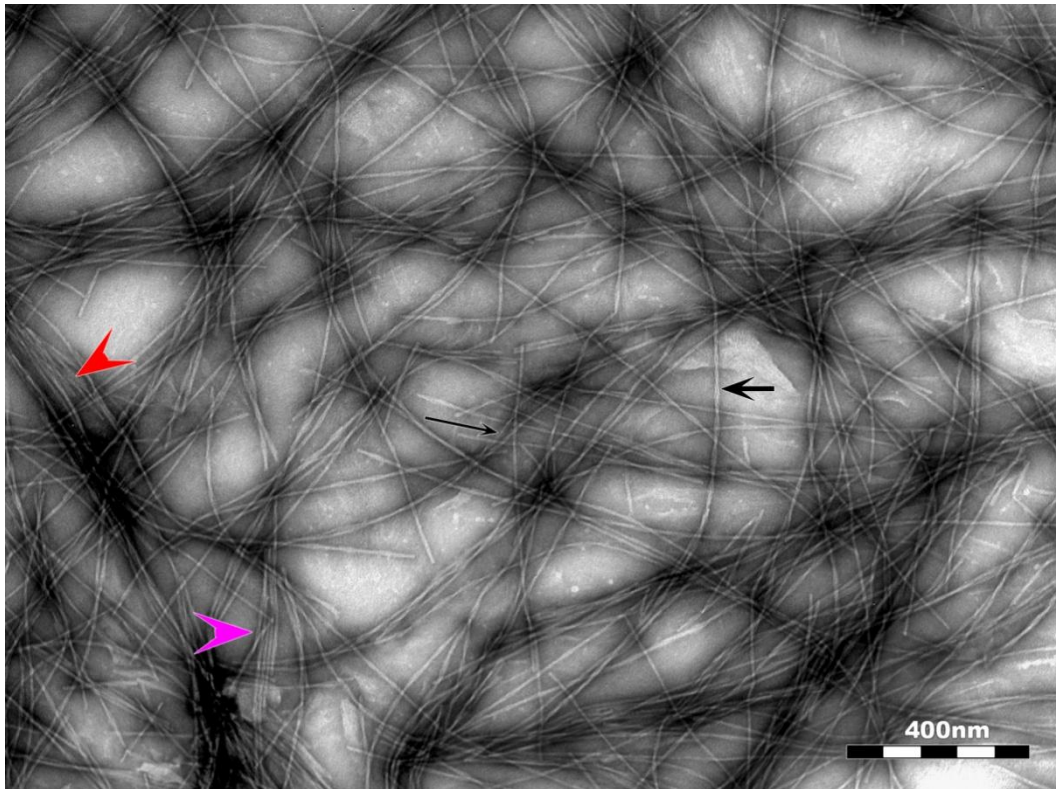


Εικόνα 119. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης $^{47}\text{LQVVR}^{51} : ^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 1:1 και ο χρόνος επώασης είναι 15 ημέρες. Σημειώνονται τα πρωτοϊνίδια (λεπτά μαύρα βέλη), οι υπερελίκες πρωτοϊνιδίων (μαύρα βέλη), καθώς και σφαιρικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα (κίτρινα βέλη), που κατανέμονται ομοιόμορφα στο δείγμα.

Αντίθετα, συνεπώαση των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51} : ^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ οδήγησε στη δημιουργία δομών τυπικών αμυλοειδών ινιδίων, δηλαδή ινιδίων που παρουσιάζονται ομοιόμορφα, αδιακλάδιστα, ευθύγραμμα και έχουν απροσδιόριστο μήκος, ενώ παρατηρείται η εμφάνιση τόσο πρωτοϊνιδίων (Εικόνα 119, λεπτό μαύρο βέλος), όσο και υπερελικών

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

πρωτοϊνιδίων (Εικόνα 119, μαύρο βέλος). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όμως, παρουσιάζει η εμφάνιση σφαιρικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τα οποία κατανέμονται ομοιόμορφα στο δείγμα και συχνά εμφανίζονται σαν ‘διακόσμηση’ στις δομές των ινιδίων, αφού φαίνεται να προσκολλώνται σε αυτές (Εικόνα 119, κίτρινα βέλη). Η μορφολογία των ινιδίων δεν παραπέμπει στην εμφάνιση των μεμονωμένων πεπτιδίων, καθώς δεν παρατηρούμε ούτε την έντονη τάση του πενταπεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ (Εικόνα 98) να σχηματίζει επίπεδες ταινίες πρωτοϊνιδίων, ούτε την ιδιότητα σχηματισμού δεματίων ινιδίων του δεκαπεπτιδίου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ (Εικόνα 110). Η αποκάλυψη μίας νέας οργάνωσης αποδεικνύει την τάση των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ να αλληλεπιδρούν ειδικά.



Εικόνα 120. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 1:1 και ο χρόνος επώασης είναι 15 ημέρες. Παρατηρούμε τυπικά αμυλοειδή ινίδια $\sim 100\text{\AA}$, που σχηματίζουν δεμάτια (κόκκινη αιχμή βέλους), είτε ταινίες (φούξια αιχμή βέλους) αλληλεπιδρώντας πλευρικά. Με λεπτό μαύρο βέλος σημειώνεται πρωτοϊνίδιο $\sim 60\text{\AA}$.

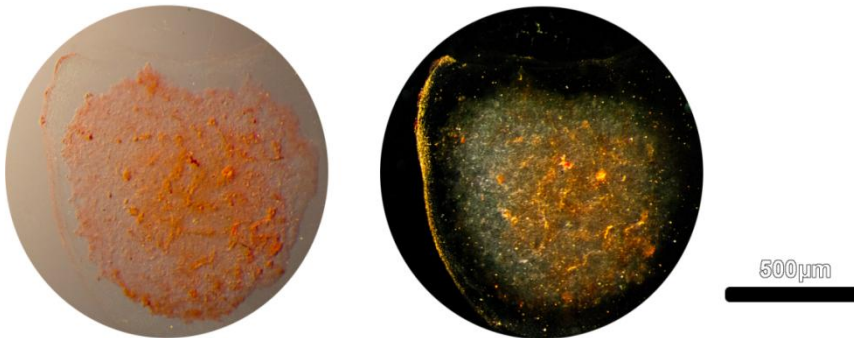
Τέλος, η μελέτη του διαλύματος συνεπώασης των δεκαπεπτιδίων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ αποκαλύπτει απροσδόκητα την εμφάνιση τυπικών, ομοιόμορφων και πολυμορφικών αμυλοειδών ινιδίων. Σε αντίθεση με το διάλυμα συνεπώασης των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, όπου οι μικροκρυσταλλίτες κυριαρχούν (Εικόνα 118),

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

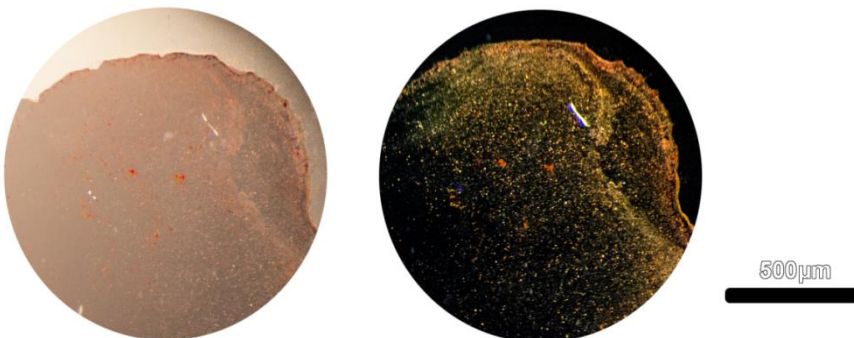
παρατηρείται η παντελής απουσία μικροκρυσταλλιτών του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Επιπρόσθετα, οι δομές των αμυλοειδών ινιδίων διαφέρουν σημαντικά από την παρατήρηση των μεμονωμένων ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ (εικόνα), παρότι εμφανίζουν την τάση να δημιουργούν δεμάτια ινιδίων (Εικόνα 120, κόκκινη αιχμή βέλους). Έτσι, κατά την αλληλεπίδραση των πεπτιδίων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ καταγράφεται η εμφάνιση ενός ‘νέου’ πληθυσμού ινιδίων, εύρημα που υποδηλώνει τη συνάφεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πεπτιδικών τμημάτων της ανθρώπινης κυστατίνης C.

Χρώση υμενίων των 1:1 διαλυμάτων συνεπώασης των συνδυασμών των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51} : ^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65} : ^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ και $^{47}\text{LQVVR}^{51} : ^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ έδειξε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά τη διαγνωστική χρωστική Congo Red και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων κατά την παρατήρησή τους με πολωτικό μικροσκόπιο.

[α] $^{47}\text{LQVVR}^{51} : ^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$

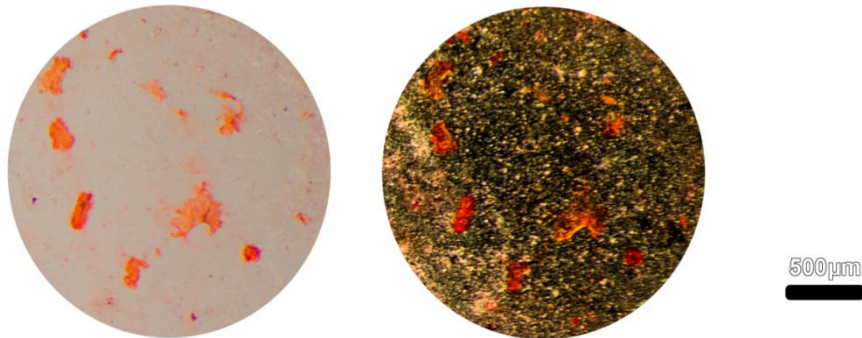


[β] $^{47}\text{LQVVR}^{51} : ^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$



Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

[γ] $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$

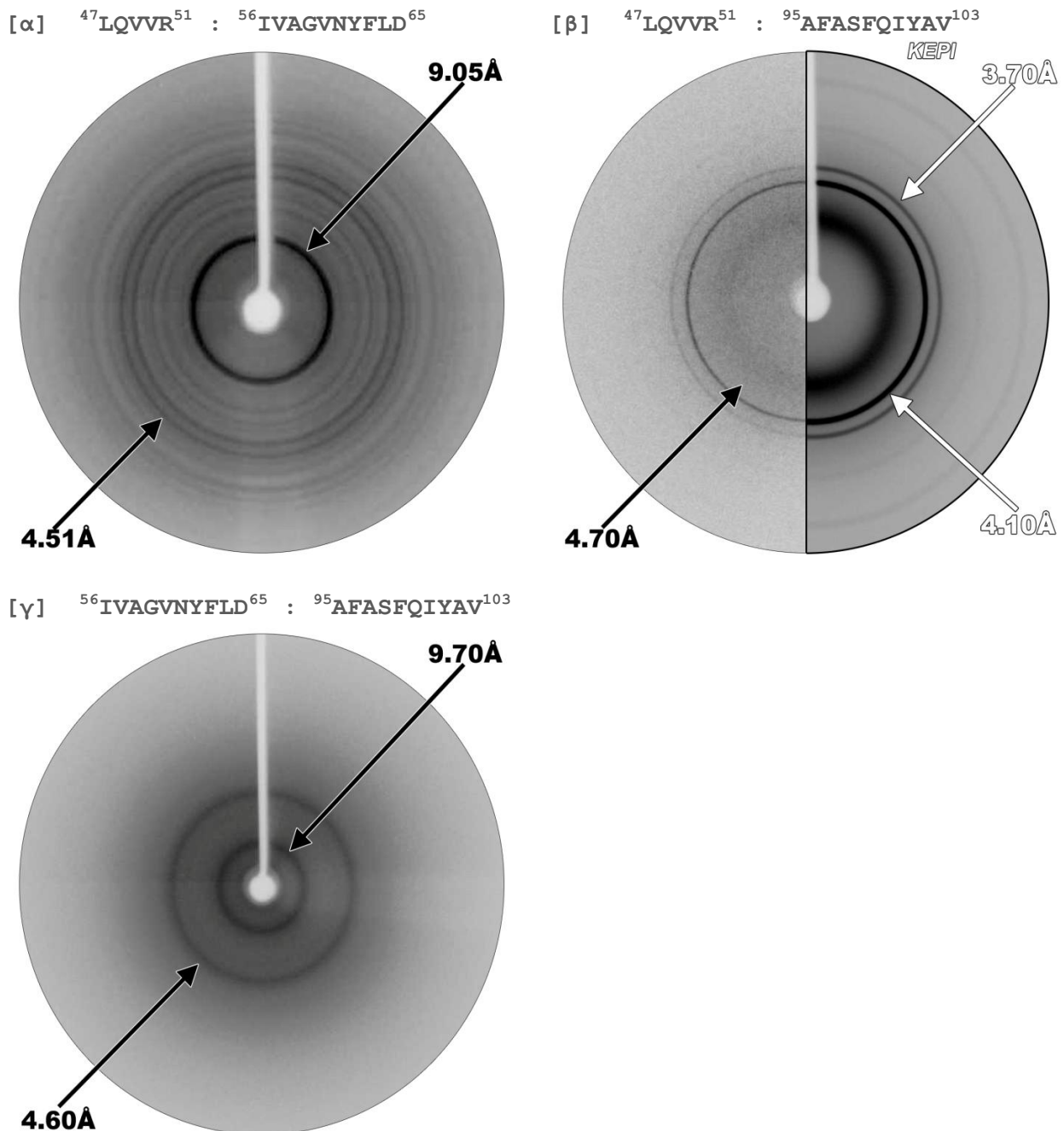


Εικόνα 121. Φωτομικρογραφίες των αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμών των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C, έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (δεξιά).

Η ευθυγράμμιση των αμυλοειδών ινιδίων των διαλυμάτων συνεπώασης των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C σε κατάλληλη διάταξη έδωσε προσανατολισμένες ίνες μόνο στην περίπτωση των διαλυμάτων των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. Τα περιθλασιγράμματα για τους δύο συνδυασμούς πεπτιδίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 122. Τόσο για το διάλυμα συνεπώασης $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, όσο και για το διάλυμα συνεπώασης $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ παρατηρείται η καταγραφή των χαρακτηριστικών ανακλάσεων της cross-β στερεοδιάταξης όλων των αμυλοειδών ινιδίων (Sunde and Blake, 1997). Ειδικότερα, το περιθλασίγραμμα που προέκυψε από το συνδυασμό των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ (Εικόνα 122α), είναι περιθλασίγραμμα πολυκρυσταλλικού υλικού και εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με εκείνο του μεμονωμένου πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, επιβεβαιώνοντας τα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, που υποδεικνύουν ότι το δεκαπεπτίδιο επικρατεί του πενταπεπτιδίου (Εικόνα 118). Αντίθετα, το περιθλασίγραμμα που προέκυψε από το συνδυασμό των δεκαπεπτιδίων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$, προς έκπληξή μας δεν ομοιάζει των περιθλασιγραμμάτων των ανεξάρτητων πεπτιδίων, καθώς εξαλείφεται παντελώς η πολυκρυσταλλική φύση του πεπτιδίου $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$, ενώ οι ανακλάσεις της cross-β στερεοδιάταξης παρουσιάζουν αποκλίσεις από εκείνες του πεπτιδίου $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. Το περιθλασίγραμμα αυτό (Εικόνα 122γ) επιβεβαιώνει την εμφάνιση του νέου πληθυσμού ινιδίων που καταγράφεται κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Εικόνα 120) και ενισχύει την ιδέα ότι τα δεκαπεπτίδια αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα. Η αδυναμία δημιουργίας

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

προσανατολισμένης ίνας ινιδίων από το διάλυμα συνεπώασης των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$: $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ και κατ' επέκταση η απόκτηση περιθλασιγράμματος δημιουργεί ερωτηματικά, καθώς από την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης είναι εμφανής η παρουσία τυπικών αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 119). Μία πιθανή ερμηνεία είναι η συνύπαρξη σφαιρικών πρωτεϊνικών δομών, οι οποίες πιθανά αποτρέπουν την ευθυγράμμιση των ινιδίων του διαλύματος.



Εικόνα 122. Περιθλασιγράμματα ακτίνων-X που προέκυψαν από αμυλοειδή ινίδια συνδυασμού των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$, $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ και $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. (α) (β) Παρουσιάζονται πειθλασιγράμματα χαρακτηριστικά της cross-β αρχιτεκτονικής. (γ)

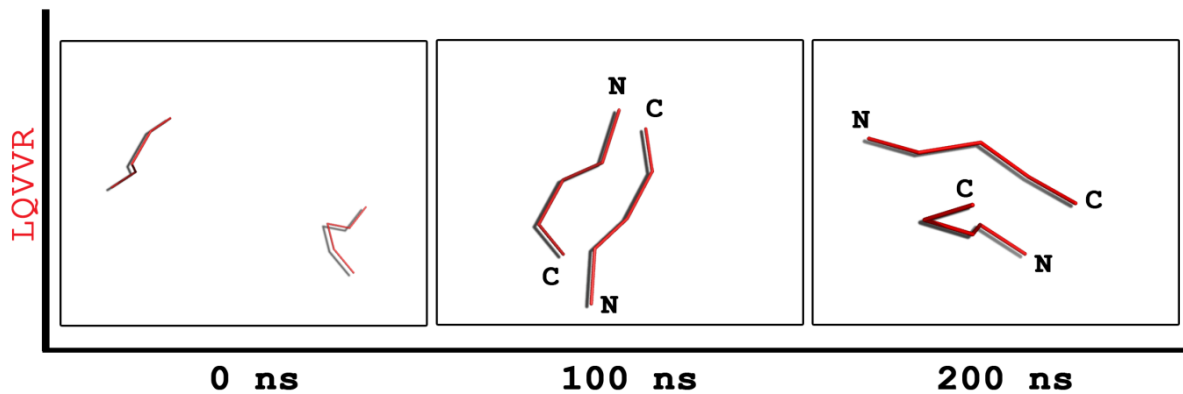
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Αδυναμία δημιουργίας προσανατολισμένης ίνας ινιδίων από το διάλυμα συνεπώσεως των πεπτιδίων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$.

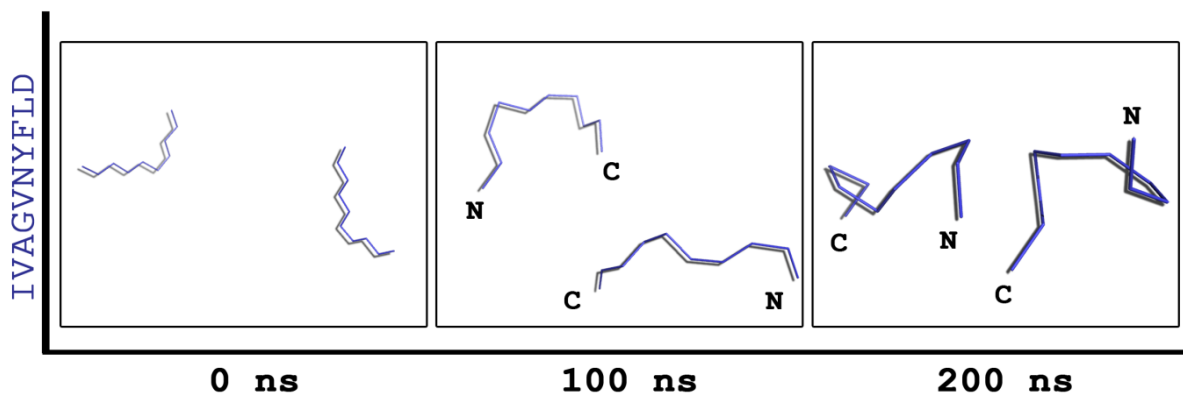
3.2.6. Η δυναμική της αλληλεπίδρασης στην κυστατίνη C

Παράλληλα με τα παραπάνω αποτελέσματα σχεδιάστηκαν πειράματα προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για να μελετηθεί υπολογιστικά η δυναμική των συνδυασμών συνεπώσεως των πεπτιδίων αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C, καθώς και για να εξαχθεί η απαραίτητη δομική πληροφορία, σχετικά με τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις των πεπτιδίων. Οι προσομοιώσεις των ομοδιμερών που παρουσιάζονται στην Εικόνα 123 χρησιμοποιήθηκαν ως πειράματα-ελέγχου.

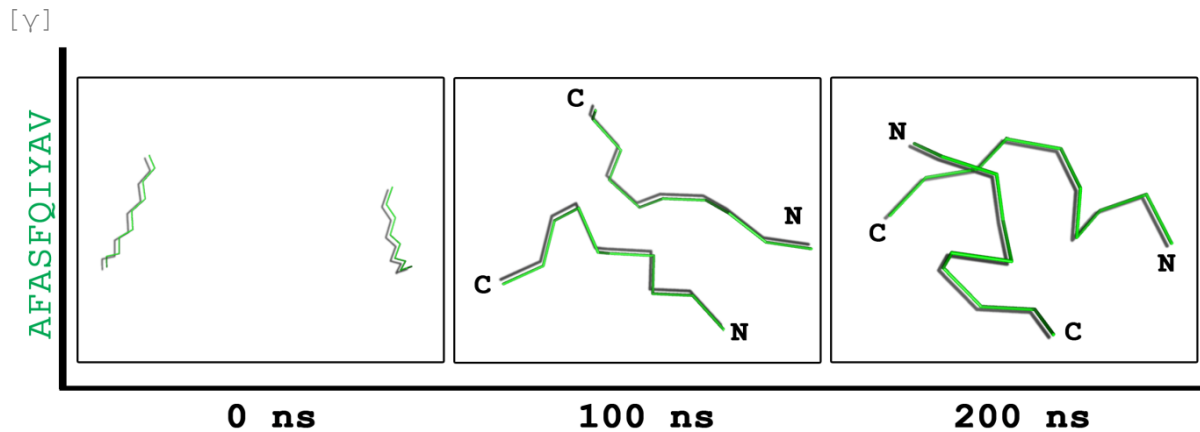
[α]



[β]



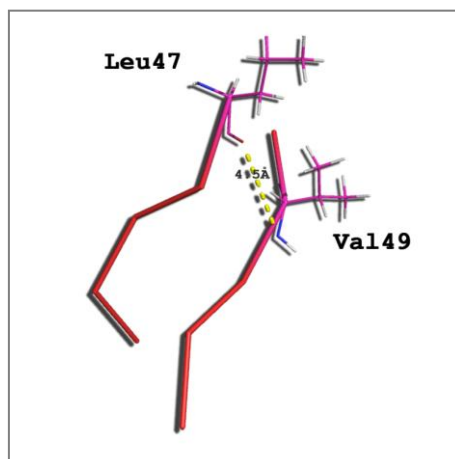
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 123. Προσομιώσεις μοριακής δυναμικής ομοδιμερών πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης κυστατίνης C. Στιγμιότυπα των 0, 100 και 200 ns.

3.2.6.1. Πειράματα ελέγχου

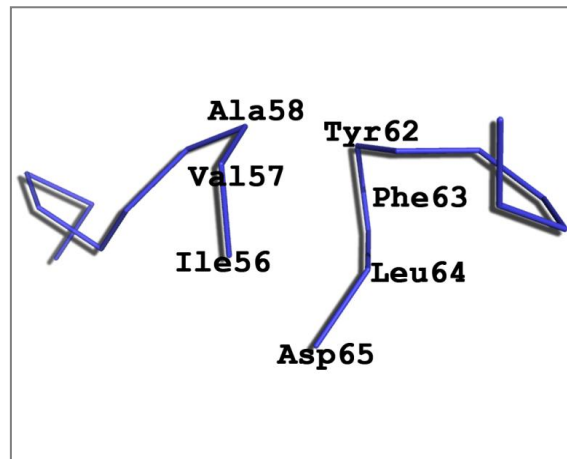
Τα πειράματα ελέγχου έδειξαν ότι και τα τρία πεπτίδια εμφανίζουν την τάση να έρχονται κοντά έπειτα από χρόνο προσομοίωσης 100-200 ns. Η τάση αυτή επιβεβαιώνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα που αποδεικνύουν ότι όλα τα υπο μελέτη πεπτίδια ανάλογα της ανθρώπινης κυστατίνης C αυτοσυγκροτούνται προς το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 98, Εικόνα 104, Εικόνα 111). Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι, η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ με τον εαυτό του φαίνεται να συμφωνεί με την αντίστοιχη αλληλεπίδραση των πεπτιδίων στην κρυσταλλική δομή του οκταμερούς, της ανθρώπινης κυστατίνης C (Εικόνα 114), καθώς τα κατάλοιπα έρχονται πιο κοντά στο χώρο στα 100 ns είναι τα κατάλοιπα V49 του ενός πεπτιδίου αναλόγου και L47 του δεύτερου (Εικόνα 124).



Εικόνα 124. Αλληλεπίδραση του συστήματος ομοδιμερούς $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ στα 100 ns. Η αλληλεπίδραση επιβεβαιώνεται από την κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή του οκταμερούς της κυστατίνης με κωδικό στη βάση PDB 1R4C (Janowski *et al.*, 2004).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Αντίστοιχα, το πεπτιδιο-ανάλογο $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ επιβεβαιώνει τη δημιουργία μιας εκτεταμένης β -πτυχωτής επιφάνεια $\beta\text{L-}\beta\text{L}$, η οποία σχηματίζει την εκτεθειμένη περιοχή αλληλεπίδρασης (*open interface*) που σταθεροποιείται συνολικά από διαδοχικούς δεσμούς υδρογόνου στην κρυσταλλική δομή του οκταμερούς της κυστατίνης C (Janowski *et al.*, 2004; Janowski *et al.*, 2001). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων αναλόγων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ εμφανίζουν αντιπαράλληλη κατεύθυνση κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων (200 ns) και επιβεβαιώνονται από την αλληλεπίδραση των δύο πεπτιδικών τμημάτων στην κρυσταλλική δομή του οκταμερούς (Εικόνα 114).



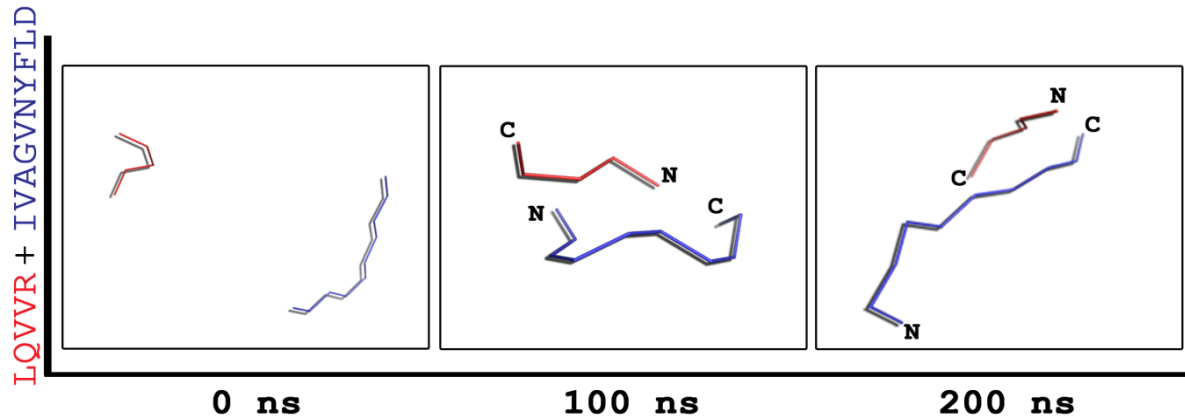
Εικόνα 125. Αλληλεπίδραση του συστήματος ομοδιμερούς $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ στα 200 ns. Τα δύο πεπτιδία αποδεικνύεται ότι αλληλεπιδρούν με αντιπαράλληλη κατεύθυνση, κάτι που επιβεβαιώνεται από την προσδιορισμένη δομή του οκταμερούς της κυστατίνης με κωδικό στη βάση PDB 1R4C (Janowski *et al.*, 2004).

3.2.6.2. Προσομοίωση πεπτιδίων-αναλόγων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$

Η υπολογιστική ανάλυση της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων-αναλόγων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ αποδεικνύει την τάση των πεπτιδίων να αλληλεπιδρούν με αντιπαράλληλη διευθέτηση. Στην Εικόνα 126 παρατηρούμε ότι έπειτα από υπολογιστικό χρόνο 100 ns τα πεπτιδία-ανάλογα έρχονται κοντά, ενώ η αλληλεπίδρασή τους διατηρείται και έπειτα από χρόνο 200 ns. Το αποτέλεσμα της προσομοίωσης εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς επιβεβαιώνει την πειραματική συνεπώαση των πεπτιδίων σε αναλογία 1:1 (Εικόνα 118), ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αντίστοιχη διευθέτηση καταγράφεται στο θεωρητικό μονοπάτι πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C,

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

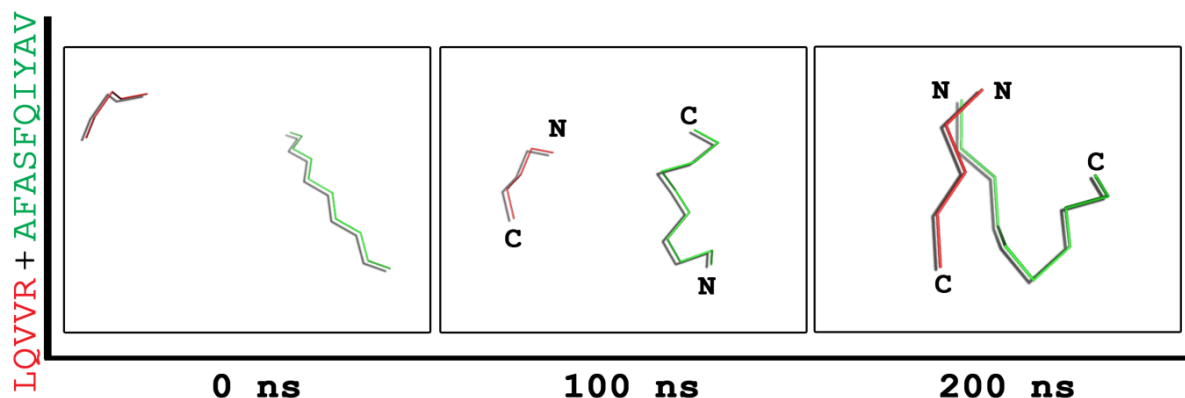
που προτάθηκε κατά αντιστοιχία με τον πολυμερισμό της ανθρώπινης στεφίνης Β (Εικόνα 117).



Εικόνα 126. Αλληλεπίδραση του συστήματος $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ - $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$. Παρατηρείται η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με αντιπαράλληλη διεύθυνση.

3.2.6.3. Προσομοίωση πεπτιδίων-αναλόγων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$

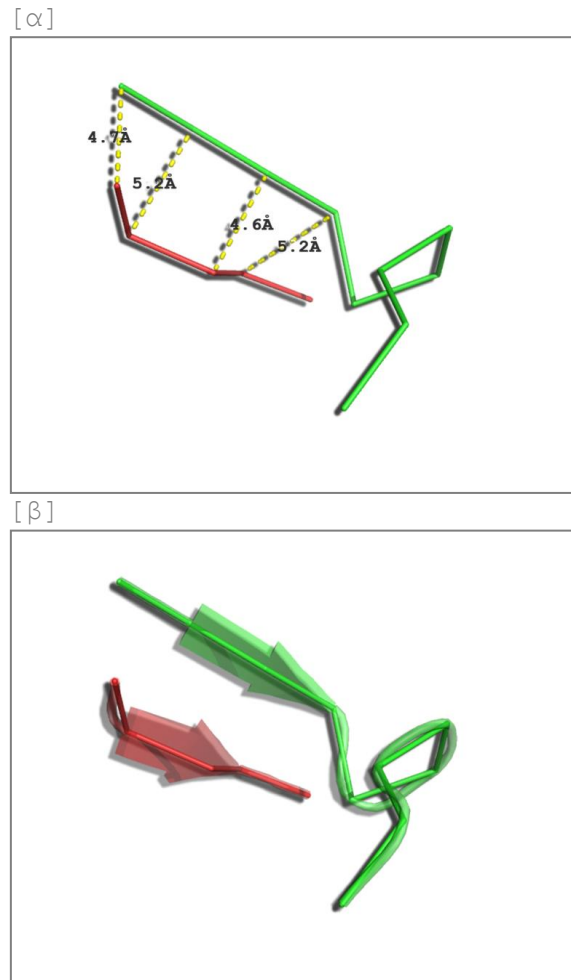
Η προσομοίωση μεταξύ των πεπτιδίων-αναλόγων $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$, όπως καταγράφεται υπολογιστικά, αποδεικνύει την παράλληλη διεύθυνση των μορίων στο χώρο. Η συνεύρεση καταγράφεται σε υπολογιστικό χρόνο ~ 200 ns (Εικόνα 127) και επιβεβαιώνει την πειραματική αλληλεπίδραση των πεπτιδίων, όπως έχουν καταγραφεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης.



Εικόνα 127. Αλληλεπίδραση του συστήματος $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ - $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. Παρατηρείται η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με παράλληλη διεύθυνση σε υπολογιστικό χρόνο 200 ns.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Κατά την αλληλεπίδραση τα αμινοτελικά τμήματα των δύο πεπτιδίων στα 200 ns διευθετούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπεται η δημιουργία δύο παράλληλων β-κλώνων (Εικόνα 128). Η μέση απόσταση μεταξύ αυτών μετρήθηκε στα 4.9 Å.



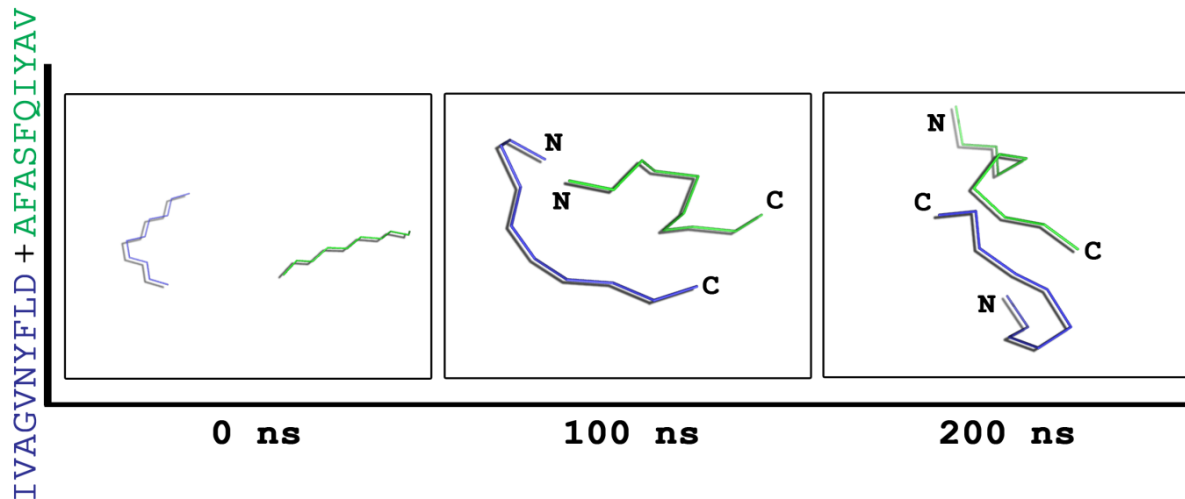
Εικόνα 128. Λεπτομέρεια από το στιγμιότυπο αλληλεπίδρασης του συστήματος $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ - $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. (α) Καταγράφεται η απόσταση μεταξύ των παρακείμενων β-κλώνων. (β) Απεικόνιση των β-κλώνων σε αναπαράσταση καρτούν, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PyMol (Delano, 2005).

3.2.6.4. Προσομοίωση πεπτιδίων-αναλόγων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$

Η προσομοίωση των δεκαπεπτιδίων $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ και $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$ παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς τα πεπτίδια εμφάνισαν μία ιδιαίτερη τάση αλληλεπίδρασης, έπειτα από χρόνο 200 ns. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 129, σε υπολογιστικό χρόνο 100 ns τα δεκαπεπτίδια βρίσκονται σε απόσταση ~ 7 Å, σε παράλληλη διεύθυνση, ενώ έπειτα από 100 ns τα βρίσκουμε σε απόσταση μικρότερη των 5 Å και σε

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

αντιπαράλληλη διεύθυνση. Τα υπολογιστικά ευρήματα εξηγούν την **ιδιάζουσα αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε κατά την παρατήρηση του διαλύματος συνεπώσης των πεπτιδίων** (Εικόνα 119), όπου καταγράφεται η εμφάνιση αμυλοειδών ινιδίων μορφολογίας ανεξάρτητης της αυτοσυγκρότησης των μεμονωμένων πεπτιδίων (Εικόνα 105, Εικόνα 111).

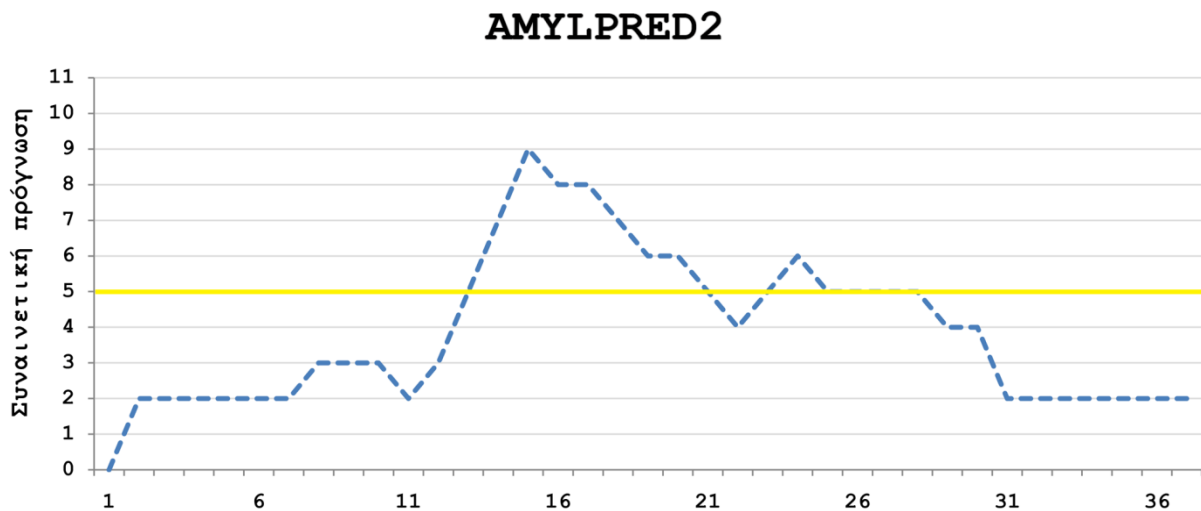


Εικόνα 129. Αλληλεπίδραση του συστήματος $^{56}\text{IVAGVNYFLD}^{65}$ - $^{95}\text{AFASFQIYAV}^{103}$. Παρατηρείται η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με αντιπαράλληλη διεύθυνση σε υπολογιστικό χρόνο 200 ns.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.3. Αμυλίνη

Η αμυλίνη υπήρξε μία από τις πρώτες αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες στις οποίες μελετήθηκε το αμυλοειδογόνο δυναμικό πεπτιδικών τμημάτων (Westermarck *et al.*, 1990). Τα μικρά πεπτιδικά τμήματα της αμυλίνης μπορεί να αποτελούνται από 4, 5 ή και περισσότερα κατάλοιπα και έχει προταθεί ότι συνεισφέρουν σημαντικά στην προώθηση της αμυλοειδογονικότητας του μορίου (Azriel and Gazit, 2001; Scrocchi *et al.*, 2003; Tenidis *et al.*, 2000), ενώ κατάλληλα τροποποιημένα τμήματα της ορμόνης έχουν χρησιμοποιηθεί ως πολλά υποσχόμενοι αναστολείς της συσσωμάτωσής της (Scrocchi *et al.*, 2002). Κατά συνέπεια, σήμερα σχεδόν όλο το μήκος της ακολουθίας της αμυλίνης έχει εκτενώς μελετηθεί, με έμφαση στις περιοχές 13-20 και 20-29, οι οποίες έχουν προταθεί ως περιοχές πυρήνωσης, κατά τη διαδικασία αμυλοειδογένεσης της πεπτιδικής ορμόνης. Σημαντικό εύρημα αποτελεί ο εντοπισμός μικρών πεπτιδικών θραυσμάτων της αμυλίνης *in vivo*, στο πάγκρεας, στο πλάσμα του αίματος και στο γαστρεντερικό σύστημα (Miyazato *et al.*, 1992).



Εικόνα 130. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ανθρώπινης αμυλίνης, όπως προβλέπεται από τον αλγόριθμο AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013). Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την συναινετική πρόγνωση του αλγορίθμου για πιθανές περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στην ανθρώπινη αμυλίνη. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*).

Ανάλυση της ακολουθίας της αμυλίνης, με το συναινετικό αλγόριθμο πρόγνωσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση AMYLPRED (Tsolis *et al.*, 2013), **αποκαλύπτει δύο πεπτιδικά τμήματα εντοπισμένα στην κεντρική περιοχή της ορμόνης** (Εικόνα 130). Συγκεκριμένα, το πεπτίδιο $^{13}\text{ANFLVHSSN}^{21}$ παρουσιάζει μία ισχυρή πρόβλεψη, σε αντίθεση

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

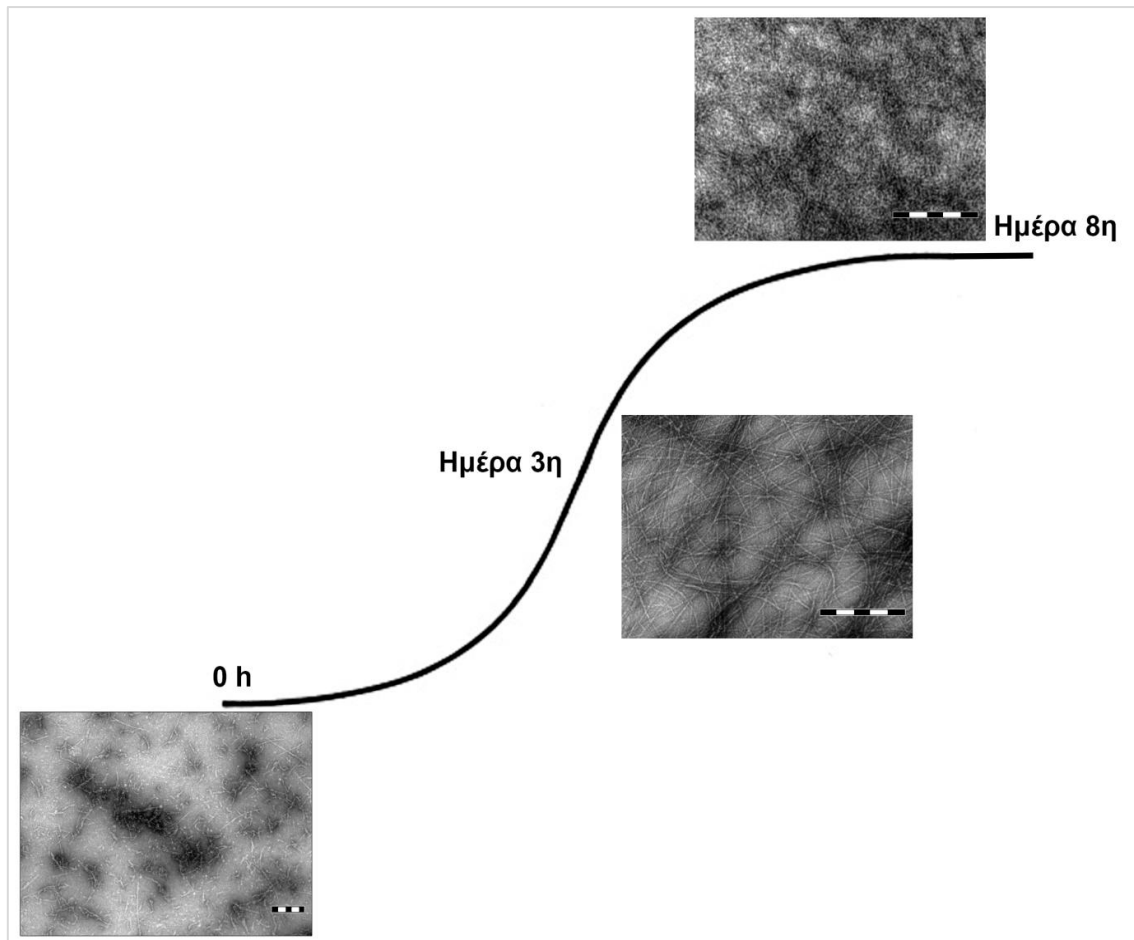
με το πεπτίδιο ²³FGAILS²⁸, η πρόβλεψη του οποίου βρίσκεται στο κατώφλι πρόβλεψης των 5 εκ των 11 αλγορίθμων που συνδυάζονται στον συναινετικό αλγόριθμο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το αποτέλεσμα της συναίνεσης των μεθόδων συμφωνεί απόλυτα με τις πειραματικές προσεγγίσεις που προτείνουν ότι, τα τμήματα 13-20 και 20-29 αποτελούν τις περιοχές πυρήνωσης κατά την αμυλοειδογένεση της ορμόνης (Buchanan *et al.*, 2013; Tenidis *et al.*, 2000; Westermarck *et al.*, 1990).

Η εκτενής ανάλυση των βιβλιογραφικών δεδομένων που αφορά τη μελέτη πεπτιδικών τμημάτων της αμυλίνης αποδεικνύει ότι **οι δύο περιοχές στις οποίες δεν έχει πραγματοποιηθεί στοχευμένη και συστηματική μελέτη σε επίπεδο πεπτιδίων-αναλόγων και μεταλλαγών είναι το αμινοτελικό (N-terminal) και καρβοξυτελικό (C-terminal) τμήμα της ορμόνης.** Στα αποτελέσματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα πειραματικά ευρήματα σε πεπτίδια-ανάλογα τόσο της αμινοτελικής όσο και της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης και οι προσπάθειες ανίχνευσης του αμυλοειδογόνου προφίλ στα ελλειπώς μελετημένα ακραία τμήματα της ορμόνης. Επιπρόσθετες μελέτες **συνδυαστικής επώασης των υπό μελέτη πεπτιδίων με την αμυλίνη** φυσικού τύπου βοήθησαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη σχεδίαση νέων πεπτιδίων-αναστολέων της αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης.

3.3.1. Δομικές μελέτες της ανθρώπινης αμυλίνης φυσικού τύπου

Οι αμυλοειδογόνες ιδιότητες της αμυλίνης φυσικού τύπου έχουν προηγουμένως ταυτοποιηθεί και μελετηθεί εκτενώς από πολλές ομάδες, σε ένα τεράστιο εύρος συνθηκών (Goldsbury *et al.*, 1997). Η αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής με απώτερο στόχο **την καταγραφή των ιδιοτήτων της πεπτιδικής ορμόνης σε όμοιες συνθήκες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στα πειράματα των ενοτήτων που ακολουθούν, καθώς και στην χρήση των δεδομένων ως ‘πειράματα ελέγχου’ / ή μάρτυρες στις περαιτέρω αναλύσεις.** Το 37 καταλοίπων πεπτίδιο προέκυψε από χημική σύνθεση από την GeneCust Europe, Luxembourg, είχε καθαρότητα >86%, σχηματισμένο τον δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των κυστεϊνών 2 και 7, ελεύθερο αμινοτελικό και αμιδιωμένο καρβοξυτελικό άκρο. Όλες οι χημικές τροποποιήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά αντιστοιχία με την κατάσταση στην οποία εντοπίζεται η ορμόνη εντός του ανθρώπινου οργανισμού (Cao *et al.*, 2013).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

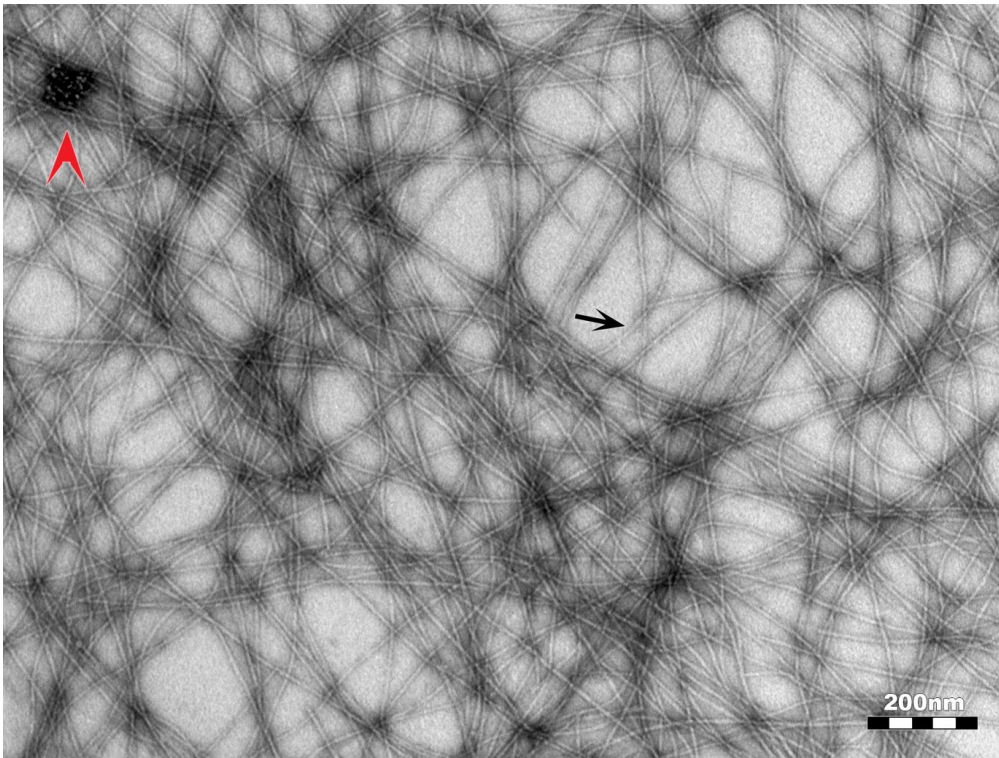


Εικόνα 131. Κινητική της αυτοσυγκρότησης της ανθρώπινης αμυλίνης σε ώριμα αμυλοειδή ινίδια. Η παρακολούθηση του φαινομένου της αυτοσυγκρότησης της αμυλίνης αποκάλυψε την αυτό-οργάνωση λεπτών αμυλοειδών ινιδίων σε ένα πυκνό δίκτυο αμυλοειδών ινιδίων, μέσα σε διάστημα μόλις 8 ημερών. Παρατηρούμε λεπτά ‘κατακερματισμένα’ ινίδια κατά το χρόνο 0 της διαλυτοποίησης (0h), τα οποία μετασχηματίζονται σε ώριμα αμυλοειδή ινίδια κατά την 3^η ημέρα επώασης. Ο πολυμερισμός των ινιδίων ολοκληρώνεται την 8^η ημέρα επώασης του πεπτιδίου, όπου και παρατηρείται δημιουργία πηκτώματος ώριμων αμυλοειδών ινιδίων (ημέρα 8^η) (Ράβδοι 200nm).

Διαλύματα της αμυλίνης προετοιμάστηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.5 έως και 10 mg ml⁻¹. Η αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ήταν ραγδαία, καθώς σε ειδικά παρασκευάσματα στα πρώτα μόλις λεπτά της διαλυτοποίησης παρατηρήθηκε η δημιουργία προϊνιδιακών συσσωματώματων, τα οποία μετασχηματίζονται σε ώριμα αμυλοειδή ινίδια, μόλις την πρώτη ημέρα επώασης του. Ειδικότερα η κινητική της αμυλοειδογένεσης της αμυλίνης φυσικού τύπου σε συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹ αποκάλυψε τη δημιουργία λεπτών θραυσμάτων ινιδίων, αμέσως μετά τη διαλυτοποίηση του πεπτιδίου σε απεσταγμένο νερό. Οι πρώιμες αυτές μορφές ινιδίων βρέθηκαν να κατανέμονται ομοιόμορφα στο παρασκεύασμα, το οποίο κατασκευάστηκε περίπου ~1 λεπτό μετά την προσθήκη του διαλύτη (Εικόνα 131, 0h). Ωριμα αμυλοειδή ινίδια

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

χαρακτηριστικής μορφολογίας παρατηρούνται σε παρασκευάσματα διαλυτοποιημένης αμυλίνης επώσης 3 ημερών (Εικόνα 131, ημέρα 3^η), όπου εντοπίζονται ευδιάκριτα, ώριμα αμυλοειδή ινίδια, χωρίς την παρουσία των πρώιμων μορφών που είχαν παρατηρηθεί προηγουμένως. Τέλος, μετά από χρόνο μίας εβδομάδας και συγκεκριμένα κατά την 8^η ημέρα επώσης του πεπτιδίου εντοπίζεται ένα ιδιαίτερος πυκνό δίκτυο ινιδίων (Εικόνα 131, ημέρα 8^η). Στην τελευταία περίπτωση η πυκνότητα του δικτύου δυσχεραίνει την παρατήρηση των μοναδιαίων ινιδιακών μορφών.

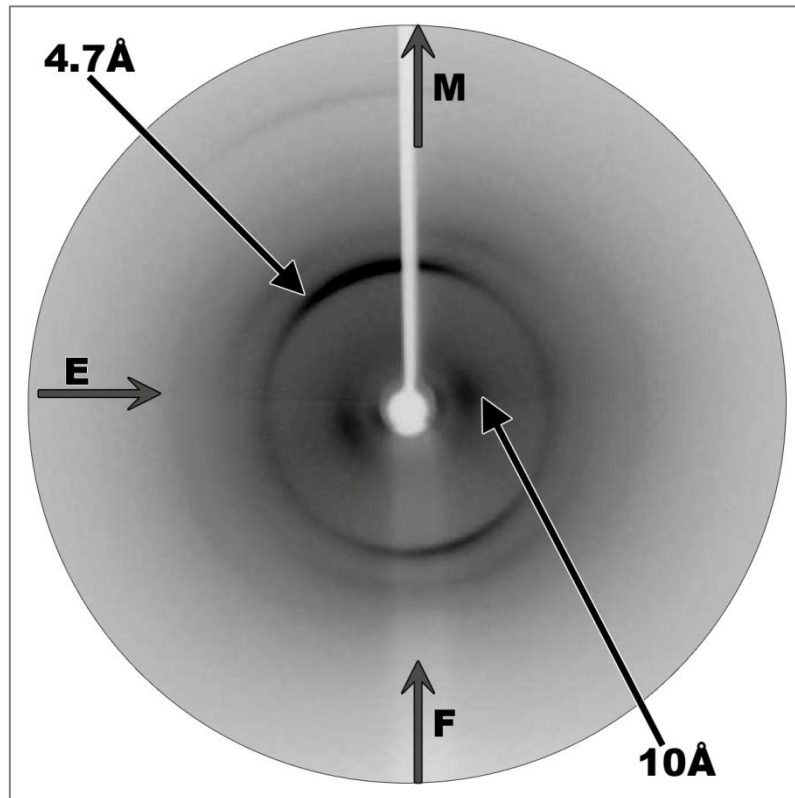


Εικόνα 132. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης πηκτώματος αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση της ανθρώπινης αμυλίνης (0.5 mg ml^{-1}) σε υδατικό διάλυμα. Τα ινίδια έχουν υποστεί αρνητική χρώση (οξικό ουρανύλιο 2%). Το βέλος σημειώνει ένα μοναδιαίο ινίδιο διαμέτρου 100 Å, ενώ η κόκκινη αιχμή βέλους σημειώνει ένα δεμάτι ώριμων αμυλοειδών ινιδίων.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου στο διάλυμα είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πηκτωμάτων, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις ήταν δύσκολο να μελετηθούν με ηλεκτρονική μικροσκοπία λόγω της πυκνότητάς του. Η συγκέντρωση των 0.5 mg ml^{-1} κρίθηκε η καταλληλότερη για την παρατήρηση της μορφολογίας και του πολυμορφισμού των αμυλοειδών ινιδίων της αμυλίνης (Εικόνα 132). Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου που παρουσιάζονται στην Εικόνα 132 παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, έπειτα από αρνητική

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

χρώση και αφορούν διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 mg ml^{-1} και επώασης 7 ημερών. Παρατηρούμε ένα ιδιαίτερος πυκνό δίκτυο ομοιόμορφων, αδιακλάδιστων και απροσδιορίστου μήκους ινιδίων, που έχουν διάμετρο $\sim 100 \text{ \AA}$ (Εικόνα 132, βέλος). Η κόκκινη αιχμή του βέλος στην Εικόνα 132 επισημαίνει τη δημιουργία δεματίου ώριμων αμυλοειδών ινιδίων αμυλίνης.

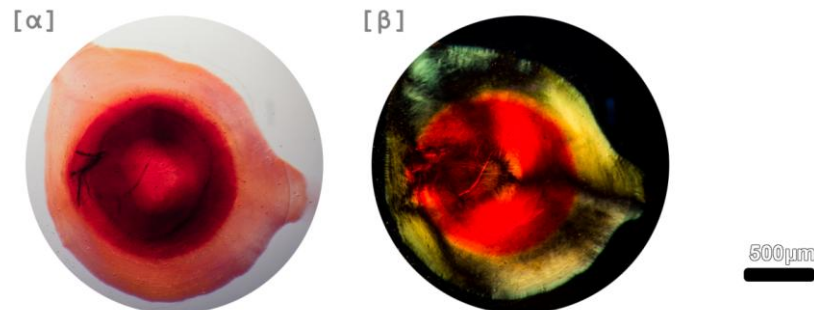


Εικόνα 133. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια της ανθρώπινης αμυλίνης. Διακρίνονται οι δύο χαρακτηριστικές ανακλάσεις της cross-β δομής, η μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.7 \AA και η ισημερινή ανάκλαση στα 10 \AA . Ο προσανατολισμός των αμυλοειδών ινιδίων είναι ευδιάκριτος από την εμφάνιση τόξων τόσο στο μεσημβρινό (M) άξονα, όσο και στον ισημερινό (E) άξονα. Ο άξονας της ίνας σημειώνεται με την ένδειξη F.

Το προσανατολισμένο περιθλασίγραμμα ακτίνων-X, το οποίο συλλέχθηκε από ευθυγραμμισμένη ίνα των ινιδίων της ανθρώπινης αμυλίνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 133. Η παρουσία δύο ισχυρών ανακλάσεων σε περιοδικότητες 4.7 και 10 \AA , υποδηλώνει ότι τα ινίδια της αμυλίνης οργανώνονται στην χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια cross-β αρχιτεκτονική (Sunde and Blake, 1997). Τέλος, η δέσμευση της χρωστικής Congo Red και η εμφάνιση της χαρακτηριστικής κιτρινοπράσινης διπλοθλαστικότητας σε υμένα που

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

δημιουργούνται από διαλυτοποιημένη αμυλίνη, επιβεβαιώνουν την ύπαρξη τυπικών αμυλοειδών ινιδίων.



Εικόνα 134. Φωτομικρογραφίες από υμένιο που δημιουργούν τα αμυλοειδή ινίδια της ανθρώπινης αμυλίνης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, έπειτα από χρώση με Congo red. (α) Παρατηρούμε τη δέσμευση της χρωστικής Congo red με μη διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. (β) Η κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα είναι εμφανής με διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου.

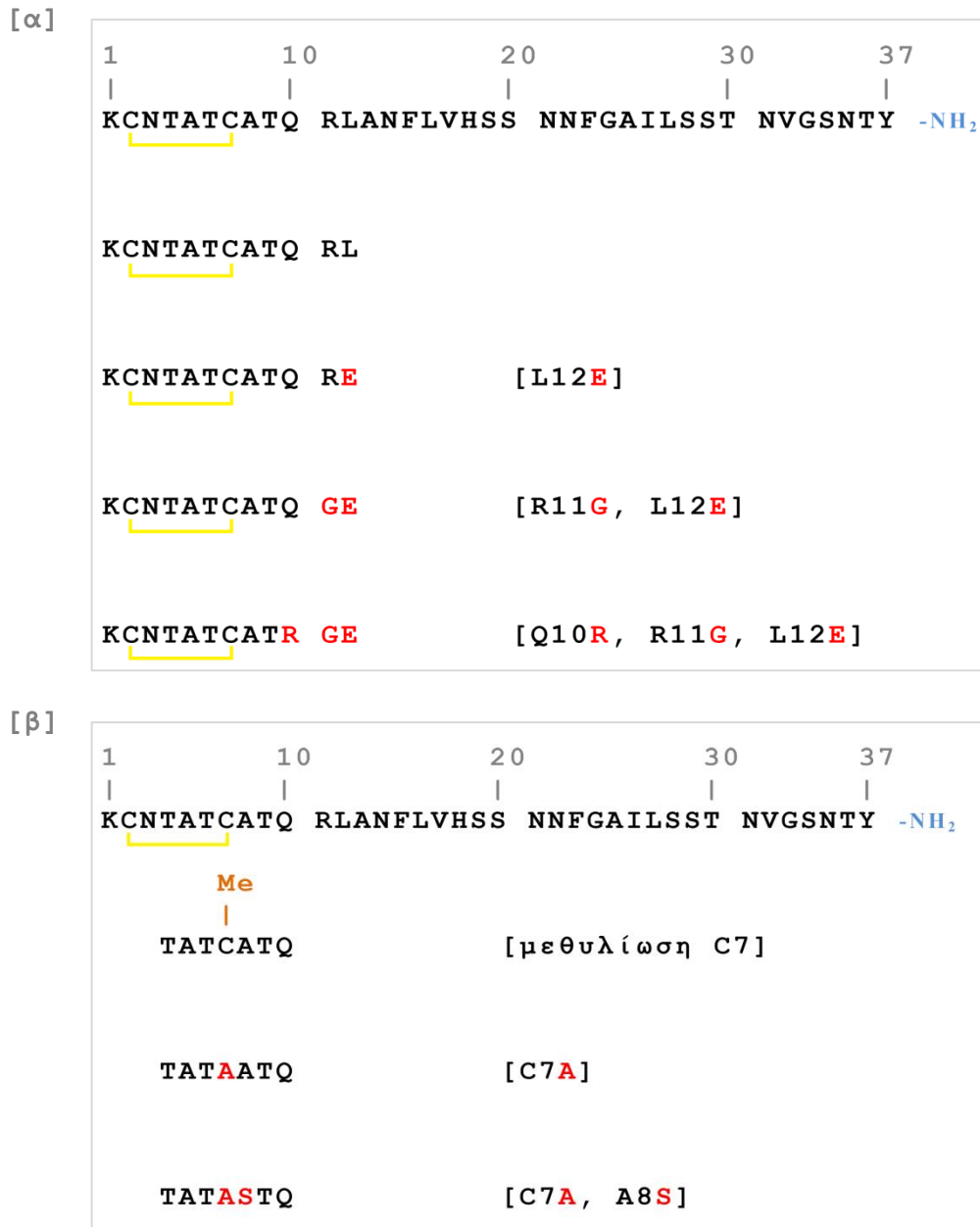
3.3.2. Δομικές μελέτες της αμινοτελική περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης

Η αμινοτελική περιοχή της ανθρώπινης αμυλίνης είχε μέχρι σήμερα μελετηθεί εσκεμμένα ελλιπώς, λόγω της ύπαρξης της δισουλφιδικής γέφυρας. Βιβλιογραφικά οι απόψεις για τη σημασία των δισουλφιδικών δεσμών στην αμυλοειδογονικότητα των πρωτεϊνών είναι αντικρουόμενες. Αφενός, πειραματικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί που υπάρχουν φυσιολογικά στις δομές των πρωτεϊνών δεν συμμετέχουν στη διαδικασία συσσωμάτωσής τους. Η ινσουλίνη, για παράδειγμα, σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια σε όξινες συνθήκες, ενώ και οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί της, τόσο οι διαμοριακοί όσο και ο ενδομοριακός, παραμένουν ανέπαφοι (KurouSKI *et al.*, 2012). Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έδειξαν ότι, ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που συμμετέχει στο σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού μπορεί να συμβάλλει τοπικά στη σταθερότητα του τμήματος που φέρει το κατάλοιπο κυστεΐνης και να κάνει την περιοχή λιγότερο επιρρεπή προς συσσωμάτωση (Grana-Montes *et al.*, 2012).

Αντίθετα, είναι σημαντικό να καταλάβουμε τις μελέτες εκείνες που προτείνουν ότι οι δισουλφιδικές γέφυρες μπορεί να συνεισφέρουν στο σχηματισμό οργανωμένων δομών και άρα, μπορεί να σχετιστούν εν γένει με την αμυλοειδογονικότητα των πρωτεϊνών (Li *et al.*, 2013), καθώς πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι τα αμυλοειδή ινίδια μπορεί να σταθεροποιούνται από διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

δισουλφιδικών δεσμών, παρόλο που οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα σαφείς. Ένα παράδειγμα αποτελεί η α-συνουκλείνη, η οποία συσσωματώνεται ραγδαία μετά την δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών (Suk *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2004).



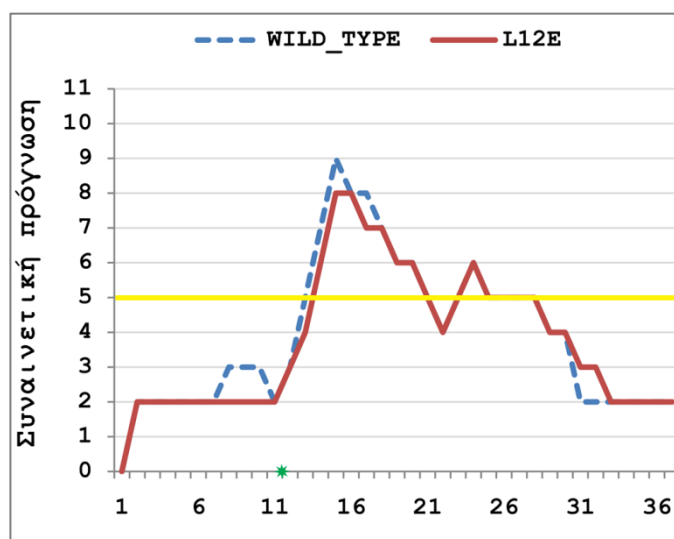
Εικόνα 135. Οι αλληλουχίες των δύο υπό μελέτη ομάδων πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημαϊκές μεταλλαγές των αμινοξικών καταλοίπων. (α) Η ομάδα μελέτης πεπτιδίων-αναλόγων της περιοχής 1-12 της ανθρώπινης αμυλίνης. (β) Η ομάδα μελέτης πεπτιδίων-αναλόγων της περιοχής 4-10 της ανθρώπινης αμυλίνης.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Στην περίπτωση της αμυλίνης, ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης 2 και 7 είναι ένα συντηρημένο στοιχείο της δευτεροταγούς δομής ολόκληρης της οικογένειας των CGRP πεπτιδικών ορμονών, μιας και λειτουργεί ως επίτοπος αλληλεπίδρασης μεταξύ των ορμονών και των υποδοχέων που ενεργοποιούν (Poynier *et al.*, 1993). Μελέτες συσσωμάτωσης του Core και των συνεργατών του έχουν δείξει ότι το πεπτιδικό τμήμα της αμυλίνης 1-8 σχηματίζει άμορφα συσσωματώματα που είναι ορατά ακόμα και μακροσκοπικά, ενώ στην ίδια εργασία διατυπώθηκε ότι, αποκοπή του δισουλφιδικού δεσμού της αμυλίνης αναστέλλει τη συσσωμάτωση ολόκληρης της ορμόνης (Core *et al.*, 2013).

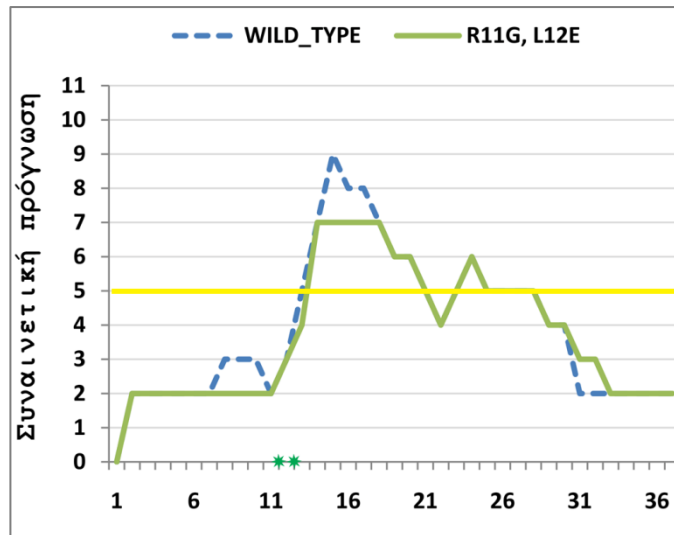
Η ανάλυση του προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου αποδεικνύει μία ασθενή τάση συσσωμάτωσης για το αμινοτελικό άκρο (Εικόνα 130). Λογικά σχεδιασμένες παραλλαγές που τροποποιούν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της περιοχής του αμινοτελικού άκρου της αμυλίνης επέτρεψαν τη μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της. Στην πρώτη ομάδα μεταλλαγών που παρουσιάζονται στην Εικόνα 135 το τμήμα 1-8 παρέμεινε ανέπαφο, ενώ μεταλλαγές πραγματοποιήθηκαν μεμονωμένες και συνδυαστικά στα κατάλοιπα γλουταμίνη 10, αργινίνη 11 και λευκίνη 12. Σε κάθε περίπτωση η υδρόφοβη λευκίνη 12 αντικαθίσταται από το αρνητικά φορτισμένο γλουταμικό, ενώ η θετικά φορτισμένη αργινίνη μεταλλάχθηκε σε γλυκίνη. Το πεπτίδιο ανάλογο φυσικού τύπου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι στοχευμένες μεταλλαγές αλλάζουν το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ορμόνης, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα ιστογράμματα στην Εικόνα 136.

[α]

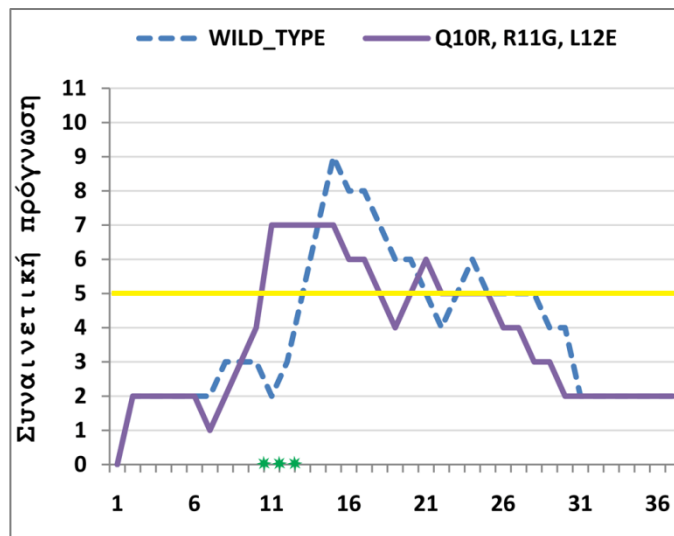


Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

[β]



[γ]



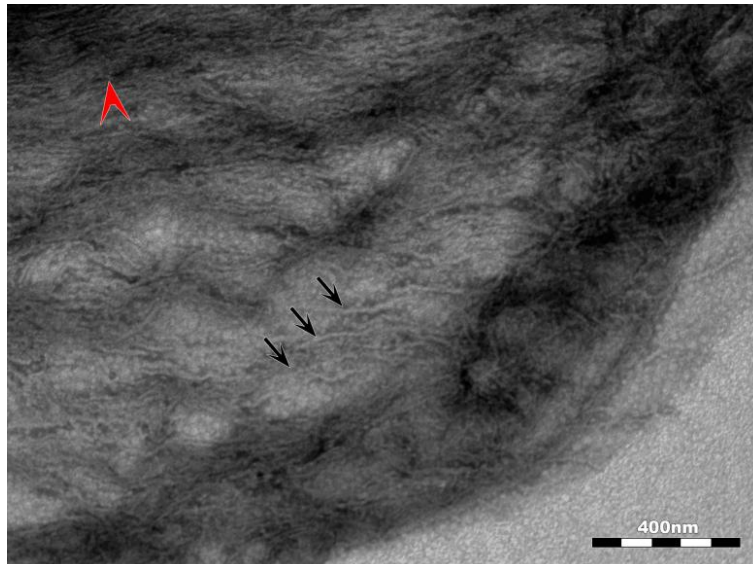
Εικόνα 136. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου και των μεταλλαγών της στην περιοχή 1-12 του αμινοτελικού άκρου. Η στικτή γραμμή αναπαριστά την πρόγνωση του αλγορίθμου AMYLPRED για την αμυλίνη φυσικού τύπου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Παρατηρούμε ότι οι νεοεισαχθείσες μεταλλαγές (πράσινα αστέρια) μειώνουν σε κάθε περίπτωση το αμυλοειδογόνο δυναμικό της ορμόνης φυσικού τύπου.

Τα πεπτίδια-ανάλογα της αμινοτελική περιοχής της αμυλίνης $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$, $^1\text{KCNTATCATQRE}^{12}$, $^1\text{KCNTATCATQGE}^{12}$ και $^1\text{KCNTATCATRGE}^{12}$ συντέθηκαν χημικά με τη συνδρομή του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Διαλύματα των πεπτιδίων δημιουργήθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, σε απεσταγμένο νερό με pH 5.75 και παρατηρήθηκαν για διάστημα ~6 μηνών. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε παρασκευάσματα που δημιουργήθηκαν από το πεπτίδιο-ανάλογο φυσικού τύπου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ επιβεβαίωσε την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου σε ινίδια,

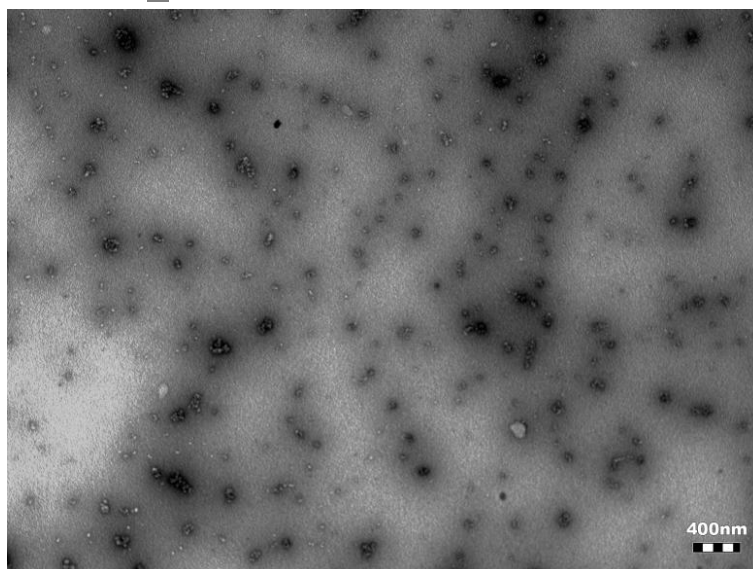
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

διαμέτρου ~ 120 Å, που μοιράζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 137α, βέλη). Τα αμυλοειδή ινίδια εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν πλευρικά δημιουργώντας δεμάτια (Εικόνα 137α, κόκκινη αιχμή βέλους), τα οποία με τη σειρά τους δομούν πυκνά πλέγματα ινιδίων. Η τάση αυτή ήταν εμφανής ακόμα και μακροσκοπικά, μιας και η κατανομή του δείγματος στο πλέγμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δεν ήταν κανονική, αλλά κομμάτια πηκτώματος εμφανίζονταν διεσπαρμένα σε όλο το πλέγμα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί με μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM) στο πεπτιδιο-ανάλογο $^1\text{KCNTATCA}^8$, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μορφολογία των ινιδίων έχει άμεση συσχέτιση με την ύπαρξη της δισουλφιδικής γέφυρας (Core *et al.*, 2013).

[α] $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$

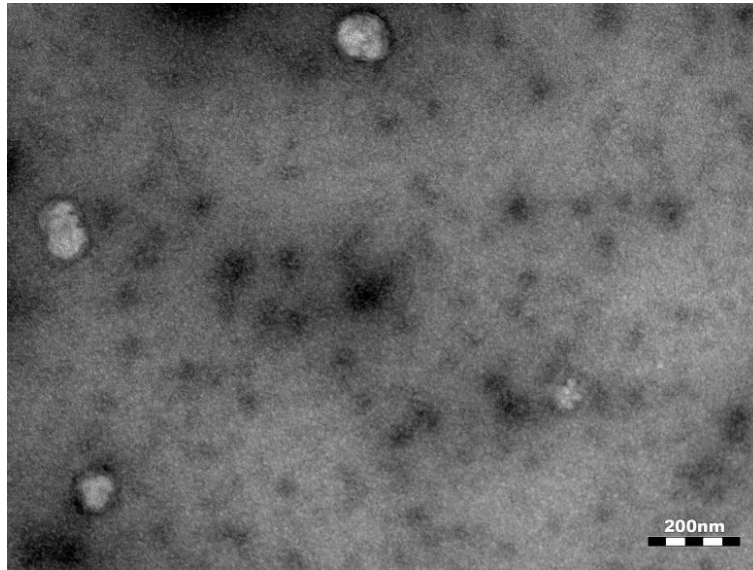


[β] $^1\text{KCNTATCATQRE}^{12}$

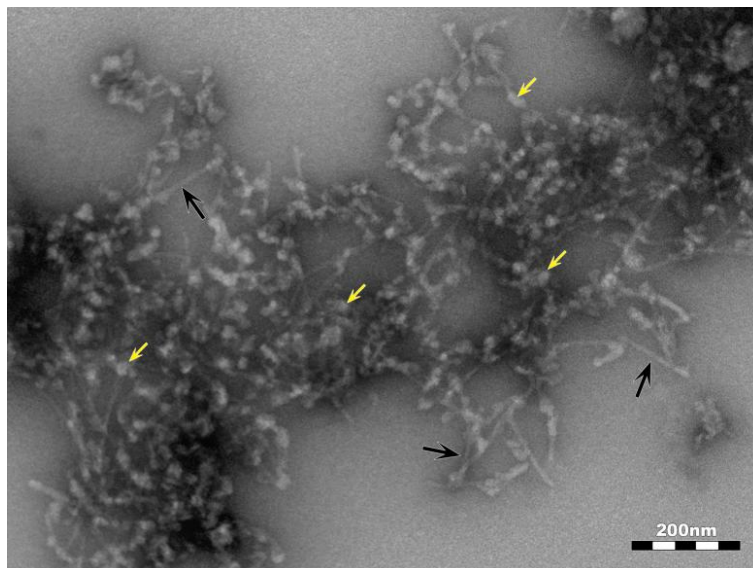


Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

[γ] $^1\text{KCNTATCATQGE}^{12}$



[δ] $^1\text{KCNTATCATRGE}^{12}$

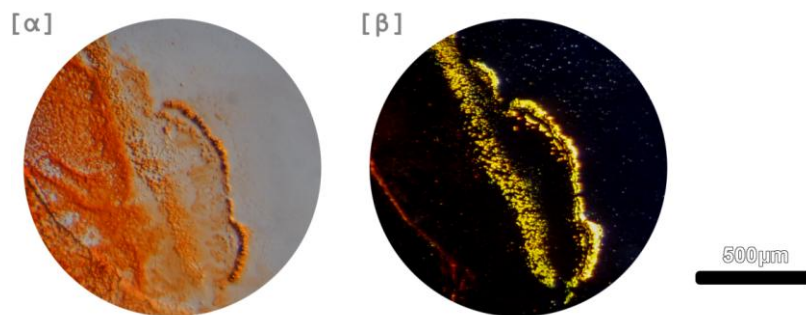


Εικόνα 137. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής 1-12 της ανθρώπινης αμυλίνης. Τα πεπτίδια-ανάλογα διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό, pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml^{-1} . Οι ηλεκτρονιογραφίες παρουσιάζουν δείγματα μετά από επώαση 7 ημερών.

Αντιθέτως, τα πεπτίδια ανάλογα $^1\text{KCNTATCATQRE}^{12}$ και $^1\text{KCNTATCATQGE}^{12}$, που φέρουν δραστικές αλλαγές στα κατάλοιπα των θέσεων 12 και 11, 12, αντίστοιχα, αδυνατούν να οργανωθούν και να δημιουργήσουν αντίστοιχες δομές με το πεπτίδιο-ανάλογο φυσικού τύπου. Συγκεκριμένα, το πεπτίδιο-ανάλογο $^1\text{KCNTATCATQGE}^{12}$, εμφανίζει την τάση να δημιουργεί τόσο σκωληκοειδή (worm-like) συσσωματώματα, όσο και σφαιρικές πρωτεϊνικές δομές (Εικόνα 137γ). Η εμφάνιση των σφαιρικών δομών και η

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

διατήρησή τους ακόμα και έπειτα από 6 μήνες επώασης έρχεται σε αντίθεση με τις σφαιρικές πρωτεϊνικές δομές που συναντώνται σε άλλες αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες και θεωρούνται σχηματισμοί των πρώιμων σταδίων της αμυλοειδογένεσης (Hamodrakas *et al.*, 2004). Τέλος, προς έκπληξή μας, το πεπτιδίο-ανάλογο $^1\text{KCNTATCATRGE}^{12}$ με 3 δραστικές αλλαγές στις θέσεις 10, 11 και 12, εμφανίζει δύο διακριτούς πρωτεϊνικούς πληθυσμούς. Αφενός παρουσιάζει την τάση να αυτοσυγκροτείται σε ινίδια με την τυπική διάμετρο των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 137δ, μαύρο βέλος), ενώ αφετέρου αξιοσημείωτη είναι η διακόσμηση των ινιδίων από την ομοίμορφη προσκόλληση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στην επιφάνειά τους (Εικόνα 137δ, κίτρινα βέλη).



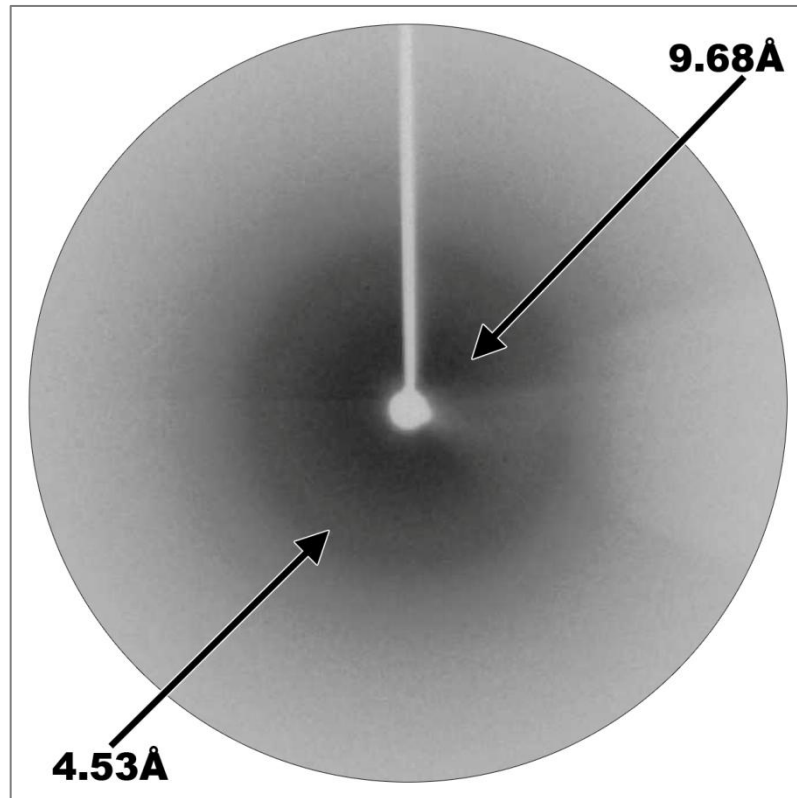
Εικόνα 138. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (β).

Τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου-αναλόγου φυσικού τύπου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ ταυτοποιήθηκαν από όλα τα κριτήρια που πληρούν οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ (συγκέντρωσης 10 mg ml^{-1} και επώασης 14 ημερών) κατέγραψε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red (Εικόνα 138α) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 138β).

Επιπρόσθετα, προσανατολισμένες ίνες που δημιουργούνται έπειτα από την ευθυγράμμιση των ινιδίων του πεπτιδίου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ δίνουν χαρακτηριστικά περιθλασιγράμματα της cross-β δομής, επισημαίνοντας ότι η αρχιτεκτονική των ινιδίων του δωδεκαπεπτιδίου στο χώρο ταυτίζεται με εκείνη των αμυλοειδών ινιδίων (Sunde and Blake, 1997). Οι ασθενείς και διάχυτες ανακλάσεις στα 4.53 \AA και στα 9.68 \AA αποδίδονται

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών κλώνων και στο πακετάρισμα διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών, αντίστοιχα (Εικόνα 139). Η εμφάνιση δακτυλίων και όχι τόξων, είναι γνώρισμα της μη κανονικής ευθυγράμμισης των ινιδίων στην προς μελέτη ίνα.

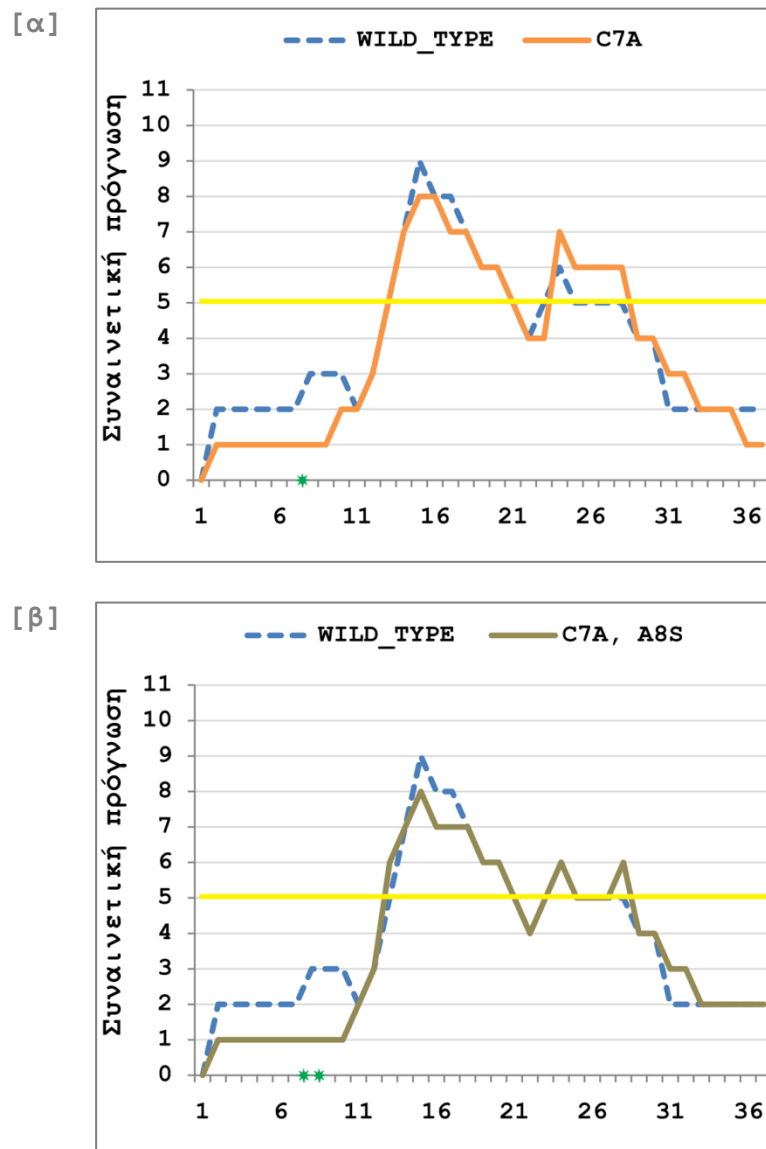


Εικόνα 139. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$. Στο περιθλασίγραμμα καταγράφονται ανακλάσεις χαρακτηριστικές της cross-β δομής. Οι ανακλάσεις παρουσιάζονται ασθενείς και διάχυτες λόγω της μη κανονικής ευθυγράμμισης των ινιδίων στην προς μελέτη ίνα.

Στη δεύτερη ομάδα μεταλλαγών που αφορά το αμινοτελικό άκρο της αμυλίνης τροποποιήθηκε η αμινοξική σύσταση στην περιοχή της κυστεΐνης 7. Συγκεκριμένα, **σχεδιάστηκαν τρεις παραλλαγές του πεπτιδικού τμήματος $^4\text{TATCATQ}^{10}$, τα πεπτίδια $^4\text{TATAATQ}^{10}$ και $^4\text{TATASTQ}^{10}$** . Η πρώτη παραλλαγή ($^4\text{TATCATQ}^{10}$) είχε στόχο τη μελέτη του πεπτιδίου φυσικού τύπου, στο οποίο πραγματοποιήθηκε χημική τροποποίηση της πλευρικής της αλυσίδας της κυστεΐνης για την αποφυγή ανεπιθύμητων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων στο διάλυμα (προσθήκη μεθυλομάδας). Στην περίπτωση της δεύτερης παραλλαγής ($^4\text{TATAATQ}^{10}$) το κατάλοιπο της κυστεΐνης 7 αντικαταστάθηκε από μία αλανίνη, ενώ τέλος στην τρίτη παραλλαγή ($^4\text{TATASTQ}^{10}$) πραγματοποιείται διπλή τροποποίηση τόσο στο κατάλοιπο 7, όσο και στο κατάλοιπο 8. Όμοια με την προηγούμενη

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

ομάδα μελέτης της αμινοτελικής περιοχής, οι στοχευμένες μεταλλάξεις αλλάζουν το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ορμόνης (Εικόνα 140). Αντικατάσταση των κυστεϊνών στις θέσεις 2 και 7 φαίνεται ότι καθυστερεί την αμυλοειδογένεση της αμυλίνης, καθώς σύμφωνα με ευρήματα των Jayasinghe και Langen, η φάση πυρήνωσης της πρωτεΐνης αυξάνεται έπειτα από διπλή μεταλλαγή των κυστεϊνών 2 και 7 σε αλανίνες (Jayasinghe and Langen, 2004).



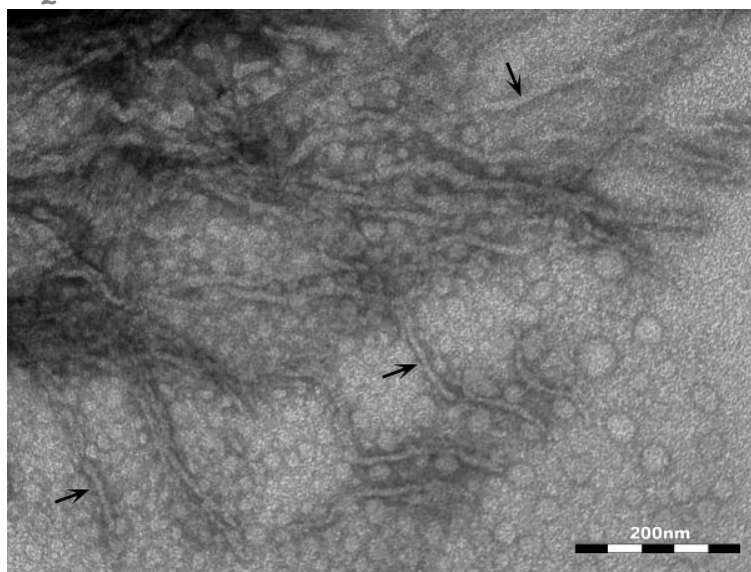
Εικόνα 140. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου και των μεταλλαγών της στην περιοχή 4-10 του αμινοτελικού άκρου. Η στικτή γραμμή αναπαριστά την πρόγνωση του αλγορίθμου AMYLPRED για την αμυλίνη φυσικού τύπου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Παρατηρούμε ότι οι νεοεισαχθείσες μεταλλάξεις (πράσινα αστέρια) μειώνουν σε κάθε περίπτωση το αμυλοειδογόνο δυναμικό της ορμόνης φυσικού τύπου.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης στα παραπάνω πεπτίδια ανάλογα έφερε στο φως πολλές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις για τις ιδιότητες του τμήματος 4-10 της αμυλίνης. Ειδικότερα το πεπτίδιο-ανάλογο ${}^4\text{TATCATQ}^{10}$ αυτοσυγκροτείται σε ινίδια διαμέτρου $\sim 80 \text{ \AA}$ (Εικόνα 141α), με αξιοσημείωτη την ομοιότητά τους με το φυσικού τύπου πεπτίδιο-ανάλογο ${}^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ (Εικόνα 137α). Αντίθετα, το πεπτίδιο ανάλογο ${}^4\text{TATAATQ}^{10}$, με μία μόνο συντηρητική αλλαγή της κυστεΐνης σε αλανίνη παρατηρήθηκε αδύνατο να αυτοσυγκροτηθεί σε αμυλοειδή ινίδια, ακόμα και μετά από αρκετούς μήνες επώασης σε συνθήκες δωματίου (Εικόνα 141β).

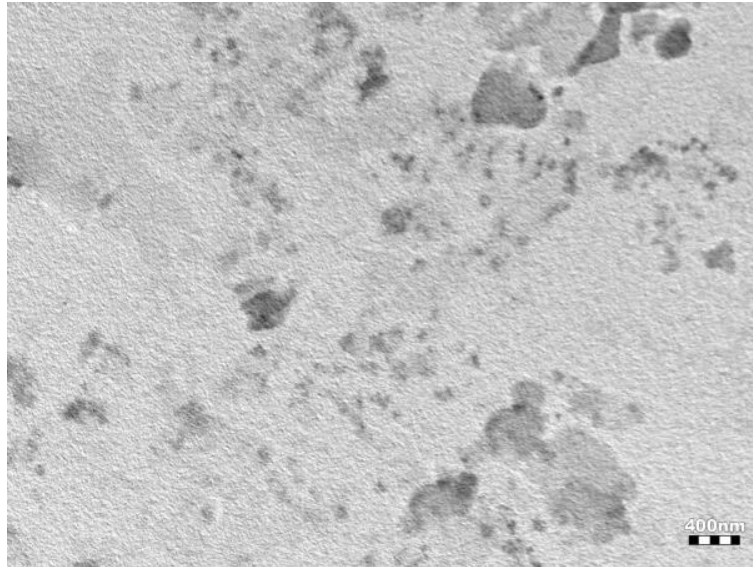
Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση του πεπτιδίου-αναλόγου ${}^4\text{TATASTQ}^{10}$ με δύο συντηρητικές τροποποιήσεις στις θέσεις 7 και 8. Προς έκπληξή μας οι συγκεκριμένες αμινοξικές αντικαταστάσεις οδήγησαν στη δημιουργία ενός υψηλά αμυλοειδογόνου πεπτιδίου-αναλόγου, το οποίο αυτοσυγκροτείται σε τυπικά ινίδια, που παρουσιάζουν σαφώς τις ιδιότητες των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 141γ). Τα ινίδια παρουσιάζονται ομοιόμορφα, ευθύγραμμα, αδιακλάδιστα, με απροσδιόριστο μήκος, ενώ έχουν διάμετρο $\sim 100 \text{ \AA}$. Με τα μικρά μαύρα βέλη παρατηρούμε πρωτοϊνίδια διαμέτρου $\sim 50\text{-}60 \text{ \AA}$ τα οποία περιελίσσονται μεταξύ τους προς το σχηματισμό χαλαρών υπερελίκων. Αξιοσημείωτη είναι εμφάνιση ινιδίων σε δύο επίπεδα· λεπτά πρωτοϊνίδια φαίνεται να διευθετούνται κανονικά διακοσμώντας το ‘φόντο’ του παρασκευάσματος, ενώ ώριμα αμυλοειδή ινίδια με χαρακτηριστικό πολυμορφισμό τοποθετούνται ‘σε πρώτο πλάνο’ πάνω από τα πρωτοϊνίδια.

[α] ${}^4\text{TATCATQ}^{10}$

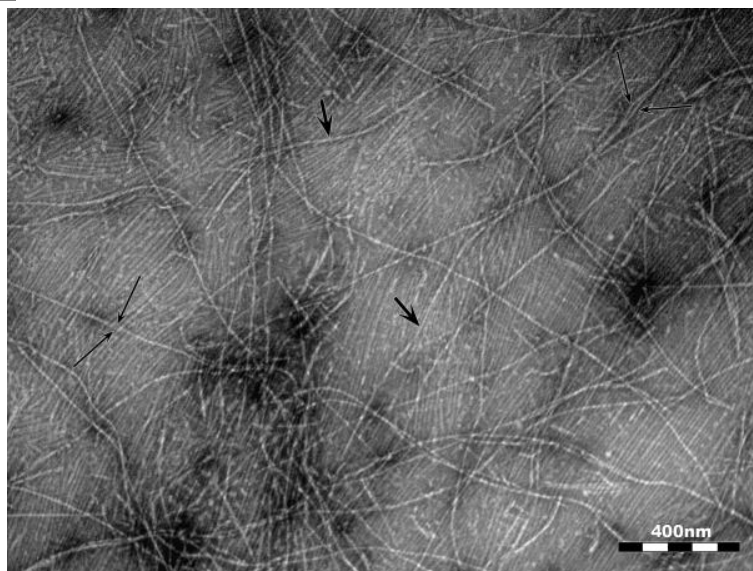


Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

[β] ${}^4\text{TAT}\underline{\text{AATQ}}^{10}$



[γ] ${}^4\text{TAT}\underline{\text{ASTQ}}^{10}$

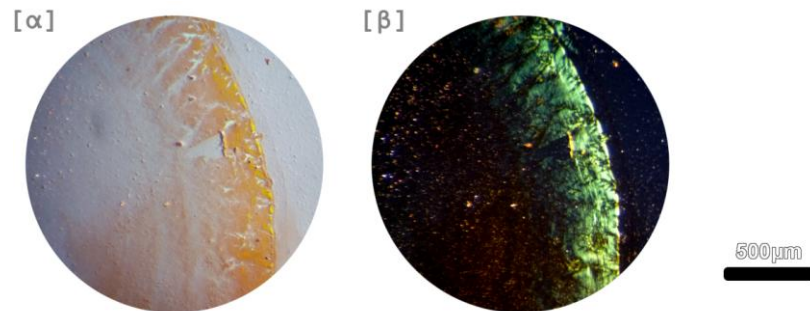


Εικόνα 141. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής 4 - 10 της ανθρώπινης αμυλίνης. Τα πεπτιδία-ανάλογα διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml^{-1} . Οι ηλεκτρονιογραφίες παρουσιάζουν δείγματα επώασης 7 ημερών.

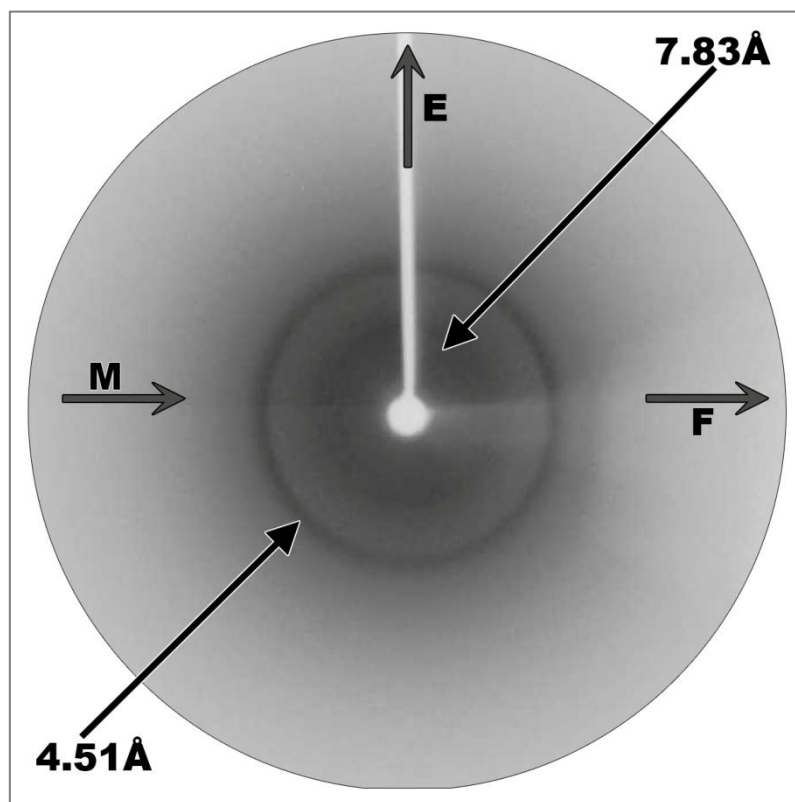
Τα αμυλοειδή ινίδια του τροποποιημένου πεπτιδίου-αναλόγου ${}^4\text{TAT}\underline{\text{ASTQ}}^{10}$ ταυτοποιήθηκαν από όλα τα κριτήρια που πληρούν οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου ${}^4\text{TAT}\underline{\text{ASTQ}}^{10}$ (συγκέντρωσης 10 mg ml^{-1} και επώασης 7 ημερών) κατέγραψε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red (Εικόνα 142α) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 142β). Ακόμα, προσανατολισμένες ίνες που

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

δημιουργούνται έπειτα από την ευθυγράμμιση των ινιδίων του πεπτιδίου ${}^4\text{TATASTQ}^{10}$ δίνουν χαρακτηριστικά περιθλασιγράμματα της cross- β δομής, χαρακτηριστική όλων των αμυλοειδών ινιδίων (Sunde and Blake, 1997). Οι προσανατολισμένες ανακλάσεις στα 4.51 Å και στα 7.83 Å αποδίδονται στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών κλώνων και στο πακετάρισμα διαδοχικών β -πτυχωτών επιφανειών, αντίστοιχα (Εικόνα 139).



Εικόνα 142. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του πεπτιδίου έπειτα από χρώση με Congo Red ${}^4\text{TATASTQ}^{10}$. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (β).



Εικόνα 143. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ${}^4\text{TATASTQ}^{10}$. Στο περιθλασίγραμμα καταγράφονται μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.51 Å (M) και μία ισημερινή ανάκλαση στα 7.83 Å (E), χαρακτηριστικές της cross- β δομής (Sunde and Blake, 1997).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

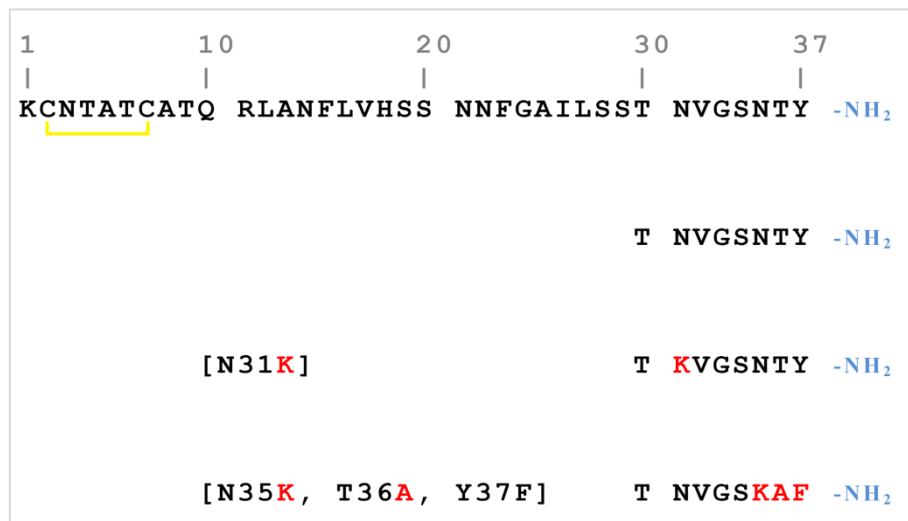
Συνολικά, αξιοσημείωτη είναι η ομοιότητα των ινιδίων που δημιουργούνται κατά την αυτοσυγκρότηση τόσο του δωδεκαπεπτιδίου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$ (Εικόνα 137α), όσο και του επταπεπτιδίου $^4\text{TATCATQ}^{10}$ (Εικόνα 141α). Φυσικά το περιβάλλον επώασης των πεπτιδίων έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του δισουλφιδικού δεσμού του πεπτιδίου $^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$. Έτσι, οι στοχευμένες αλλαγές στο αμινοτελικό τμήμα της αμυλίνης αποκάλυψαν τη σημαντική συνεισφορά τόσο της δισουλφιδικής γέφυρας της αμυλίνης, όσο και της καθεαυτής αλληλουχίας των αμινοξικών καταλοίπων που το συγκροτούν.

Ειδικότερα μεταλλαγές στο τμήμα 1-12 οδήγησαν στη δημιουργία δύο μη αμυλοειδογόνων ($^1\text{KCNTATCATQRE}^{12}$, $^1\text{KCNTATCATQGE}^{12}$) και ενός αμυλοειδογόνου αναλόγου ($^1\text{KCNTATCATRGE}^{12}$). Η συμπεριφορά των τριών πεπτιδίων σε υδατικά διαλύματα σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του πεπτιδίου φυσικού τύπου ($^1\text{KCNTATCATQRL}^{12}$) μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα κατάλοιπα Q10, R11 και L12 συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση της αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης. Από την άλλη μεριά, οι τροποποιήσεις στο τμήμα 4-10 οδήγησαν στη δημιουργία ενός μη αμυλοειδογόνου αναλόγου ($^4\text{TATAATQ}^{10}$) και ενός ραγδαία αμυλοειδογόνου αναλόγου ($^4\text{TATASTQ}^{10}$), αποτελέσματα που εστιάζουν ειδικότερα το ενδιαφέρον της αμινοτελικής περιοχής στις θέσεις C7 και A8. Το τροποποιημένο πεπτιδιο-ανάλογο $^4\text{TATCATQ}^{10}$, φαίνεται πως ακολουθεί διαφορετικό μονοπάτι συσσωμάτωσης από το τροποποιημένο αμυλοειδογόνο πεπτιδιο-ανάλογο $^4\text{TATASTQ}^{10}$ οδηγώντας στη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων ξεχωριστής μορφολογίας. Σημαντικά, η τροποποίηση του καταλοίπου της κυστεΐνης 7, αποδεικνύεται ότι τροποποιεί τις ιδιότητες της ορμόνης, σε συμφωνία και με τα πρόσφατα ευρήματα του Core και των συνεργατών του (Core *et al.*, 2013), σε αντίθεση με παλαιότερα υπολογιστικά αποτελέσματα στα οποία υποστηριζόταν ότι το τμήμα 1-7 δεν είναι απαραίτητο για τη δημιουργία ινιδίων (Jaikaran *et al.*, 2001).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.3.3. Δομικές μελέτες της καρβοξυτελικής περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης

Το καρβοξυτελικό τμήμα της ανθρώπινης αμυλίνης είναι η δεύτερη κατά σειρά ελλιπώς μελετημένη περιοχή της ορμόνης. Το καρβοξυτελικό άκρο της ώριμης αμυλίνης τροποποιείται φυσιολογικά από το ένζυμο PAM (*petpidyl amidating mono-oxygenase complex*), το οποίο καταλύει την αμιδιώση ενός κατάλοιπου γλυκίνης, προς το σχηματισμό ενός αμιδιωμένου άκρου στο κατάλοιπο της τυροσίνης 37 (Εικόνα 45). Το αμιδιωμένο άκρο είναι αναγκαίο για τη λειτουργικότητα όλων των μελών της οικογένεια των CGRP ορμονών, στην οποία ανήκει η αμυλίνη, και φαίνεται ότι δημιουργείται στα εκκριτικά κυστίδια που αποθηκεύονται στα β-κύτταρα του παγκρέατος (Martinez and Treston, 1996; Merkler, 1994). Η κοινή αυτή χημική τροποποίηση έχει οδηγήσει εξελικτικά στην εμφάνιση συντηρημένων καρβοξυτελικών τμημάτων στις ακολουθίες της αμυλίνης των θηλαστικών (Εικόνα 46), αλλά και στις ακολουθίες των ορμονών που ανήκουν στην οικογένεια των CGRP πεπτιδίων. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποκάλυψαν ότι σε σύγκριση με το αμιδιωμένο μονομερές, το μη-αμιδιωμένο μονομερές της αμυλίνης εμφανίζει μία χαμηλή τάση σχηματισμού β-κλώνων και άρα, η ικανότητά του να δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια είναι ασθενέστερη (Tran and Ha-Duong, 2016).

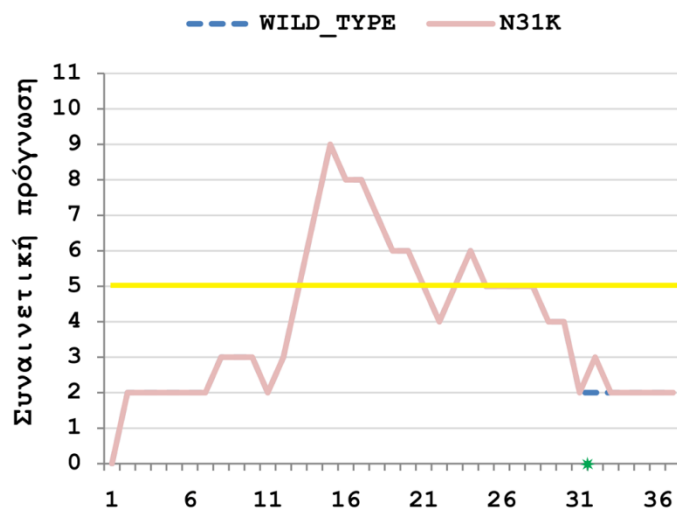


Εικόνα 144. Οι αλληλουχίες των πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της ανθρώπινης αμυλίνης. Με κόκκινο σημειώνονται οι σημειακές μεταλλάξεις των αμινοξικών καταλοίπων. Όλα τα πεπτίδια φέρουν αμιδιωμένο καρβοξυτελικό άκρο. Η ομάδα μελέτης αφορά πεπτίδια-anáλογα της περιοχής 30-37 της ανθρώπινης αμυλίνης.

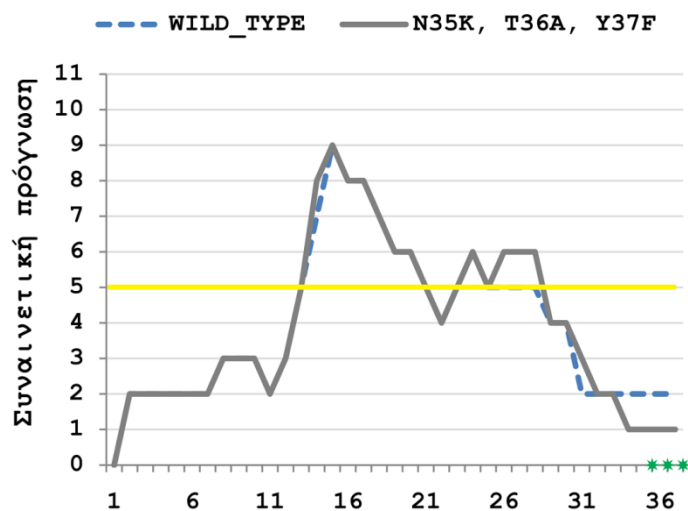
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η ανάλυση του προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 130, εμφανίζει σε γενικές γραμμές μία ασθενή τάση συσσωμάτωσης για το καρβοξυτελικό της άκρο. Λογικά σχεδιασμένες παραλλαγές εμπνευσμένες τόσο από την εξελικτική σχέση των καρβοξυτελικών τμημάτων μεταξύ των θηλαστικών, όσο και από την ομολογία των ορμονών της οικογένειας των CGRP πεπτιδίων μας επέτρεψαν να μελετήσουμε τις ιδιαιτερότητες των αμιδιωμένων καρβοξυτελικών τμημάτων. Το πεπτίδιο ανάλογο φυσικού τύπου ³⁰TNGSNTY³⁷ χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

[α]



[β]



Εικόνα 145. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της αμυλίνης φυσικού τύπου και των μεταλλαγών της στο καρβοξυτελικό άκρο. Η στικτή γραμμή αναπαριστά την πρόγνωση του αλγορίθμου AMYLPRED για την αμυλίνη φυσικού τύπου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Παρατηρούμε ότι οι νεοεισαχθείσες μεταλλαγές (πράσινα αστέρια) μειώνουν το αμυλοειδογόνο δυναμικό της ορμόνης φυσικού τύπου.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

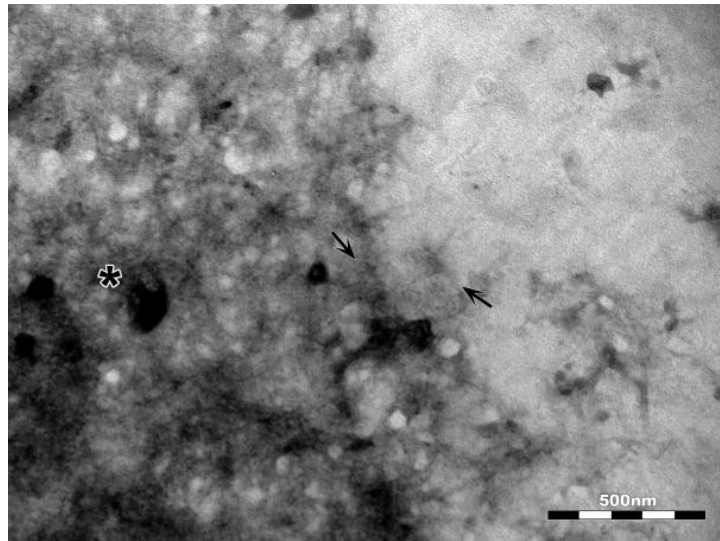
Η πρώτη παραλλαγή αφορά το κατάλοιπο της ασπαραγίνης 31, το οποίο τροποποιείται σε κατάλοιπο λυσίνης ($^{30}\text{T}\underline{\text{K}}\text{GSNTY}^{37}$). Η τροποποίηση αυτή εμφανίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της αμυλίνης τρωκτικών, τα οποία βιβλιογραφικά γνωρίζουμε ότι δεν εμφανίζουν διαβήτη (Betsholtz *et al.*, 1989b). Η δεύτερη κατά σειρά τροποποίηση αφορά μία τριπλή αλλαγή των τριών τελευταίων καταλοίπων της ώριμης αμυλίνης και συγκεκριμένα τα κατάλοιπα ασπαραγίνη 35, θρεονίνη 36 και τυροσίνη 37. Το πεπτιδίο-ανάλογο $^{30}\text{TNVGS}\underline{\text{KAF}}^{37}$ αποτελεί το καρβοξυτελικό τμήμα του πεπτιδίου CGRP, που ανήκει στην ίδια οικογένεια με την αμυλίνη και εμφανίζει ~43% ταυτότητα με αυτή σε επίπεδο ακολουθίας (Muff *et al.*, 1995). Οι στοχευμένες μεταλλαγές μεταβάλλουν αισθητά το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ορμόνης, καθώς όπως παρατηρείται στα ιστογράμματα στην Εικόνα 145 αυξάνουν το αμυλοειδογόνο δυναμικό του καρβόξυτελικού άκρου.

Τα πεπτιδία-ανάλογα της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης $^{30}\text{TNGSNTY}^{37}$, $^{30}\text{T}\underline{\text{K}}\text{GSNTY}^{37}$ και $^{30}\text{TNGS}\underline{\text{KAF}}^{37}$ συντέθηκαν χημικά με τη συνδρομή του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Διαλύματα των πεπτιδίων δημιουργήθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, σε απεσταγμένο νερό με pH 5.75 και παρατηρήθηκαν για διάστημα ~6 μηνών.

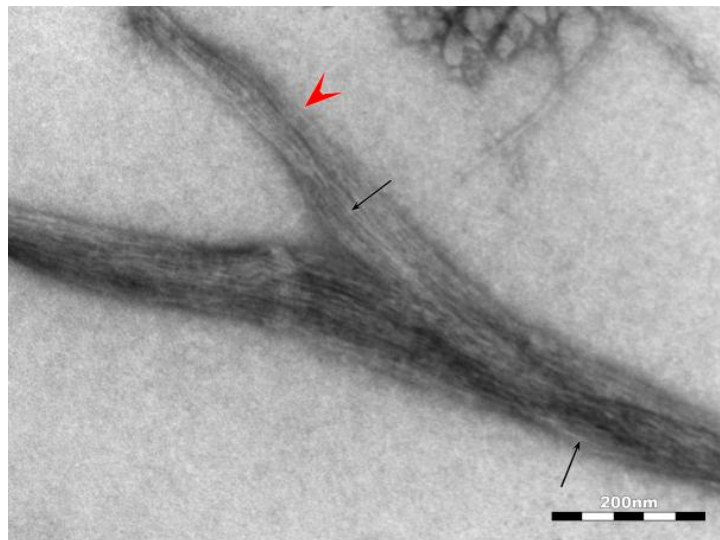
Οι ηλεκτρονιογραφίες με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης έδειξαν ότι και τα τρία πεπτιδία της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης αυτοσυγκροτούνται σε ινίδια, που διαφέρουν όμως μορφολογικά μεταξύ τους. Τα ινίδια του πεπτιδίου-αναλόγου φυσικού τύπου $^{30}\text{TNGSNTY}^{37}$ δημιουργούν πηκτώματα, τα οποία κατανέμονται ομοιόμορφα στο πλέγμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, η πυκνότητά τους όμως δεν επιτρέπει την μορφολογική μελέτη μοναδιαίων ινιδίων του δείγματος (Εικόνα 146α). Στην περίπτωση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{30}\text{T}\underline{\text{K}}\text{GSNTY}^{37}$ δημιουργούνται πρωτοϊνίδια με μικρές διαμέτρους, της τάξης των 30-50 Å (μαύρα βέλη), τα οποία εμφανίζουν τη τάση να αλληλεπιδρούν πλευρικά σχηματίζοντας κορδέλες ινιδίων με ραβδώσεις (*striated ribbons*) και διαμέτρους που εμφανίζουν υψηλή διακύμανση ανά περίπτωση (Εικόνα 146β). Αντίθετα, με τα παραπάνω τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου-αναλόγου $^{30}\text{TNVGS}\underline{\text{KAF}}^{37}$ σχηματίζουν καλά οργανωμένα δίκτυα ινιδίων διαμέτρου ~100 Å, τα οποία αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας ευδιάκριτες ταινίες (Εικόνα 146γ, φούξια αιχμή βέλους).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

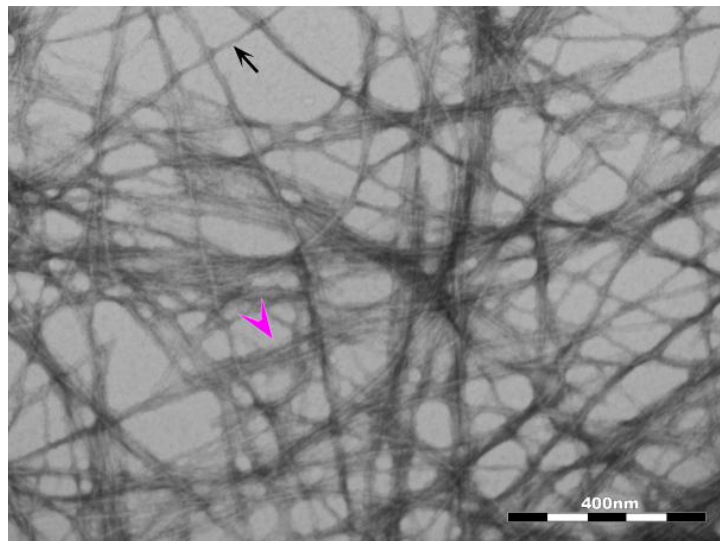
[α] $^{30}\text{TNGSNTY}^{37}$



[β] $^{30}\text{TKGSNTY}^{37}$



[γ] $^{30}\text{TNVGSKAF}^{37}$

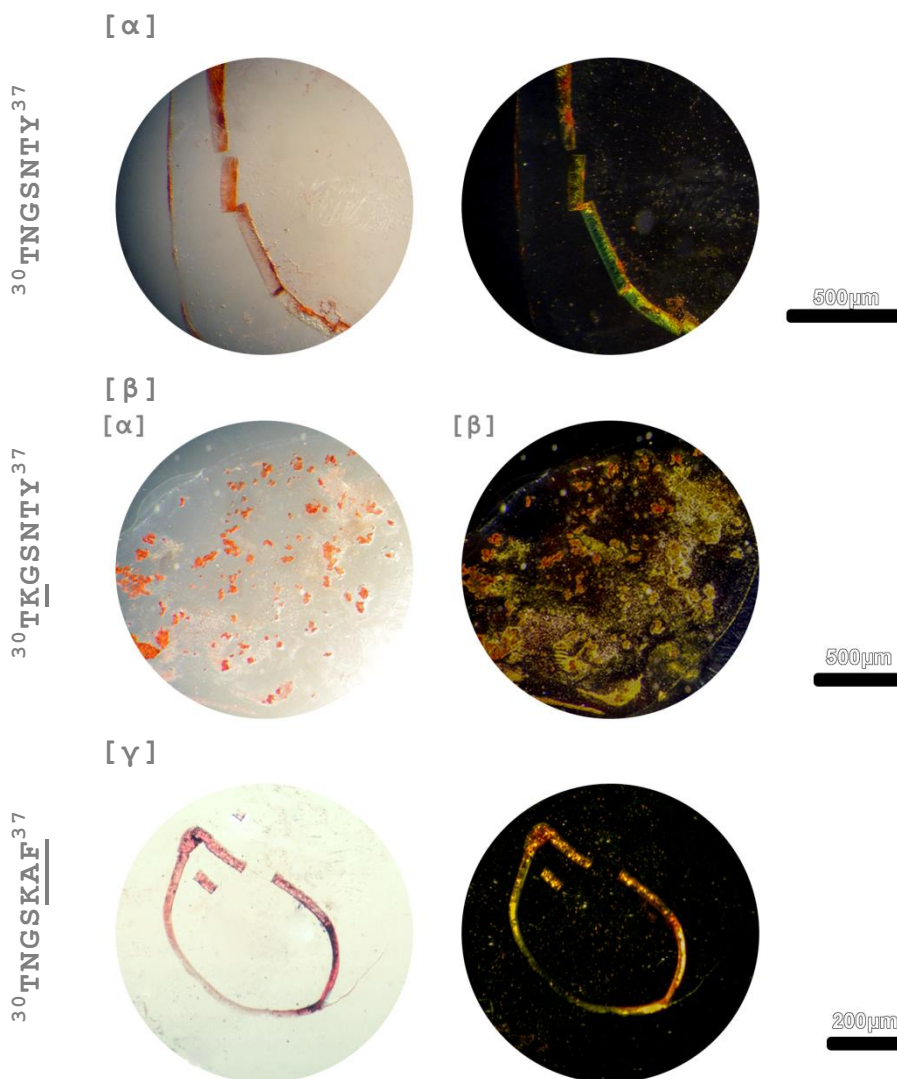


Εικόνα 146. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης. Τα

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

πεπτιδια-ανάλογα διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. Οι ηλεκτρονιογραφίες παρουσιάζουν δείγματα επώασης 7 ημερών.

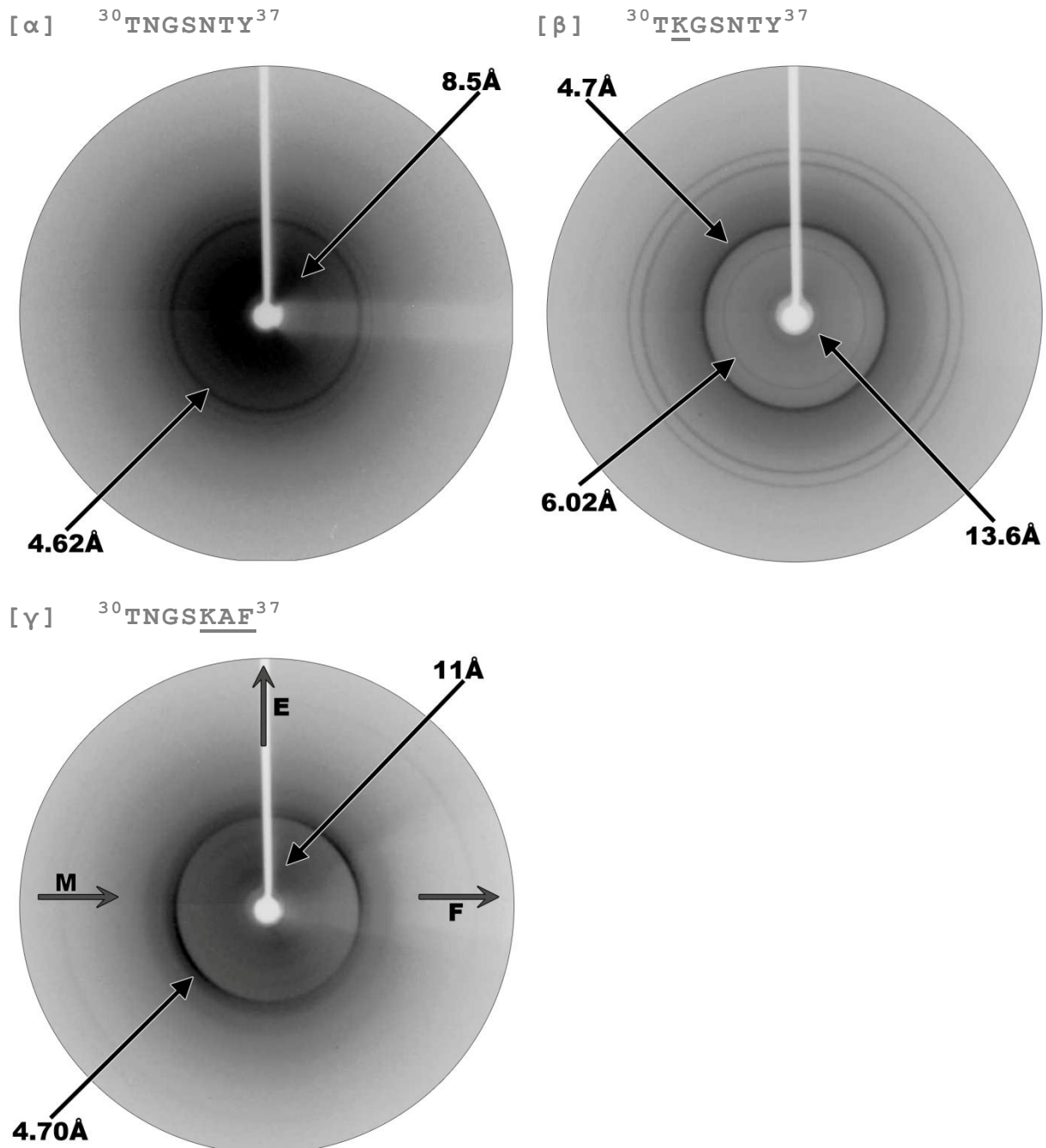
Χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων των πεπτιδίων ³⁰TNGSNTY³⁷, ³⁰TKGSNTY³⁷ και ³⁰TNVGSKAF³⁷ (συγκέντρωσης 10mg ml⁻¹ και επώασης 7 ημερών) κατέγραψε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red (Εικόνα 147, αριστερά) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 147, δεξιά).



Εικόνα 147. Φωτομικρογραφίες υμενίων των πεπτιδίων-ανολόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης, έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου και εντοπισμός της κιτρινοπράσινης διπλοθλαστικότητας (δεξιά).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Περίθλαση ακτίνων X σε προσανατολισμένες ίνες των αμυλοειδών ινιδίων των πεπτιδίων-αναλόγων $^{30}\text{TNGSNTY}^{37}$, $^{30}\text{TKGSNTY}^{37}$ και $^{30}\text{TNVGSKAF}^{37}$ δίνουν περιθλασιγράμματα που εμφανίζουν χαρακτηριστικές ανακλάσεις της “cross-β” αρχιτεκτονικής των αμυλοειδών ινιδίων (Sunde and Blake, 1997) (Εικόνα 148).



Εικόνα 148. Προσανατολισμένα περιθλασιγράμματα των πεπτιδίων-αναλόγων της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης. Τα πεπτίδια-ανάλογα $^{30}\text{TNGSNTY}^{37}$ (α), $^{30}\text{TKGSNTY}^{37}$ (β) και $^{30}\text{TNVGSKAF}^{37}$ (γ) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml^{-1} . (M: μεσημερινός, E: ισημερινός, F: άξονας της ίνας)

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

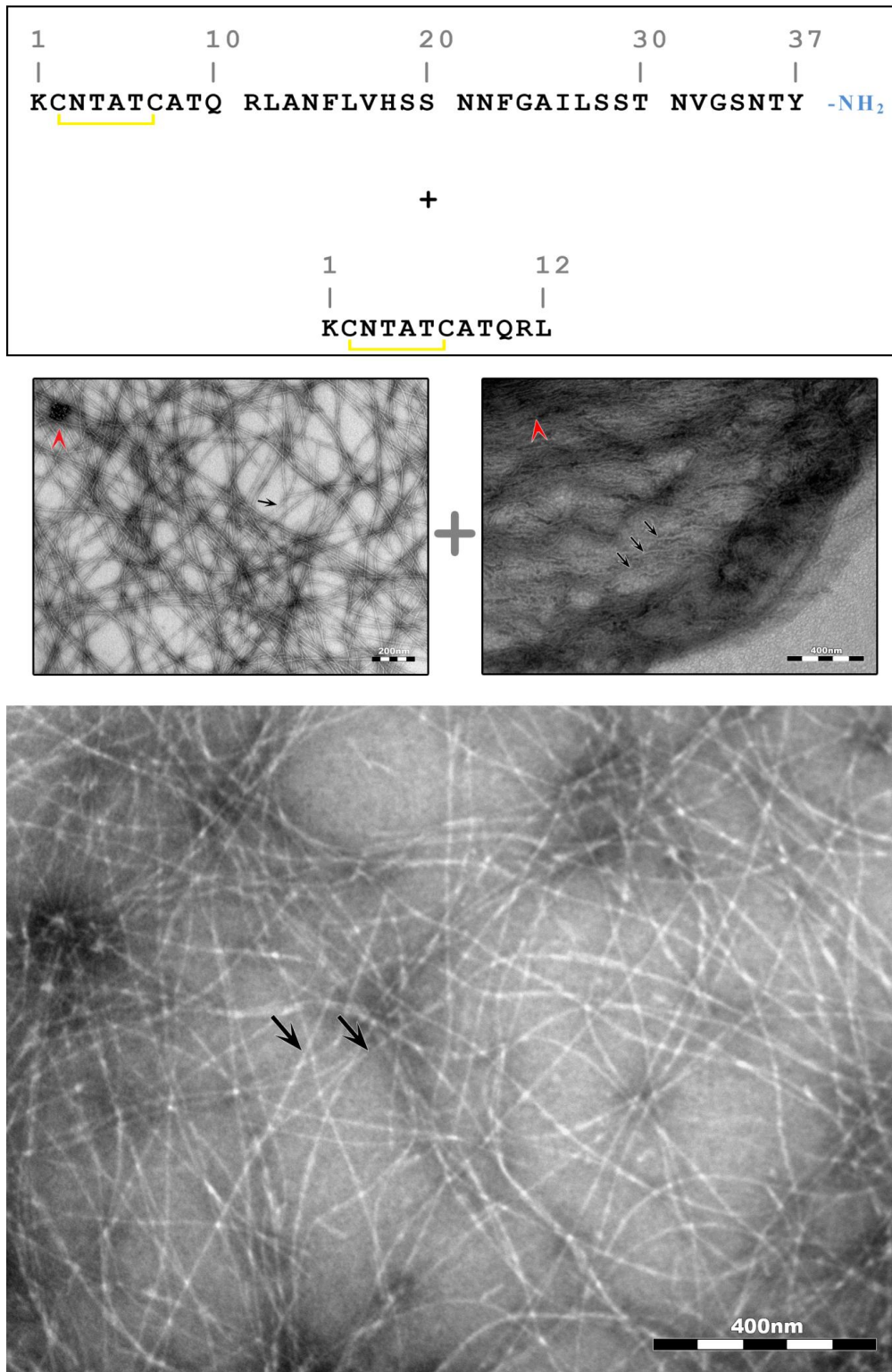
Η εμφάνιση των ανακλάσεων με τη μορφή δακτυλίου είναι αποτέλεσμα μη-βέλτιστου προσανατολισμού των αμυλοειδών ινιδίων στην ίνα. Στο περιθλασίγραμμα του πεπτιδίου-αναλόγου ³⁰TNVGSKAF³⁷ με την εμφάνιση τόξου (arch), όπου έχει επιτευχθεί καλός προσανατολισμός των ινιδίων, σημειώνονται ο μεσημβρινός άξονας (M), ο ισημερινό άξονας (E) και τέλος ο άξονας του ινιδίου (F) (Εικόνα 148γ). Η μεσημβρινή ανάκλαση των περιθλασιγραμμάτων κυμαίνεται από 4.62-4.7 Å και είναι ενδεικτική της απόστασης μεταξύ β-κλώνων που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου και οργανώνονται κάθετα ως προς τον άξονα της ίνας. Η ισημερινή ισχυρή ανάκλαση καταγράφεται στα 8.5 Å, 13.6 Å και 11 Å για τα πεπτίδια-ανάλογα ³⁰TNGSNTY³⁷, ³⁰TKGSNTY³⁷ και ³⁰TNVGSKAF³⁷, αντίστοιχα. Η δεύτερη αυτή ανάκλαση αντιστοιχεί στο διαδοχικά πακετάρισμα μεταξύ των β-πτυχωτών επιφανειών, οι οποίες βρίσκονται παράλληλα ως προς τον άξονα της εκάστοτε προσανατολισμένη ίνας.

3.3.4. Δομικές μελέτες συνεπώασης στην αμυλίνη

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης πεπτιδίων-αναλόγων της αμυλίνης με την ορμόνη φυσικού τύπου πραγματοποιήθηκε σε στοχευμένα πειράματα συνεπώασης. Οι δοκιμές περιλαμβάνουν πεπτίδια-ανάλογα φυσικού τύπου, αλλά και πεπτίδια-ανάλογα με εξειδικευμένες παραλλαγές, οι ιδιότητες των οποίων έχουν περιγραφεί στις παραγράφους που προηγήθηκαν. Η στοιχειομετρική αναλογία αμυλίνης / πεπτιδίου-αναλόγου είναι 1:10, η διαλυτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε απεσταγμένο νερό και η επώαση έγινε σε συνθήκες δωματίου. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, έπειτα από επώαση 7 ημερών.

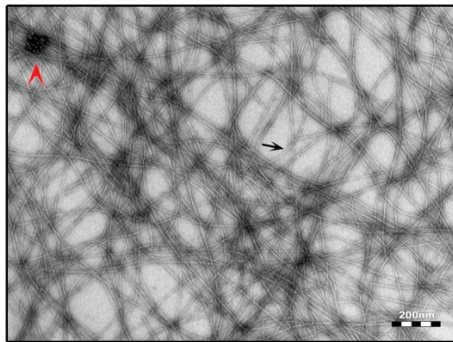
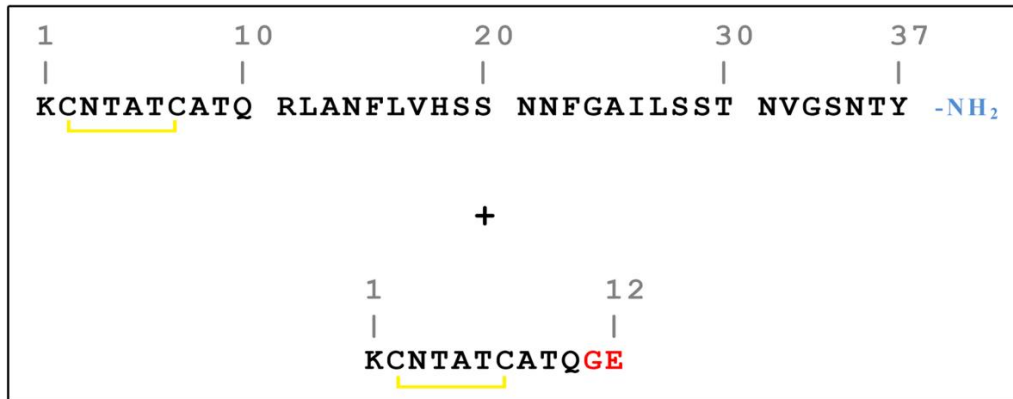
Η δοκιμή συνεπώασης στην ομάδα πεπτιδίων-αναλόγων της αμινοτελικής περιοχής πραγματοποιήθηκε σε δύο πεπτίδια-ανάλογα φυσικού τύπου και δύο παραλλαγές των πεπτιδίων-αναλόγων φυσικού τύπου. Οι εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 149, Εικόνα 150, Εικόνα 151, Εικόνα 152, Εικόνα 153) παρουσιάζουν συγκεντρωτικά ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης των μεμονωμένων πεπτιδίων-αναλόγων, καθώς και των αμυλοειδών ινιδίων που έχουν προκύψει από τη συνεπώαση αυτών για διάστημα μίας εβδομάδας.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

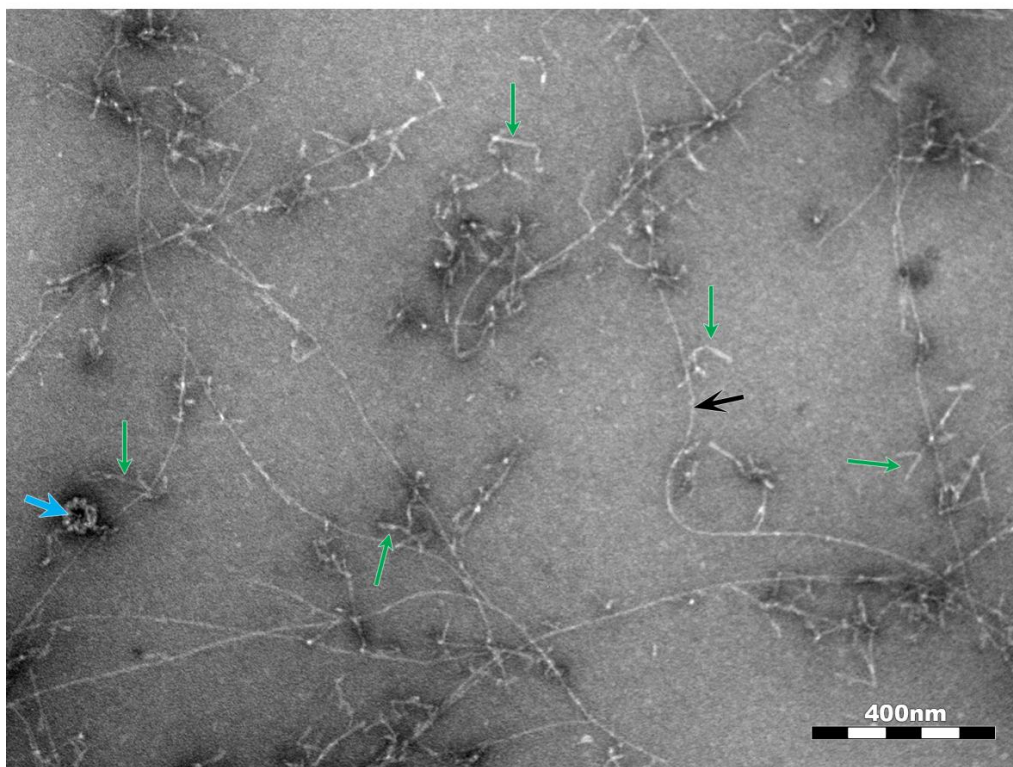
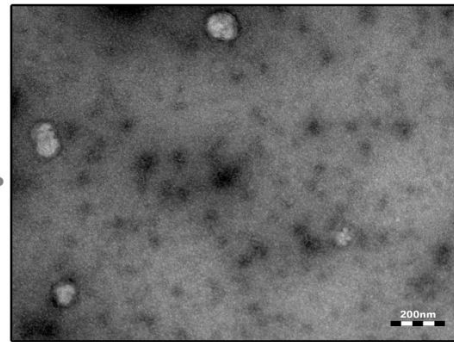


Εικόνα 149. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτιδίο-ανάλογο ¹KCNTATCATQRL¹². Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (βέλη).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

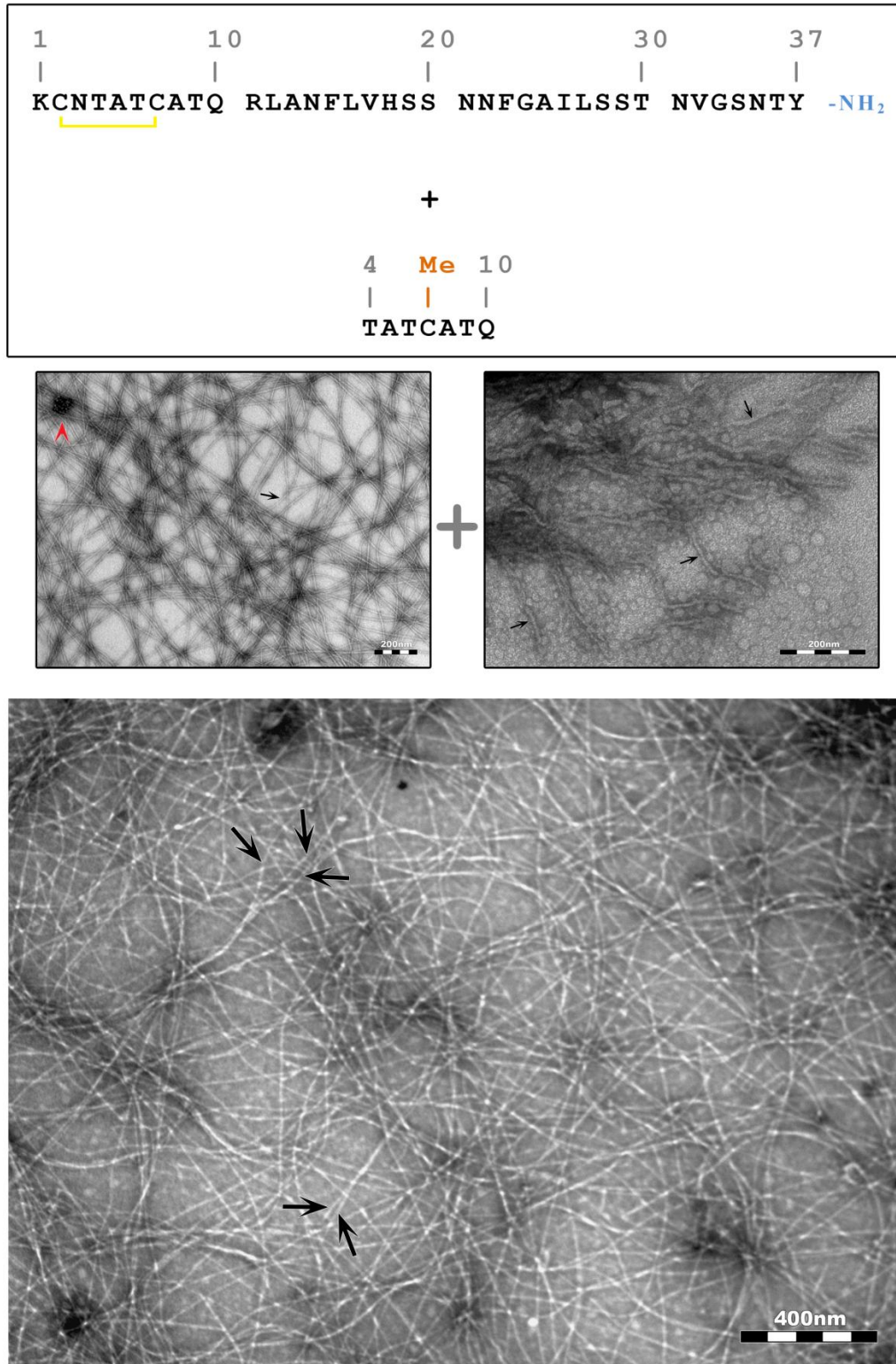


+



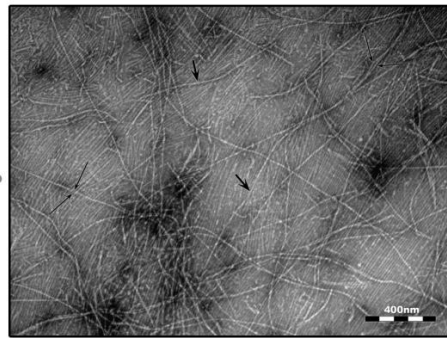
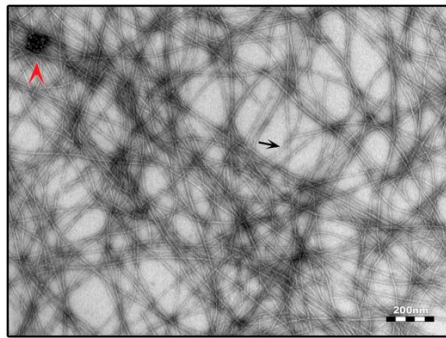
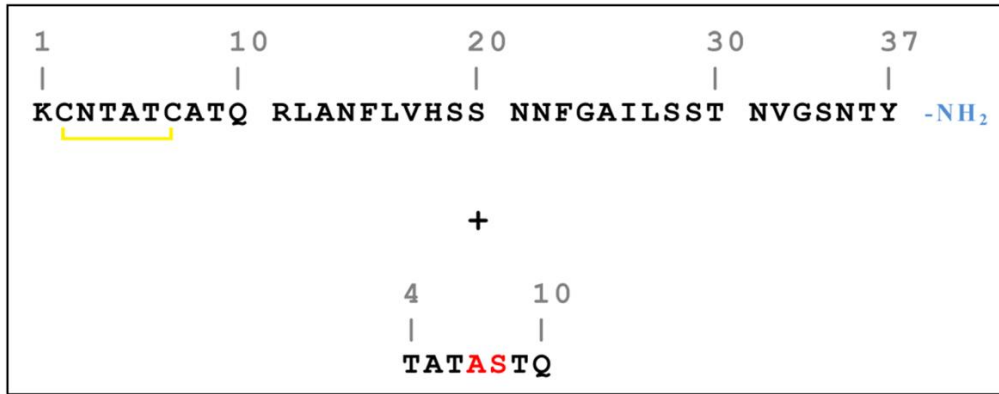
Εικόνα 150. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτιδίο-ανάλογο ¹ΚCNTATCATQGE¹². Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη), προϊνιδιακά συσσωματώματα (πράσινα βέλη) και σφαιρικό συσσωμάτωμα, σχήματος πρωτεϊνικού ‘πόρου’ (γαλάζιο βέλος).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

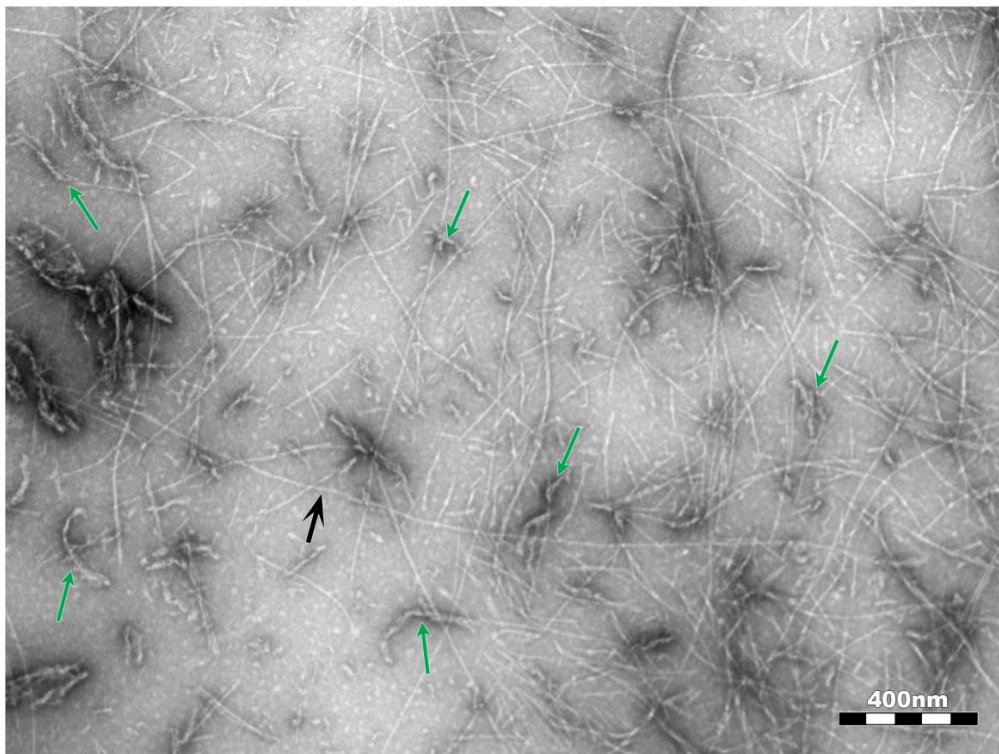


Εικόνα 151. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτιδιο-ανάλογο $^4\text{TATCATQ}^{10}$. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη) και παρατηρείται ο έντονος πολυμορφισμός τους.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

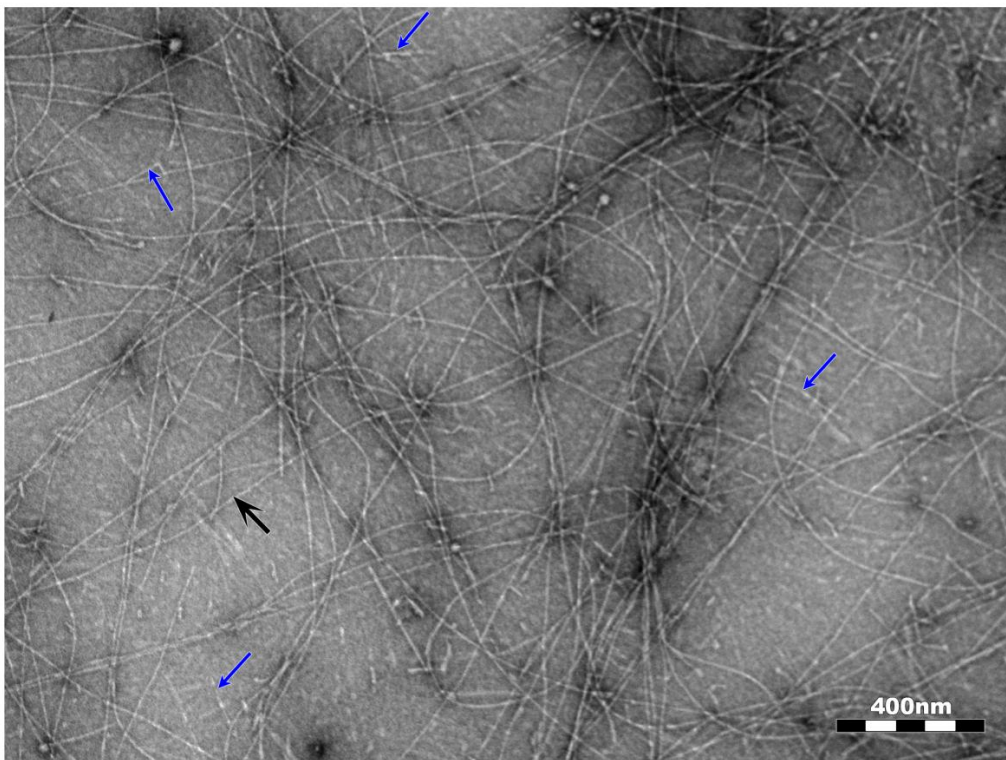
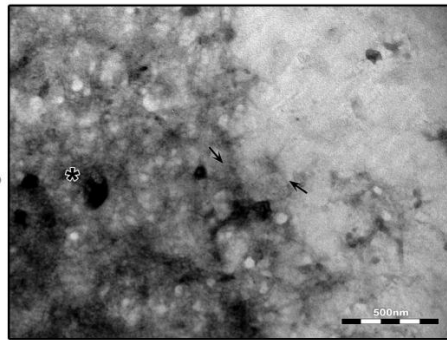
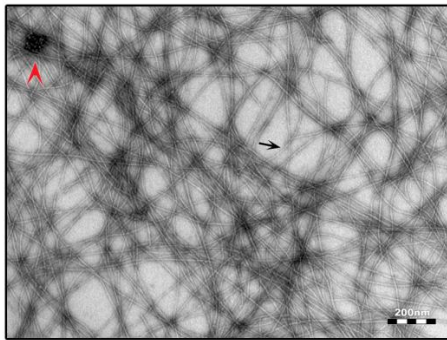
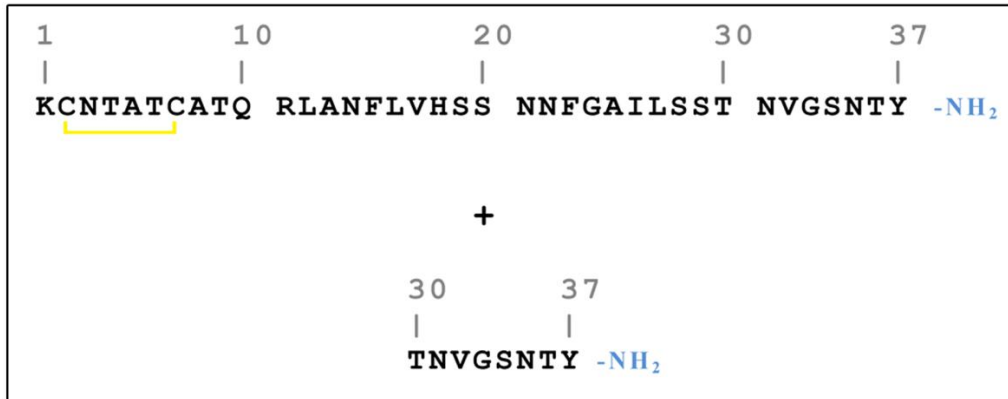


+



Εικόνα 152. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτίδιο-ανάλογο ⁴TATASTQ¹⁰. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη) και άμορφα συσσωματώματα που κατανέμονται ομοιόμορφα στο πλέγμα μικροσκοπίας (πράσινα βέλη).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 153. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση συνδυασμού της αμυλίνης με το πεπτιδιο-ανάλογο ³⁰TNGSNTY³⁷. Η αναλογία των πεπτιδίων είναι 10:1 και ο χρόνος επώασης είναι 7 ημέρες. Σημειώνονται τα τυπικά αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης (μαύρα βέλη) καθώς και ινιδιακά θραύσματα (μπλε βέλη).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Συνολικά, τα πεπτίδια ανάλογα φυσικού τύπου (¹KCNTATCATQRL¹² και ⁴TATCATQ¹⁰) φαίνεται να προωθούν την αμυλοειδογένεση της αμυλίνης, αφού έπειτα από μία εβδομάδα συνεπώασης παρατηρούνται πηκτώματα αποτελούμενα από τυπικά αμυλοειδή ινίδια (Εικόνα 149, Εικόνα 151). Σημειώνεται στο σημείο αυτό ότι τα πεπτίδια ¹KCNTATCATQRL¹², ⁴TATCATQ¹⁰ αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια που εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία και πληρούν τα κριτήρια των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 137, Εικόνα 141). Αντίστοιχα με την περίπτωση της αμινοτελικής περιοχής, συνεπώαση της αμυλίνης με πεπτίδιο-ανάλογο φυσικού τύπου της καρβοξυτελικής περιοχής της αμυλίνης ³⁰TNGSNTY³⁷ φαίνεται να προωθεί της ινιδογένεση, έπειτα από μία εβδομάδα επώασης (Εικόνα 153). Ωστόσο, παρότι τα ινίδια που παρατηρούνται στο πλέγμα μικροσκοπίας εμφανίζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων, ινιδιακά ‘θραύσματα’ (Εικόνα 153, μπλέ βέλη) φαίνονται να συνυπάρχουν με τα ινίδια. Αντίθετα, οι παραλλαγές των πεπτιδίων της αμινοτελικής περιοχής (¹KCNTATCATQGE¹² και ⁴TATASTQ¹⁰) αναστέλλουν μερικώς τη αμυλοειδογένεση της αμυλίνης, καθώς και στις δύο περιπτώσεις παρατηρούνται λιγότερο πυκνά δίκτυα ινιδίων και συγκεκριμένα, δύο ή και περισσότεροι διακριτοί πληθυσμοί συσσωματωμάτων (Εικόνα 150, Εικόνα 152).

Τα πειράματα συνεπώασης και η μελέτη συν-συσσωμάτωσης (*co-aggregation*) έχουν μελετηθεί εκτενώς και θεωρούνται μία πιθανή παρεμβατική μέθοδος στη ραγδαία συσσωμάτωση πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε γνωστές ασθένειες (Selkoe, 2003). Η ιδέα έχει υλοποιηθεί ήδη με εφαρμογή σε ένα σύνολο ανοσοσφαιρινών, όπου μελετήθηκε η ικανότητα ομόλογων δομικών αυτοτελών περιοχών να συν-συσσωματώνονται συμπαρασύροντας η μία την άλλη. Τα ευρήματα απέδειξαν ότι η συν-συσσωμάτωση των πρωτεϊνών εξαρτάται άμεσα από την ομοιότητά τους σε επίπεδο ακολουθίας και πρότειναν ότι η τάση συνσυσσωμάτωσης μειώνεται όταν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες αποκλίνουν σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής (Wright *et al.*, 2005).

Τα πειράματα συνεπώασης στην περίπτωση της αμυλίνης επιβεβαιώνουν τα παραπάνω αποτελέσματα στη μελέτη των ανοσοσφαιρινών, καθώς σε κάθε περίπτωση από το συνδυασμό της αμυλίνης με τα πεπτίδια-ανάλογα φυσικού τύπου προκύπτουν **πυκνά πηκτώματα με έναν πληθυσμό ινιδίων, που ομοιάζει με τα αμυλοειδή ινίδια της αμυλίνης φυσικού τύπου** (Εικόνα 149, Εικόνα 151, Εικόνα 153). Αντίθετα, **συνεπώαση της αμυλίνης με παραλλαγές των πεπτιδίων-αναλόγων οδηγεί σε λιγότερο πυκνά δίκτυα ινιδίων, όπου παρατηρούνται δύο ή περισσότεροι διακριτοί πληθυσμοί ινιδίων** (Εικόνα 150, Εικόνα 152). Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι ο χαρακτηρισμός των ινιδιακών

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

μορφών είναι μόνο μορφολογικός, καθώς δεν υπάρχει δυνατότητα να ταυτοποιηθεί η προέλευση των ινιδίων ή των συσσωματωμάτων που εντοπίζονται στο εκάστοτε παρασκεύασμα.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.4. C-πεπτιδίο της προϊνσουλίνης

Η εμπλοκή του C-πεπτιδίου στο διαβήτη υπήρξε το έναυσμα για τη σε βάθος μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του πεπτιδίου. Μία αξιοσημείωτη ιδιότητα στην κατεύθυνση αυτή υπήρξε η τάση του πολυμερισμού του C-πεπτιδίου, τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* συστήματα μελέτης, η οποία γέννησε πολλά ερωτηματικά σχετικά με το πιθανό αμυλοειδογόνο δυναμικό του πεπτιδίου. Ήδη από το 2010, εκτεταμένες *in vitro* προσπάθειες της ομάδας του Johansson, στο Ινστιτούτο Karolinska της Στοκχόλμης, αποκαλύψαν τη τάση του C-πεπτιδίου να σχηματίζει ολιγομερή (Jornvall *et al.*, 2010), ενώ κάποιες από αυτές τις προσπάθειες στόχευσαν και στη διερεύνηση του αμυλοειδογόνου δυναμικού του πεπτιδίου (Lind *et al.*, 2010).

Παρότι μελέτες πολυμερισμού αποδεικνύουν τις αμυλοειδογόνες ιδιότητες της ινσουλίνης και της προϊνσουλίνης *in vitro*, πειράματα αυτοσυγκρότησης του C-πεπτιδίου ήδη από το 1996 ξεκάθαρα διατύπωναν την αδυναμία του πεπτιδίου να αυτοσυγκροτείται σε αμυλοειδή ινίδια (Westermarck *et al.*, 1996). Σε αντίθεση λοιπόν με το C-πεπτιδίο, η ώριμη ινσουλίνη έχει αποδειχθεί ότι αυτοσυγκροτείται δημιουργώντας ινίδια με αμυλοειδογόνες ιδιότητες σε όξινο pH (Brange *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 2002; Nettleton *et al.*, 2000), ενώ η προϊνσουλίνη σχηματίζει άμορφα συσσωμάτωμα πλούσια σε στοιχεία β-δομής, όπως προκύπτει από τη φασματοσκοπία Raman (Huang *et al.*, 2005). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους, δίνουν μία νέα τροπή στις μελέτες που αφορούν την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου και συζητούν τις συνέπειες της νέα αυτής ιδιότητας.

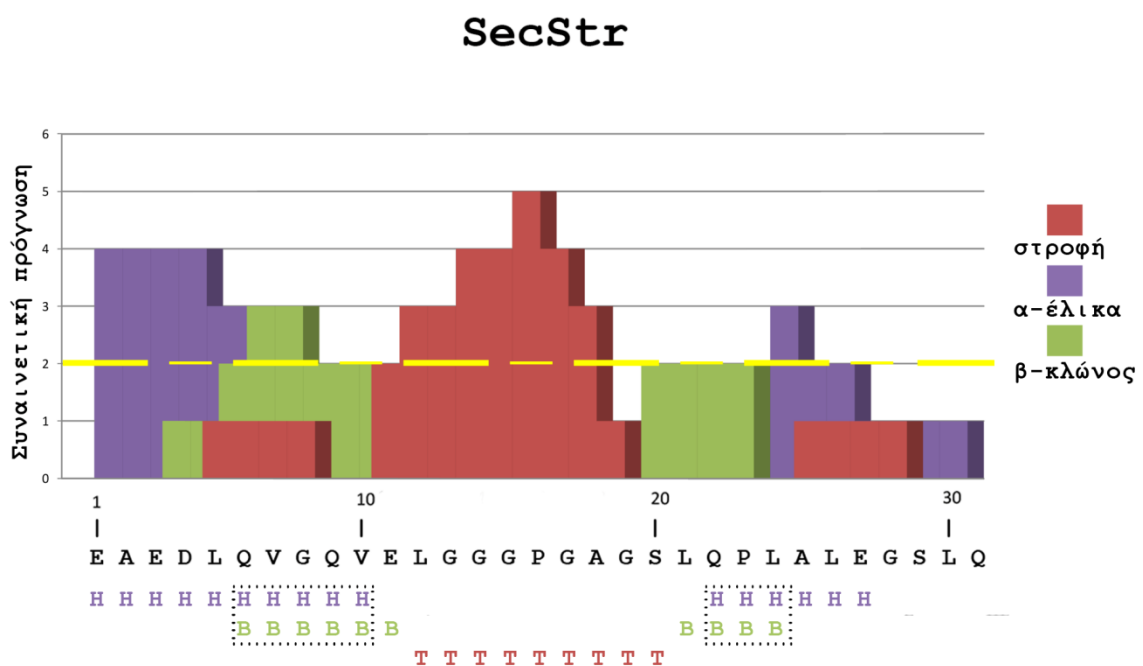
3.4.1. Ανάλυση της Ακολουθίας του C-πεπτιδίου της προϊνσουλίνης

Για την ανάλυση της ακολουθίας του C-πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε ο συναινετικός αλγόριθμος πρόγνωσης της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών SecStr (Hamodrakas, 1988), καθώς και ο αλγόριθμος εύρεσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009; Tsolis *et al.*, 2013).

Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής του πεπτιδίου προτείνει μία πιθανή περιοχή α-έλικας για τα κατάλοιπα ¹EAEDLQVGQV¹⁰ (συμφωνία τουλάχιστον 2 από τις 6 μεθόδους)

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

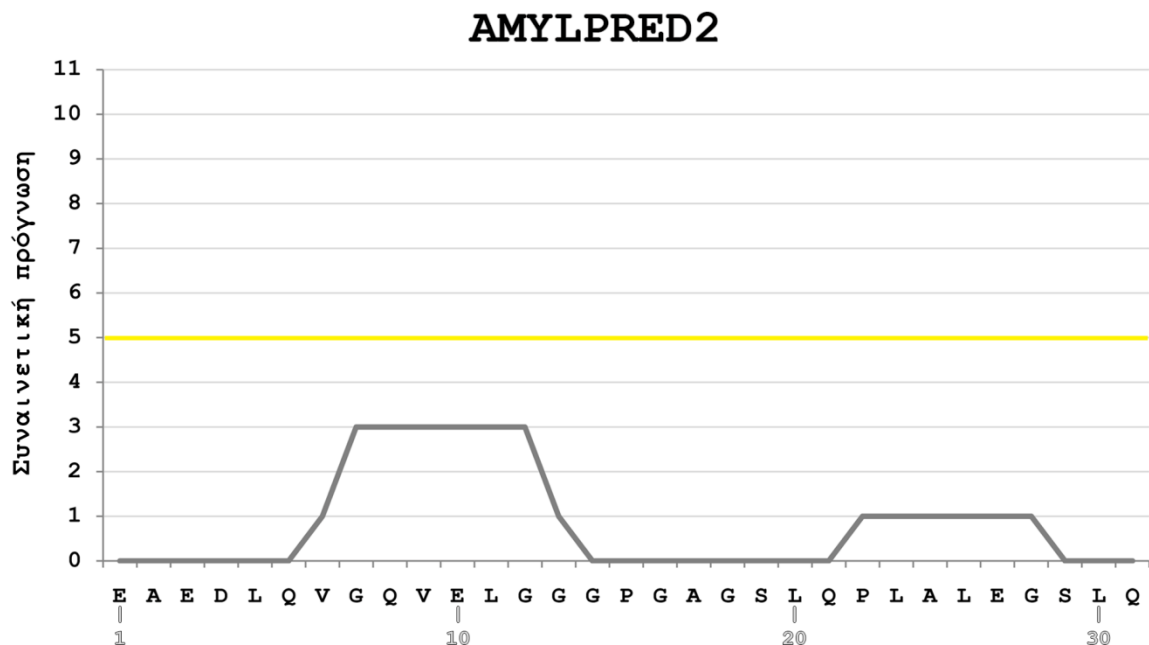
και μία μικρότερη περιοχή α-έλικας για τα κατάλοιπα ²²QPLALE²⁷ (συμφωνία τουλάχιστον 2 από τις 6 μεθόδους) (Εικόνα 154). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει η ταυτόχρονη πρόταση του αλγορίθμου για πιθανή περιοχή β-κλώνων στα τμήματα του πεπτιδίου ⁶QVGQVE¹¹ και ²¹LQPL²⁴ (συμφωνία τουλάχιστον 2 από τις 6 μεθόδους). Οι αλληλοεπικαλυπτόμενες προγνώσεις μεταξύ των καταλοίπων ⁶QVGQV¹⁰ και ²²QPL²⁴ (Εικόνα 154, πλαίσια με στικτό περίγραμμα) αποκαλύπτουν ότι το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου εμφανίζει τα χαρακτηριστικά ακολουθιών χαμαιλέοντα (*chameleon sequences*) (Kabsch and Sander, 1984), μία ιδιότητα που συναντάται συχνά στις αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Kim *et al.*, 2009). Στην περίπτωση του C-πεπτιδίου η ταυτόχρονη πρόγνωση α-ελίκων και β-κλώνων προτείνει ότι η ακολουθία του πεπτιδίου μπορεί να προσαρμόζεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, υιοθετώντας διαφορετικές στερεοδιατάξεις.



Εικόνα 154. Πρόγνωση δευτεροταγούς δομής του C-πεπτιδίου με τον αλγόριθμο SecStr (Hamodrakas, 1988). Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την πρόγνωση της δευτεροταγούς δομής του C-πεπτιδίου ανά κατάλοιπο. Με κόκκινο φαίνεται η πρόγνωση των στροφών, με μοβ η πρόγνωση των α-ελίκων και με πράσινο η πρόγνωση των β-κλώνων. Η κίτρινη διακοπτόμενη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*). Τα πεπτιδικά τμήματα ⁶QVGQV¹⁰ και ²²QPL²⁴ προβλέπονται ως περιοχές με χαρακτηριστικά ακολουθιών χαμαιλέοντα, καθώς, όπως σημειώνεται με τα στικτά πλαίσια, προβλέπεται να υιοθετούν ταυτόχρονα ελικοειδή και εκτεταμένη στερεοδιάταξη (H: α-έλικα, B: β-κλώνος, T: στροφή).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Αντίθετα, η ανάλυση του αμυλοειδογόνου προφίλ του C-πεπτιδίου, με τον αλγόριθμο εύρεσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση AMYLPRED, παρουσίασε μία **ιδιαιτέρως ασθενή πρόγνωση συσσωμάτωσης**, καθώς κανένα τμήμα του πεπτιδίου δεν κατάφερε να ξεπεράσει το προεπιλεγμένο κατώφλι του αλγορίθμου (Εικόνα 155). Το εύρημα αυτό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, μιας και το πεπτίδιο εμφανίζει την τάση να αυτοσυγκροτείται σε ινίδια με αμυλοειδογόνες ιδιότητες (§3.2.2), ενώ άλλα εκτενή πειράματα ολιγομερισμού και συσσωμάτωσης σε μεμονωμένα τμήματα του C-πεπτιδίου αποκάλυψαν ότι τόσο το αμινοτελικό (¹EAEDL⁵) όσο και το καρβοξυτελικό τμήμα του (²⁷EGSLQ³¹) εμφανίζουν την τάση να ομοπολυμερίζονται (Jornvall *et al.*, 2010; Nerelius *et al.*, 2010).



Εικόνα 155 Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας του C-πεπτιδίου, όπως προβλέπεται από τον αλγόριθμο AMYLPRED2 (Frousios *et al.*, 2009). Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την ασθενή συναινετική πρόγνωση του αλγορίθμου για πιθανές περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στην 31 καταλοίπων αμινοξική ακολουθία του C-πεπτιδίου. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του αλγορίθμου (*consensus threshold*).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.4.2. Δομικές μελέτες του C-πεπτιδίου της προϊνσουλίνης

Το 31 καταλοίπων C-πεπτίδιο συντέθηκε χημικά (GeneCust© - Europe, Luxembourg), με ελεύθερο τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο και καθαρότητα >96.8%. Στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκε σε απεσταγμένο νερό (pH 5.75) σε τελικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.5 mg ml⁻¹ έως 10 mg ml⁻¹ (ανάλογα με τις απαιτήσεις της πειραματικής δοκιμής) και αφέθηκε προς επώαση σε σταθερές συνθήκες δωματίου.

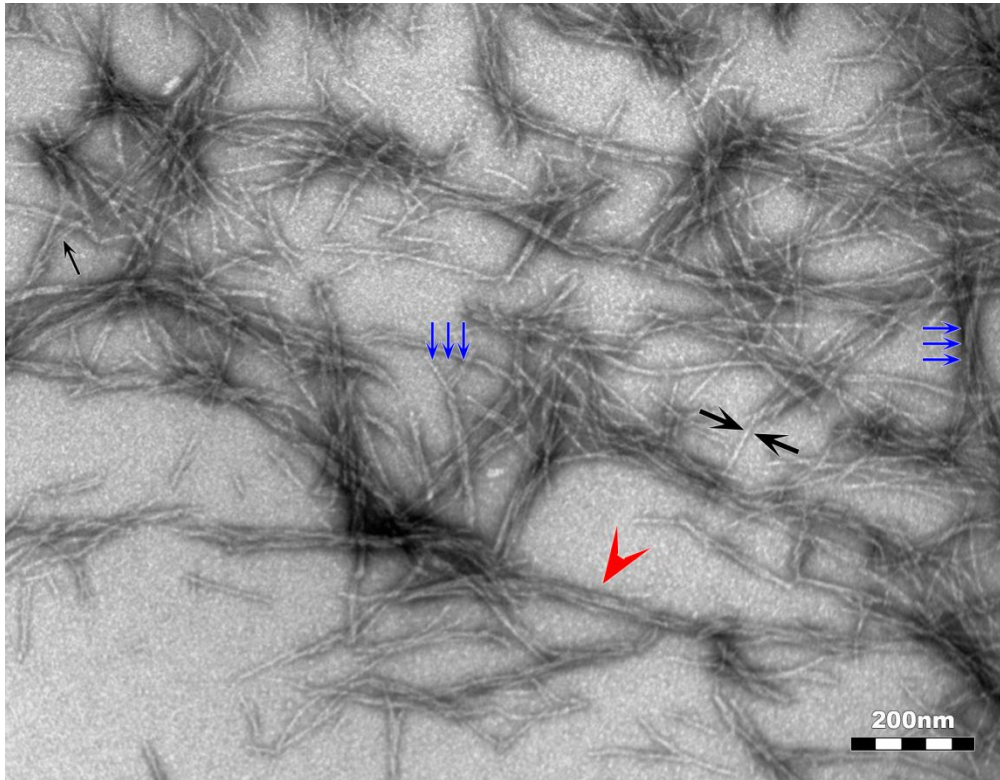
Αξίζει να σημειωθεί ότι διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα σε προηγούμενες *in vitro* δοκιμές χρησιμοποιούν συγκεντρώσεις του C-πεπτιδίου που κυμαίνονται από 1 mg ml⁻¹ μέχρι 40 mg ml⁻¹ (Jornvall *et al.*, 2010; Nettleton *et al.*, 2000; Shafqat *et al.*, 2006; Westermarck *et al.*, 1996), ωστόσο τα επίπεδα του C-πεπτιδίου σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως π.χ. κατά το μεταγενεματικό χρονικό διάστημα, φαίνεται να είναι ιδιαίτερος χαμηλά (Kuzuya *et al.*, 1978). Υψηλά επίπεδα C-πεπτιδίου, *in vivo*, παρατηρούνται σε υπέρβαρα άτομα (Polonsky *et al.*, 1988) και σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Faber *et al.*, 1978), εξαιτίας της αύξησης του χρόνου ημιζωής του πεπτιδίου (Rhodes and Alarcon, 1994). Την ίδια στιγμή, στην αθηρογένεση, το C-πεπτίδιο έχει βρεθεί να συσσωματώνεται και να εναποτίθεται στα τοιχώματα των αγγείων διαβητικών ασθενών (Marx *et al.*, 2004).

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε κατάλληλα παρασκευάσματα/δείγματα από διαλύματα του C-πεπτιδίου έπειτα από αρνητική χρώση υποδεικνύουν **την τάση του πεπτιδίου να αυτοσυγκροτείται, σχηματίζοντας πηκτώματα ώριμων ινιδίων, μόλις μία ημέρα μετά τη διάλυσή τους σε απεσταγμένο νερό.** Τα ώριμα ινίδια, μετά από επώαση 7 ημερών, εμφανίζουν τη μορφολογία των αμυλοειδών ινιδίων και παρουσιάζονται ως ευθύγραμμες και αδιακλάδιστες υπερέλικες ινιδίων με απροσδιόριστο μήκος και διάμετρο ~90-120 Å, ενώ διακρίνονται και υπερέλικες πιο πολύπλοκης μορφολογίας (Εικόνα 156, μπλε βέλη). Κάθε υπερέλικα αποτελείται από μοναδιαία πρωτοϊνίδια διαμέτρου ~50 Å (Εικόνα 156, μικρό μαύρο βέλος) τα οποία εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν είτε με περιέλιξη προς το σχηματισμό ελίκων (Εικόνα 156, μεγάλα μαύρα βέλη), είτε πλευρικά προς το σχηματισμό δεματιών (Εικόνα 156, κόκκινη αιχμή βέλους).

Ο έντονος πολυμορφισμός των αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου **διερευνήθηκε με πειράματα κινητικής.** Συγκεκριμένα, ποσότητες από το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή δειγμάτων σε ημερήσια βάση. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης, έπειτα από αρνητική χρώση. Στην Εικόνα 157 δίνονται χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από την ημέρα της

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

διάλυσης (Ημέρα 0-επάνω) και την 3^η ημέρα επώασης (Ημέρα 3-κάτω), ενώ η **Εικόνα 156** παρουσιάζει, όπως προαναφέρθηκε, ώριμα αμυλοειδή ινίδια 7 ημερών επώασης.

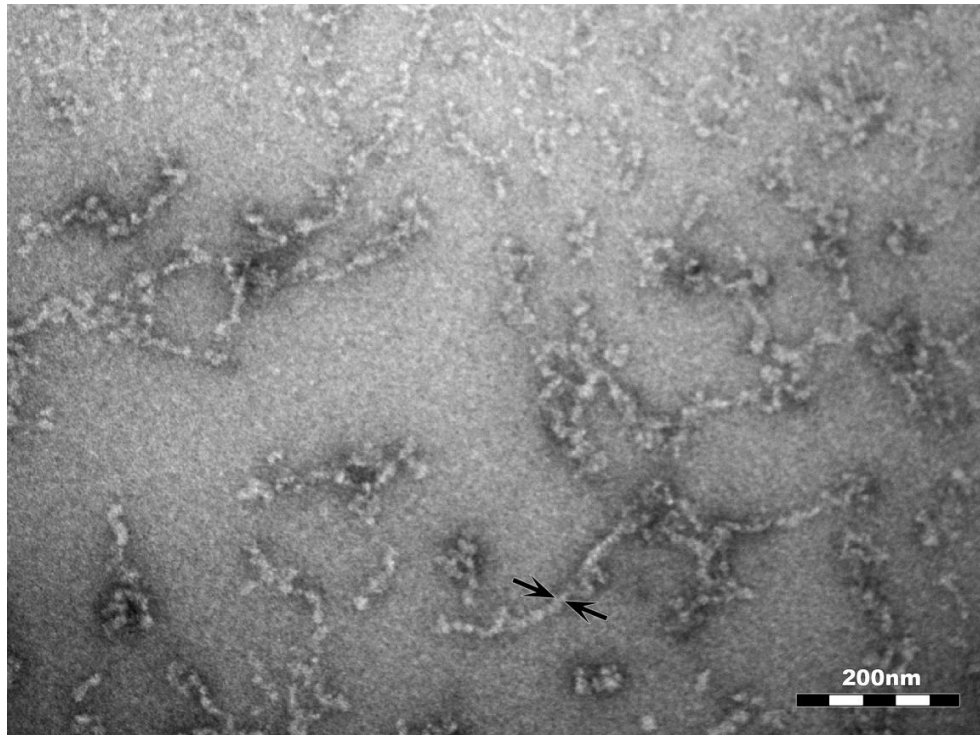


Εικόνα 156. Ηλεκτρονιογραφία διέλευσης αμυλοειδών ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου (10 mg ml⁻¹) σε απεσταγμένο νερό. Την 7^η ημέρα επώασης παρατηρούνται δεμάτια ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους) και μη διακλαδισμένες υπερέλικες ινιδίων με απροσδιόριστο μήκος και ποικίλες διαμέτρους (μπλε βέλη). Η λεπτομέρεια ενός μοναδιαίου πρωτοϊνιδίου του C-πεπτιδίου (διάμετρος ~50 Å) σημειώνεται με μικρό μαύρο βέλος, ενώ μία απομονωμένη υπερέλικα δύο πρωτοϊνιδίων (διάμετρος ~100 Å) σημειώνεται με δύο μεγάλα μαύρα βέλη.

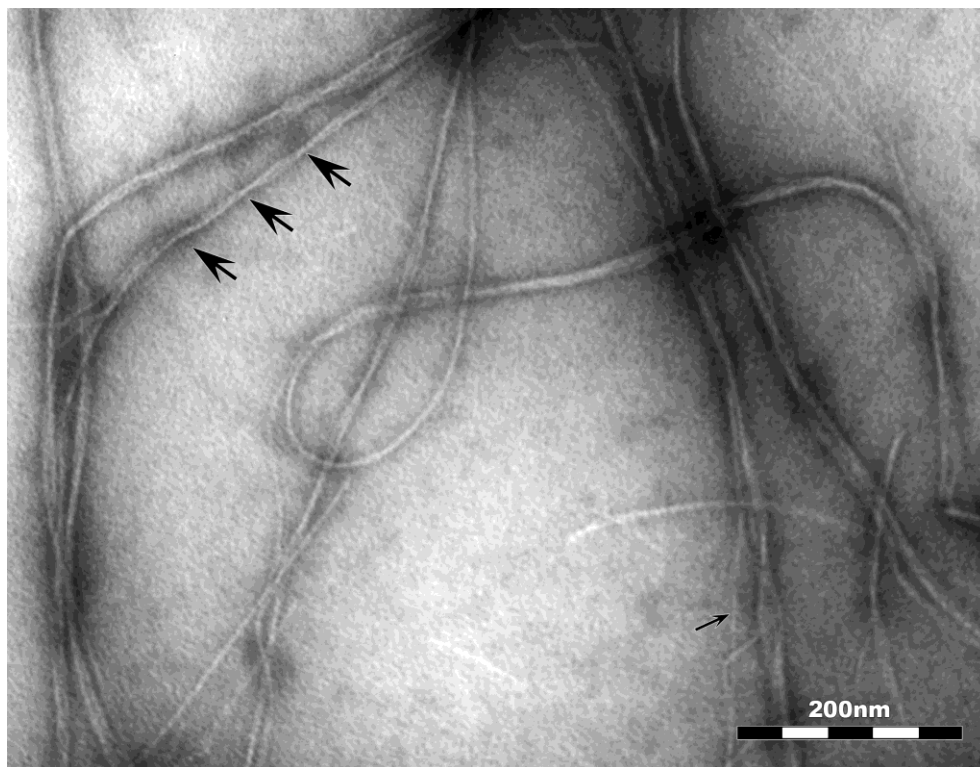
Παρατηρείται η έντονη τάση του πεπτιδίου να σχηματίζει προϊνιδιακά συσσωματώματα αμέσως μετά τη διάλυσή του σε απεσταγμένο νερό (Εικόνα 157, επάνω), τα οποία εμφανίζονται ομοιόμορφα κατανομημένα στο παρασκεύασμα και έχουν διάμετρο ~70-100 Å. Η δημιουργία προϊνιδιακών συσσωματωμάτων είναι κοινό χαρακτηριστικό στα πρώτα στάδια αυτοσυγκρότησης πολλών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Glabbe, 2008). Την εμφάνιση των προϊνιδιακών μορφών του C-πεπτιδίου διαδέχεται η αυτοσυγκρότηση ώριμων αμυλοειδών ινιδίων, τα οποία εμφανίζουν ήδη από την 3^η ημέρα επώασης τον χαρακτηριστικό πολυμορφισμό που παρατηρούμε και στα ώριμα αμυλοειδή ινίδια επώασης 7 ημερών (Εικόνα 157, κάτω).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ημέρα 0



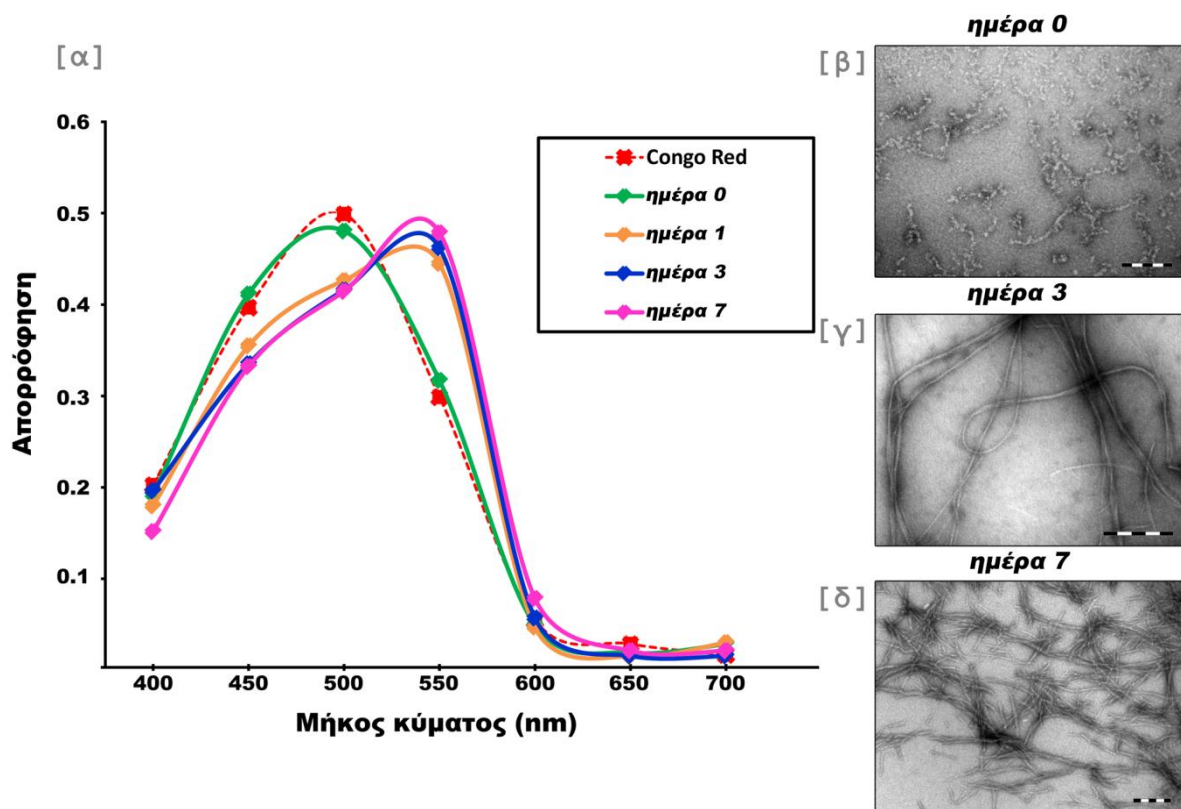
Ημέρα 3



Εικόνα 157. Ηλεκτρονιογραφίες ινιδίων που δημιουργούνται έπειτα από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης. (επάνω) Παρατηρούνται προϊνιδιακοί σχηματισμοί διαμέτρου $\sim 70-100 \text{ \AA}$ (βέλη) οι οποίοι δημιουργούνται αμέσως μετά τη διάλυση του πεπτιδίου σε απεσταγμένο νερό (Ημέρα επώασης 0). (κάτω) Η 3^η ημέρα επώασης αποκαλύπτει τη δημιουργία ώριμων αμυλοειδών ινιδίων, που εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου είναι 10 mg ml^{-1} . Το μικρό βέλος στην ηλεκτρονιογραφία διέλευσης σημειώνει την εμφάνιση ενός μοναδιαίου πρωτοϊνιδίου του C-πεπτιδίου, διαμέτρου $\sim 50 \text{ \AA}$.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

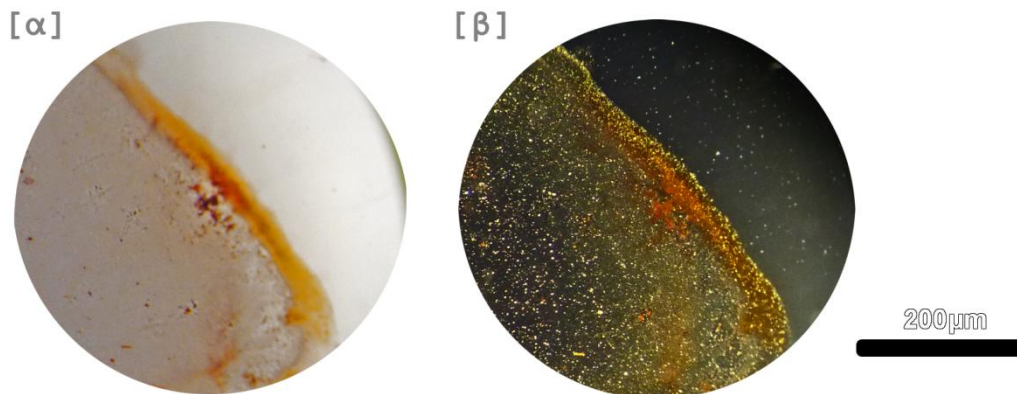
Σε συνδυασμό με τα παραπάνω αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική κινητική μελέτη για την ποσοτικοποίηση της δημιουργίας των αμυλοειδών ινιδίων του C-πεπτιδίου, με κύρια μετρική τον χρόνο πρόσδεσης της διαγνωστικής χρωστικής Congo Red. Στα πειράματα αυτά ποσότητες του διαλυτοποιημένου πεπτιδίου (συγκέντρωσης 10mg ml^{-1}) προστέθηκαν σε διάλυμα μείγματος απεσταγμένου νερού – Congo Red και μετρήθηκε ο χρόνος που απαιτούνταν για να μετατοπίσουν το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από 500 nm σε 540 nm. Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 158α, μόλις 24 ώρες μετά τη διάλυση του C-πεπτιδίου εμφανίζεται μέγιστο απορρόφησης στα 540nm, αποδεικνύοντας την παρουσία αμυλοειδών ινιδίων ήδη από την πρώτη ημέρα επώασης (Εικόνα 158α, πορτοκαλί καμπύλη).



Εικόνα 158. Φάσματα της χρωστικής Congo Red (10 mM) παρουσία του 10mg ml^{-1} C-πεπτιδίου και φωτομικρογραφίες των ινιδίων του C-πεπτιδίου έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Η καταγραφή της πρόσδεσης της χρωστικής Congo Red στα ινίδια του C-πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε για διάστημα 7 ημερών. Οι καμπύλες με διαφορετικά χρώματα παρουσιάζουν τις μετρήσεις για τις ημέρες επώασης 0, 1, 3 και 7. Η στικτή κόκκινη γραμμή παρουσιάζει το πείραμα ελέγχου της χρωστικής Congo Red. Η πρώτη μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης της χρωστικής από 500nm σε 540nm (πορτοκαλί καμπύλη) εντοπίζεται μόλις 24 ώρες μετά τη διαλυτοποίηση του πεπτιδίου και υποδηλώνει την εμφάνιση ώριμων αμυλοειδών ινιδίων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από τις ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης για τις ημέρες επώασης 0 (β), 3 (γ) και 7 (δ) (Ράβδοι 200nm).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Παράλληλα, χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων του C-πεπτιδίου (συγκέντρωσης 10 mg ml^{-1} και επώσης 7 ημερών) κατέγραψε **την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red** (Εικόνα 159α) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 159β). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με πειράματα σε ολιγομερή του C-πεπτιδίου, όπου παρατηρήθηκε ότι αλληλεπιδρούν ειδικά με τη διαγνωστική για τα αμυλοειδή χρωστική Thioflavin T (Jornvall *et al.*, 2010; Lind *et al.*, 2010).

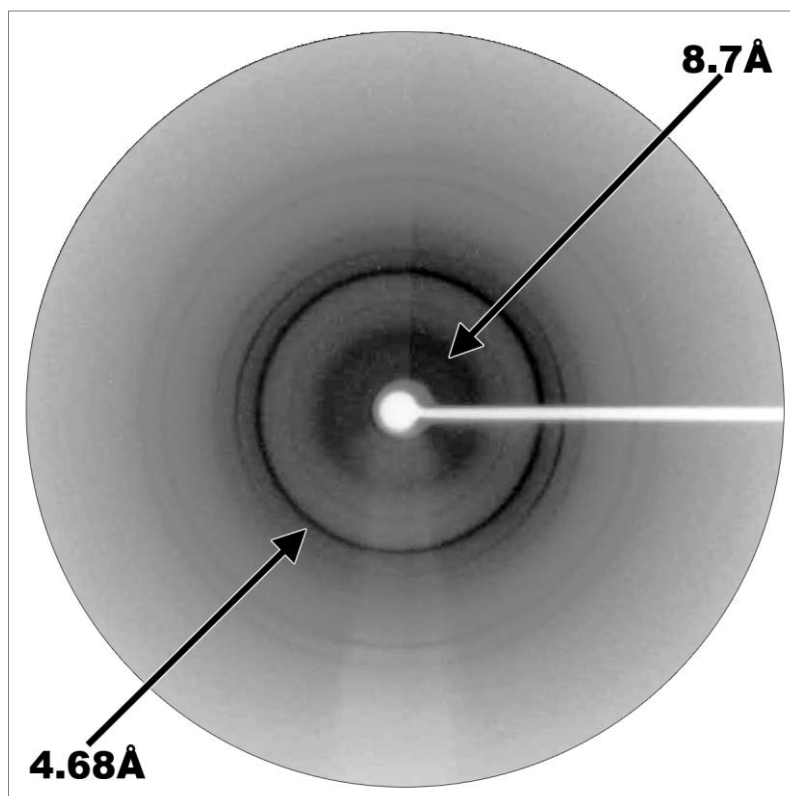


Εικόνα 159. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων του C-πεπτιδίου έπειτα από χρώση με Congo Red. (α) Παρατήρηση με πολωμένο φως (β) Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου. Παρατηρούμε την κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα των αμυλοειδών ινιδίων του πεπτιδίου (β).

Με περίθλαση ακτίνων-X σε προσανατολισμένες ίνες αμυλοειδών ινιδίων του C-πεπτιδίου **προέκυψε περιθλασίγραμμα πολυκρυσταλλικού υλικού**. Η έντονη μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.68 \AA αποδίδεται στην απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων, ενώ η έντονη αλλά διάχυτη ανάκλαση στα 8.7 \AA αποδίδεται στο πακετάρισμα διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών. Οι παραπάνω ανακλάσεις είναι χαρακτηριστικές της cross-β στερεοδιάταξης όλων των αμυλοειδών ινιδίων (Sunde and Blake, 1997), στην οποία οι β-κλώνοι είναι προσανατολισμένοι κάθετα στον άξονα των ινιδίων και οι β-πτυχωτές επιφάνειες ‘τρέχουν’ κυρίως παράλληλα στον άξονα των ινιδίων. Η εμφάνιση των ανακλάσεων με τη μορφή δακτυλίου οφείλεται κυρίως στη κακή ευθυγράμμιση των ινιδίων, κατά την προετοιμασία και παρασκευή της ίνας, τα οποία στερούνται υψηλότερου βαθμού οργάνωσης σε μοριακό επίπεδο.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πολλές πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν ομοιότητες σε περιθλασιγράμματα που προέρχονται είτε από αμυλοειδή ινίδια, είτε από μικροκρυστάλλους αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών ή πεπτιδίων (Diaz-Avalos *et al.*, 2003; Sawaya *et al.*, 2007). Όπως επιβεβαιώνουν και προηγούμενα πειράματα της ομάδας μας, η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης συχνά δεν αποκαλύπτει την πολυκρυσταλλική φύση ενός υλικού, καθώς σε πολλές περιπτώσεις αμυλοειδή ινίδια που προκύπτουν από επώαση πεπτιδίων παράγουν πολυκρυσταλλικά περιθλασιγράμματα (Louros *et al.*, 2013; Louros *et al.*, 2015a). Συστηματικές μελέτες των αμυλοειδών ινιδίων σε ατομικό επίπεδο από τις Marshall και Serpell, το 2009, επισήμαναν ότι **η ουσιαστική διαφορά μεταξύ ενός κρυστάλλου και μιας προσανατολισμένης ίνας αμυλοειδών ινιδίων είναι ο βαθμός της οργάνωσης των μορίων που τα αποτελούν** (Marshall and Serpell, 2009). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν *in vitro* πειράματα αμυλοειδογόνων πεπτιδίων τα οποία αποκαλύπτουν τη στερεοδιαταξική μετάβαση λεπτών, μοναδιαίων αμυλοειδών ινιδίων σε μονοδιάστατους νανο-κρυστάλλους (Nelson *et al.*, 2005).



Εικόνα 160. Περιθλασίγραμμα ακτίνων-X προσανατολισμένης ίνας, που δημιουργήθηκε από αμυλοειδή ινίδια του C-πεπτιδίου. Το περιθλασίγραμμα είναι χαρακτηριστικό της cross-β δομής, παρουσιάζοντας μία μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.68 Å και μία ισημερινή ανάκλαση στα 8.7 Å.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η κρυσταλλικότητα του δείγματος που έχει καταγραφεί στο περιθλασίγραμμα επέτρεψε την περαιτέρω μελέτη της οργάνωσης των ινιδίων του C-πεπτιδίου στην προσανατολισμένη ίνα. Ο Πίνακας 19 παρουσιάζει έναν κατάλογο των ανακλάσεων που παρατηρήθηκαν στο περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ των αμυλοειδών ινιδίων του C-πεπτιδίου (Εικόνα 160). Η δεικτοδότηση των ανακλάσεων πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο DICVOL06, ένα εργαλείο αυτοματοποιημένης ερμηνείας περιθλασιγραμμάτων πολυκρυσταλλικών υλικών. Στο αρχείο εισόδου του αλγορίθμου χρησιμοποιήθηκε μοναδιαία κυψελίδα του ορθορομβικού κρυσταλλικού συστήματος (μέγιστο κατώφλι $a=47$ Å, $b=47$ Å, $c=47$ Å), όγκος κυψελίδας μεταξύ 15,000 – 17,000 Å³, συντελεστής ποιότητας 10 (*figure of merit*) και τυπική απόκλιση 0.02. Συνολικά 10 ανακλάσεις μετρήθηκαν με το εργαλείο iMosFLM (Leslie and Powell, 2007) (Πίνακας 19, στήλη d_{obs}).

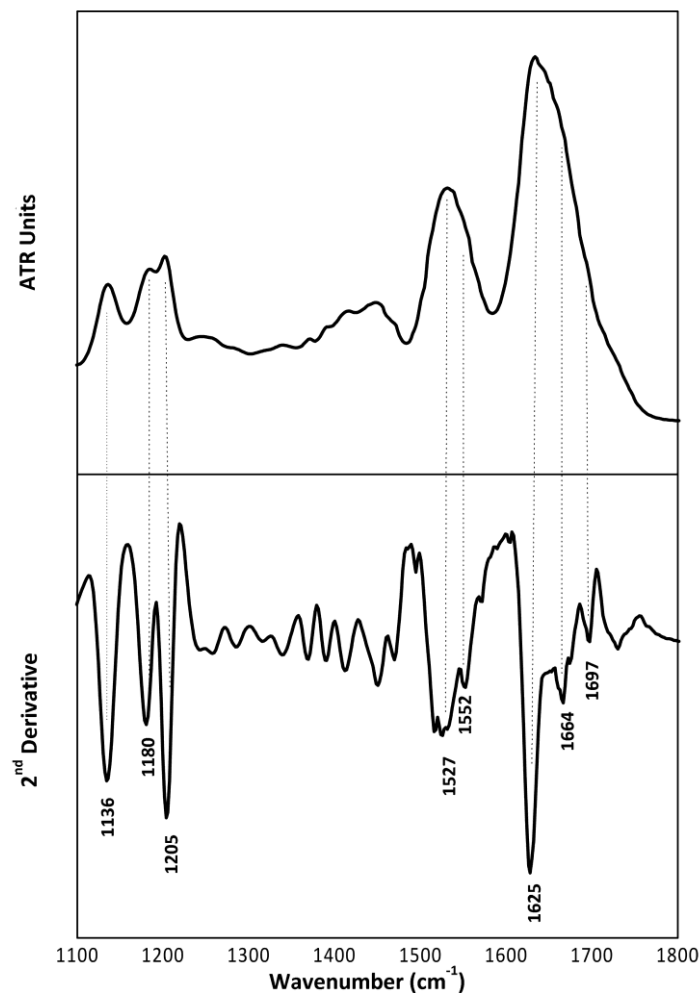
Το αρχείο εξόδου περιελάμβανε τα hkl κάθε ανάκλασης (Πίνακας 19). Η ευνοϊκότερη λύση στο αρχείο εξόδου είχε μέγεθος κυψελίδα με παραμέτρους $a = 37.50 \pm 0.02$ Å, $b = 26.18 \pm 0.01$ Å, $c = 16.10 \pm 0.01$ Å και γωνίες $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Ο όγκος της κυψελίδας υπολογίστηκε στα 15,431.2 Å³ και έτσι, εκτιμάται ότι κάθε μία από τις κυψελίδες περιέχει περίπου 4 μόρια C-πεπτιδίου.

Πίνακας 19. Ανακλάσεις (d_{obs}) που έχουν καταγραφεί από περιθλασιγράμματα ίνας προσανατολισμένων ινιδίων του C-πεπτιδίου.

h	k	l	d_{obs} (Å)	d_{calc}(Å)
0	3	0	8.70	8.69
4	2	0	7.60	7.60
3	2	2	6.00	5.99
8	0	0	4.68	4.67
3	6	0	4.12	4.11
2	7	0	3.67	3.67
9	6	0	3.01	3.00
10	6	1	2.80	2.80

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρού υποστηρίζουν τα ευρήματα της περίθλασης ακτίνων-X για το διαλυτοποιημένο C-πεπτιδίο. Τα ελάχιστα της δεύτερης παραγώγου, χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβή προσδιορισμό των αντίστοιχων μεγίστων των ταινιών απορρόφησης. Το φάσμα υπερερυθρού σε λεπτό ενυδατωμένο υμένιο που δημιουργείται από τα αμυλοειδή ινίδια του C-πεπτιδίου εμφανίζει μία οξεία κορυφή στα 1625 cm^{-1} στην περιοχή της Αμιδικής I και δύο ταινίες στα 1552 cm^{-1} και 1527 cm^{-1} στην περιοχή της Αμιδικής II, οι οποίες αναμφίβολα οφείλονται στη στερεοδιάταξη των β-πτυχωτών επιφανειών (Surewicz *et al.*, 1993), ενώ ο απομακρυσμένος κυματάριθος στα 1697 cm^{-1} είναι ένδειξη αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών (Haris and Chapman, 1995; Jackson and Mantsch, 1995; Krimm and Bandekar, 1986).



Εικόνα 161. Φάσμα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση του C-πεπτιδίου. Τα αμυλοειδή ινίδια του C-πεπτιδίου αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από την χαρακτηριστική θέση των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνεται το φάσμα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ο Πίνακας 20 παρουσιάζει συγκεντρωτικά τις ταινίες του φάσματος, καθώς και τις αποδόσεις (Caswell and Spiro, 1986; Johnston and Krimm, 1971; Krimm and Bandekar, 1986). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι, προγενέστερα πειράματα φασματοσκοπίας υπερερυθρού για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής του C-πεπτιδίου καθώς και πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού αποκάλυπταν ότι ολιγομερισμένες μορφές του πεπτιδίου εμφανίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά άλλων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων (Lind *et al.*, 2010).

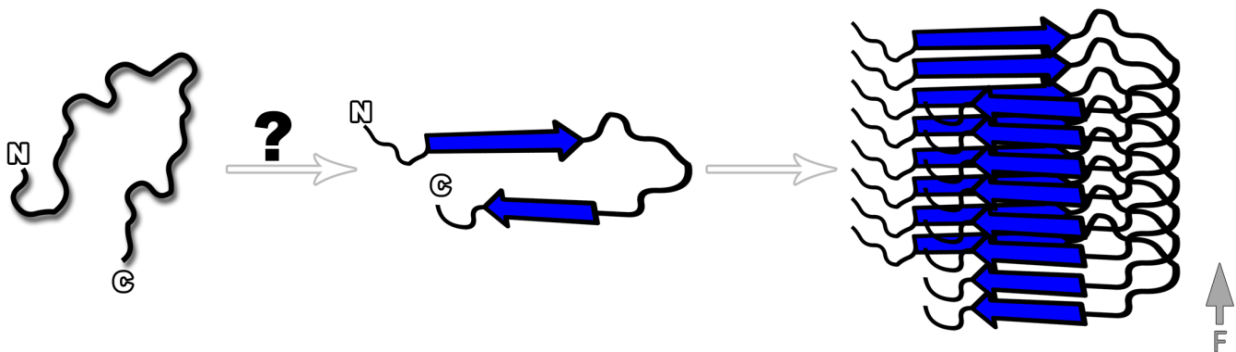
Πίνακας 20. Ταινίες όπως καταγράφονται στο ATR FT-IR (1100-1800 cm^{-1}) φάσμα ενυδατωμένου υμενίου του αμυλοειδογόνου C-πεπτιδίου, μετά την αυτοσυγκρότησή του σε χαρακτηριστικά ινίδια (Εικόνα 161). Δίνονται οι επικρατέστερες αποδόσεις τους.

Ταινίες (cm^{-1})	Αποδόσεις
1136	TFA
1180	TFA
1205	TFA
1411	Pro ^(Johnston and Krimm, 1971)
1450	CH ₂ ^(Caswell and Spiro, 1986) , Pro ^(Johnston and Krimm, 1971)
1469	CH ₂ ^(Caswell and Spiro, 1986)
1527	Αμιδική III (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1552	Αμιδική II (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1625	Αμιδική I (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1664	TFA
1697	Αμιδική I (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες)

Τα παραπάνω ξεκάθαρα αποτελέσματα της αμυλοειδογονικότητας του C-πεπτιδίου, σε συνδυασμό με τις αλληλοεπικαλυπτόμενες προγνώσεις του αλγόριθμου SecStr, που προσδίδουν τα χαρακτηριστικά ακολουθιών χαμαιλέοντα (chameleon sequences) (Kabsch and Sander, 1984) τόσο στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο (⁶QVGQV¹⁰ και ²²QPL²⁴) (Εικόνα 154, πλαίσια με στικτό περίγραμμα), αποκαλύπτουν ότι **το C-πεπτίδιο**

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

εμφανίζει ενδογενώς την τάση να αλλάζει/τροποποιεί την στερεοδιάταξή τους, εξαρτώμενο από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Πρόσφατα αποτελέσματα από την εξελικτική ανάλυση ακολουθιών των C-πεπτιδίων στα θηλαστικά (πεπτίδια ~30 αμινοξικών καταλοίπων) προτείνει ότι η ‘κρυπτογραφημένη’ β-δομή της περιοχής ⁸GQVEL¹² μπορεί να οδηγήσει το C-πεπτίδιο της προΐνσουλίνης στην απόκτηση δομής β-φουρκέτας (β-κλώνος / στροφή / β-κλώνος) (Landreh *et al.*, 2014). Ακολουθώντας την πρόταση αυτή και με βάση το αμυλοειδογόνο προφίλ του C-πεπτιδίου, ένα πιθανό μοντέλο αυτοσυγκρότησης και πολυμερισμού του πεπτιδίου παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 162.

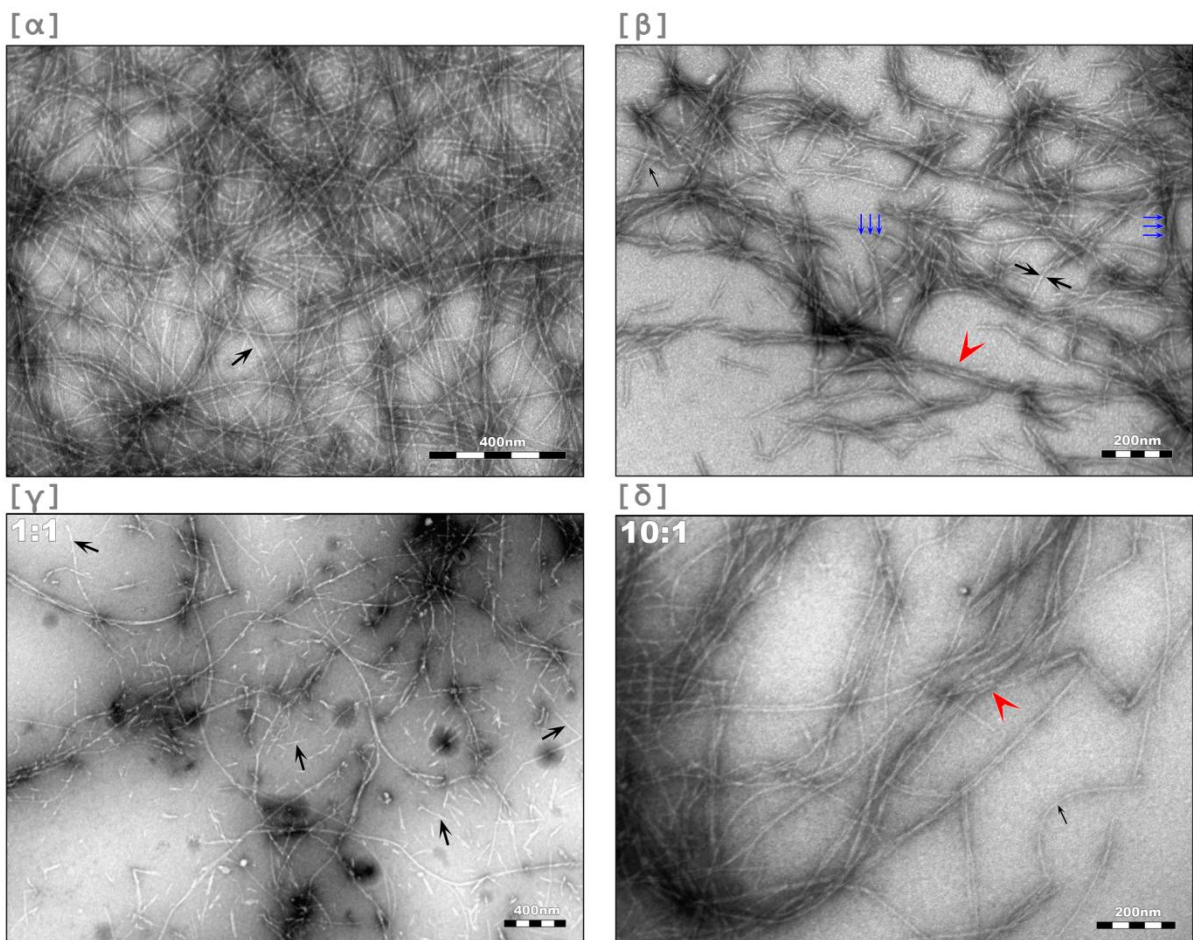


Εικόνα 162. Σχηματική απεικόνιση του πιθανού μονοπατιού αυτοσυγκρότησης του C-πεπτιδίου. Η πλειοψηφία των δομικών πειραμάτων συμφωνεί ότι το C-πεπτίδιο υιοθετεί τυχαία δομή (random coil), κάτω από αδιευκρίνιστες όμως συνθήκες μπορεί να μεταβεί σε μία μη-φυσιολογικά διπλωμένη στερεοδιάταξη και συγκεκριμένα να αποκτήσει δομή β-φουρκέτας (β-κλώνος / στροφή / β-κλώνος) (Landreh *et al.*, 2014). Στοιβάξη μη-φυσιολογικά διπλωμένων μονομερών του C-πεπτιδίου μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία οργανωμένων πολυμερών, δηλαδή αμυλοειδών ινιδίων (N: αμινοτελικό άκρο, C: καρβοξυτελικό άκρο, F: ο άξονας του ινιδίου). Η σχεδίαση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό TopDraw (Bond, 2003) του πακέτου CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994), υπό κλίμακα.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.4.3. Πειράματα συνεπώασης C-πεπτιδίου της προϊνσουλίνης & Αμυλίνης

Λαμβάνοντας υπόψη το μικροπεριβάλλον των ώριμων κυστιδίων των β-κυττάρων του παγκρέατος (Εικόνα 56β, Εικόνα 56γ), στο οποίο οι πεπτιδικές ορμόνες συνυπάρχουν με άγνωστες μέχρι σήμερα τις αλληλεπιδράσεις τους, **πραγματοποιήσαμε συνδυαστικές δομικές μελέτες μεταξύ του C-πεπτιδίου και της αμυλίνης**. Τα πρώτα σχετικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν το 1996 με προσθήκη αμυλίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις C-πεπτιδίου (Westermarck *et al.*, 1996). Η άγνωστη τότε αμυλοειδογονικότητα του C-πεπτιδίου οδήγησε σε διαφορετική ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων αν και παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη C-πεπτιδίου σε διαλύματα αμυλίνης ενίσχυε την αμυλοειδογονικότητα της δεύτερης.



Εικόνα 163. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης των αμυλοειδών ινιδίων από αυτοσυγκρότηση της αμυλίνης, του C-πεπτιδίου και συνδυασμών τους. Πειράματα συνεπώασης C-πεπτιδίου / αμυλίνης σε αναλογία 1:1 (β) και 10:1 (γ) αποδεικνύουν το σχηματισμό πηκτωμάτων ινιδίων, σε απεσταγμένο νερό. Η αύξηση της συγκέντρωσης του C-πεπτιδίου επιδρά στη μορφολογία των ινιδίων (περιγραφή κυρίως κείμενο). Οι ηλεκτρονιογραφίες (α) και (δ) αποτελούν πειράματα ελέγχου.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα του Westermark και των συνεργατών του (Westermark *et al.*, 1996) ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης, σε κατάλληλα δείγματα με συνεπώαση C-πεπτιδίου και αμυλίνης έπειτα από αρνητική χρώση, υποδεικνύει το σχηματισμό πηκτωμάτων ώριμων ινιδίων σε απεσταγμένο νερό. Σημειώνεται στο σημείο αυτό ότι η αμυλίνη σχηματίζει ευδιάκριτα αμυλοειδή ινίδια διαμέτρου $\sim 100 \text{ \AA}$, ενώ το C-πεπτιδίο αυτοσυγκροτείται δημιουργώντας πρωτοϊνίδια $\sim 50-70 \text{ \AA}$, τα οποία αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως προς το σχηματισμό ώριμων ινιδίων $\sim 100-120 \text{ \AA}$.

- Σε αναλογία 1:1 C-πεπτιδίου / αμυλίνης (Εικόνα 163γ) παρατηρήθηκε σχηματισμός δύο πληθυσμών αμυλοειδών ινιδίων, με αρατή κατανομή στο πλέγμα μικροσκοπίας, σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου (Εικόνα 163α, Εικόνα 163β). Συγκεκριμένα, τα ινίδια που παρουσιάζονται στην Εικόνα 163γ εμφανίζουν τα ευδιάκριτα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων της αμυλίνης, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει ο πληθυσμός των ‘κατακερματισμένων’ ινιδιακών θραυσμάτων διαμέτρου $\sim 100 \text{ \AA}$ (βέλη), που δεν απαντώνται σε κανένα από τα δύο πειράματα ελέγχου.
- Αντίθετα, σε αναλογία 10:1 C-πεπτιδίου / αμυλίνης (Εικόνα 163δ) εντοπίστηκε η επικράτηση των χαρακτηριστικών των αμυλοειδών ινιδίων του C-πεπτιδίου, καθώς παρατηρούνται δεμάτια ινιδίων (κόκκινη αιχμή βέλους) και μη διακλαδισμένες υπερέλικες ινιδίων με απροσδιόριστο μήκος και ποικίλες διαμέτρους. Αξιοσημείωτη, σε αυτή την αναλογία του C-πεπτιδίου, είναι η απουσία των ινιδιακών θραυσμάτων.

Συνολικά, η άγνωστη μέχρι σήμερα αμυλοειδογονικότητα του C-πεπτιδίου **δίνει πιθανά σημαντικές απαντήσεις λειτουργικού, φαρμακευτικού ή και βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος**. Έτσι, οι ολιγομερισμένες μορφές του πεπτιδίου που απαντώνται σε ασθενείς με διαβήτη (Faber *et al.*, 1978; Marx *et al.*, 2004) ή σε υπέρβαρα άτομα (Polonsky *et al.*, 1988) θα πρέπει να αναθεωρηθούν και στοχευμένα πειράματα ελέγχου της αμυλοειδογονικότητας θα πρέπει να ξεκαθαρίσουν το τοπίο. Παράλληλα, ερωτήματα θα πρέπει να τεθούν και στην εμφάνιση και εξέλιξη του διαβήτη, μιας και είναι σύνηθες στην πλειοψηφία των αμυλοειδώσεων δύο ή και περισσότερες πρωτεΐνες να συσσωματώνονται ταυτόχρονα και να συν-εναποτείνονται στις αμυλοειδείς πλάκες (Howlett and Moore, 2006; Kaur and Levy, 2012). Τέλος, η χρήση ενός αμυλοειδογόνου πεπτιδίου, ως ευεργετικό φάρμακο σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I ή διαβήτη τύπου II θα πρέπει πιθανά να τεθεί υπο αμφισβήτηση, ενώ πειράματα κυτταροτοξικότητας θα πρέπει να επιβεβαιώσουν την ασφάλεια του C-πεπτιδίου ως φαρμακευτικό σκεύασμα.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.5. Κλαστερίνη

Το πιο εντυπωσιακό εύρημα στις ερευνητικές μελέτες της κλαστερίνης αποτελεί ο εντοπισμός της τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ως πρωτεΐνη-συνοδός συμμετέχει σε μία πληθώρα διεργασιών, όπως η μεταφορά λιπιδίων, λιπαρών οξέων και γενικότερα υδρόφοβων μορίων μεταξύ των ιστών και η διευκόλυνση της μετακίνησής τους (LaDu *et al.*, 1998). Αντίθετα, σε παθολογικές καταστάσεις βρίσκεται συν-εναποθετημένη μαζί με πληθώρα μη-φυσιολογικά διπλωμένων πρωτεϊνικών συστατικών. Συγκεκριμένα εντοπίζεται ως σημαντικό συστατικό στις πλάκες ηλικιωμένων ατόμων που έχουν διαγνωσθεί με τη νόσο του Alzheimer (Kida *et al.*, 1995). Η συνεύρεση της μοριακής συνοδού σε αμυλοειδείς εναποθέσεις δεν αποδεικνύει την ‘ενοχή’ ή την ‘αθώωση’ της, υπαινίσσεται όμως την τάση της κλαστερίνης να αλληλεπιδρά με μη-φυσιολογικά διπλωμένες πρωτεΐνες. Ο ανεξιχνίαστος, μέχρι και σήμερα, ρόλος των πρωτεϊνών που συμμετέχουν συν-εναποθετημένες στις αμυλοειδείς πλάκες, αναδεικνύει τη σημασία των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (*protein-protein interactions*), τόσο για την εξέλιξη των παθολογικών καταστάσεων, όσο και για την εύρεση πιθανών φαρμακευτικών στόχων. Το ερώτημα αν η ίδια η κλαστερίνη αυτοσυγκροτείται σε αμυλοειδή ινίδια, παραμένει αναπάντητο.

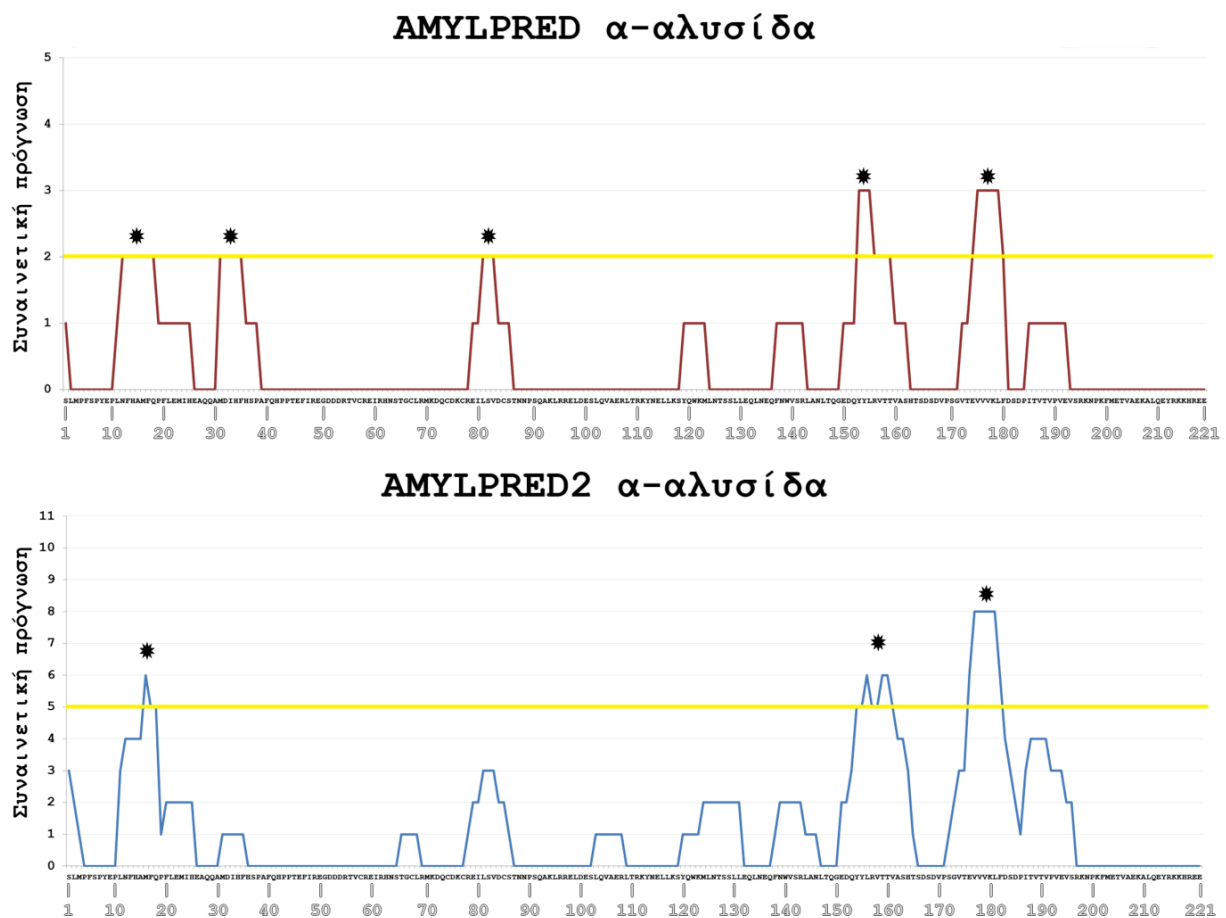
Στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της υπολογιστικής και της πειραματικής ανάλυσης της αμυλοειδογονικότητας της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Η παρούσα ανάλυση αποτελεί **την πρώτη προσέγγιση για την εύρεση της αμυλοειδογονικότητας σε μία μοριακή συνοδό.**

3.5.1. Ανάλυση της Ακολουθίας της κλαστερίνης

Για την ανάλυση του αμυλοειδογόνου προφίλ της ακολουθίας της α-αλυσίδας της κλαστερίνης χρησιμοποιήθηκε ο συναινετικός αλγόριθμος εύρεσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009; Tsolis *et al.*, 2013). Από τη βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών UniProt απομονώθηκε η ακολουθία της α-αλυσίδας της κλαστερίνης (UniProt AC: P10909), η οποία στην κυρίαρχη εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης αποτελείται από 222 αμινοξικά κατάλοιπα.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

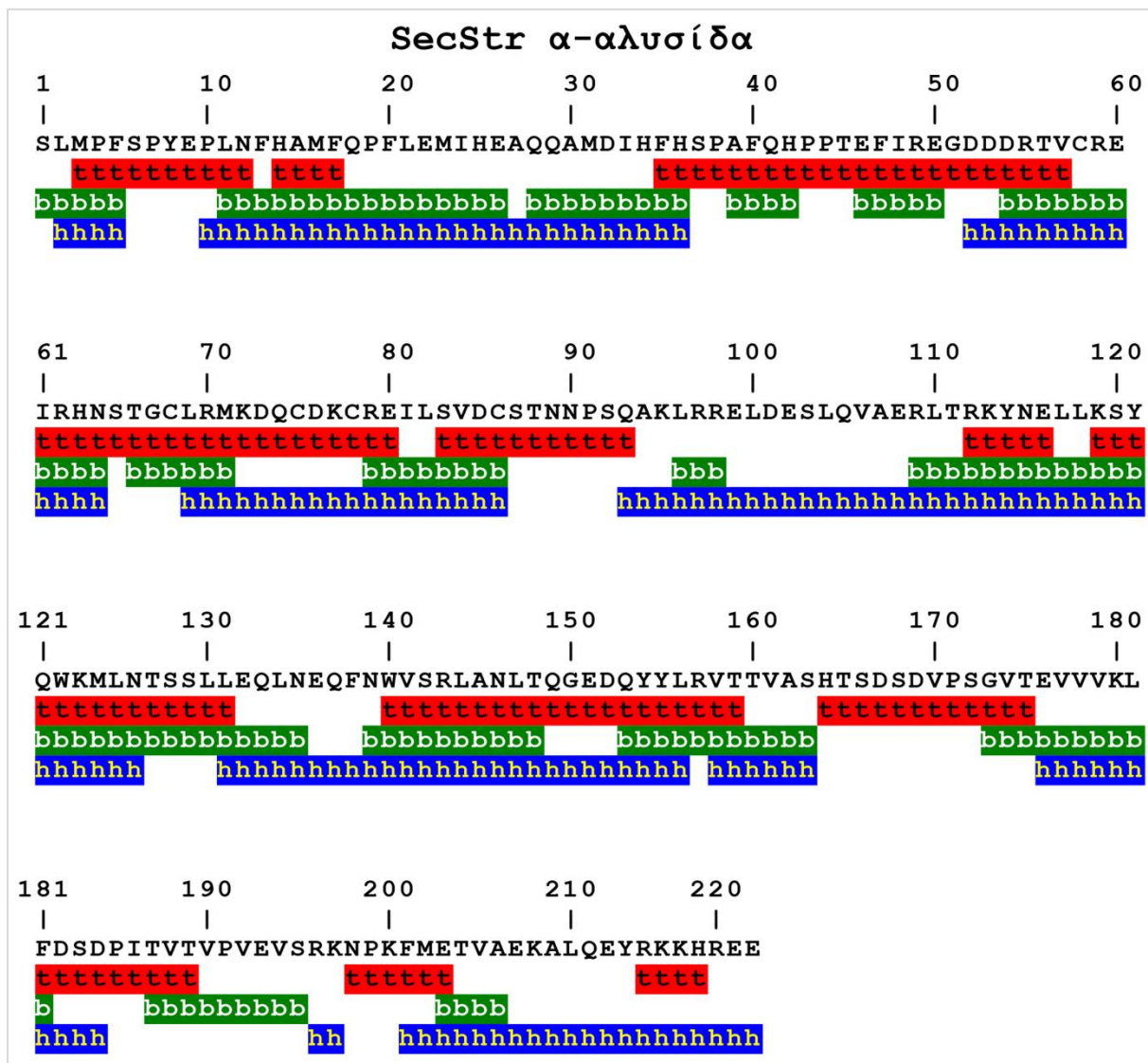
Στην Εικόνα 164 παρουσιάζεται η συναινετική πρόγνωση των αλγορίθμων AMYLPRED και AMYLPRED2 για την α -αλυσίδα της κλαστερίνης. Παρατηρούμε ότι το προφίλ αμυλοειδογονικότητας μεταξύ των δύο μεθόδων διαφέρει αρκετά. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος AMYLPRED, με κατώφλι πρόβλεψης τους 2 από τους 5 αλγορίθμους προβλέπει τα πεπτιδικά τμήματα 12 NFHAMFQ 18 , 31 MDIHF 35 , 82 LSVD 84 , 155 YYLRVTT 161 και 177 EVVVKLF 183 , σε αντίθεση με τον αλγόριθμο AMYLPRED2, ο οποίος με κατώφλι πρόβλεψης τους 5 από τους 11 αλγορίθμους προβλέπει τα πεπτιδικά τμήματα 16 MFQ 18 , 155 YYLRVTTA 162 και 177 EVVVKLFD 184 (Εικόνα 164, αστερίσκοι).



Εικόνα 164. Το προφίλ αμυλοειδογονικότητας της α -αλυσίδας της κλαστερίνης, όπως προβλέπεται από τους συναινετικούς αλγορίθμους AMYLPRED(Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2(Tsolis *et al.*, 2013). Τα ιστογράμματα παρουσιάζουν την συναινετική πρόγνωση του αλγορίθμου για πιθανές περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στην 222 καταλοίπων αμινοξική ακολουθία της α -αλυσίδας της κλαστερίνης. Η κίτρινη γραμμή σημειώνει το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι του κάθε αλγορίθμου (*consensus threshold*). Με αστερίσκο σημειώνονται τα πεπτιδικά-τμήματα που ξεπερνούν ή βρίσκονται στο προεπιλεγμένο κατώφλι πρόγνωσης. Ο αλγόριθμος AMYLPRED προβλέπει τα πεπτιδικά τμήματα 12 NFHAMFQ 18 , 31 MDIHF 35 , 82 LSVD 84 , 155 YYLRVTT 161 και 177 EVVVKLF 183 . Ο αλγόριθμος AMYLPRED2 προβλέπει τα πεπτιδικά τμήματα 16 MFQ 18 , 155 YYLRVTTA 162 και 177 EVVVKLFD 184 .

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η κοινή πρόβλεψη των τμημάτων του αμινοτελικού (¹²NFHAMFQ¹⁸) και του καρβοξυτελικού άκρου (¹⁵⁵YYLRVTTA¹⁶² και ¹⁷⁷EVVVKLFD¹⁸⁴) της α-αλυσίδας, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, σε συνδυασμό με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις επόμενες ενότητες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των αλγορίθμων οφείλονται στις παραμέτρους των εκάστοτε μεθόδων που συνδυάζονται, καθώς και στην ιδιάζουσα αμινοξική σύσταση στην ακολουθία της α-αλυσίδας της κλαστερίνης (Lakins *et al.*, 2002).



Εικόνα 165. Πρόγνωση δευτεροταγούς δομής της α-αλυσίδας της κλαστερίνης με τον αλγόριθμο SecStr (Hamodrakas, 1988). Με κόκκινο σημειώνεται η πρόγνωση των στροφών (t), με πράσινο η πρόγνωση των β-κλώνων (b) και με μπλε η πρόγνωση των ελίκων (h). Παρατηρούνται πεπτιδικά τμήματα με χαρακτηριστικά ακολουθιών χαμαιλέοντα, καθώς προβλέπεται να εμφανίζουν την τάση να υιοθετούν ταυτόχρονα ελικοειδή και εκτεταμένη στερεοδιάταξη.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Προηγούμενες αναλύσεις της ακολουθίας της κλαστερίνης προέβλεψαν 3 περιοχές αμφιπαθικών ελίκων, καθώς και εκτενή εγγενώς μη δομημένα τμήματα, ευρήματα εύλογα για μία μοριακή συνοδό που διαμεσολαβεί των αλληλεπιδράσεων πολλών υδρόφοβων μορίων (de Silva *et al.*, 1990). Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της α-αλυσίδας της κλαστερίνης με τον αλγόριθμο SecStr (Hamodrakas, 1988) (Εικόνα 165), εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, σε συνδυασμό με τα παραπάνω αποτελέσματα. Η επεξεργασία επιβεβαιώνει τα ευρήματα του deSilva και των συνεργατών τους για περιοχές ελίκων σχεδόν σε όλο το μήκος της ακολουθίας (de Silva *et al.*, 1990; Humphreys *et al.*, 1999), **αποκαλύπτει όμως και περιοχές με ιδιότητες ακολουθιών χαμαιλέοντα**. Συγκεκριμένα, σχεδόν σε όλα τα τμήματα όπου προβλέπονται περιοχές ελίκων (Εικόνα 165, μπλε), παρατηρείται η ταυτόχρονη πρόβλεψη β-κλώνων (Εικόνα 165, πράσινο), γεγονός που αποδεικνύει ότι **η α-αλυσίδα της κλαστερίνης φέρει τμήματα με χαρακτηριστικά ‘στερεοδιαταξικών διακοπών’** (Hamodrakas *et al.*, 2007), δηλαδή τμήματα που μπορεί να μεταβάλλουν τη δομή τους ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (Waterhous and Johnson, 1994; Zhong and Johnson, 1992). Η ιδιαιτερότητα της ακολουθίας της α-αλυσίδας ταυτίζεται με τις ιδιότητες που διαθέτουν πολλές αμυλοειδογόνες απολιποπρωτεΐνες (Louros *et al.*, 2015a), αλλά και με αμυλοειδογόνα πεπτίδια ή πρωτεΐνες γενικότερα, σε συνδυασμό και με το αμυλοειδογόνου προφίλ που παρουσιάζεται στην Εικόνα 164.

3.5.2. Δομικές μελέτες της α-αλυσίδας της κλαστερίνης

Τα πεπτιδικά τμήματα ¹²NFHAMFQ¹⁸, ³¹MDIHF³⁵, ⁸²LSVD⁸⁴, ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³, που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση της ακολουθίας της α-αλυσίδας της κλαστερίνης συντέθηκαν χημικά (GeneCust© - Europe, Luxembourg), με ελεύθερο τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο, καθαρότητα >98% και μελετήθηκαν ως πιθανοί ‘αμυλοειδογόνοι καθοριστές’.

Στην περίπτωση των πεπτιδίων-αναλόγων ³¹MDIHF³⁵ και ⁸²LSVD⁸⁴ σχεδιάστηκαν τα πεπτίδια-ανάλογα ³⁰AMDHF³⁵ και ⁸¹ILSVD⁸⁴, αντίστοιχα. Οι προσθήκες αυτές βασίζονται στην παρατήρηση του αμυλοειδογόνου προφίλ της κλαστερίνης, καθώς και στην ιδέα ότι πενταπεπτιδικά ή εξαπεπτιδικά τμήματα των πρωτεϊνών είναι ικανά να εμπεριέχουν την πληροφορία που οδηγεί

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

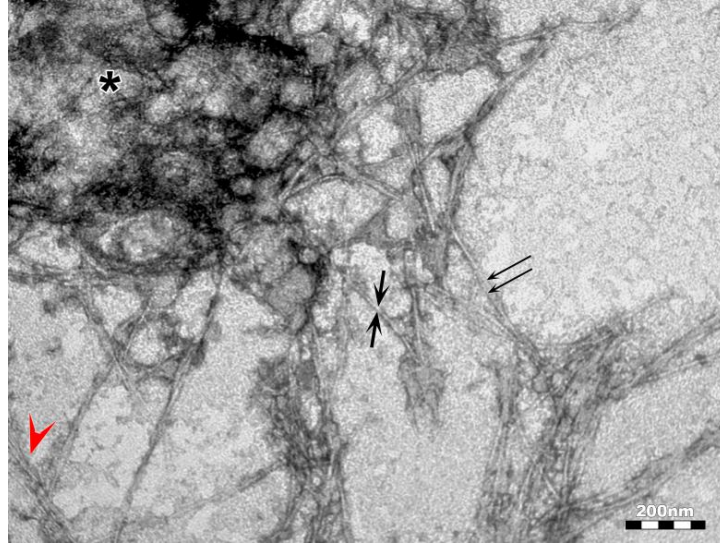
φυσιολογικές πρωτεΐνες στην ινιδιακή κατάσταση (Balbach *et al.*, 2000; Mazor *et al.*, 2002; Tenidis *et al.*, 2000). Τα χημικά συνθετισμένα πεπτιδία-ανάλογα των τμημάτων της ανθρώπινης κλαστερίνης ($^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$, $^{30}\text{AMDIDHF}^{35}$, $^{81}\text{ILSVD}^{84}$, $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ και $^{177}\text{EYVVKLF}^{183}$) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 5 mg ml⁻¹ έως 10 mg ml⁻¹ και αφέθηκαν προς επώαση για διάστημα τουλάχιστον μιας εβδομάδας. Σε όλες τις περιπτώσεις τα διαλύματα των πεπτιδίων-αναλόγων βρέθηκε να δημιουργούν πηκτώματα.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης σε κατάλληλα παρασκευάσματα/δείγματα από διαλύματα των πεπτιδίων $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$, $^{30}\text{AMDIDHF}^{35}$, $^{81}\text{ILSVD}^{84}$, $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ και $^{177}\text{EYVVKLF}^{183}$, έπειτα από αρνητική χρώση, υποδεικνύουν **την τάση όλων των πεπτιδίων-αναλόγων να αυτοσυγκροτούνται, σχηματίζοντας ινίδια διαφορετικής μορφολογίας**. Στην Εικόνα 166 παρατηρούμε τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων-αναλόγων έπειτα από 7 μέρες επώασης σε συνθήκες δωματίου. Το πυκνό δίκτυο ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$ (Εικόνα 166α, αστερίσκος) φαίνεται να δημιουργείται από πρωτοϊνίδια διαμέτρου ~60-70Å (Εικόνα 166α, λεπτά μαύρα βέλη) τα οποία εμφανίζουν την τάση να αλληλεπιδρούν πλευρικά σχηματίζοντας δεμάτια (Εικόνα 166α, κόκκινη αιχμή βέλους) ή υπερέλικες πρωτοϊνιδίων (Εικόνα 166α, μεγάλα μαύρα βέλη).

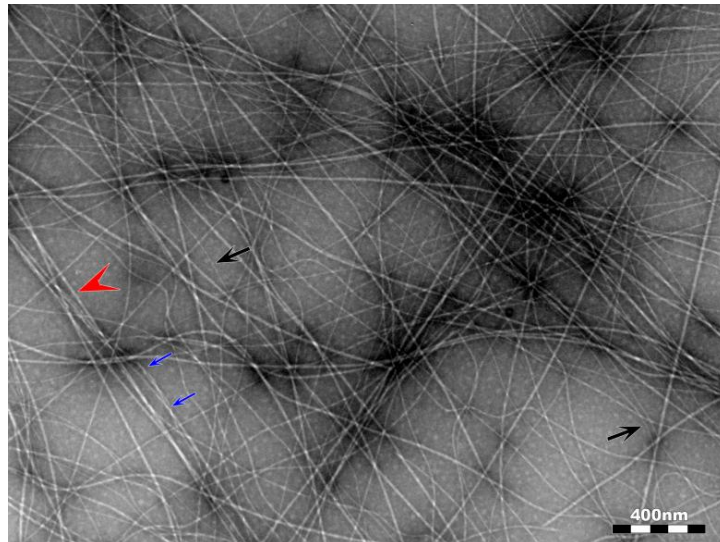
Το πενταπεπτιδίο ανάλογο $^{30}\text{AMDIDHF}^{35}$ με τη σειρά του σχηματίζει δίκτυα ευδιάκριτων ινιδίων διαμέτρου 100Å (Εικόνα 166β, μεγάλα μαύρα βέλη), τα οποία ξεκάθαρα εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων, ενώ όμοια με το προηγούμενο πεπτιδίο-ανάλογο σχηματίζουν υπερέλικες (Εικόνα 166β, μπλε βέλη) και δεμάτια ινιδίων (Εικόνα 166β, κόκκινη αιχμή βέλους). Αντίθετα, το πεπτιδίο-ανάλογο $^{81}\text{ILSVD}^{84}$ αυτό συγκροτείται δημιουργώντας ινιδιακές δομές, λιγότερο χαρακτηριστικής μορφολογίας (Εικόνα 166γ). Αμυλοειδή ινίδια χαρακτηριστικής μορφολογίας και διαμέτρου ~120Å παρατηρούμε κατά την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ (Εικόνα 166δ), ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμφάνιση ινιδιακών θραυσμάτων στο πήκτωμα του πεπτιδίου-αναλόγου. Τέλος το επταπεπτιδίο-ανάλογο $^{177}\text{EYVVKLF}^{183}$ αυτοοργανώνεται δημιουργώντας πρωτοϊνίδια διαμέτρου ~60-70Å (Εικόνα 166ε, λεπτό μαύρο βέλος) και μεγαλύτερα ινίδια διαμέτρου ~100-120Å (Εικόνα 166ε, μεγάλο μαύρο βέλος) η αλληλεπίδραση των οποίων οδηγεί στο σχηματισμό δεματίων. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση καλά οργανωμένων ταινιών του πεπτιδίου $^{177}\text{EYVVKLF}^{183}$, όπως παρουσιάζεται στην ένθετη εικόνα στην Εικόνα 166ε.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

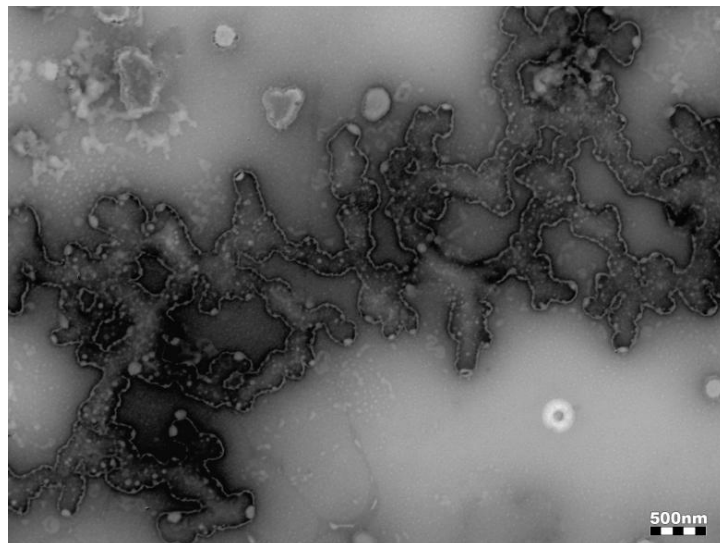
[α] $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$



[β] $^{30}\text{AMDIEHF}^{35}$

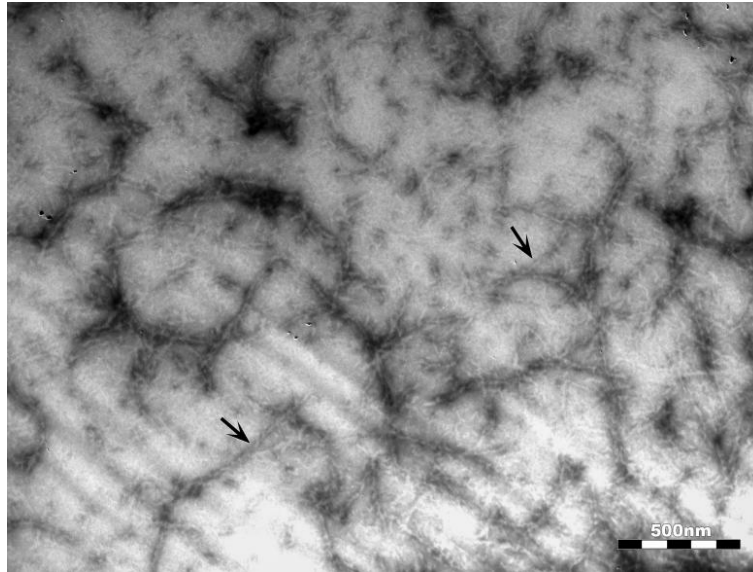


[γ] $^{81}\text{ILSVD}^{84}$

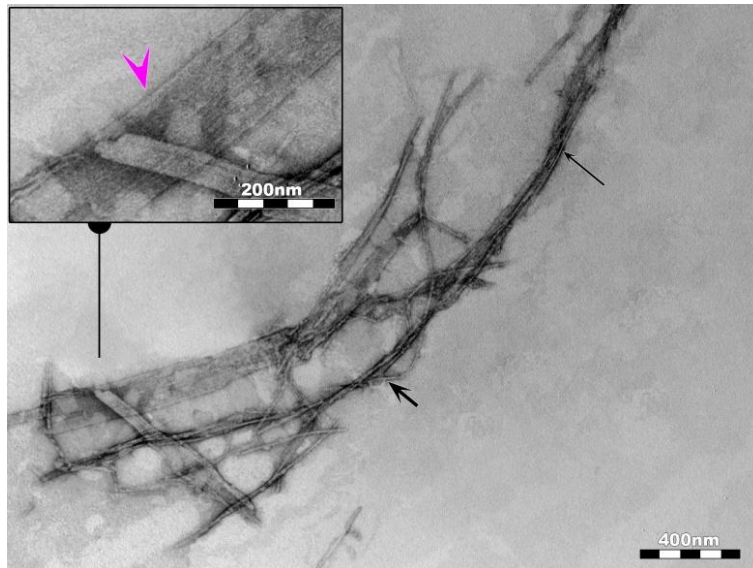


Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

[δ] $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$



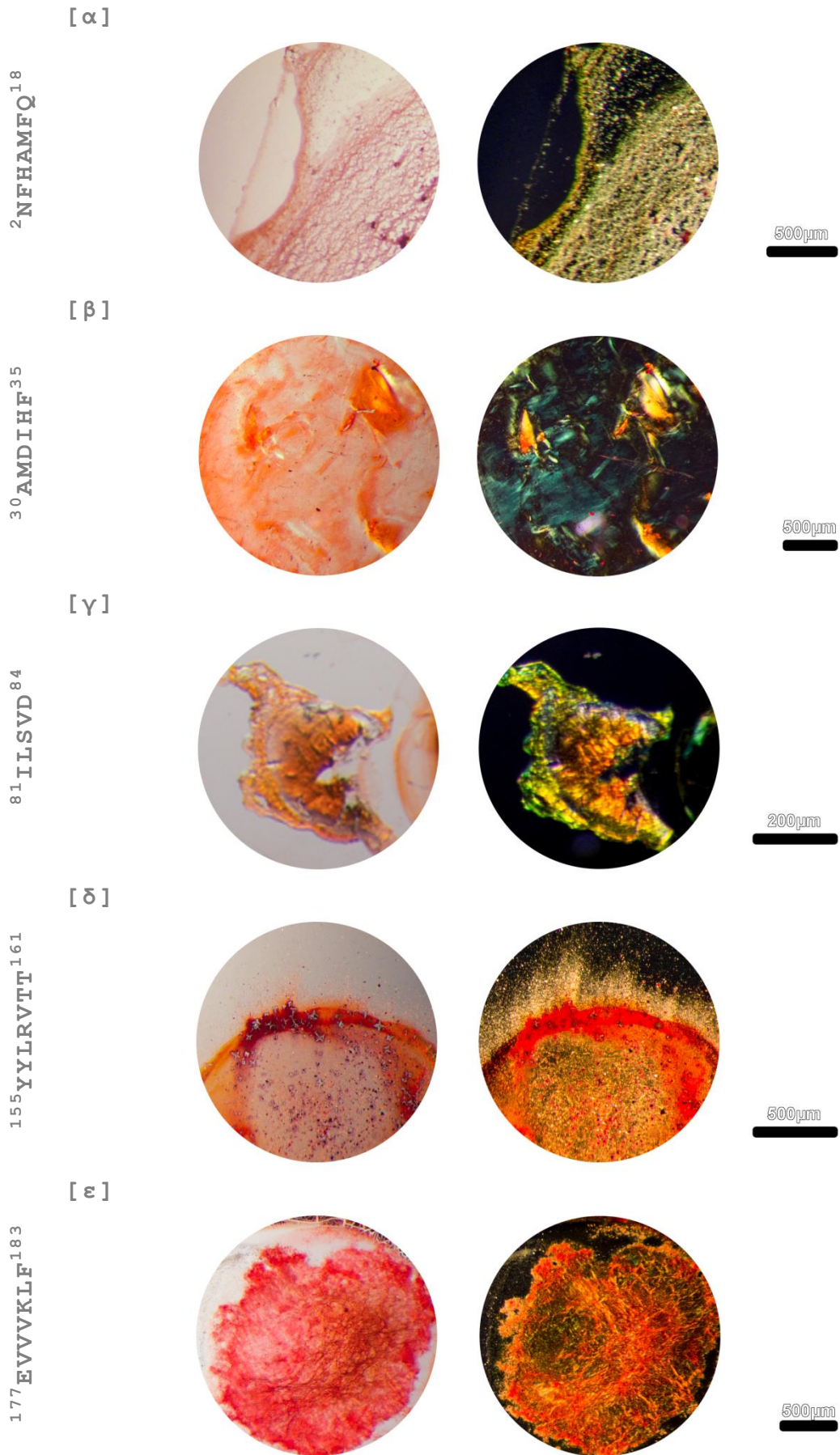
[ε] $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$



Εικόνα 166. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης πολυμορφικών αμυλοειδών ινιδίων που προκύπτουν από την αυτοσυγκρότηση πεπτιδίων-αναλόγων της α -αλυσίδας της κλαστερίνης. Τα πεπτιδία-ανάλογα $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$ (α), $^{30}\text{AMDHF}^{35}$ (β), $^{81}\text{ILSVD}^{84}$ (γ), $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ (δ) και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ (ϵ) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml^{-1} . Παρατηρούμε ινίδια επώασης 7 ημερών.

Χρώση υμενίων ώριμων αμυλοειδών ινιδίων των παραπάνω πεπτιδίων-αναλόγων κατέγραψε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red (Εικόνα 167, αριστερά) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 167, δεξιά).

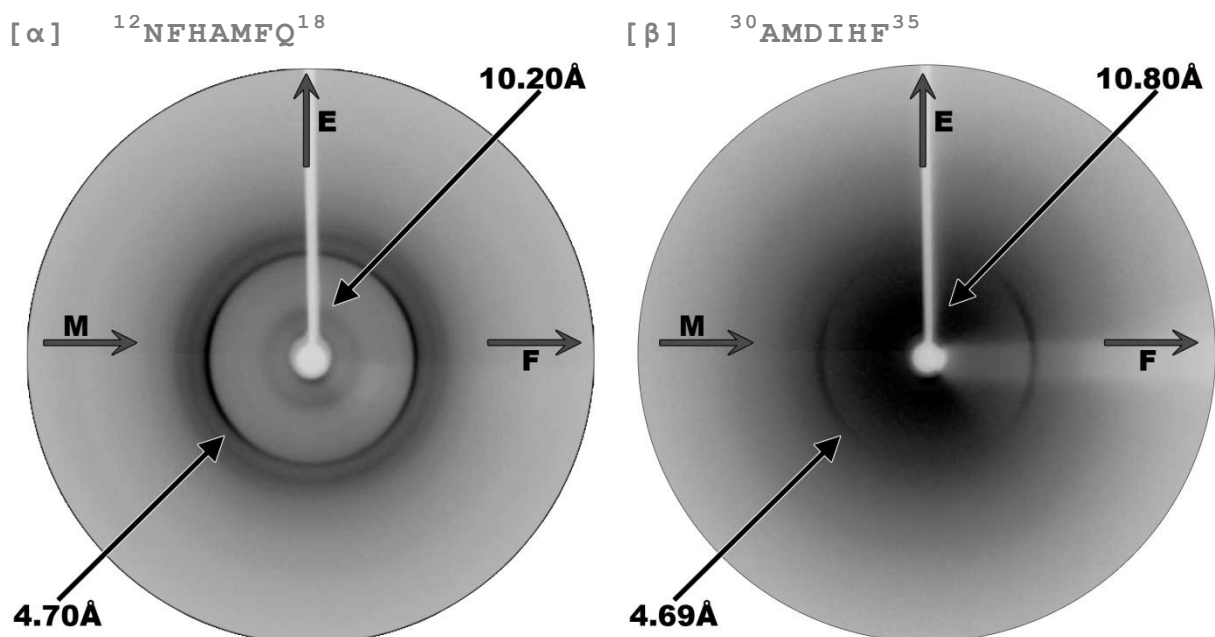
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



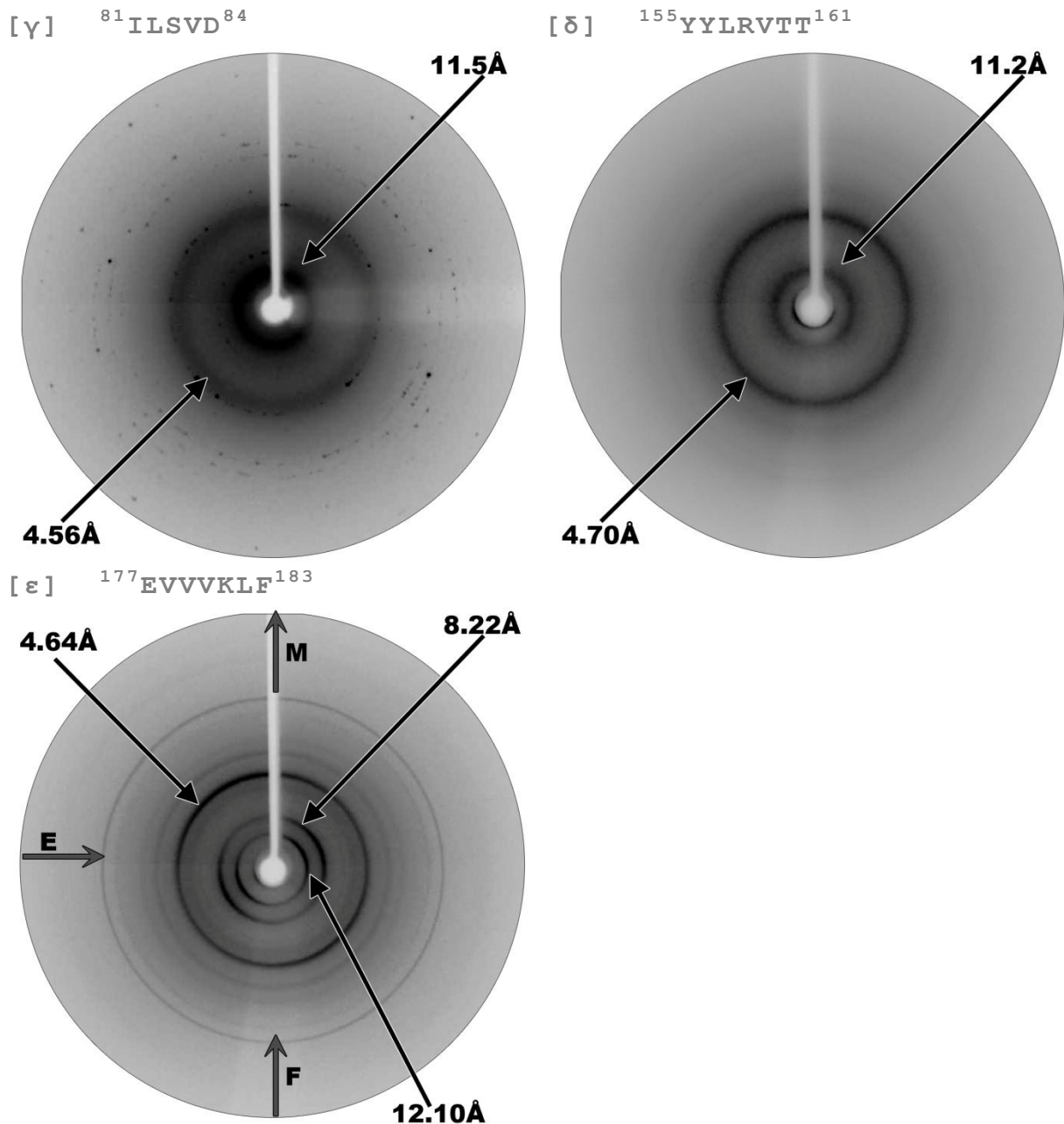
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Εικόνα 167. Φωτομικρογραφίες των ινιδίων των πεπτιδίων-αναλόγων της α -αλυσίδας της κλαστερίνης έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (δεξιά). ($^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$ (α), $^{30}\text{AMD IHF}^{35}$ (β), $^{81}\text{ILSVD}^{84}$ (γ), $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ (δ) και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ (ε)).

Περίθλαση ακτίνων X σε προσανατολισμένες ίνες των αμυλοειδών ινιδίων των πεπτιδίων-αναλόγων $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$, $^{30}\text{AMD IHF}^{35}$, $^{81}\text{ILSVD}^{84}$, $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ δίνουν περιθλασιγράμματα που εμφανίζουν χαρακτηριστικές ανακλάσεις της “cross- β ” αρχιτεκτονικής των αμυλοειδών ινιδίων. Η εμφάνιση των ανακλάσεων με τη μορφή δακτυλίου είναι αποτέλεσμα μη-βέλτιστου προσανατολισμού των αμυλοειδών ινιδίων στην ίνα. Στα περιθλασιγράμματα με την εμφάνιση αψίδας (arch), όπου έχει επιτευχθεί καλός προσανατολισμός των ινιδίων, σημειώνονται ο μεσημβρινός άξονας (M), ο ισημερινό άξονας (E) και τέλος ο άξονας του ινιδίου (F). Η μεσημβρινή ανάκλαση των περιθλασιγραμμάτων κυμαίνεται από 4.56-4.7 \AA και είναι ενδεικτική της απόστασης μεταξύ β -κλώνων που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου και οργανώνονται κάθετα ως προς τον άξονα της ίνας. Η ισημερινή ισχυρή ανάκλαση καταγράφεται στα 10.2 \AA , 10.8 \AA , 11.5 \AA , 11.2 \AA , 8.22 \AA για τα πεπτίδια-ανάλογα $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$, $^{30}\text{AMD IHF}^{35}$, $^{81}\text{ILSVD}^{84}$, $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$, αντίστοιχα. Η δεύτερη αυτή ανάκλαση αντιστοιχεί στο διαδοχικά πακετάρισμα μεταξύ των β -πτυχωτών επιφανειών, οι οποίες βρίσκονται παράλληλα ως προς τον άξονα της εκάστοτε προσανατολισμένης ίνας.



Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

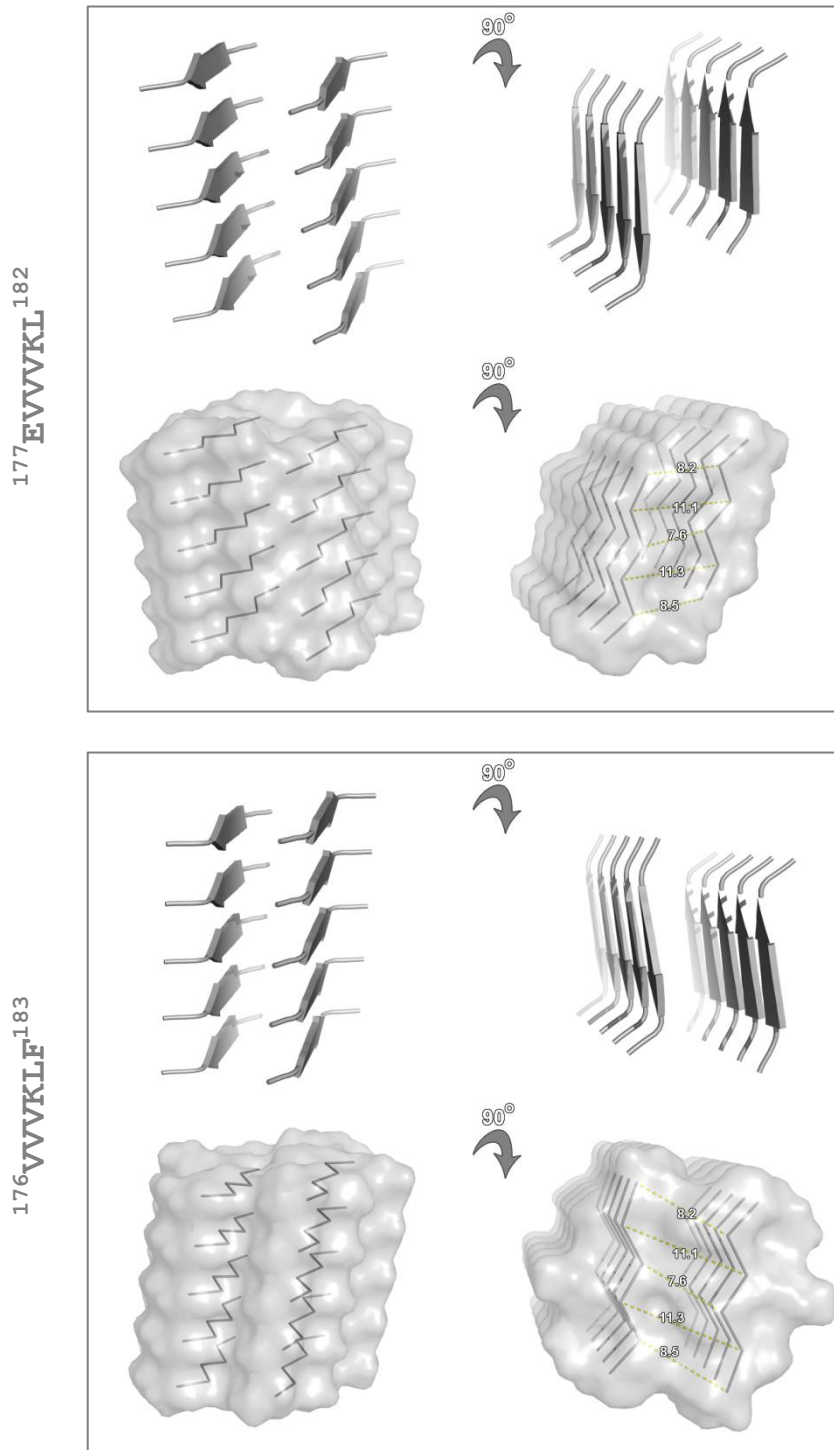


Εικόνα 168. Προσανατολισμένα περιθλασιγράμματα των πεπτιδίων-αναλόγων της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Τα πεπτιδία-ανάλογα $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$ (α), $^{30}\text{AMDHF}^{35}$ (β), $^{81}\text{ILSVD}^{84}$ (γ), $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ (δ) και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ (ε) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹. (M: μεσημβρινός, E: ισημερινός, F: άξονας της ίνας)

Σημειώνεται ότι η προσανατολισμένες ανακλάσεις του πεπτιδίου $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ στα 12.10Å και στα 8.22Å καταγράφουν το πακετάρισμα των β-πτυχωτών επιφανειών, καθώς καταγράφεται η οργάνωση και των δύο επιφανειών που δημιουργούνται από το πακετάρισμα γειτονικών β-κλώνων. Η τελευταία μέτρηση επιβεβαιώνεται και από μελέτες σε διαδοχικά εξαπεπτιδία του πεπτιδίου $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ που εξάχθηκαν από τη ZipperDB (Goldsbury *et al.*, 1997). Σε συμφωνία με τις πειραματικές μετρήσεις βρέθηκε ότι η τιμή του μέσου

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

πακεταρίσματος των πλευρικών αλυσίδων που συγκροτούν τα δεκαπεπτίδια προσεγγίζει την τιμή $\sim 9\text{\AA}$ (Εικόνα 169).



Εικόνα 169. Διαδοχικά μοντέλα του επταπεπτιδίου $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$, που βρίσκονται κατατεθειμένα στη βάση ZipperDB (Goldschmidt *et al.*, 2010). Παρουσιάζονται τα διαδοχικά στερεοδιαταξικά φερμουάρ του πεπτιδίου στις 0 και 90°. Οι αναπαραστάσεις καρτών (επάνω) και χωροπληρωτικών μοντέλων (κάτω) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005).

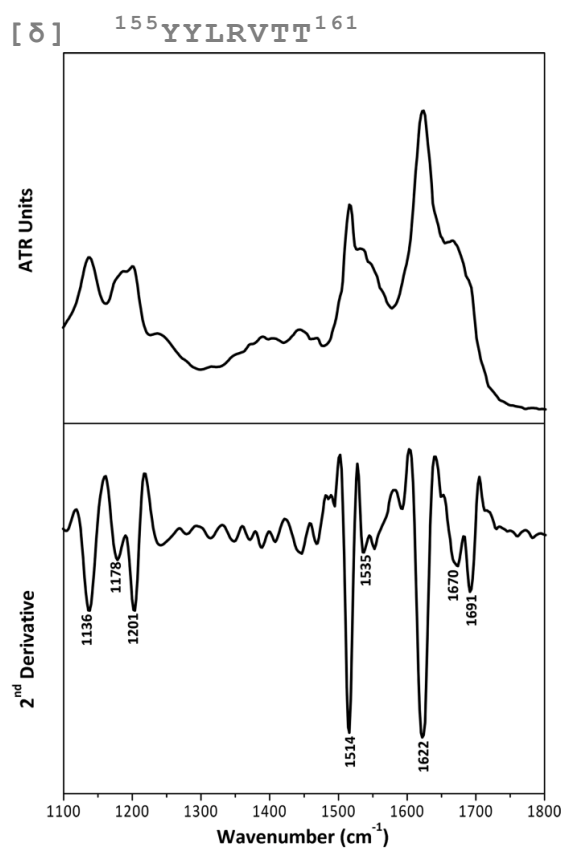
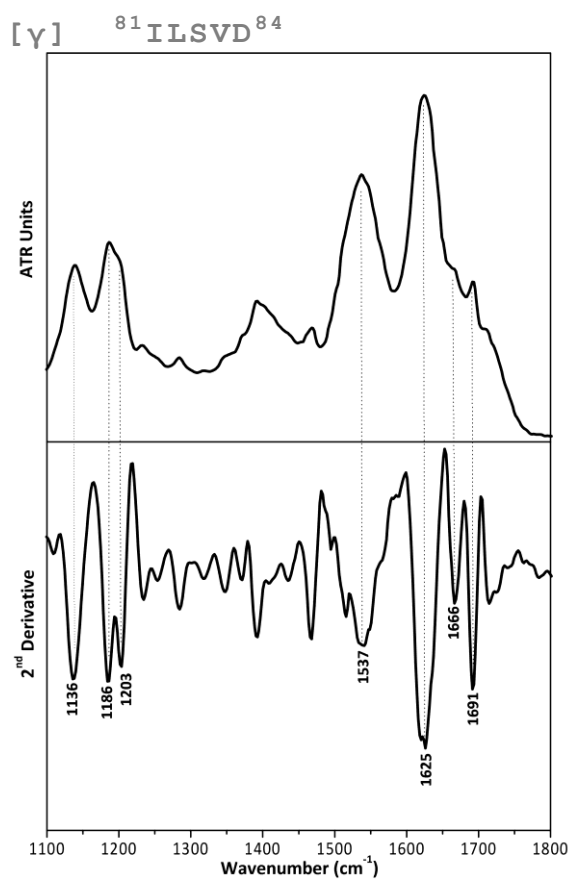
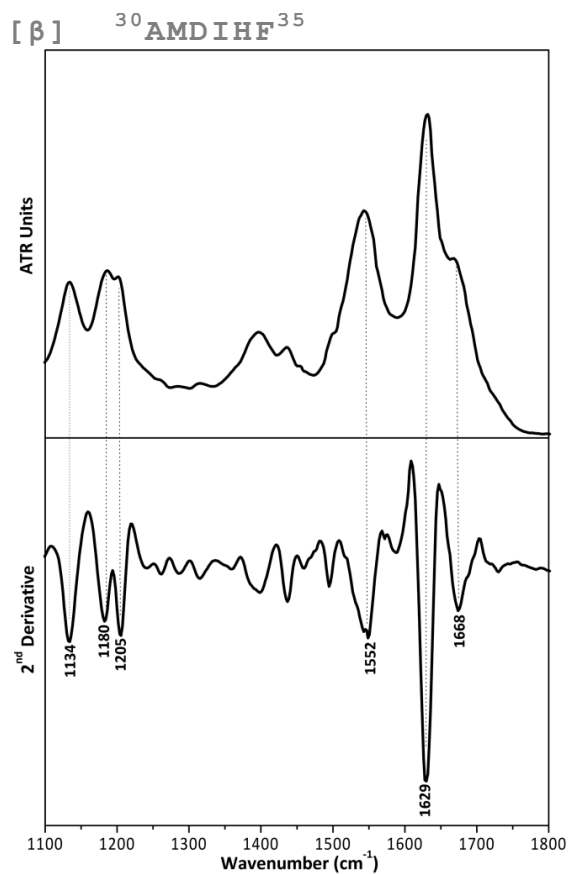
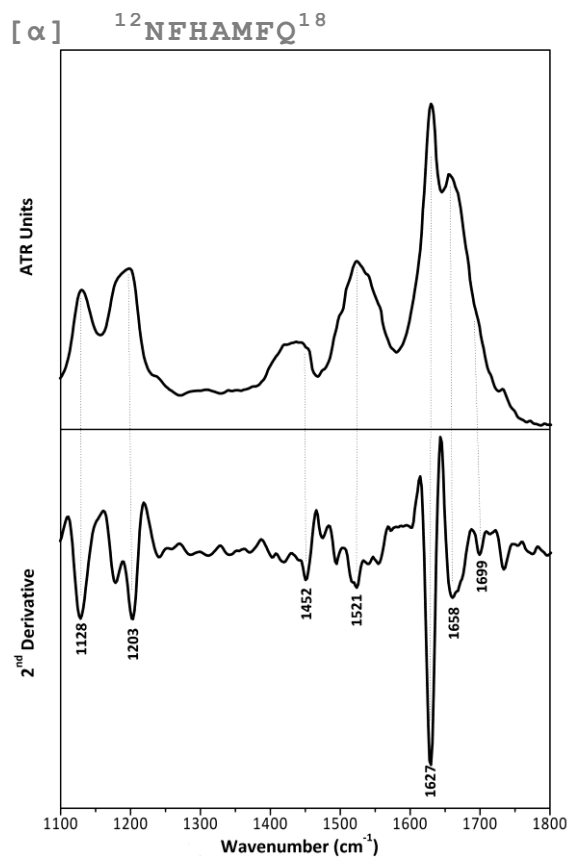
Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Συμπληρωματικές ενδείξεις για τη δευτεροταγή δομή των πεπτιδίων-αναλόγων της α-αλυσίδας της κλαστερίνης προκύπτουν με την απόκτηση φασμάτων υπερερυθρού. Τα φάσματα εμφανίζουν μεγάλη ομοιομορφία και αποκαλύπτουν μία κυρίαρχη ταινία στη περιοχή της αμιδικής I στα 1627, 1629, 1625, 1622, 1625 cm^{-1} για τα πεπτίδια-άναλογα $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$, $^{30}\text{AMDHF}^{35}$, $^{81}\text{ILSVD}^{84}$, $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας πως τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων οργανώνονται, σχηματίζοντας β-πτυχωτές επιφάνειες. Χαρακτηριστική είναι η έντονη κορυφή τυροσίνης στο δείγμα του πεπτιδίου-αναλόγου $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$. Η ομοιομορφία των δομών επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη οξύληκτων ταινιών. Ο Πίνακας 21 παρουσιάζει τις κορυφές των ταινιών και τις αποδόσεις τους.

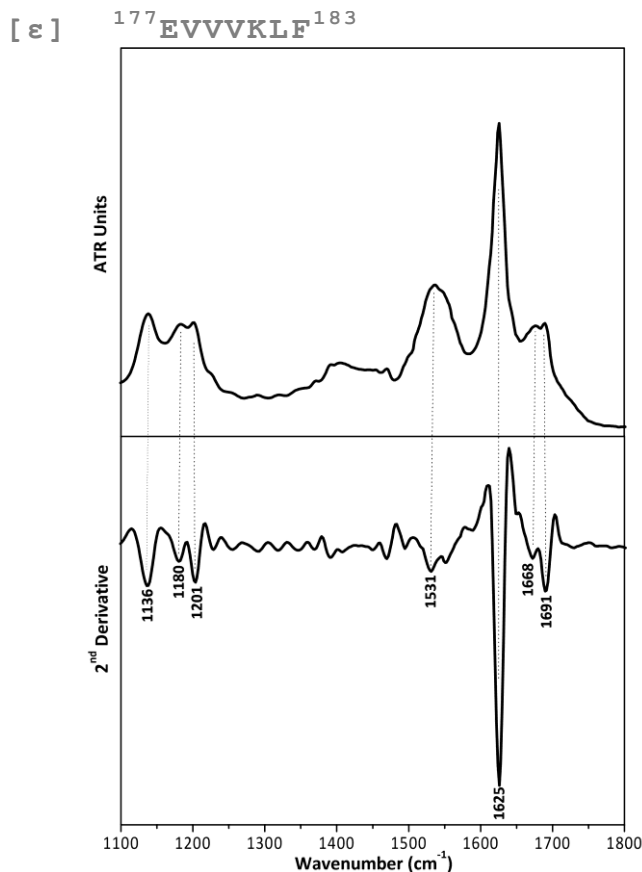
Πίνακας 21. Κορυφές και αποδόσεις των φασμάτων ATR FT-IR των $^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$, $^{30}\text{AMDHF}^{35}$, $^{81}\text{ILSVD}^{84}$, $^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$ και $^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$ πεπτιδίων-αναλόγων, έπειτα από την αυτοσυγκρότηση τους σε ινίδια.

Ταινίες (cm^{-1})					Αποδόσεις
$^{12}\text{NFHAMFQ}^{18}$	$^{30}\text{AMDHF}^{35}$	$^{81}\text{ILSVD}^{84}$	$^{155}\text{YYLRVTT}^{161}$	$^{177}\text{EVVVKLF}^{183}$	
1128	1134	1136	1136	1136	TFA
-	1180	1186	1178	1180	TFA
1203	1205	1203	1201	1201	TFA
-	-	-	1514	-	Τυροσίνη
1521	1552	1537	1535	1531	Αμιδική II (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1627	1629	1625	1622	1625	Αμιδική I (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1658	1668	1666	1670	1668	TFA
1699	-	1691	1691	1691	Αμιδική I (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες)

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση



Εικόνα 170. Φάσματα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση των πεπτιδίων-αναλόγων ¹²NFHAMFQ¹⁸ (α), ³⁰AMDIHF³⁵ (β), ⁸¹ILSVD⁸⁴ (γ), ¹⁵⁵YYLRVTT¹⁶¹ (δ) και ¹⁷⁷EVVVKLF¹⁸³ (ε) της α-αλυσίδας της κλαστερίνης. Τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων αποτελούνται από αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές θέσεις των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος. Δίνονται και τα φάσματα της δεύτερης παραγώγου (2nd derivative).

Η κλαστερίνη, ένα σημαντικό μόριο-συνοδός, εκφράζεται σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα και οι βιολογικές της λειτουργίες εξαρτώνται από τον τόπο και το χρόνο έκφρασής της, το επίπεδο γλυκοζυλίωσής της ή τη διαδικασία ωρίμανσης την οποία υφίσταται. Σε αντίθεση με την εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης, η οποία απαντάται με τη μορφή ετεροδιμερούς, απομονωμένες α- και β-αλυσίδες της κλαστερίνης μπορούν να δρουν ανεξάρτητα (Howes *et al.*, 1998), αν και ως μονομερή εμφανίζονται ιδιαίτερος ασταθή και με μειωμένη δράση ως πρωτεΐνη-συνοδός (Matukumalli *et al.*, 2017; Rohne *et al.*, 2014). Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών και δομικών μελετών στην α-αλυσίδα της κλαστερίνης αποκαλύπτουν για πρώτη φορά το αμυλοειδογόνο προφίλ της 222 αμινοξικών καταλοίπων πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Το εύρημα αυτό εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και **πιθανά εξηγεί την εμπλοκή ενός μορίου-συνοδού σε διάφορες στερεοδιαταξικές ασθένειες/αμυλοειδώσεις ή τη συνέυρεση της συν-εναποθεθειμένη στις αμυλοειδείς πλάκες.**

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.6. Στεφίνη Α

Παρότι η στεφίνη Α δεν έχει μέχρι σήμερα συσχετιστεί με κάποια αμυλοείδωση, *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν την συν-εναπόθεση της πρωτεΐνης στις πλάκες ασθενών με τη νόσο του Alzheimer (Bernstein *et al.*, 1994). Κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η στεφίνη Α ολιγομερίζεται μέσω του μηχανισμού της τρισδιάστατης ανταλλαγής αυτοτελών δομικών περιοχών (Staniforth *et al.*, 2001), ακολουθώντας το παράδειγμα άλλων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών της υπεροικογένειας των κυστατινών, όπως είναι η κυστατίνη C (Janowski *et al.*, 2004). Πειραματικά δεδομένα, όμως, υποστηρίζουν ότι, σε αντίθεση με την ομόλογή της πρωτεΐνη στεφίνη Β, η στεφίνη Α αυτοσυγκροτείται σε αμυλοειδή ινίδια μόνο κάτω από ακραίες συνθήκες (Zerovnik *et al.*, 2002).

Στόχος της παρούσας ερευνητικής προσέγγισης υπήρξε **η μελέτη της δομής και της ακολουθίας της ανθρώπινης στεφίνης Α και η διεξοδικός έλεγχος του πιθανού αμυλοειδογόνου προφίλ της**, σε ένα περιβάλλον φυσιολογικό για το ανθρώπινο κύτταρο. Τα πεπτιδικά-τμήματα της πρωτεΐνης που εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια αποκαλύπτουν νέες ανεξερεύνητες ιδιότητες σε έναν ακόμα εκπρόσωπο της υπεροικογένειας των κυστατινών.

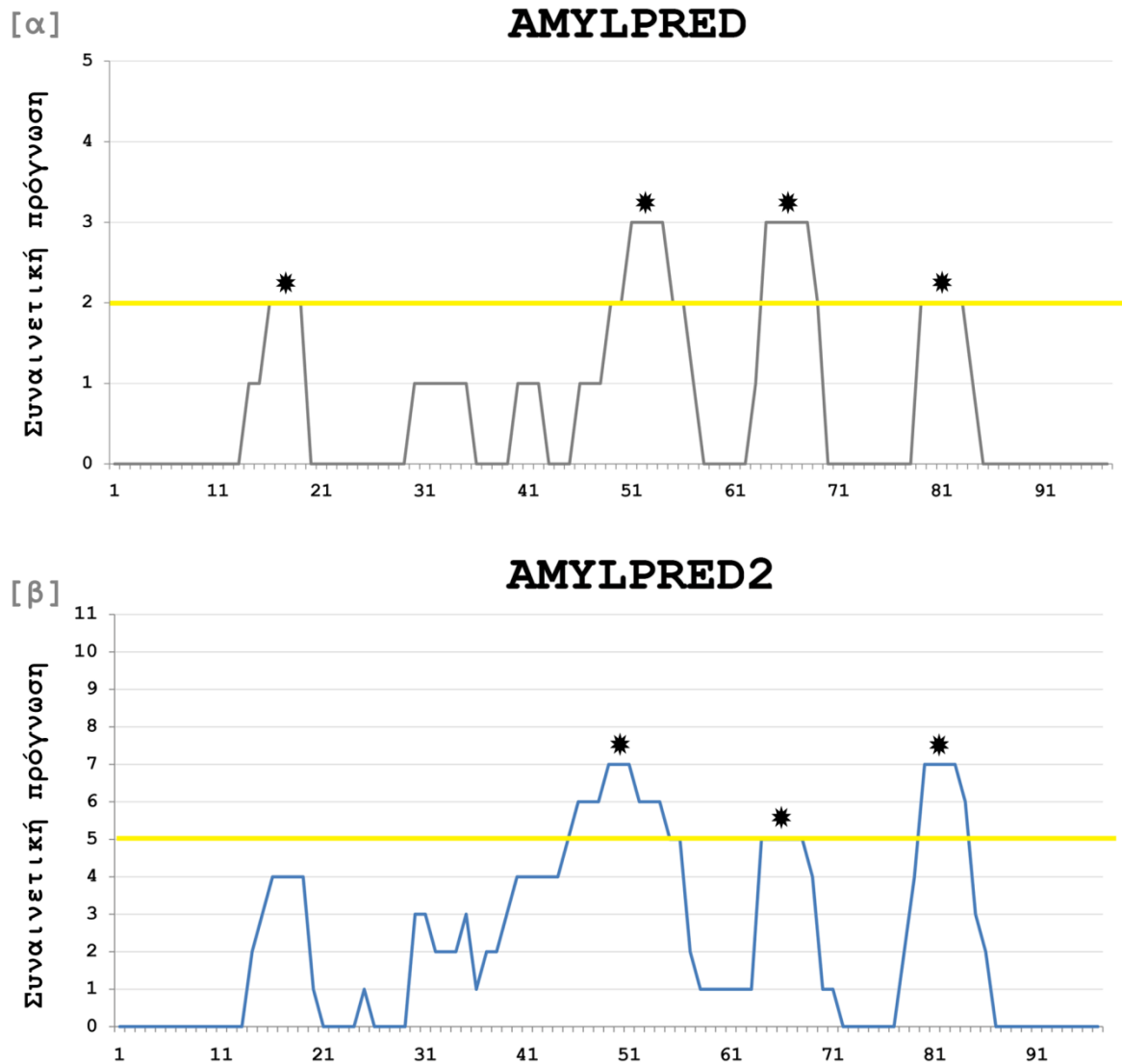
3.6.1. Ανάλυση της ακολουθίας και της δομής της ανθρώπινης στεφίνης Α

Για την ανάλυση της ακολουθίας της ανθρώπινης στεφίνης Α (UniProt AC: P01040) χρησιμοποιήθηκαν οι δύο εκδόσεις του συναινετικού αλγορίθμου πρόγνωσης περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013).

Η ανάλυση του αμυλοειδογόνου δυναμικού της ανθρώπινης στεφίνης Α αποκάλυψε, **τέσσερα πεπτιδικά τμήματα με υψηλή ‘τάση προς συσσωμάτωση’**, όπως φαίνεται και στα ιστογράμματα στην Εικόνα 171. Τόσο ο αλγόριθμος AMYLPRED, όσο και το αλγόριθμος AMYLPRED2 αποκάλυψαν αντίστοιχο αμυλοειδογόνο προφίλ για την πολυπεπτιδική αλυσίδα της στεφίνης Α. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος AMYLPRED, βασισμένος σε 5 ανεξάρτητες μεθόδους προέβλεψε 4 περιοχές με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ και συγκεκριμένα τα πεπτιδικά τμήματα ¹⁶QEIV¹⁹, ⁴⁹GTNYIYIKV⁵⁶, ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ και ⁷⁹LVVTG⁸³. Αντίθετα, ο αλγόριθμος AMYLPRED2, βασισμένος σε 11 ανεξάρτητες

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

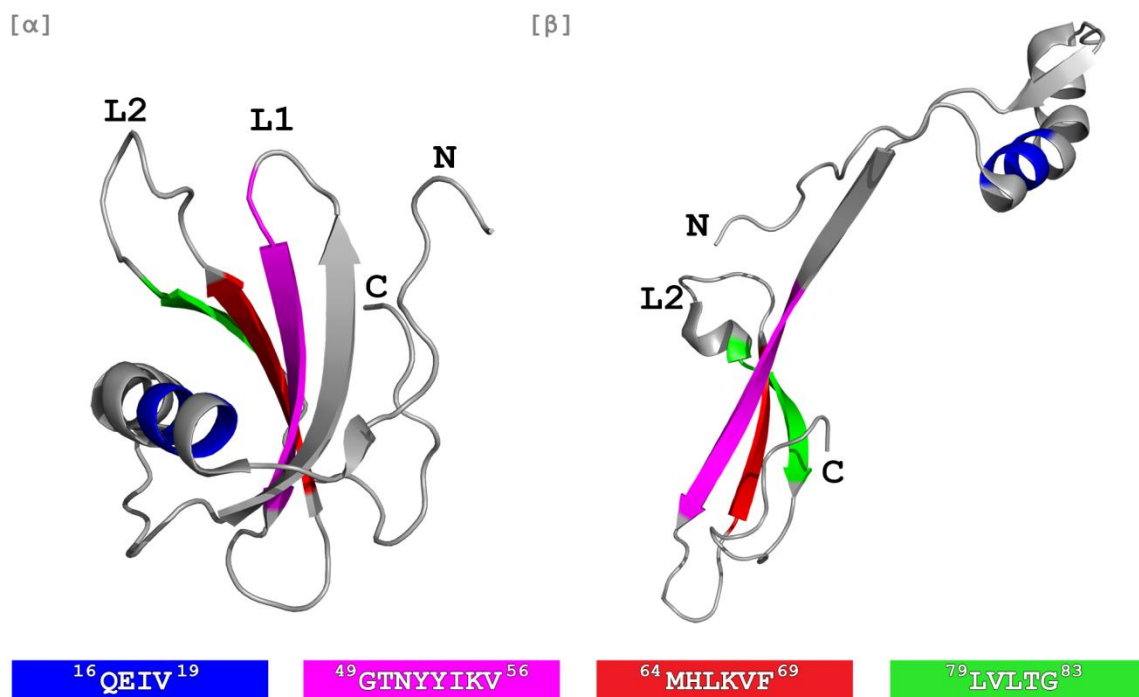
μεθόδους προέβλεψε 3 περιοχές με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ και συγκεκριμένα τα πεπτιδικά τμήματα ⁴⁰VQYKYQNVVAGTNYIYIKV⁵⁶, ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ και ⁷⁹LVVTG⁸³. Παρατηρούμε ότι η συναίνεση περισσότερων μεθόδων εξαλείφει την πρόβλεψη του πεπτιδίου στην περιοχή 16-19 και επεκτείνει την πρόγνωση στην περιοχή 49-56 (Εικόνα 171β).



Εικόνα 171. Ιστογράμματα του προφίλ αμυλοειδογονικότητας της ανθρώπινης στεφίνης A, όπως προκύπτουν έπειτα από τη χρήση των αλγορίθμων AMYLPRED (Frousios *et al.*, 2009) και AMYLPRED2 (Tsolis *et al.*, 2013). Η συναινετική πρόγνωση των αλγορίθμων αποκάλυψε, τρία πεπτιδικά τμήματα με υψηλή ‘τάση προς συσσωμάτωση’ (τα πεπτιδικά τμήματα ⁴⁹GTNYIYIKV⁵⁶, ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ και ⁷⁹LVVTG⁸³). Το αστέρι σημειώνει τα τμήματα με ‘τάση προς συσσωμάτωση’ και η κίτρινη γραμμή το προεπιλεγμένο συναινετικό κατώφλι κάθε αλγορίθμου (*consensus threshold*).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Οι θέσεις των πεπτιδίων στη δομή του φυσιολογικού μονομερούς και του μη-φυσιολογικού μονομερούς της ανθρώπινης στεφίνης A παρουσιάζονται στην Εικόνα 172. Το πεπτίδιο $^{16}\text{QEIV}^{19}$ βρίσκεται στην α -έλικα, στο σημείο δηλαδή εκείνο της δομής που ανταλλάσσεται κατά το μηχανισμό ολιγομερισμού, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τρία πεπτίδια που βρίσκονται στους τρεις β -κλώνους της αντιδιαμετρικής αυτοτελούς δομικής περιοχής. Συγκεκριμένα το πεπτίδιο $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$ βρίσκεται στον κλώνο $\beta 3$, το πεπτίδιο $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$ βρίσκεται στον κλώνο $\beta 4$ και το πεπτίδιο $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ στον τελευταίο β -κλώνο, δηλαδή τοποθετούνται στη περιοχή εκείνη της πρωτεΐνης που αλλάζει αμελητέα τη στερεοδιάταξή της κατά τον ολιγομερισμό. Αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι το αμυλοειδογόνο προφίλ στην περιοχή του $\beta 2$ κλώνου και της L1 λούπας, που αλλάζει άρδην τη στερεοδιάταξή της, είναι αρκετά ασθενές (Εικόνα 171), σε αντίθεση με το αμυλοειδογόνο προφίλ της ανθρώπινης κυστατίνης C, που παρουσιάστηκε προηγουμένως (Εικόνα 95).



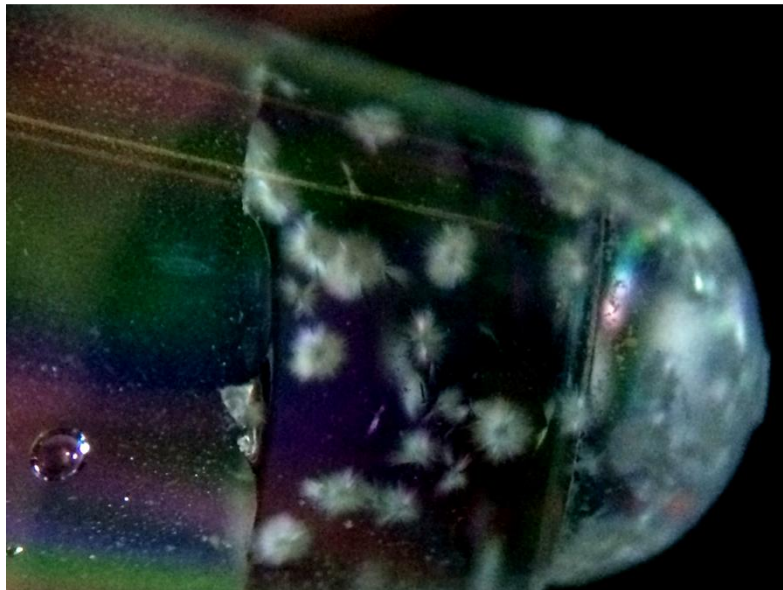
Εικόνα 172. Η δομή της ανθρώπινης στεφίνης A. Τα πεπτίδια με 'τάση προς συσσωμάτωση' που πρόβλεψε ο αλγόριθμος AMYLPRED χρωματίζονται με μπλε ($^{16}\text{QEIV}^{19}$), φούξια ($^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$), κόκκινο ($^{64}\text{MHLKVF}^{69}$) και πράσινο ($^{79}\text{LVVTG}^{83}$), αντίστοιχα. (α) (β) Οι δομές παρουσιάζονται με αναπαράσταση καρτούν με τη χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMol (Delano, 2005). Σημειώνονται με αντίστοιχο κώδικα χρωμάτων οι θέσεις των πεπτιδίων με 'τάση προς συσσωμάτωση' στη δομή του φυσιολογικού μονομερούς (α) και στη δομή του μη-φυσιολογικού μονομερούς (β) (L: οι λούπες, N: το αμινοτελικό άκρο και C: το καρβοξυτελικό άκρο).

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.6.2. Δομικές μελέτες της ανθρώπινης στεφίνης A

Τα πεπτιδικά τμήματα που προέκυψαν από τη παραπάνω ανάλυση της ακολουθίας και της δομής της ανθρώπινης στεφίνης A συντέθηκαν χημικά (GeneCust© - Europe, Luxembourg), με ελεύθερο τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο, καθαρότητα >98% και μελετήθηκαν ως πιθανοί ‘αμυλοειδογόνοι καθοριστές’.

Στην περίπτωση του πεπτιδίου-αναλόγου ¹⁶QEIIV¹⁹ προστέθηκε το κατάλοιπο της ισολευκίνης 15, καθώς βιβλιογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι πεπτίδια πέντε ή έξι καταλοίπων, είναι ικανά να οδηγούν της αμυλοειδογένεση σφαιρικών πρωτεϊνών (Balbach *et al.*, 2000; Mazor *et al.*, 2002; Tenidis *et al.*, 2000). Έτσι, τα πεπτίδια-ανάλογα ¹⁵IQEIIV¹⁹, ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶, ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ και ⁷⁹LVVTG⁸³ διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό και pH 5.75, σε συγκέντρωση 10 mg ml⁻¹ και αφέθηκαν προς επώαση για διάστημα τουλάχιστον μιας εβδομάδας. Εκτός από το πεπτίδιο-ανάλογο ¹⁵IQEIIV¹⁹, όλα τα διαλύματα των πεπτιδίων-αναλόγων στις συνθήκες αυτές βρέθηκε να δημιουργούν πηκτώματα.



Εικόνα 173. Παρατήρηση σφαιρικών κρυστάλλων που προέκυψαν από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου ¹⁵IQEIIV¹⁹ σε οπτικό στερεομικροσκόπιο. Παρατηρούμε την εμφάνιση μικροκρυσταλλιδίων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προς το σχηματισμό δομών ‘αχιών’. Η εμφάνιση αυτή παραπέμπει σε μικροκρυστάλλους άλλων αμυλοειδογόνων πεπτιδίων-αναλόγων (Landau *et al.*, 2011).

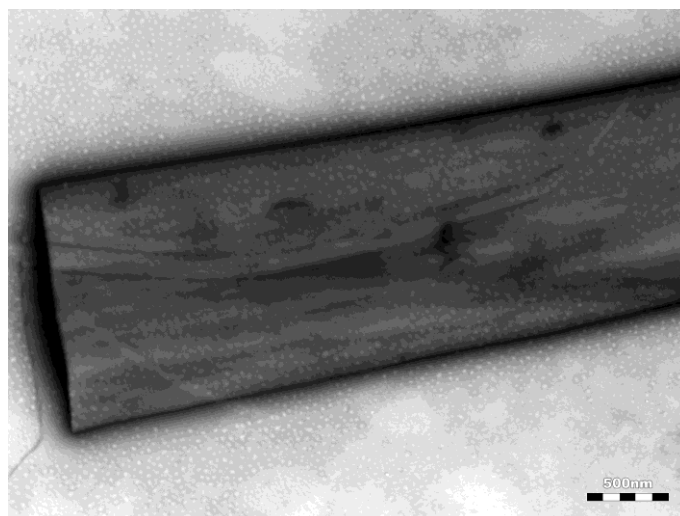
Μακροσκοπική παρατήρηση του πεπτιδίου-αναλόγου ¹⁵IQEIIV¹⁹ αποκαλύπτει την εμφάνιση κρυστάλλων μερικών μm στις παραπάνω συνθήκες, οι οποίοι εντοπίζονται ακόμα και με γυμνό οφθαλμό (Εικόνα 173), ενώ προσομοιάζουν με μικροκρυσταλλίτες που

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

δημιουργούνται από άλλες αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες (Landau *et al.*, 2011). Η εμφάνιση αυτή επιβεβαιώνεται από την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, σε ειδικά δείγματα, έπειτα από αρνητική χρώση. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 174α ένας απομονωμένος κρύσταλλος έχει διάμετρο ~150 μm, ενώ αξιοσημείωτη είναι η επιφάνεια του κρυστάλλου, όπου εμφανίζονται έντονες ραβδώσεις (Εικόνα 174α). Η μορφολογία αυτή της επιφάνειας συναντάται συχνά σε κρυστάλλους πρωτεϊνικών μορίων, καθώς κατά τη δημιουργία τους μπορεί να δημιουργούνται κοιλότητες (*‘rockets’*) που σχετίζονται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις των μορίων που οργανώνονται στο χώρο (Matsuura and Chernov, 2003).

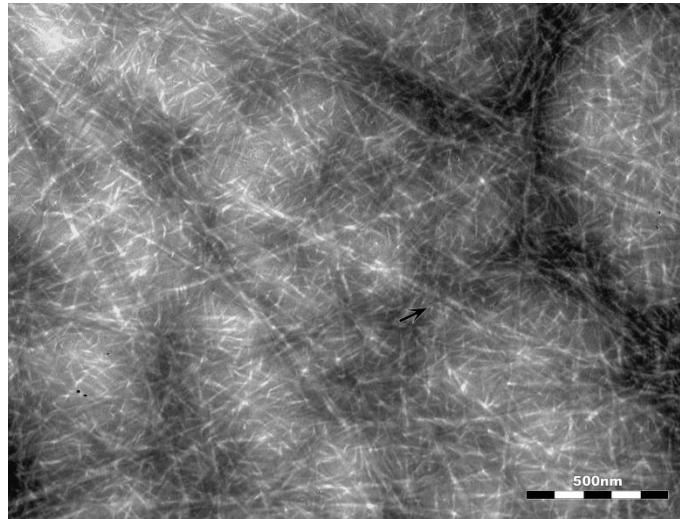
Αντίθετα με τα παραπάνω αποτελέσματα, **τα πεπτίδια-ανάλογα $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$ και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ της στεφίνης Α αυτοσυγκροτούνται δημιουργώντας πυκνά δίκτυα ινιδίων.** Στην περίπτωση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$ στην παρούσα συγκέντρωση σχηματίζονται δίκτυα ινιδίων που κατανέμονται ομοιόμορφα και καλύπτουν το πλέγμα μικροσκοπίας. (Εικόνα 174β), ενώ κάθε μοναδιαίο ινίδιο παρουσιάζεται ευθύγραμμο, ομοιόμορφο, με απροσδιόριστο μήκος και διάμετρο ~100 Å (Εικόνα 174β, βέλος). Το πεπτίδιο-ανάλογο $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ με τη σειρά του, αυτοσυγκροτείται δημιουργώντας κολλώδη δίκτυα ταινιών, ως αποτέλεσμα της πλευρικής αλληλεπίδρασης ινιδίων. Τα λεπτά βέλη στην Εικόνα 174δ επισημαίνουν ινίδια ~70-80 Å. Τέλος, **το πεπτίδιο-ανάλογο $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$ δημιουργεί άμορφα συσσωματώματα** (Εικόνα 174γ), εύρημα που επιβεβαιώνεται και από τις υπόλοιπες δοκιμές συσσωμάτωσης, όπως παρουσιάζεται και στη συνέχεια.

[α] $^{16}\text{IQEIV}^{19}$

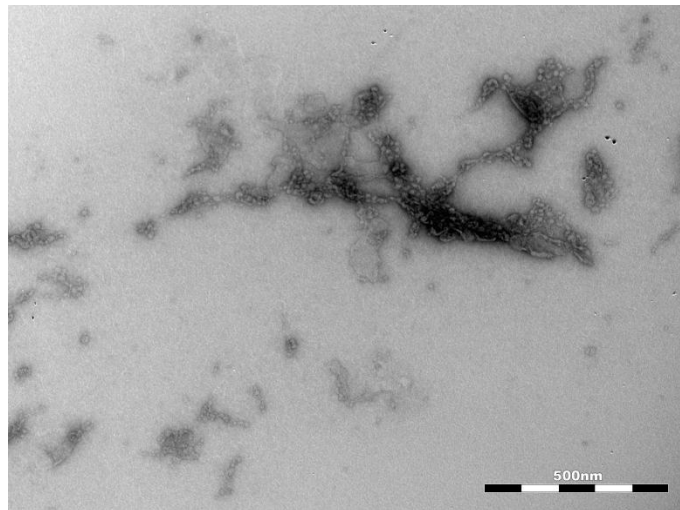


Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

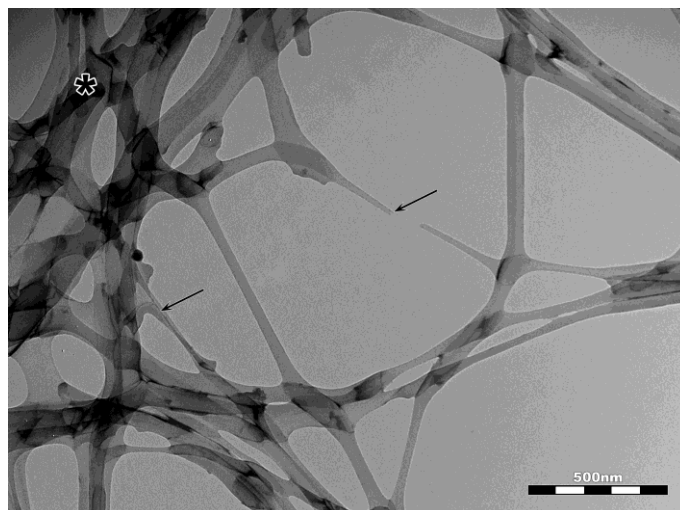
[β] $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$



[γ] $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$



[δ] $^{79}\text{LVVTG}^{83}$

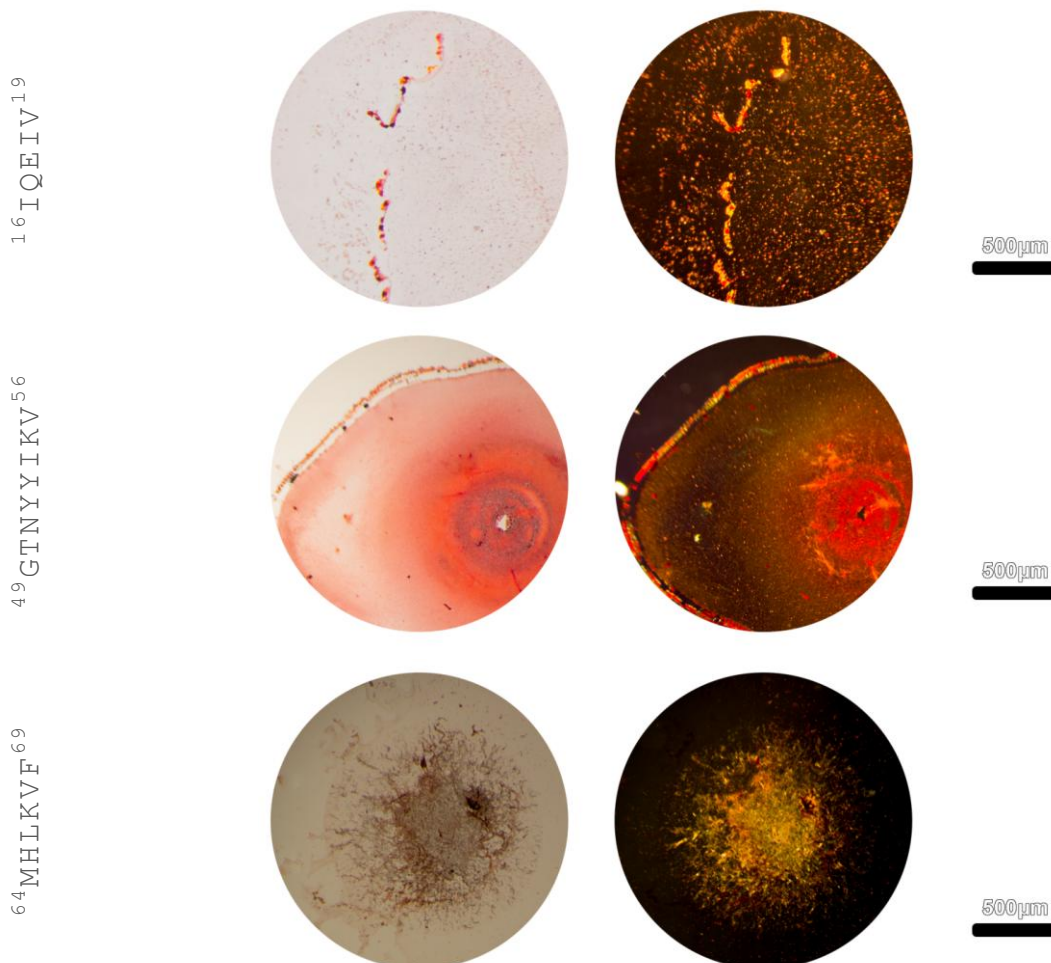


Εικόνα 174. Ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A (α) Παρατηρείται κρύσταλλος που προκύπτει από την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου $^{15}\text{IQEIV}^{19}$. Στην επιφάνεια του κρυστάλλου παρατηρούνται ραβδώσεις, ενώ το μέγεθός του είναι $\sim 150\mu\text{m}$. (β) Πυκνό δίκτυο ινιδίων του πεπτιδίου-αναλόγου $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$. Το μαύρο βέλος σημειώνει μοναδιαίο ινίδιο διαμέτρου $\sim 100 \text{ \AA}$. (γ)

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

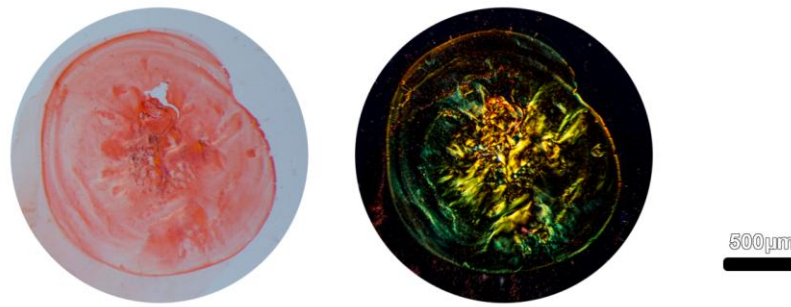
Άμορφα συσσωματώματα του πεπτιδίου $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$. (δ) Δίκτυο επίπεδων ταινιών που δημιουργούνται κατά την αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου $^{79}\text{LVVTG}^{83}$. Με το βέλος σημειώνονται ινίδια διαμέτρου $\sim 60\text{-}70 \text{ \AA}$, ενώ με τον αστερίσκο σημειώνεται το πυκνό πλέγμα των ινιδίων.

Χρώση υμενίων των πεπτιδίων-αναλόγων $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$ και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ που δημιουργούν πυκνά δίκτυα αμυλοειδών ινιδίων **κατέγραψε την τάση τους να δεσμεύουν ειδικά την χρωστική Congo Red** (Εικόνα 175β και Εικόνα 175δ, αριστερά) και να εμφανίζουν την χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου ((Εικόνα 175β και Εικόνα 175δ, δεξιά). Ταυτόχρονα, **τα άμορφα συσσωματώματα του πεπτιδίου-αναλόγου $^{64}\text{MHLKVF}^{69}$ δεσμεύουν τη διαγνωστική για τα αμυλοειδή ινίδια χρωστική Congo Red** και εμφανίζουν κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (Εικόνα 175γ). Αντίθετα, η κρυσταλλική φύση του πεπτιδίου-αναλόγου $^{16}\text{IQEIV}^{19}$, δεν επέτρεψε την εμφάνιση της κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητας, παρότι όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 175α το ενυδατωμένο υμένιο του δείγματος δεσμεύει τη χρωστική Congo Red.



Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

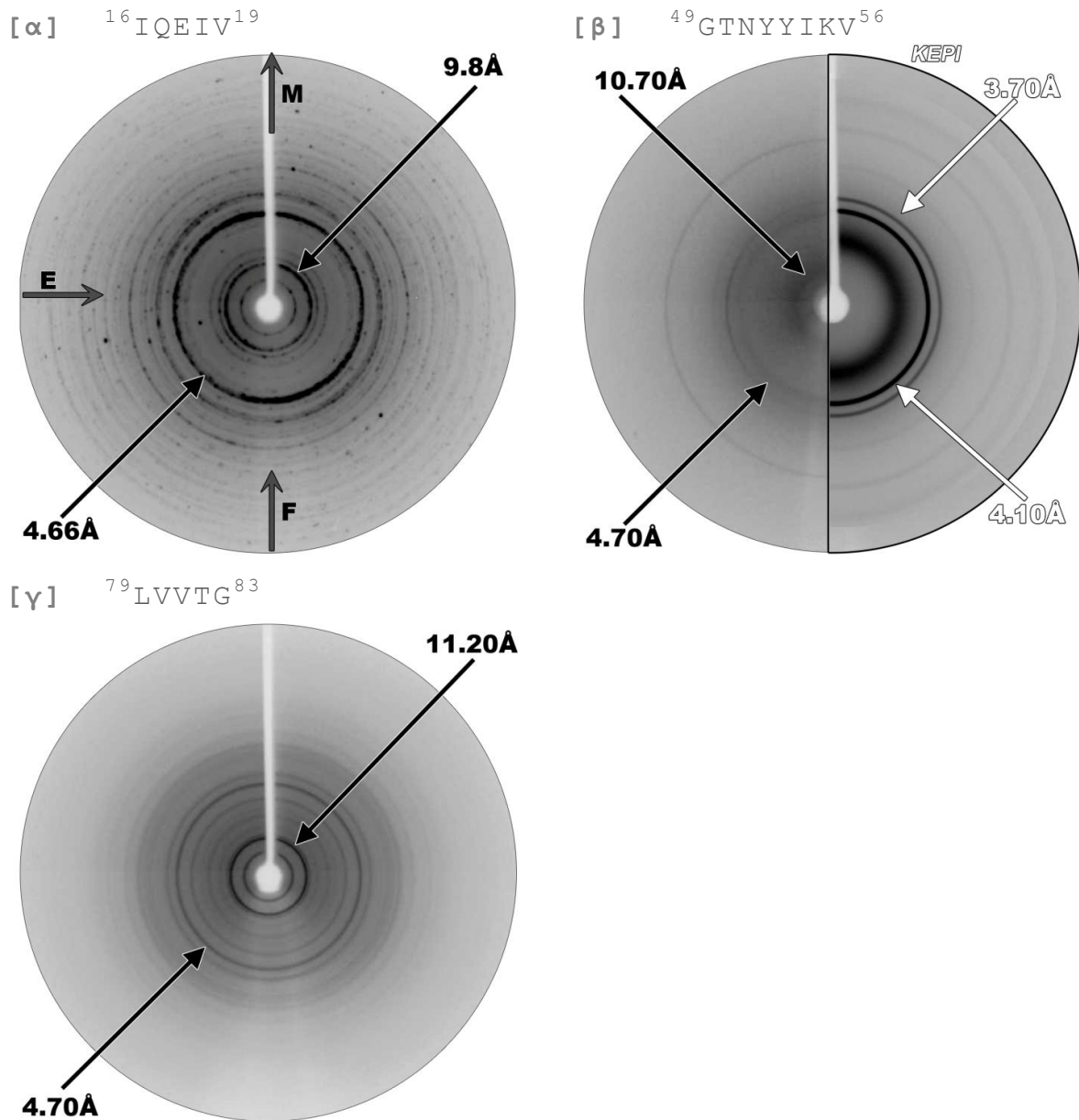
⁷⁹LVVTG⁸³



Εικόνα 175. Φωτομικρογραφίες υμενίων των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A, έπειτα από χρώση με Congo Red. Παρατήρηση με πολωμένο φως (αριστερά). Παρατήρηση με διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου (δεξιά). Τα πεπτίδια ανάλογα ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶ (β), ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶ (γ) και ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ (δ) εμφανίζουν τη χαρακτηριστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα, σε αντίθεση με το πεπτιδιο-ανάλογο ¹⁶IQEIF¹⁹ (α).

Περίθλαση ακτίνων X σε προσανατολισμένες ίνες των αμυλοειδών ινιδίων των πεπτιδίων-αναλόγων ¹⁶IQEIF¹⁹, ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶ και ⁷⁹LVVTG⁸³ δίνουν περιθλασιγράμματα που εμφανίζουν χαρακτηριστικές ανακλάσεις της “cross-β” δομής των αμυλοειδών ινιδίων. Αντίθετα, στην περίπτωση του πεπτιδίου-αναλόγου ⁶⁴MHLKVF⁶⁹, δεν ήταν δυνατή η απόκτηση ευθυγραμμισμένη ίνας, για τη διεξαγωγή του πειράματος, πιθανά λόγω της ύπαρξης άμορφων συσσωματωμάτων. Η εμφάνιση των ανακλάσεων με τη μορφή δακτυλίου είναι αποτέλεσμα μη-βέλτιστου προσανατολισμού των αμυλοειδών ινιδίων στην εκάστοτε ίνα. Η μεσημβρινή ανάκλαση των περιθλασιγραμμάτων κυμαίνεται από 4.6-4.7 Å και είναι ενδεικτική της απόστασης μεταξύ β-κλώνων που αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου και οργανώνονται κάθετα ως προς τον άξονα της ίνας. Η ισημερινή ανάκλαση καταγράφεται στα 9.7 Å, 10.7 Å, και 11.2 Å για τα πεπτίδια-ανάλογα ¹⁶IQEIF¹⁹, ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶ και ⁷⁹LVVTG⁸³, αντίστοιχα και αποδίδεται στο διαδοχικό πακετάρισμα μεταξύ των β-πτυχωτών επιφανειών, οι οποίες βρίσκονται παράλληλα ως προς τον άξονα της εκάστοτε προσανατολισμένη ίνας. Ειδικότερα, η εμφάνιση κουκκίδων και η πολυκρυσταλλικότητα στο περιθλασίγραμμα του πεπτιδίου-αναλόγου ¹⁶IQEIF¹⁹ οφείλεται στην ύπαρξη κρυστάλλων στο διάλυμα, αν και οι προσανατολισμένες ανακλάσεις της cross-β στερεοδιάταξης ενισχύουν την άποψη ότι δομές ινιδίων πιθανά συνυπάρχουν με τους μικροκρυστάλλους. Αντίστοιχα με αποτελέσματα άλλων πεπτιδίων στη παρούσα διατριβή (3.4), το πεπτίδιο ⁷⁹LVVTG⁸³, εμφανίζει πολυκρυσταλλική φύση, παρά την ύπαρξη πυκνού δικτύου ινιδίων και όχι μικροκρυστάλλων, κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

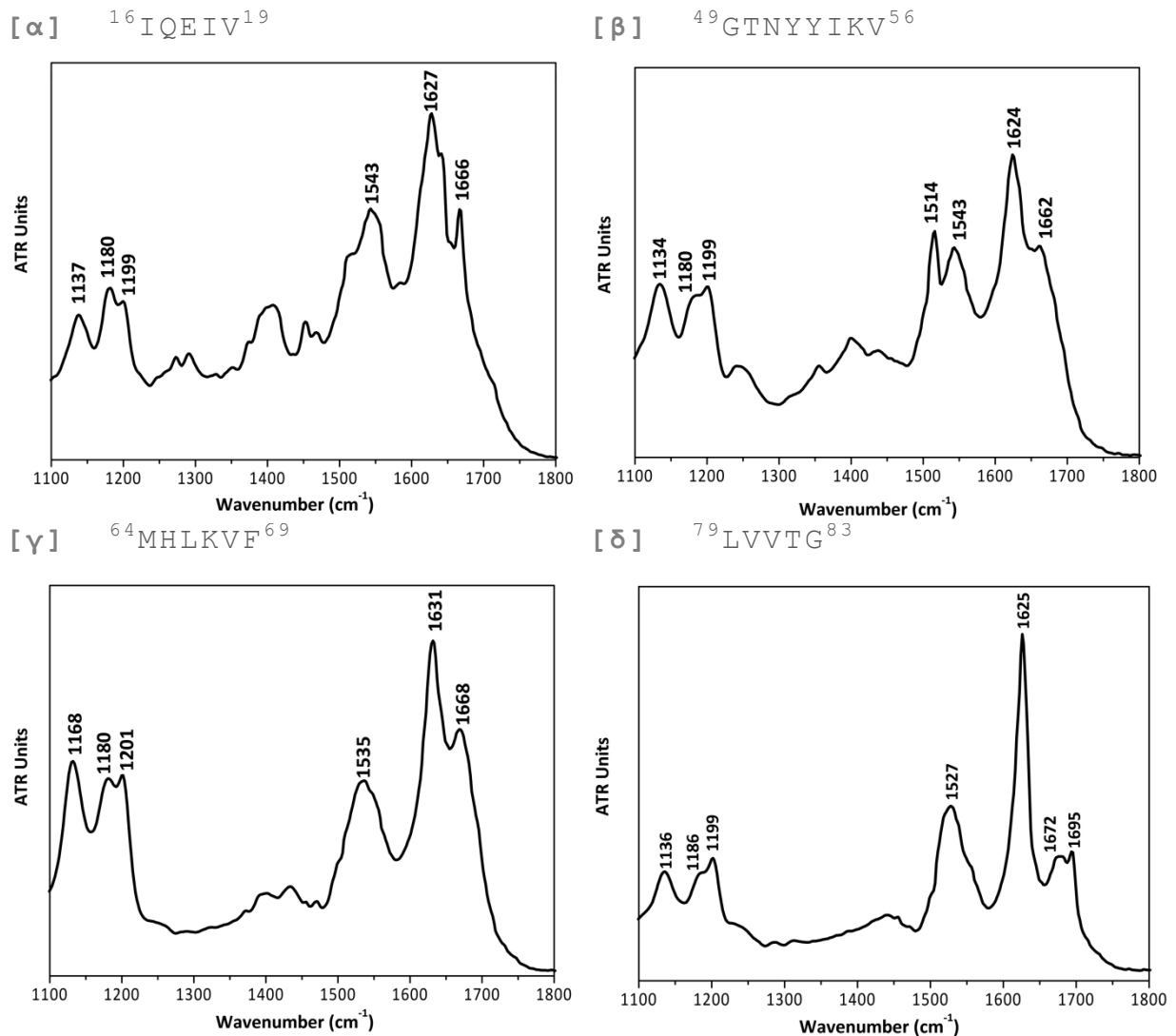


Εικόνα 176. Περιθλασιγράμματα των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A. Τα πεπτιδία-ανάλογα $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (α), $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$ (β) και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ (γ) διαλυτοποιήθηκαν σε απεσταγμένο νερό, pH 5.75 και συγκέντρωση 10 mg ml^{-1} . Η πολυκρυσταλλικότητα των πεπτιδίων $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (α) και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$, χαρακτηρίζει πολλά αμυλοειδογόνο πεπτιδία-ανάλογα πρωτεϊνών (M: μεσημβρινός, E: ισημερινός, F: άξονας της ίνας).

Τέλος, τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερερυθρού υποστηρίζουν τα παραπάνω ευρήματα της περίθλασης ακτίνων-X για τα πεπτιδία-ανάλογα $^{16}\text{IQEIV}^{19}$ (Εικόνα 177α), $^{49}\text{GTNYIYIKV}^{56}$ (Εικόνα 177β) και $^{79}\text{LVVTG}^{83}$ (Εικόνα 177δ). Τα φάσματα υπερερυθρού σε λεπτά ενυδατωμένα υμένα που δημιουργούνται από τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων εμφανίζουν μία οξεία κορυφή μεταξύ $1624\text{-}1631 \text{ cm}^{-1}$ στην περιοχή της Αμιδικής I και ταινίες μεταξύ $1527\text{-}1543 \text{ cm}^{-1}$ στην περιοχή της Αμιδικής II, οι οποίες

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

αναμφίβολα οφείλονται στη στερεοδιάταξη των β-πτυχωτών επιφανειών (Surewicz *et al.*, 1993).



Εικόνα 177. Φάσματα ATR-IR των αμυλοειδών ινιδίων από την αυτοσυγκρότηση των πεπτιδίων-αναλόγων ¹⁶IQEIIV¹⁹ (α), ⁴⁹GTNYIYIKV⁵⁶ (β), ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ (γ) και ⁷⁹LVVTG⁸³ (δ) της ανθρώπινης στεφίνης Α. Τα αμυλοειδή ινίδια των πεπτιδίων αποτελούνται από β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές θέσεις των αμιδικών I και II κορυφών του φάσματος.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το φάσμα του πεπτιδίου ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ (Εικόνα 177γ), το οποίο σχηματίζει άμορφα συσσωματώματα (Εικόνα 174γ). Αντίθετα με τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων-X, η φασματοσκοπία υπερερυθρού ήταν πληροφοριακή για το πεπτιδιο-ανάλογο ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ (Εικόνα 177γ), καθώς η ταινία στα 1631 cm⁻¹ στη περιοχή της Αμιδικής I και η ταινία στα 1535 cm⁻¹, είναι ενδεικτικές της ύπαρξης β-πτυχωτών επιφανειών. Ο Πίνακας 22 παρουσιάζει τις κορυφές των ταινιών και τις επικρατέστερες αποδόσεις τους.

Κεφάλαιο III – Αποτελέσματα & Συζήτηση

Πίνακας 22. Κορυφές και αποδόσεις των φασμάτων ATR FT-IR των πεπτιδίων-αναλόγων της ανθρώπινης στεφίνης A.

Ταινίες (cm ⁻¹)				Αποδόσεις
¹⁶ IQEIV ¹⁹	⁴⁹ GTNYYIKV ⁵⁶	⁶⁴ MHLKVF ⁶⁹	⁷⁹ LVVTG ⁸³	
1137	1134	1168	1136	TFA
1180	1180	1180	1186	TFA
1199	1199	1201	1199	TFA
-	1514	-	-	Τυροσίνη
1543	1543	1535	1527	Αμιδική II (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1627	1624	1631	1625	Αμιδική I (β-πτυχωτές επιφάνειες)
1666	1662	1668	1672	TFA
-	-	-	1695	Αμιδική I (αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες)

Συνολικά, οι πειραματικές προσεγγίσεις σε πεπτιδικά τμήματα της στεφίνης A αποδεικνύουν ότι **τα τμήματα ⁴⁹GTNYYIKV⁵⁶ και ⁷⁹LVVTG⁸³ αυτοσυγκροτούνται σε ινίδια με αμυλοειδογόνες ιδιότητες.** Αντίθετα το πεπτίδιο-ανάλογο ⁶⁴MHLKVF⁶⁹ δημιουργεί άμορφα συσσωματώματα, τα οποία δεν παράγουν περιθλασιγράμματα cross-β δομής, εντούτοις σε ενυδατωμένα υμένα του πεπτιδίου αποδεικνύεται η ύπαρξη β-πτυχωτών επιφανειών. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με πειράματα σε άμορφα συσσωματώματα πεπτιδικών τμημάτων του αμυλοειδογόνου Αβ πεπτιδίου (Huang *et al.*, 2000). Τέλος, τα αποτελέσματα των πειραμάτων που αφορούν το πεπτίδιο ¹⁶IQEIV¹⁹ απέδειξαν **ένα πεπτίδιο με ιδιότητες να οργανώνεται προς τη δημιουργία κρυσταλλιτών**, οι οποίοι καταγράφονται τόσο στις ηλεκτρονιογραφίες διέλευσης, όσο και στα περιθλασιγράμματα του πεπτιδίου. Η κρυσταλλικότητα του πεπτιδίου πιθανά ακολουθεί το παράδειγμα άλλων αμυλοειδογόνων τμημάτων που έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Wiltzius *et al.*, 2008).

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

Κεφάλαιο IV

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά, η παρούσα διατριβή επιχείρησε να μελετήσει το φαινόμενο της αμυλοειδογονικότητας σε παθολογικές καταστάσεις, προσεγγίζοντας τα αμυλοειδογόνα πρωτεϊνικά μόρια, τόσο ‘μακροσκοπικά’, όσο και ‘μικροσκοπικά’. Η αποκρυπτογράφηση των εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ – φαινομενικά – ξένων μεταξύ τους πρωτεϊνών, καθώς και της εγγενούς τάσης των πρωτεϊνών να αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια που οδηγούν σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, αποτέλεσε θεμελιώδη στόχο της παρούσας διατριβής. Αφενός, η δημιουργία του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, αποκάλυψε τις άμεσες και έμμεσες συσχετίσεις μίας ομάδας μορίων που διαφέρουν ουσιαστικά στην αλληλουχία, τη δομή αλλά και τη λειτουργία τους. Αφετέρου, στην πλειοψηφία τους οι πειραματικές μελέτες επιβεβαίωσαν την ιδέα ότι η αμυλοειδογονικότητα μπορεί να βρίσκεται κρυμμένη σε μικρά τμήματα των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, αναδεικνύοντας σημαντικά πεπτιδικά τμήματα φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Οι προσπάθειες που συγκεντρώνονται στις προηγούμενες ενότητες, αποτελούν τη βασική έρευνα και τα πρώτα βήματα για τον επιτυχημένο σχεδιασμό θεραπευτικών στρατηγικών, αν και θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα *in vitro* πειράματα μπορεί να είναι απλά ένα στιγμιότυπο των πολύπλοκων διαδικασιών που πραγματοποιούνται *in vivo*.

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

4.1. Μακροσκοπική Ανάλυση Συσχετίσεων Μεταξύ Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών

Η δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων, όπως συζητήθηκε εκτενώς, είναι μία κοινή ιδιότητα των πρωτεϊνικών και πεπτιδικών μορίων (Chiti and Dobson, 2006; Guijarro *et al.*, 1998) και έχει συσχετιστεί σε αρκετές περιπτώσεις με την εμφάνιση μίας ποικιλίας διαταραχών. Η εμπλοκή περισσότερων του ενός πρωτεϊνών στην εξέλιξη διαφορετικών διαταραχών, μαζί με την επιβεβαιωμένη συνεργατική δράση μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών στις ασθένειες, τονίζει την αναγκαιότητα μίας πιο γενικευμένης προσέγγισης για τη μελέτη των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτές. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων ή την αμυλοειδογονικότητα *en génie*, καθιστά δύσκολη τη μελέτη της δυναμικής της αυτοσυγκρότησης και της συσσωμάτωσης στην ολότητά τους.

Ένας από τους βασικότερους στόχους που επιτεύχθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν **η συγκέντρωση όλων των μέχρι σήμερα πειραματικά επιβεβαιωμένων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων**, με εκτεταμένη αναζήτηση στη βιβλιογραφία, αλλά και σε εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων. Η καταγραφή τους παρουσίασε για πρώτη φορά μία ομάδα **145 μοναδικών πρωτεϊνών** που σχετίζονται με τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων, εκ των οποίων μόνο οι 36 έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, ενώ για τις υπόλοιπες υπάρχει πειραματική επιβεβαίωση *in vitro*. Έτσι, τα πρωτεϊνικά μόρια κατηγοριοποιήθηκαν σε **3 διακριτές ομάδες**, τις **αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vivo* εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων**, τις **αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την *in vitro* δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων** και τις **πρωτεΐνες που συσχετίζονται με τον *in vivo* σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων άλλων πρόδρομων αμυλοειδογόνων μορίων**, ενώ η θεωρία γράφων χρησιμοποιήθηκε ως μία εκλεπτυσμένη προσέγγιση για τη συστηματική μελέτη των δεδομένων αυτών (Tsiolaki *et al.*, 2017a).

Η κατασκευή του δικτύου αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών επιχείρησε να δώσει απαντήσεις στα κομβικά ερωτήματα της αμυλοειδογονικότητας, ακολουθώντας ένα πρωτόκολλο μελέτης της βιολογίας συστημάτων και συγκεντρώνοντας μία ομάδα από ετερόκλητες πρωτεΐνες σε ένα κοινό βιολογικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων (Biza *et al.*, 2017). Η μελέτη της δυναμικής, της δομής και της λειτουργίας των δικτύων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών έχει αποδειχθεί κρίσιμη στην κατανόηση πολλών βιολογικών φαινομένων (Collavin *et al.*, 2010; Fukuyama *et al.*, 2013; Schwikowski *et al.*,

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

2000; Vinayagam *et al.*, 2014). Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών παρουσιάζει **έναν πρωτεϊνικό χάρτη με συσχετίσεις της πλειοψηφίας των αμυλοειδογόνων στοιχείων που συλλέχθηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν**, ενώ επιβεβαιώνει ακόμα όλες τις γνωστές διασυνδέσεις μεταξύ καλά χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων που σχετίζονται με τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων. Τα αμυλοειδογόνα και μη-αμυλοειδογόνα στοιχεία που το απαρτίζουν, τελικά έρχονται κοντά για να σχηματίσουν ένα πολυσύνθετο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, με σημαντικά τοπολογικά χαρακτηριστικά. Η ενοποιημένη προσπάθειά μας θέτει πολλά ερωτήματα που **θα μπορούσαν να γίνουν κινητήριος δύναμη για το σχεδιασμό στοχευμένων πειραμάτων** στον απαιτητικό κλάδο της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης, ακόμα και σε μοριακό επίπεδο.

4.2. Μικροσκοπική Ανάλυση Αμυλοειδογόνων Πρωτεϊνών

Οι πολύπλοκοι στόχοι της παρούσας διατριβής σε πειραματικό επίπεδο επικεντρώθηκαν τόσο στη **μελέτη της αμυλοειδογονικότητας γνωστών αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών μορίων**, όσο και στην **αποκάλυψη νέων, άγνωστων μέχρι σήμερα, αμυλοειδογόνων συστημάτων**. Η ανάλυση στην πλειοψηφία των συστημάτων είχε ως βάση τον εντοπισμό ‘αμυλοειδογόνων καθοριστών’, δηλαδή **πεπτιδικών τμημάτων με ενδογενή τάση προς αυτοσυγκρότηση**, χρησιμοποιώντας την υπολογιστική συναινετική μέθοδο AMYLPRED. Η συναινετική προσέγγιση εύρεσης τέτοιων περιοχών, αποδεικνύεται ύψιστης σημασίας, λαμβάνοντας υπόψη ότι όλες οι μέχρι σήμερα μελέτες (Louros and Iconomidou, 2016; Louros *et al.*, 2013; Louros *et al.*, 2016; Louros *et al.*, 2015a; Louros *et al.*, 2014; Louros *et al.*, 2017; Louros *et al.*, 2015b), συμπεριλαμβανομένων και των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν την επιτυχία πρόβλεψης της μεθόδου.

Αποδεικνύεται ότι **οι πεπτιδικοί καθοριστές μπορούν να δρουν ως ‘στερεοδιαταξικοί διακόπτες’ αλλάζοντας τα δομικά τους χαρακτηριστικά, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες βρίσκονται** (Hamodrakas *et al.*, 2007), υιοθετώντας χαρακτηριστικά των ακολουθιών ‘με ιδιότητες χαμαιλέοντα’. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι οι περιοχές που προβλέπονται βρίσκονται συνήθως εκτεθειμένες και όχι κρυμμένες στους υδρόφοβους πυρήνες των πρωτεϊνών (Frousios *et al.*, 2009). Η μελέτη των πεπτιδικών καθοριστών, που αναφέρονται και ως ‘αμυλοειδογόνοι καθοριστές’ έχει

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

διττή σημασία. Αφενός, **φέρνει στο φως μικρά αμυλοειδογόνα τμήματα στις πρωτεϊνικές ακολουθίες**, τα οποία φέρουν συμπυκνωμένη την πληροφορία της αμυλοειδογονικότητας (Esteras-Chopo *et al.*, 2005) και αφετέρου, **αναδεικνύει σημαντικά πεπτίδια φαρμακολογικού ενδιαφέροντος**, τα οποία μπορούν πιθανά να χρησιμοποιηθούν για να ανακόψουν την αμυλοειδογονικότητα σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις. Το ελκυστικό φαρμακολογικό προφίλ και οι ιδιότητές τους, κάνουν τα πεπτιδικά τμήματα ένα εξαιρετικό σημείο εκκίνησης για το σχεδιασμό καινοτόμων θεραπευτικών μορίων (Fosgerau and Hoffmann, 2015).

Στη μελέτη **της αμυλοειδογόνου κυστατίνης C** τέθηκε ως στόχος η εύρεση του τμήματος εκείνου που είναι υπεύθυνο να συμπαρασύρει την πρωτεΐνη προς το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων. Η πειραματική προσέγγιση της παρούσας διατριβής, **ανέδειξε 3 σημαντικά τμήματα της πρωτεΐνης ως αμυλοειδογόνους καθοριστές και αποκάλυψε το θεμελιώδη ρόλο τους στο σχηματισμό του αμυλοειδογόνου πυρήνα της ανθρώπινης κυστατίνης C (Tsiolaki *et al.*, 2015a; Tsiolaki *et al.*, 2015b)**. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν τόσο την πειραματική επιβεβαίωση των ιδιοτήτων των αμυλοειδογόνων καθοριστών, όσο και την πρόταση ενός πιθανού μονοπατιού πολυμερισμού της κυστατίνης C. Έτσι παράλληλα με τα πειραματικά αποτελέσματα και την εγγενή αμυλοειδογονικότητα αυτών των πεπτιδίων-αναλόγων δημιουργήθηκε ένα πιθανό τρισδιάστατο μοντέλο πολυμερισμού της ανθρώπινης κυστατίνης C. Το σύστημα αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς ο ολιγομερισμός της κυστατίνης εμπλέκεται τόσο στην παθοφυσιολογία μίας σπάνιας μορφής αμυλοείδωσης, που ονομάζεται Κληρονομική Αμυλοείδωση Ισλανδικού τύπου (Gudmundsson *et al.*, 1972), όσο και στην εμφάνιση εναποθέσεων σε ηλικιωμένους ασθενείς (Revesz *et al.*, 2009), ενώ ευρήματα της πρωτεΐνης εντοπίζονται και σε ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer. Συγκεκριμένα, η συν-εναπόθεση της αμυλοειδογόνου Κυστατίνης C σε ασθενείς με Alzheimer's φαίνεται να έχει λειτουργικό χαρακτήρα, καθώς η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση της κυστατίνης C με το Αβ πεπτίδιο αναστέλλει τον ολιγομερισμό του δεύτερου προστατεύοντας τον εγκέφαλο από την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (Levy, 2008; Levy *et al.*, 2001). Η ανάλυση του αμυλοειδογόνου προφίλ της συν-εναποθεμιμένης κυστατίνης C μπορεί να αποδειχθεί σημαντικό εργαλείο στην ανάπτυξη αναστολέων, ικανών να ανακόπτουν τον καταρράκτη των φαινομένων που συντελούν στον πολυμερισμό, όχι μόνο της ίδιας της κυστατίνης C, αλλά και του Αβ πεπτιδίου.

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

Επιπλέον, το σύστημα μελέτης **της στεφίνης A**, αποκάλυψε την ύπαρξη **σημαντικών καθοριστών της αμυλοειδογονικότητας σε έναν ακόμα εκπρόσωπο της υπερουκογένειας των κυστατινών**. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι, η στεφίνη A δεν είχε προηγουμένως μελετηθεί ως προς την ικανότητά της να δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια, παρόλο που έχει υψηλή ομολογία με την αμυλοειδογόνο στεφίνη B και τα πολυμερή της δημιουργούνται με μηχανισμό παρόμοιο με εκείνο της κυστατίνης C. Τα πεπτιδικά-τμήματα της πρωτεΐνης που εξετάστηκαν ως προς την τάση τους να αυτοσυγκροτούνται σε αμυλοειδή ινίδια στην παρούσα διατριβή αποκαλύπτουν **νέες ανεξερευνήτες ιδιότητες που δίνουν πιθανές εξηγήσεις στα μοντέλα πολυμερισμού του ενδοκυτταρικού αναστολέα, στεφίνη A** (Tsiolaki, *et al.*, in preparation).

Στην περίπτωση **της αμυλίνης**, μελέτες συνεπώασης του πεπτιδίου με αμυλοειδογόνους καθοριστές που αντιστοιχούν στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό τμήμα του πεπτιδίου, έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Το αμινοτελικό τμήμα της αμυλίνης, φυσιολογικά, θεωρείται υπεύθυνο για την πρόσδεση στις μεμβράνες μέσω του ελέγχου της κατεύθυνσης και του βαθμού διείδυσης των μορίων σε σχέση με την επιφάνεια των μεμβρανών, ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα, ακολουθώντας το παράδειγμα των υπόλοιπων ορμονών της οικογένειας στην οποία ανήκει, παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα της ορμόνης (Westermarck *et al.*, 2011). Στις μελέτες συνεπώασης της αμυλίνης φυσικού τύπου με τμήματα αυτής εκμεταλευτήκαμε την ιδιότητα των μικρών αμυλοειδογόνων πεπτιδικών τμημάτων να εντοπίζουν ειδικά τον εαυτό τους και να αλληλεπιδρούν, δημιουργώντας σταθερά στερεοδιαταξικά φερμουάρ (Wiltzius *et al.*, 2008). Η αμυλίνη έχει καταγραφεί ως η πιο αμυλοειδογόνος αλληλουχία αμινοξικών καταλοίπων και για το λόγο αυτό έχει αποδειχθεί ότι, μικρά πεπτιδικά τμήματα που αντιστοιχούν σχεδόν σε όλο το μήκος της αυτοσυγκροτούνται αυτόνομα σε ινίδια με αμυλοειδογόνες ιδιότητες. Αντίθετα με πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα της ομάδας μας, τα οποία αποδεικνύουν με πειράματα micro-Raman και μοριακής δυναμικής ότι το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό τμήμα της αμυλίνης δεν συμμετέχουν στον σχηματισμό του αμυλοειδογόνου πυρήνα της αμυλίνης (Louros *et al.*, 2017), **η αλληλεπίδραση ειδικά σχεδιασμένων τμημάτων με υψηλή συνάφεια προς τα δύο άκρα αποδεικνύεται ότι τροποποιεί τις αμυλοειδογόνες ιδιότητες της ορμόνης**. Συγκεκριμένα, η μελέτη δέκα (10) πεπτιδικών τμημάτων απέδειξε ότι **η παρέμβαση με μόρια αναστολεις στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της αμυλίνης θα μπορούσε να είναι ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος για την επιβράδυνση της ραγδαίας συσσωμάτωσης της**.

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

Μία διαφορετική προσέγγιση εφαρμόστηκε για τη μελέτη του **C-πεπτιδίου**, ενός πεπτιδικού τμήματος που παραμερίζονταν στις μέχρι σήμερα μελέτες της ινσουλίνης, καθώς η αμυλοειδογονικότητα του C-πεπτιδίου αποτελούσε έναν άγνωστο παράγοντα. Η πειραματική προσέγγιση που παρουσιάζεται στην παρούσα διατριβή, απέδειξε για πρώτη φορά την **ικανότητα του 31 καταλοίπων πεπτιδίου να αυτοοργανώνεται δημιουργώντας χαρακτηριστικές συναθροίσεις ινιδίων, σε ποικιλία συνθηκών (Tsiolaki et al., 2017c)**. Επιπρόσθετα, η συνεπώαση του C-πεπτιδίου με την αμυλοειδογόνο αμυλίνη αποκάλυψε την επικράτηση των ινιδίων του C-πεπτιδίου, υποδηλώνοντας τον πιθανό ανεξυχνίαστο ρόλο του, σε παθολογικές καταστάσεις. Η διαφορετική αυτή προσέγγιση στη μελέτη της ινσουλίνης μπορεί να αποκαλύψει τις ιδιότητες του C-πεπτιδίου, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι τα ευρήματα ολιγομερών που καταγράφονται σε ασθενείς με διαβήτη θα πρέπει να επανεξεταστούν, ενώ η χρήση του C-πεπτιδίου ως φάρμακο θα πρέπει να τεθεί πιθανά υπο αμφισβήτηση.

Η **κλαστερίνη**, μία πρωτεΐνη-συνοδός που φυσιολογικά δρα αποτρέποντας την πρωτεϊνική συσσωμάτωση, αποκαλύφθηκε ότι φέρει ένα ισχυρά αμυλοειδογόνο προφίλ. Πειραματικές μελέτες σε αμυλοειδογόνους καθοριστές της α-αλυσίδας του μορίου, **έδειξαν ότι εμφανίζουν την τάση να αυτοοργανώνονται σε ινίδια με τα τυπικά χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων**, εξηγώντας πιθανά τον συνεντοπισμό της κλαστερίνης σε εναποθέσεις ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer (Tsiolaki et al., 2017b). Ο λόγος για τον οποίο τα μόρια-συνοδοί βρίσκονται στις πρωτεϊνικές εναποθέσεις δεν είναι ξεκάθαρος, καθώς η φύση των μορίων δεν έχει αποσαφηνιστεί (Calero et al., 2005; Calero et al., 2000). Πιστεύεται ότι πρόκειται είτε για την προσπάθεια των μορίων-συνοδών να σημάνουν μη-φυσιολογικά διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια προς αποικοδόμηση, είτε συμπαρασύρονται κατά τη διαδικασία της αμυλοειδογένεσης, λόγω της ραγδαίας εξέλιξης του φαινομένου. Το άγνωστο μέχρι σήμερα αμυλοειδογόνο προφίλ μίας πρωτεΐνης-συνοδού, μπορεί να αποδειχθεί σημαντική ιδιότητα για την παρέμβαση στην ινιδιογένεση άλλων πρωτεϊνών, καθώς οι συνοδοί πρωτεΐνες είναι μόρια που συχνά έχουν μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων (Ellis and van der Vies, 1991).

Συνολικά, η αυτοσυγκρότηση των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, που σχετίζονται με αμυλοειδώσεις, **καθοδηγείται από μικρά τμήματα της αλληλουχίας τους**, που εμφανίζουν υψηλό αμυλοειδογόνο δυναμικό και **παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στους μηχανισμούς αυτοσυγκρότησής τους**. Η αναγνώριση αμυλοειδογόνων καθοριστών σε πρωτεΐνες είναι

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

μέγιστης σημασίας, καθώς αποτελούν ιδανικούς στόχους για φαρμακευτικές παρεμβάσεις με κατάλληλους αναστολείς. Ταυτόχρονα, η αποκάλυψη νέων, άγνωστων μέχρι σήμερα, αμυλοειδογόνων πρωτεϊνικών συστημάτων μπορεί να ρίξει φως σε ανεξερεύνητες πτυχές των στερεοδιαταξικών ασθενειών και πιθανά να ανακατευθύνει τις πειραματικές προσεγγίσεις. Τα πειραματικά αποτελέσματα του αμυλοειδογόνου C-πεπτιδίου, που χρησιμοποιείται ως ευεργετικό φάρμακο σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 ή διαβήτη τύπου 2, αποδεικνύει ότι η χρήση πεπτιδικών μορίων ως φαρμακευτικά σκευάσματα θα πρέπει να τεθεί υπο αμφισβήτηση, ενώ πειράματα κυτταροτοξικότητας επιβάλλεται να επιβεβαιώσουν την ασφάλεια σκευασμάτων με αμυλοειδογόνες ιδιότητες.

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

4.3. Γενικά Συμπεράσματα – Μελλοντικές κατευθύνσεις

Μέχρι σήμερα, δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί ο λόγος για τον οποίο η αμυλοειδογονικότητα παρότι είναι γενικευμένη ιδιότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων εντοπίζεται *in vivo* μόνο σε μερικές από τις πρωτεΐνες. Παρά τις γνώσεις που έχουμε αποκομίσει σχετικά με τη συσσωμάτωση και την αμυλοειδογονικότητα των γνωστών και των νεοεμφανιζόμενων αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, πολλά είναι τα αναπάντητα ερωτήματα που χρειάζεται να διαλευκανθούν. Η λεπτομερής κατανόηση της αυτοσυγκρότησης / συσσωμάτωσης τους, η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση ενός εύρους συμπτωμάτων σε διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, αναδείχθηκε ως ένα πεδίο φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, καθώς μεγάλο μέρος της ερευνητικής κοινότητας στοχεύει στο σχεδιασμό φαρμάκων που αναστέλλουν των καταρράκτη των φαινομένων. Οι επιδιωκόμενοι στόχοι του σχεδιασμού αυτού έχουν προσανατολιστεί είτε στη μείωση της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης, είτε στην αναστολή της ραγδαίας συσσωμάτωσης τους ή στην επιτάχυνση των διαδικασιών απομάκρυνσης των λάθος διπλωμένων μορίων, από τους ιστούς στους οποίους εναποτίθενται (Hardy and Selkoe, 2002). Παρά τις πολλά υποσχόμενες προκλινικές μελέτες, που είτε επιδρούν με εκλεπτυσμένες τεχνικές στα μοριακά μονοπάτια έκφρασης και ωρίμανσης των πρωτεϊνών, είτε εκμεταλλεύονται τις σύγχρονες τεχνικές ανοσοθεραπείας, καμία θεραπευτική τακτική δεν έχει εμφανίσει μέχρι σήμερα οφέλη σε ασθενείς (De-Paula et al., 2012).

Συγκεκριμένα, πολλές στρατηγικές αναστολής περιλαμβάνουν α) το σχεδιασμό πεπτιδίων-αναστολέων ικανών να μεσολαβούν στο σχηματισμό της cross-β δομής των ινιδίων (Soto et al., 1998) (β-sheet blockers), β) πεπτιδίων-αναστολέων ανθεκτικών στην πρωτεολυτική διάσπαση αποτελούμενα από D-αμινοξικά κατάλοιπα, γ) πεπτιδίων-αναστολέων με τροποποιημένες πλευρικές αλυσίδες (μεθυλίωση αμινοξικών καταλοίπων) κ.α. (Sun et al., 2012). Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση, δημοσιευμένη ήδη από το 2004, παρουσίασε τα αποτελέσματα πεπτιδίου που αναστέλλει την ειδική αλληλεπίδραση του Αβ πεπτιδίου με την μοριακή συνοδό του, Απολιποπρωτεΐνη Ε, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, τονίζοντας για πρώτη φορά τη σημασία των συν-εναποτεθειμένων πρωτεϊνών στις πλάκες της Alzheimer's, ως πιθανά εργαλεία αναστολής του πολυμερισμού του Αβ πεπτιδίου (Sadowski et al., 2004). Ο ανεξιχνίαστος, μέχρι και σήμερα, ρόλος των πρωτεϊνών που συμμετέχουν συν-εναποτεθειμένες στις αμυλοειδείς πλάκες, αναδεικνύει τη σημασία των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (*protein-protein interactions*), τόσο για την εξέλιξη των αμυλοειδώσεων, όσο και για την εύρεση πιθανών φαρμακευτικών στόχων. Κατάλληλα

Κεφάλαιο IV – Συμπεράσματα

σχεδιασμένα μόρια μπορεί να προκύψουν από την στοχευμένη επέμβαση των ερευνητών σε κάθε ένα από τα διάφορα στάδια της βιογένεσης, της ωρίμανσης, ή της συσσωμάτωσης των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών, όπως κατά την πρωτεολυτική ωρίμανση, ή κατά την αυτοοργάνωση ή κατά τον ολιγομερισμό ή κατά την αμυλοειδογένεση κ.ο.κ. Μία προφανής προσέγγιση για το σχεδιασμό υποψήφιων αναστολέων των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών είναι η στοχευμένη δράση σε μικρά τμήματα, που έχουν υψηλό αμυλοειδογόνο δυναμικό. Η χρήση μικρών πεπτιδικών μορίων με υψηλή συγγένεια ως προς τις αμυλοειδογόνες αυτές περιοχές αποτελεί μία αποτελεσματική μεθοδολογία χαμηλού κόστους για τη στοχευμένη αναστολή μη επιθυμητών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών–πρωτεϊνών.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

Κεφάλαιο V

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., Nathanson, C.M., 2003. Cystatins. *Biochemical Society Symposia*, 179-199.
- Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G., Grubb, A., 1986. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *Journal of Biological Chemistry* 261, 11282-11289.
- Abrahamson, M., Grubb, A., Olafsson, I., Lundwall, A., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS letters* 216, 229-233.
- Ahmed, A.B., Kajava, A.V., 2013. Breaking the amyloidogenicity code: methods to predict amyloids from amino acid sequence. *FEBS letters* 587, 1089-1095.
- Aitken, A., 1999. Protein consensus sequence motifs. *Molecular biotechnology* 12, 241-253.
- Alexandrescu, A.T., 2005. Amyloid accomplices and enforcers. *Protein Sci* 14, 1-12.
- Andreotto, E., Yan, L.M., Tatarek-Nossol, M., Velkova, A., Frank, R., Kapurniotu, A., 2010. Identification of hot regions of the Abeta-IAPP interaction interface as high-affinity binding sites in both cross- and self-association. *Angewandte Chemie* 49, 3081-3085.
- Argiles, A., Mourad, G., Axelrud-Cavadore, C., Derancourt, J., Adell, J.J., Mion, C., Cavadore, J.C., 1987. Haemodialysis-associated amyloidosis: beta 2-microglobulin alone or associated with globin chains? *Clinical science* 73, 515-518.
- Arimon, M., Grimminger, V., Sanz, F., Lashuel, H.A., 2008. Hsp104 targets multiple intermediates on the amyloid pathway and suppresses the seeding capacity of Abeta fibrils and protofibrils. *Journal of molecular biology* 384, 1157-1173.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Aronow, B.J., Lund, S.D., Brown, T.L., Harmony, J.A., Witte, D.P., 1993. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 725-729.
- Assenov, Y., Ramirez, F., Schelhorn, S.E., Lengauer, T., Albrecht, M., 2008. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 24, 282-284.
- Astbury, W.T., Dickinson, S., Bailey, K., 1935. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *The Biochemical journal* 29, 2351-2360 2351.
- Avila, J., Simon, D., Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., Hernandez, F., 2014. Sources of extracellular tau and its signaling. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 40 Suppl 1, S7-S15.
- Azriel, R., Gazit, E., 2001. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *The Journal of biological chemistry* 276, 34156-34161.
- Bader, S., Kuhner, S., Gavin, A.C., 2008. Interaction networks for systems biology. *FEBS letters* 582, 1220-1224.
- Bai, Y., Markham, K., Chen, F., Weerasekera, R., Watts, J., Horne, P., Wakutani, Y., Bagshaw, R., Mathews, P.M., Fraser, P.E., Westaway, D., St George-Hyslop, P., Schmitt-Ulms, G., 2008. The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7, 15-34.
- Balbach, J.J., Ishii, Y., Antzutkin, O.N., Leapman, R.D., Rizzo, N.W., Dyda, F., Reed, J., Tycko, R., 2000. Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* 39, 13748-13759.
- Barabasi, A.L., Albert, R., 1999. Emergence of scaling in random networks. *Science* 286, 509-512.
- Barabasi, A.L., Oltvai, Z.N., 2004. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics* 5, 101-113.
- Barabasi, A.L., Gulbahce, N., Loscalzo, J., 2011. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature reviews. Genetics* 12, 56-68.
- Barrett, A.J., 1986. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomedica biochimica acta* 45, 1363-1374.
- Barrett, A.J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Jarvinen, M., Katunuma, N., Machleidt, W., Muller-Esterl, W., Sasaki, M., Turk, V., 1986. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *The Biochemical journal* 236, 312.
- Bauer, H.H., Aebi, U., Haner, M., Hermann, R., Muller, M., Merkle, H.P., 1995. Architecture and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by in vitro aggregation of human calcitonin. *Journal of structural biology* 115, 1-15.
- Beauchamp, K.A., Lin, Y.S., Das, R., Pande, V.S., 2012. Are Protein Force Fields Getting Better? A Systematic Benchmark on 524 Diverse NMR Measurements. *Journal of chemical theory and computation* 8, 1409-1414.
- Beerten, J., Van Durme, J., Gallardo, R., Capriotti, E., Serpell, L., Rousseau, F., Schymkowitz, J., 2015. WALTZ-DB: a benchmark database of amyloidogenic hexapeptides. *Bioinformatics* 31, 1698-1700.
- Belli, M., Ramazzotti, M., Chiti, F., 2011. Prediction of amyloid aggregation in vivo. *EMBO reports* 12, 657-663.
- Bely, M., Makovitzky, J., 2006. Sensitivity and specificity of Congo red staining according to Romhanyi. Comparison with Puchtler's or Bennhold's methods. *Acta histochemica* 108, 175-180.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Benditt, E.P., Eriksen, N., Berglund, C., 1970. Congo red dichroism with dispersed amyloid fibrils, an extrinsic cotton effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66, 1044-1051.
- Bennhold, H., 1922. Eine spezifische amyloidfärbung mit kongorot. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 44, 1537.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A., Haak, J.R., 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 81, 3684-3690.
- Bergstrom, J., Murphy, C.L., Weiss, D.T., Solomon, A., Sletten, K., Hellman, U., Westermark, P., 2004. Two different types of amyloid deposits--apolipoprotein A-IV and transthyretin--in a patient with systemic amyloidosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84, 981-988.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* 28, 235-242.
- Bernstein, H.G., Rinne, R., Kirschke, H., Jarvinen, M., Knofel, B., Rinne, A., 1994. Cystatin A-like immunoreactivity is widely distributed in human brain and accumulates in neuritic plaques of Alzheimer disease subjects. *Brain research bulletin* 33, 477-481.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., Tanzi, R.E., 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature genetics* 39, 17-23.
- Betsholtz, C., Johnson, K.H., Westermark, P., 1989a. 'Amylin' hormone. *Nature* 338, 211.
- Betsholtz, C., Christmansson, L., Engstrom, U., Rorsman, F., Svensson, V., Johnson, K.H., Westermark, P., 1989b. Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS letters* 251, 261-264.
- Biza, K.V., Nastou, K.C., Tsiolaki, P.L., Mastrokalou, C.V., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2017. The amyloid interactome: Exploring protein aggregation. *PloS one* 12, e0173163.
- Blake, C., Serpell, L., 1996. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure* 4, 989-998.
- Blaschuk, O., Burdzy, K., Fritz, I.B., 1983. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *The Journal of biological chemistry* 258, 7714-7720.
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V., 1988. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO journal* 7, 2593-2599.
- Bodi, K., Prokaeva, T., Spencer, B., Eberhard, M., Connors, L.H., Seldin, D.C., 2009. AL-Base: a visual platform analysis tool for the study of amyloidogenic immunoglobulin light chain sequences. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 16, 1-8.
- Bokarewa, M., Abrahamson, M., Levshin, N., Egesten, A., Grubb, A., Dahlberg, L., Tarkowski, A., 2007. Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties. *The Journal of rheumatology* 34, 1293-1301.
- Bond, C.S., 2003. TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons. *Bioinformatics* 19, 311-312.
- Boultif, A., Louër, D., 2004. Powder pattern indexing with the dichotomy method. *Journal of Applied Crystallography* 37, 724-731.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A.J., Poux, S., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2016. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View. *Methods in molecular biology* 1374, 23-54.
- Brange, J., Andersen, L., Laursen, E.D., Meyn, G., Rasmussen, E., 1997. Toward understanding insulin fibrillation. *Journal of pharmaceutical sciences* 86, 517-525.
- Brems, D.N., Brown, P.L., Heckenlaible, L.A., Frank, B.H., 1990. Equilibrium denaturation of insulin and proinsulin. *Biochemistry* 29, 9289-9293.
- Bryan, A.W., Jr., Menke, M., Cowen, L.J., Lindquist, S.L., Berger, B., 2009. BETASCAN: probable beta-amyloids identified by pairwise probabilistic analysis. *PLoS computational biology* 5, e1000333.
- Buchanan, L.E., Dunkelberger, E.B., Tran, H.Q., Cheng, P.N., Chiu, C.C., Cao, P., Raleigh, D.P., de Pablo, J.J., Nowick, J.S., Zanni, M.T., 2013. Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient beta-sheet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19285-19290.
- Burkey, B.F., deSilva, H.V., Harmony, J.A., 1991. Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer. *Journal of lipid research* 32, 1039-1048.
- Burkey, B.F., Stuart, W.D., Harmony, J.A., 1992. Hepatic apolipoprotein J is secreted as a lipoprotein. *Journal of lipid research* 33, 1517-1526.
- Cabarkapa, V., 2015. Cystatin C - More Than the Marker of the Glomerular Filtration Rate. *Medicinski pregled* 68, 173-179.
- Calero, M., Rostagno, A., Ghiso, J., 2012. Search for amyloid-binding proteins by affinity chromatography. *Methods in molecular biology* 849, 213-223.
- Calero, M., Rostagno, A., Frangione, B., Ghiso, J., 2005. Clusterin and Alzheimer's disease. *Sub-cellular biochemistry* 38, 273-298.
- Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B., Ghiso, J., 2000. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microscopy research and technique* 50, 305-315.
- Cao, P., Marek, P., Noor, H., Patsalo, V., Tu, L.H., Wang, H., Abedini, A., Raleigh, D.P., 2013. Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS letters* 587, 1106-1118.
- Carter, D.B., 2005. The interaction of amyloid-beta with ApoE. *Sub-cellular biochemistry* 38, 255-272.
- Carter, D.B., Chou, K.C., 1998. A model for structure-dependent binding of Congo red to Alzheimer beta-amyloid fibrils. *Neurobiology of aging* 19, 37-40.
- Carver, J.A., Rekas, A., Thorn, D.C., Wilson, M.R., 2003. Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB life* 55, 661-668.
- Castillo, V., Ventura, S., 2009. Amyloidogenic regions and interaction surfaces overlap in globular proteins related to conformational diseases. *PLoS computational biology* 5, e1000476.
- Caswell, D.S., Spiro, T.G., 1986. Tyrosine and tryptophan modification monitored by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* 873, 73-78.
- Chayen, N.E., 2005. Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Progress in biophysics and molecular biology* 88, 329-337.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Chen, J.Y., Shen, C., Sivachenko, A.Y., 2006. Mining Alzheimer disease relevant proteins from integrated protein interactome data. *Pacific Symposium on Biocomputing*. Pacific Symposium on Biocomputing, 367-378.
- Chen, L.M., Yang, X.W., Tang, J.G., 2002. Acidic residues on the N-terminus of proinsulin C-Peptide are important for the folding of insulin precursor. *Journal of biochemistry* 131, 855-859.
- Cheng, Y.K., Rossky, P.J., 1998. Surface topography dependence of biomolecular hydrophobic hydration. *Nature* 392, 696-699.
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* 75, 333-366.
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2009. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature Chemical Biology* 5, 15-22.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., Dobson, C.M., 1999. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3590-3594.
- Choi-Miura, N.H., Oda, T., 1996. Relationship between multifunctional protein "clusterin" and Alzheimer disease. *Neurobiology of aging* 17, 717-722.
- Choi-Miura, N.H., Takahashi, Y., Nakano, Y., Tobe, T., Tomita, M., 1992. Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). *Journal of biochemistry* 112, 557-561.
- Chothia, C., 1973. Conformation of twisted beta-pleated sheets in proteins. *Journal of molecular biology* 75, 295-302.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D.J., 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Coelho, T., 1996. Familial amyloid polyneuropathy: new developments in genetics and treatment. *Current opinion in neurology* 9, 355-359.
- Cohen, A.S., Calkins, E., 1959. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183, 1202-1203.
- Cohen, S.I., Linse, S., Luheshi, L.M., Hellstrand, E., White, D.A., Rajah, L., Otzen, D.E., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P., 2013. Proliferation of amyloid-beta42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 9758-9763.
- Collaborative Computational Project, N., 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 50, 760-763.
- Collavin, L., Lunardi, A., Del Sal, G., 2010. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell death and differentiation* 17, 901-911.
- Conchillo-Sole, O., de Groot, N.S., Aviles, F.X., Vendrell, J., Daura, X., Ventura, S., 2007. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC bioinformatics* 8, 65.
- Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury, P.T., Jr., 2000. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39, 2552-2563.
- Cooper, G.J., 1994. Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocrine reviews* 15, 163-201.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Cooper, G.J., Day, A.J., Willis, A.C., Roberts, A.N., Reid, K.B., Leighton, B., 1989. Amylin and the amylin gene: structure, function and relationship to islet amyloid and to diabetes mellitus. *Biochimica et biophysica acta* 1014, 247-258.
- Cooper, G.J., Willis, A.C., Reid, K.B., Clark, A., Baker, C.A., Turner, R.C., Lewis, C.E., Morris, J.F., Howland, K., Rothbard, J.B., 1987. Diabetes-associated peptide. *Lancet* 2, 966.
- Cooper, J.H., 1969. A n evaluation of current methods for the diagnostic histochemistry of amyloid. *Journal of clinical pathology* 22, 410-413.
- Cope, S.M., Shinde, S., Best, R.B., Ghirlanda, G., Vaiana, S.M., 2013. Cyclic N-terminal loop of amylin forms non amyloid fibers. *Biophysical journal* 105, 1661-1669.
- Cruts, M., Theuns, J., Van Broeckhoven, C., 2012. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation* 33, 1340-1344.
- CrysAlis^{PRO}. 2014. Agilent Technologies, pp. Software system, Version 1.171.37.31 ed. Agilent Technologies UK Ltd, Oxford, UK.
- Crystal, A.S., Giasson, B.I., Crowe, A., Kung, M.P., Zhuang, Z.P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2003. A comparison of amyloid fibrillogenesis using the novel fluorescent compound K114. *Journal of neurochemistry* 86, 1359-1368.
- Cusick, M.E., Klitgord, N., Vidal, M., Hill, D.E., 2005. Interactome: gateway into systems biology. *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2, R171-181.
- D'Souza, A., Theis, J.D., Vrana, J.A., Dogan, A., 2014. Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 21, 71-75.
- Davies, M.E., Barrett, A.J., 1984. Immunolocalization of human cystatins in neutrophils and lymphocytes. *Histochemistry* 80, 373-377.
- De-Paula, V.J., Radanovic, M., Diniz, B.S., Forlenza, O.V., 2012. Alzheimer's disease. *Sub-cellular biochemistry* 65, 329-352.
- De Baets, G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., 2014. Predicting aggregation-prone sequences in proteins. *Essays in biochemistry* 56, 41-52.
- de Groot, N.S., Castillo, V., Grana-Montes, R., Ventura, S., 2012. AGGRESCAN: method, application, and perspectives for drug design. *Methods in molecular biology* 819, 199-220.
- de Silva, H.V., Harmony, J.A., Stuart, W.D., Gil, C.M., Robbins, J., 1990. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* 29, 5380-5389.
- de Sousa, M.M., Vital, C., Ostler, D., Fernandes, R., Pouget-Abadie, J., Carles, D., Saraiva, M.J., 2000. Apolipoprotein AI and transthyretin as components of amyloid fibrils in a kindred with apoAI Leu178His amyloidosis. *The American journal of pathology* 156, 1911-1917.
- Delano, W.L. 2005. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC
400, Oyster Point Blvd., Suite 213, South San Francisco, CA 94080-1918, USA.
- DeLano, W.L. 2006. The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- DeLellis, R.A., Glenner, G.G., Ram, J.S., 1968. Histochemical observations on amyloid with reference to polarization microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 16, 663-665.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- DeMattos, R.B., O'Dell M, A., Parsadanian, M., Taylor, J.W., Harmony, J.A., Bales, K.R., Paul, S.M., Aronow, B.J., Holtzman, D.M., 2002. Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10843-10848.
- Diaz-Avalos, R., Long, C., Fontano, E., Balbirnie, M., Grothe, R., Eisenberg, D., Caspar, D.L., 2003. Cross-beta order and diversity in nanocrystals of an amyloid-forming peptide. *Journal of molecular biology* 330, 1165-1175.
- Dill, K.A., Chan, H.S., 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology* 4, 10-19.
- Divry, P., Florkin, M., 1927. Sur les proprietes optiques de l'amyloide. *C R Soc Biol* 97, 1808-1810.
- Dobson, C.M., 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences* 24, 329-332.
- Dobson, C.M., 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology* 15, 3-16.
- Dodson, G., Steiner, D., 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Current opinion in structural biology* 8, 189-194.
- Dominguez-Prieto, M., Velasco, A., Vega, L., Taberner, A., Medina, J.M., 2016. Aberrant Co-localization of Synaptic Proteins Promoted by Alzheimer's Disease Amyloid-beta Peptides: Protective Effect of Human Serum Albumin. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 55, 171-182.
- Dong, J., Horvath, S., 2007. Understanding network concepts in modules. *BMC systems biology* 1, 24.
- Eanes, E.D., Glenner, G.G., 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 16, 673-677.
- Eichner, T., Radford, S.E., 2011. A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Molecular cell* 43, 8-18.
- Eisenberg, D., Jucker, M., 2012. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148, 1188-1203.
- Eisenberg, D.S., Sawaya, M.R., 2017. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annual review of biochemistry* 86, 69-95.
- Elam, J.S., Taylor, A.B., Strange, R., Antonyuk, S., Doucette, P.A., Rodriguez, J.A., Hasnain, S.S., Hayward, L.J., Valentine, J.S., Yeates, T.O., Hart, P.J., 2003. Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nature structural biology* 10, 461-467.
- Elghetany, M.T., Saleem, A., Barr, K., 1989. The congo red stain revisited. *Annals of clinical and laboratory science* 19, 190-195.
- Ellis, R.J., van der Vies, S.M., 1991. Molecular chaperones. *Annual review of biochemistry* 60, 321-347.
- Ellis, R.J., Minton, A.P., 2003. Cell biology: join the crowd. *Nature* 425, 27-28.
- Emily, M., Talvas, A., Delamarche, C., 2013. MetAmyl: a METa-predictor for AMYLoid proteins. *PloS one* 8, e79722.
- Esteras-Chopo, A., Serrano, L., Lopez de la Paz, M., 2005. The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16672-16677.
- Faber, O.K., Hagen, C., Binder, C., Markussen, J., Naithani, V.K., Blix, P.M., Kuzuya, H., Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H., Rossing, N., 1978. Kinetics of human connecting peptide in normal and diabetic subjects. *The Journal of clinical investigation* 62, 197-203.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Fan, L., Westermark, G., Chan, S.J., Steiner, D.F., 1994. Altered gene structure and tissue expression of islet amyloid polypeptide in the chicken. *Molecular endocrinology* 8, 713-721.
- Fandrich, M., 2007. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 2066-2078.
- Fandrich, M., Dobson, C.M., 2002. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *The EMBO journal* 21, 5682-5690.
- Fandrich, M., Fletcher, M.A., Dobson, C.M., 2001. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410, 165-166.
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L., 2004. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature biotechnology* 22, 1302-1306.
- Fink, T.M., Zimmer, M., Tschopp, J., Etienne, J., Jenne, D.E., Lichter, P., 1993. Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene. *Genomics* 16, 526-528.
- Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., Scheres, S.H.W., 2017. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* 547, 185-190.
- Fosgerau, K., Hoffmann, T., 2015. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today* 20, 122-128.
- Fox, A., Snollaerts, T., Errecart Casanova, C., Calciano, A., Nogaj, L.A., Moffet, D.A., 2010. Selection for nonamyloidogenic mutants of islet amyloid polypeptide (IAPP) identifies an extended region for amyloidogenicity. *Biochemistry* 49, 7783-7789.
- Fraser, R.D., Macrae, T.P., Stewart, F.H., Suzuki, E., 1965. Poly-L-Alanylglycine. *Journal of molecular biology* 11, 706-712.
- French, L.E., Chonn, A., Ducrest, D., Baumann, B., Belin, D., Wohlwend, A., Kiss, J.Z., Sappino, A.P., Tschopp, J., Schifferli, J.A., 1993. Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. *The Journal of cell biology* 122, 1119-1130.
- Fricker, L.D., Evans, C.J., Esch, F.S., Herbert, E., 1986. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine carboxypeptidase E. *Nature* 323, 461-464.
- Frid, P., Anisimov, S.V., Popovic, N., 2007. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* 53, 135-160.
- Friedrich, N., Kekule, A., 1859. Zur amyloidfrage. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 16, 50–65.
- Fronczak, A., Fronczak, P., Holyst, J.A., 2004. Average path length in random networks. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 70, 056110.
- Frousios, K.K., Iconomidou, V.A., Karletidi, C.M., Hamodrakas, S.J., 2009. Amyloidogenic determinants are usually not buried. *BMC structural biology* 9, 44.
- Fukuyama, H., Verdier, Y., Guan, Y., Makino-Okamura, C., Shilova, V., Liu, X., Maksoud, E., Matsubayashi, J., Haddad, I., Spirohn, K., Ono, K., Hetru, C., Rossier, J., Ideker, T., Boutros, M., Vinh, J., Hoffmann, J.A., 2013. Landscape of protein-protein interactions in *Drosophila* immune deficiency signaling during bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 10717-10722.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Galzitskaya, O.V., Garbuzynskiy, S.O., Lobanov, M.Y., 2006. Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains. *PLoS computational biology* 2, e177.
- Gasior, P., Kotulska, M., 2014. FISH Amyloid - a new method for finding amyloidogenic segments in proteins based on site specific co-occurrence of aminoacids. *BMC bioinformatics* 15, 54.
- Ge, H., Walhout, A.J., Vidal, M., 2003. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends in genetics : TIG* 19, 551-560.
- Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D., Beighton, E., 1968. "Cross-beta" conformation in proteins. *Journal of molecular biology* 32, 343-358.
- Gerhartz, B., Abrahamson, M., 2002. Physico-chemical properties of the N-terminally truncated L68Q cystatin C found in amyloid deposits of brain haemorrhage patients. *Biological chemistry* 383, 301-305.
- Ghiso, J., Pons-Estel, B., Frangione, B., 1986a. Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochemical and biophysical research communications* 136, 548-554.
- Ghiso, J., Jenson, O., Frangione, B., 1986b. Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2974-2978.
- Glabe, C.G., 2008. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *The Journal of biological chemistry* 283, 29639-29643.
- Glenner, G.G., 1981. The bases of the staining of amyloid fibers: their physico-chemical nature and the mechanism of their dye-substrate interaction. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 13, 1-37.
- Goh, K.I., Cusick, M.E., Valle, D., Childs, B., Vidal, M., Barabasi, A.L., 2007. The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8685-8690.
- Goldsbury, C.S., Cooper, G.J., Goldie, K.N., Muller, S.A., Saafi, E.L., Gruijters, W.T., Misur, M.P., Engel, A., Aebi, U., Kistler, J., 1997. Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *Journal of structural biology* 119, 17-27.
- Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., Eisenberg, D., 2010. Identifying the amyloyme, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3487-3492.
- Gonatas, N.K., Terry, R.D., Weiss, M., 1964. Ultrastructural studies in Jacob-Creutzfeldt disease. *Transactions of the American Neurological Association* 89, 13-14.
- Goni, J., Esteban, F.J., de Mendizabal, N.V., Sepulcre, J., Ardanza-Trevijano, S., Agirrezabal, I., Villoslada, P., 2008. A computational analysis of protein-protein interaction networks in neurodegenerative diseases. *BMC systems biology* 2, 52.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., Nitsch, R.M., 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491-1495.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8342-8347.
- Grana-Montes, R., de Groot, N.S., Castillo, V., Sancho, J., Velazquez-Campoy, A., Ventura, S., 2012. Contribution of disulfide bonds to stability, folding, and amyloid fibril formation: the PI3-SH3 domain case. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1-15.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Grubb, A., Lofberg, H., 1982. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohipophysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 3024-3027.
- Grubb, A.O., 2000. Cystatin C--properties and use as diagnostic marker. *Advances in Clinical Chemistry* 35, 63-99.
- Gudmundsson, G., Hallgrimsson, J., Jonasson, T.A., Bjarnason, O., 1972. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. *Brain : a journal of neurology* 95, 387-404.
- Gueft, B., Ghidoni, J.J., 1963. The Site of Formation and Ultrastructure of Amyloid. *The American journal of pathology* 43, 837-854.
- Guijarro, J.I., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell, I.D., Dobson, C.M., 1998. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4224-4228.
- Gunawardana, C.G., Mehrabian, M., Wang, X., Mueller, I., Lubambo, I.B., Jonkman, J.E., Wang, H., Schmitt-Ulms, G., 2015. The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 14, 3000-3014.
- Gunsalus, K.C., Ge, H., Schetter, A.J., Goldberg, D.S., Han, J.D., Hao, T., Berriz, G.F., Bertin, N., Huang, J., Chuang, L.S., Li, N., Mani, R., Hyman, A.A., Sonnichsen, B., Echeverri, C.J., Roth, F.P., Vidal, M., Piano, F., 2005. Predictive models of molecular machines involved in *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis. *Nature* 436, 861-865.
- Guo, J.P., Arai, T., Miklossy, J., McGeer, P.L., 2006. Aβ and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1953-1958.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hamodrakas, S.J., 1988. A protein secondary structure prediction scheme for the IBM PC and compatibles. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 4, 473-477.
- Hamodrakas, S.J., 2011. Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. *The FEBS journal* 278, 2428-2435.
- Hamodrakas, S.J., Hoenger, A., Iconomidou, V.A., 2004. Amyloid fibrillogenesis of silkworm chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase. *Journal of structural biology* 145, 226-235.
- Hamodrakas, S.J., Liappa, C., Iconomidou, V.A., 2007. Consensus prediction of amyloidogenic determinants in amyloid fibril-forming proteins. *International journal of biological macromolecules* 41, 295-300.
- Hamosh, A., Scott, A.F., Amberger, J.S., Bocchini, C.A., McKusick, V.A., 2005. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research* 33, D514-517.
- Hanger, D.P., Lau, D.H., Phillips, E.C., Bondulich, M.K., Guo, T., Woodward, B.W., Pooler, A.M., Noble, W., 2014. Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 40 Suppl 1, S37-45.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Haris, P.I., Chapman, D., 1995. The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 37, 251-263.
- Harrison, R.S., Sharpe, P.C., Singh, Y., Fairlie, D.P., 2007. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159, 1-77.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Henriksson, M., Shafqat, J., Liepinsh, E., Tally, M., Wahren, J., Jornvall, H., Johansson, J., 2000. Unordered structured of proinsulin C-peptide in aqueous solution and in the presence of lipid vesicles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57, 337-342.
- Henskens, Y.M., Veerman, E.C., Nieuw Amerongen, A.V., 1996. Cystatins in health and disease. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 377, 71-86.
- Hermjakob, H., Montecchi-Palazzi, L., Lewington, C., Mudali, S., Kerrien, S., Orchard, S., Vingron, M., Roechert, B., Roepstorff, P., Valencia, A., Margalit, H., Armstrong, J., Bairoch, A., Cesareni, G., Sherman, D., Apweiler, R., 2004. IntAct: an open source molecular interaction database. *Nucleic acids research* 32, D452-455.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Fraaije, J.G.E.M., 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 18, 1463-1472.
- Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Sato, K., Sasamoto, K., Saido, T.C., 2005. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nature neuroscience* 8, 527-533.
- Hills, C.E., Brunskill, N.J., 2008. Intracellular signalling by C-peptide. *Experimental diabetes research* 2008, 635158.
- Hirschfield, G.M., Hawkins, P.N., 2003. Amyloidosis: new strategies for treatment. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35, 1608-1613.
- Hopsu-Havu, V.K., Joronen, I.A., Jarvinen, M., Rinne, A., 1983. Cysteine proteinase inhibitors in psoriatic epidermis. *Archives of dermatological research* 275, 305-309.
- Howes, E.A., Hurst, S., Laslop, A., Jones, R., 1998. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Molecular human reproduction* 4, 673-681.
- Howie, A.J., 2015. "Green (or apple-green) birefringence" of Congo red-stained amyloid. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 22, 205-206.
- Howlett, G.J., Moore, K.J., 2006. Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 17, 541-547.
- Huang, K., Dong, J., Phillips, N.B., Carey, P.R., Weiss, M.A., 2005. Proinsulin is refractory to protein fibrillation: topological protection of a precursor protein from cross-beta assembly. *The Journal of biological chemistry* 280, 42345-42355.
- Huang, L., Liu, X., Cheng, B., Huang, K., 2015. How our bodies fight amyloidosis: effects of physiological factors on pathogenic aggregation of amyloidogenic proteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 568, 46-55.
- Huang, T.H., Yang, D.S., Fraser, P.E., Chakrabarty, A., 2000. Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid. *The Journal of biological chemistry* 275, 36436-36440.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Huang, Y., Herman, M.M., Liu, J., Katsetos, C.D., Wills, M.R., Savory, J., 1997. Neurofibrillary lesions in experimental aluminum-induced encephalopathy and Alzheimer's disease share immunoreactivity for amyloid precursor protein, A beta, alpha 1-antichymotrypsin and ubiquitin-protein conjugates. *Brain research* 771, 213-220.
- Huber, W., Carey, V.J., Long, L., Falcon, S., Gentleman, R., 2007. Graphs in molecular biology. *BMC bioinformatics* 8 Suppl 6, S8.
- Humphreys, D.T., Carver, J.A., Easterbrook-Smith, S.B., Wilson, M.R., 1999. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 6875-6881.
- Hung, C.F., Cheng, T.L., Wu, R.H., Teng, C.F., Chang, W.T., 2006. A novel bidirectional expression system for simultaneous expression of both the protein-coding genes and short hairpin RNAs in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 339, 1035-1042.
- Hye, A., Lynham, S., Thambisetty, M., Causevic, M., Campbell, J., Byers, H.L., Hooper, C., Rijdsdijk, F., Tabrizi, S.J., Banner, S., Shaw, C.E., Foy, C., Poppe, M., Archer, N., Hamilton, G., Powell, J., Brown, R.G., Sham, P., Ward, M., Lovestone, S., 2006. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 129, 3042-3050.
- Iconomidou, V.A., Vriend, G., Hamodrakas, S.J., 2000. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS letters* 479, 141-145.
- Iconomidou, V.A., Leontis, A., Hoenger, A., Hamodrakas, S.J., 2013. Identification of a novel 'aggregation-prone'/amyloidogenic determinant' peptide in the sequence of the highly amyloidogenic human calcitonin. *FEBS letters* 587, 569-574.
- Inoue, S., 2008. In situ Aβ pores in AD brain are cylindrical assembly of Aβ protofilaments. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 15, 223-233.
- Inoue, S., Kuroiwa, M., Ohashi, K., Hara, M., Kisilevsky, R., 1997. Ultrastructural organization of hemodialysis-associated beta 2-microglobulin amyloid fibrils. *Kidney international* 52, 1543-1549.
- Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespie, J.R., Petrick, J.S., Trabachino, L.C., Minert, L.J., Carter, S.A., Fink, A.L., 1999. Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13175-13179.
- Isobe, T., 1993. AA amyloidosis and AL amyloidosis. *Internal medicine* 32, 919-920.
- Ivanova, M.I., Sawaya, M.R., Gingery, M., Attinger, A., Eisenberg, D., 2004. An amyloid-forming segment of beta2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10584-10589.
- Jackson, M., Mantsch, H.H., 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30, 95-120.
- Jahn, T.R., Radford, S.E., 2008. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of biochemistry and biophysics* 469, 100-117.
- Jaikaran, E.T., Higham, C.E., Serpell, L.C., Zurdo, J., Gross, M., Clark, A., Fraser, P.E., 2001. Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *Journal of molecular biology* 308, 515-525.
- Jalili, M., Askari Sichani, O., Yu, X., 2015. Optimal pinning controllability of complex networks: dependence on network structure. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 91, 012803.
- Janin, J., 1997. Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nature structural biology* 4, 973-974.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskolski, M., 2004. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *Journal of molecular biology* 341, 151-160.
- Janowski, R., Kozak, M., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskolski, M., 2005. 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular beta-sheets. *Proteins* 61, 570-578.
- Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M., Jaskolski, M., 2001. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nature structural biology* 8, 316-320.
- Jayasinghe, S.A., Langen, R., 2004. Identifying structural features of fibrillar islet amyloid polypeptide using site-directed spin labeling. *The Journal of biological chemistry* 279, 48420-48425.
- Jenko Kokalj, S., Guncar, G., Stern, I., Morgan, G., Rabzelj, S., Kenig, M., Staniforth, R.A., Waltho, J.P., Zerovnik, E., Turk, D., 2007. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. *Journal of molecular biology* 366, 1569-1579.
- Jenko, S., Dolenc, I., Guncar, G., Dobersek, A., Podobnik, M., Turk, D., 2003. Crystal structure of Stefin A in complex with cathepsin H: N-terminal residues of inhibitors can adapt to the active sites of endo- and exopeptidases. *Journal of molecular biology* 326, 875-885.
- Jimenez, J.L., Nettleton, E.J., Bouchard, M., Robinson, C.V., Dobson, C.M., Saibil, H.R., 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9196-9201.
- Jimenez, J.L., Guijarro, J.I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C.M., Sunde, M., Saibil, H.R., 1999. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *The EMBO journal* 18, 815-821.
- Jin, L.W., Claborn, K.A., Kurimoto, M., Geday, M.A., Maezawa, I., Sohraby, F., Estrada, M., Kaminsky, W., Kahr, B., 2003. Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15294-15298.
- Johansson, J., Ekberg, K., Shafqat, J., Henriksson, M., Chibalin, A., Wahren, J., Jornvall, H., 2002. Molecular effects of proinsulin C-peptide. *Biochemical and biophysical research communications* 295, 1035-1040.
- Johnston, N., Krimm, S., 1971. An infrared study of unordered poly-L-proline in CaCl₂ solutions. *Biopolymers* 10, 2597-2605.
- Jones, S., Manning, J., Kad, N.M., Radford, S.E., 2003. Amyloid-forming peptides from beta2-microglobulin: Insights into the mechanism of fibril formation in vitro. *Journal of molecular biology* 325, 249-257.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L., 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Physics* 79, 926-935.
- Jornvall, H., Lindahl, E., Astorga-Wells, J., Lind, J., Holmlund, A., Melles, E., Alvelius, G., Nerelius, C., Maler, L., Johansson, J., 2010. Oligomerization and insulin interactions of proinsulin C-peptide: Threefold relationships to properties of insulin. *Biochemical and biophysical research communications* 391, 1561-1566.
- Joy, M.P., Brock, A., Ingber, D.E., Huang, S., 2005. High-betweenness proteins in the yeast protein interaction network. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2005, 96-103.
- Juszczyk, P., Paraschiv, G., Szymanska, A., Kolodziejczyk, A.S., Rodziewicz-Motowidlo, S., Grzonka, Z., Przybylski, M., 2009. Binding epitopes and interaction structure of the neuroprotective protease inhibitor cystatin C with beta-amyloid revealed by proteolytic excision mass spectrometry and molecular docking simulation. *Journal of medicinal chemistry* 52, 2420-2428.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Kabsch, W., Sander, C., 1984. On the use of sequence homologies to predict protein structure: identical pentapeptides can have completely different conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1075-1078.
- Kaesler, S.A., Herzig, M.C., Coomaraswamy, J., Kilger, E., Selenica, M.L., Winkler, D.T., Staufenbiel, M., Levy, E., Grubb, A., Jucker, M., 2007. Cystatin C modulates cerebral beta-amyloidosis. *Nature genetics* 39, 1437-1439.
- Kahn, S.E., 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3-19.
- Kajava, A.V., Aebi, U., Steven, A.C., 2005. The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *Journal of molecular biology* 348, 247-252.
- Kajava, A.V., Baxa, U., Wickner, R.B., Steven, A.C., 2004. A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7885-7890.
- Karamanos, T.K., Kalverda, A.P., Thompson, G.S., Radford, S.E., 2015. Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 88-89, 86-104.
- Karplus, M., 1997. The Levinthal paradox: yesterday and today. *Folding & design* 2, S69-75.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., Arnold, S.M., 2002. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 411-421.
- Kaur, G., Levy, E., 2012. Cystatin C in Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 5, 79.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G., 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-489.
- Kelly, J.W., 1998. The environmental dependency of protein folding best explains prion and amyloid diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 930-932.
- Kelly, J.W., 2000. Mechanisms of amyloidogenesis. *Nature structural biology* 7, 824-826.
- Khurana, R., Uversky, V.N., Nielsen, L., Fink, A.L., 2001. Is Congo red an amyloid-specific dye? *The Journal of biological chemistry* 276, 22715-22721.
- Kida, E., Choi-Miura, N.H., Wisniewski, K.E., 1995. Deposition of apolipoproteins E and J in senile plaques is topographically determined in both Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Brain research* 685, 211-216.
- Kim, C., Choi, J., Lee, S.J., Welsh, W.J., Yoon, S., 2009. NetCSSP: web application for predicting chameleon sequences and amyloid fibril formation. *Nucleic acids research* 37, W469-473.
- Kirschner, D.A., Abraham, C., Selkoe, D.J., 1986. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 503-507.
- Klunk, W.E., Pettegrew, J.W., Abraham, D.J., 1989. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 37, 1273-1281.
- Kolodziejczyk, R., Michalska, K., Hernandez-Santoyo, A., Wahlbom, M., Grubb, A., Jaskolski, M., 2010. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS Journal* 277, 1726-1737.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Koukos, P.I., Glykos, N.M., 2014. Folding molecular dynamics simulations accurately predict the effect of mutations on the stability and structure of a vamin-derived peptide. *The journal of physical chemistry. B* 118, 10076-10084.
- Kovacs, G.G., Botond, G., Budka, H., 2010. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. *Acta neuropathologica* 119, 389-408.
- Krebs, M.R., Bromley, E.H., Rogers, S.S., Donald, A.M., 2005. The mechanism of amyloid spherulite formation by bovine insulin. *Biophysical journal* 88, 2013-2021.
- Krebs, M.R., Morozova-Roche, L.A., Daniel, K., Robinson, C.V., Dobson, C.M., 2004a. Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils. *Protein Sci* 13, 1933-1938.
- Krebs, M.R., Macphee, C.E., Miller, A.F., Dunlop, I.E., Dobson, C.M., Donald, A.M., 2004b. The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14420-14424.
- Krimm, S., Bandekar, J., 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in protein chemistry* 38, 181-364.
- Kudva, Y.C., Hiddinga, H.J., Butler, P.C., Mueske, C.S., Eberhardt, N.L., 1997. Small heat shock proteins inhibit in vitro A beta(1-42) amyloidogenesis. *FEBS letters* 416, 117-121.
- Kumita, J.R., Poon, S., Caddy, G.L., Hagan, C.L., Dumoulin, M., Yerbury, J.J., Stewart, E.M., Robinson, C.V., Wilson, M.R., Dobson, C.M., 2007. The extracellular chaperone clusterin potently inhibits human lysozyme amyloid formation by interacting with prefibrillar species. *Journal of molecular biology* 369, 157-167.
- Kurouski, D., Washington, J., Ozbil, M., Prabhakar, R., Shekhtman, A., Lednev, I.K., 2012. Disulfide bridges remain intact while native insulin converts into amyloid fibrils. *PloS one* 7, e36989.
- Kuzuya, H., Blix, P.M., Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H., Steiner, D.F., Faber, O.K., Binder, C., 1978. Heterogeneity of circulating human C-peptide. *Diabetes* 27 Suppl 1, 184-191.
- Kyle, R.A., 2001. Amyloidosis: a convoluted story. *British journal of haematology* 114, 529-538.
- LaDu, M.J., Gilligan, S.M., Lukens, J.R., Cabana, V.G., Reardon, C.A., Van Eldik, L.J., Holtzman, D.M., 1998. Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *Journal of neurochemistry* 70, 2070-2081.
- Lah, T.T., Kokalj-Kunovar, M., Turk, V., 1990. Cysteine proteinase inhibitors in human cancerous tissues and fluids. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 371 Suppl, 199-203.
- Lakins, J.N., Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Tenniswood, M.P., Wilson, M.R., 2002. Evidence that clusterin has discrete chaperone and ligand binding sites. *Biochemistry* 41, 282-291.
- Landau, M., Sawaya, M.R., Faull, K.F., Laganowsky, A., Jiang, L., Sievers, S.A., Liu, J., Barrio, J.R., Eisenberg, D., 2011. Towards a pharmacophore for amyloid. *PLoS biology* 9, e1001080.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczký, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Showkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaanty, K.D., Miner, T.L., Delehaanty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak,

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., *et al.*, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Landreh, M., Jornvall, H., 2015. C-peptide evolution: generation from few structural restrictions of bioactivities not necessarily functional. *FEBS letters* 589, 415-418.
- Landreh, M., Ostberg, L.J., Jornvall, H., 2014. A subdivided molecular architecture with separate features and stepwise emergence among proinsulin C-peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 450, 1433-1438.
- Landreh, M., Rising, A., Presto, J., Jornvall, H., Johansson, J., 2015. Specific chaperones and regulatory domains in control of amyloid formation. *The Journal of biological chemistry* 290, 26430-26436.
- Lansbury, P.T., Jr., Caughey, B., 1996. The double life of the prion protein. *Current biology : CB* 6, 914-916.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S.M., Lange, O.F., Thompson, J., Jacak, R., Kaufman, K., Renfrew, P.D., Smith, C.A., Sheffler, W., Davis, I.W., Cooper, S., Treuille, A., Mandell, D.J., Richter, F., Ban, Y.E., Fleishman, S.J., Corn, J.E., Kim, D.E., Lyskov, S., Berrondo, M., Mentzer, S., Popovic, Z., Havranek, J.J., Karanicolas, J., Das, R., Meiler, J., Kortemme, T., Gray, J.J., Kuhlman, B., Baker, D., Bradley, P., 2011. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods in enzymology* 487, 545-574.
- Leclerc, R.D., 2008. Survival of the sparsest: robust gene networks are parsimonious. *Molecular systems biology* 4, 213.
- Lee, S., Carson, K., Rice-Ficht, A., Good, T., 2006. Small heat shock proteins differentially affect Aβ aggregation and toxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 347, 527-533.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673-676.
- Leslie, A.G.W., Powell, H.R., 2007. *Processing diffraction data with mosflm* Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands.
- Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H., 2006. A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352-357.
- Levy, E., 2008. Cystatin C: a potential target for Alzheimer's treatment. *Expert review of neurotherapeutics* 8, 687-689.
- Levy, E., Sastre, M., Kumar, A., Gallo, G., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., 2001. Codeposition of cystatin C with amyloid-β protein in the brain of Alzheimer disease patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60, 94-104.
- Levy, S.F., Siegal, M.L., 2008. Network hubs buffer environmental variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS biology* 6, e264.
- Li, X., Chen, H., Huang, Z., Su, H., Martinez, J.D., 2007. Global mapping of gene/protein interactions in PubMed abstracts: a framework and an experiment with P53 interactions. *Journal of biomedical informatics* 40, 453-464.
- Li, Y., Yan, J., Zhang, X., Huang, K., 2013. Disulfide bonds in amyloidogenesis diseases related proteins. *Proteins* 81, 1862-1873.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Licata, L., Orchard, S., 2016. The MIntAct Project and Molecular Interaction Databases. *Methods in molecular biology* 1415, 55-69.
- Lill, C.M., Roehr, J.T., McQueen, M.B., Kavvoura, F.K., Bagade, S., Schjeide, B.M., Schjeide, L.M., Meissner, E., Zauft, U., Allen, N.C., Liu, T., Schilling, M., Anderson, K.J., Beecham, G., Berg, D., Biernacka, J.M., Brice, A., DeStefano, A.L., Do, C.B., Eriksson, N., Factor, S.A., Farrer, M.J., Foroud, T., Gasser, T., Hamza, T., Hardy, J.A., Heutink, P., Hill-Burns, E.M., Klein, C., Latourelle, J.C., Maraganore, D.M., Martin, E.R., Martinez, M., Myers, R.H., Nalls, M.A., Pankratz, N., Payami, H., Satake, W., Scott, W.K., Sharma, M., Singleton, A.B., Stefansson, K., Toda, T., Tung, J.Y., Vance, J., Wood, N.W., Zabetian, C.P., and Me Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease, C., International Parkinson's Disease Genomics, C., Parkinson's Disease, G.C., Wellcome Trust Case Control, C., Young, P., Tanzi, R.E., Khoury, M.J., Zipp, F., Lehrach, H., Ioannidis, J.P., Bertram, L., 2012. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS genetics* 8, e1002548.
- Lind, J., Lindahl, E., Peralvarez-Marin, A., Holmlund, A., Jornvall, H., Maler, L., 2010. Structural features of proinsulin C-peptide oligomeric and amyloid states. *The FEBS journal* 277, 3759-3768.
- Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F., Serrano, L., 2004. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *Journal of molecular biology* 342, 345-353.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., Shaw, D.E., 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78, 1950-1958.
- Linke, R.P., Serpell, L.C., Lottspeich, F., Toyoda, M., 2017. Cathepsin K as a novel amyloid fibril protein in humans. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 24, 68-69.
- Liu, Y., Eisenberg, D., 2002. 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci* 11, 1285-1299.
- Lopez de la Paz, M., Serrano, L., 2004. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 87-92.
- Lorenzo, A., Yankner, B.A., 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12243-12247.
- Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G.C., Yankner, B.A., 1994. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368, 756-760.
- Lotia, S., Montojo, J., Dong, Y., Bader, G.D., Pico, A.R., 2013. Cytoscape app store. *Bioinformatics* 29, 1350-1351.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., 2016. Identification of an amyloid fibril forming segment of human Pmel17 repeat domain (RPT domain). *Biopolymers* 106, 133-139.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Giannelou, P., Hamodrakas, S.J., 2013. Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian Zona Pellucida formation. *PLoS one* 8, e73258.
- Louros, N.N., Bolas, G.M.P., Tsiolaki, P.L., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2016. Intrinsic aggregation propensity of the CsgB nucleator protein is crucial for curli fiber formation. *Journal of structural biology* 195, 179-189.
- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Griffin, M.D., Howlett, G.J., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2015a. Chameleon 'aggregation-prone' segments of apoA-I: A model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis. *International journal of biological macromolecules* 79, 711-718.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Tsiolaki, P.L., Chrysin, E.D., Baltatzis, G.E., Patsouris, E.S., Hamodrakas, S.J., 2014. An N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) 'aggregation-prone' segment involved in isolated atrial amyloidosis. *FEBS letters* 588, 52-57.
- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Baltoumas, F.A., Chryssikos, G.D., Gionis, V., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2017. Tracking the amyloidogenic core of IAPP amyloid fibrils: Insights from micro-Raman spectroscopy. *Journal of structural biology* 199, 140-152.
- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Zompra, A.A., Pappa, E.V., Magafa, V., Pairas, G., Cordopatis, P., Cheimonidou, C., Trougakos, I.P., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2015b. Structural studies and cytotoxicity assays of "aggregation-prone" IAPP(8-16) and its non-amyloidogenic variants suggest its important role in fibrillogenesis and cytotoxicity of human amylin. *Biopolymers* 104, 196-205.
- Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y., Sun, P.D., 2014. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5189-5194.
- Luca, S., Yau, W.M., Leapman, R., Tycko, R., 2007. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. *Biochemistry* 46, 13505-13522.
- Luhers, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D., Riek, R., 2005. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17342-17347.
- Lukinius, A., Wilander, E., Westermark, G.T., Engstrom, U., Westermark, P., 1989. Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the B cell secretory granules of the human pancreatic islets. *Diabetologia* 32, 240-244.
- Lundmark, K., Westermark, G.T., Olsen, A., Westermark, P., 2005. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6098-6102.
- Lundmark, K., Westermark, G.T., Nystrom, S., Murphy, C.L., Solomon, A., Westermark, P., 2002. Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6979-6984.
- Lutz, T.A., 2010. The role of amylin in the control of energy homeostasis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 298, R1475-1484.
- Maat-Schieman, M.L., van Duinen, S.G., Bornebroek, M., Haan, J., Roos, R.A., 1996. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type (HCHWA-D): II--A review of histopathological aspects. *Brain pathology* 6, 115-120.
- Madine, J., Jack, E., Stockley, P.G., Radford, S.E., Serpell, L.C., Middleton, D.A., 2008. Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20-29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 130, 14990-15001.
- Maftai, M., Tian, X., Manea, M., Exner, T.E., Schwanzar, D., von Arnim, C.A., Przybylski, M., 2012. Interaction structure of the complex between neuroprotective factor humanin and Alzheimer's beta-amyloid peptide revealed by affinity mass spectrometry and molecular modeling. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 18, 373-382.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., Riek, R., 2009. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325, 328-332.
- Mangione, P., Sunde, M., Giorgetti, S., Stoppini, M., Esposito, G., Gianelli, L., Obici, L., Asti, L., Andreola, A., Viglino, P., Merlini, G., Bellotti, V., 2001. Amyloid fibrils derived from the apolipoprotein A1 Leu174Ser variant contain elements of ordered helical structure. *Protein Sci* 10, 187-199.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Marek, P., Abedini, A., Song, B., Kanungo, M., Johnson, M.E., Gupta, R., Zaman, W., Wong, S.S., Raleigh, D.P., 2007. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology. *Biochemistry* 46, 3255-3261.
- Mares-Guia, T.R., Maigret, B., Martins, N.F., Maia, A.L., Vilela, L., Ramos, C.H., Neto, L.J., Juliano, M.A., dos Mares-Guia, M.L., Santoro, M.M., 2006. Molecular dynamics and circular dichroism studies of human and rat C-peptides. *Journal of molecular graphics & modelling* 25, 532-542.
- Marsh, R.E., Corey, R.B., Pauling, L., 1955. An investigation of the structure of silk fibroin. *Biochimica et biophysica acta* 16, 1-34.
- Marshall, K.E., Serpell, L.C., 2009. Structural integrity of beta-sheet assembly. *Biochemical Society transactions* 37, 671-676.
- Marshall, K.E., Hicks, M.R., Williams, T.L., Hoffmann, S.V., Rodger, A., Dafforn, T.R., Serpell, L.C., 2010. Characterizing the assembly of the Sup35 yeast prion fragment, GNNQQNY: structural changes accompany a fiber-to-crystal switch. *Biophysical journal* 98, 330-338.
- Martinez, A., Treston, A.M., 1996. Where does amidation take place? *Molecular and cellular endocrinology* 123, 113-117.
- Marx, N., Walcher, D., Raichle, C., Aleksic, M., Bach, H., Grub, M., Hombach, V., Libby, P., Zieske, A., Homma, S., Strong, J., 2004. C-peptide colocalizes with macrophages in early arteriosclerotic lesions of diabetic subjects and induces monocyte chemotaxis in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 540-545.
- Matsubara, E., Frangione, B., Ghiso, J., 1995. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *The Journal of biological chemistry* 270, 7563-7567.
- Matsuura, Y., Chernov, A.A., 2003. Morphology and the strength of intermolecular contacts in protein crystals. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 59, 1347-1356.
- Matukumalli, S.R., Tangirala, R., Rao, C.M., 2017. Clusterin: full-length protein and one of its chains show opposing effects on cellular lipid accumulation. *Scientific reports* 7, 41235.
- Maurer-Stroh, S., Debulpaep, M., Kuemmerer, N., Lopez de la Paz, M., Martins, I.C., Reumers, J., Morris, K.L., Copland, A., Serpell, L., Serrano, L., Schymkowitz, J.W., Rousseau, F., 2010. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nature methods* 7, 237-242.
- Mazor, Y., Gilead, S., Benhar, I., Gazit, E., 2002. Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide. *Journal of molecular biology* 322, 1013-1024.
- Merkler, D.J., 1994. C-terminal amidated peptides: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. *Enzyme and microbial technology* 16, 450-456.
- Min, C.Y., Qiao, Z.S., Feng, Y.M., 2004. Unfolding of human proinsulin. Intermediates and possible role of its C-peptide in folding/unfolding. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 1737-1747.
- Missmahl, H.P., Hartwig, M., 1953. [Optical polarization studies of amyloid substance]. *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin* 324, 489-508.
- Miyazato, M., Nakazato, M., Shiomi, K., Aburaya, J., Kangawa, K., Matsuo, H., Matsukura, S., 1992. Molecular forms of islet amyloid polypeptide (IAPP/amylin) in four mammals. *Diabetes research and clinical practice* 15, 31-36.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Miyazono, M., Kitamoto, T., Iwaki, T., Tateishi, J., 1992. Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta neuropathologica* 83, 333-339.
- Molinete, M., Irminger, J.C., Tooze, S.A., Halban, P.A., 2000. Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell. *Seminars in cell & developmental biology* 11, 243-251.
- Morales, R., Moreno-Gonzalez, I., Soto, C., 2013. Cross-seeding of misfolded proteins: implications for etiology and pathogenesis of protein misfolding diseases. *PLoS pathogens* 9, e1003537.
- Morales, R., Estrada, L.D., Diaz-Espinoza, R., Morales-Scheihing, D., Jara, M.C., Castilla, J., Soto, C., 2010. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 4528-4535.
- Morgan, G.J., Giannini, S., Hounslow, A.M., Craven, C.J., Zerovnik, E., Turk, V., Waltho, J.P., Staniforth, R.A., 2008. Exclusion of the native alpha-helix from the amyloid fibrils of a mixed alpha/beta protein. *Journal of molecular biology* 375, 487-498.
- Morrissey, C., Lakins, J., Moquin, A., Hussain, M., Tenniswood, M., 2001. An antigen capture assay for the measurement of serum clusterin concentrations. *Journal of biochemical and biophysical methods* 48, 13-21.
- Muff, R., Born, W., Fischer, J.A., 1995. Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *European journal of endocrinology* 133, 17-20.
- Muller, L., Lindberg, I., 1999. The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 63, 69-108.
- Munte, C.E., Vilela, L., Kalbitzer, H.R., Garratt, R.C., 2005. Solution structure of human proinsulin C-peptide. *The FEBS journal* 272, 4284-4293.
- Naiki, H., Gejyo, F., Nakakuki, K., 1997. Concentration-dependent inhibitory effects of apolipoprotein E on Alzheimer's beta-amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 36, 6243-6250.
- Nanga, R.P., Brender, J.R., Vivekanandan, S., Ramamoorthy, A., 2011. Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment. *Biochimica et biophysica acta* 1808, 2337-2342.
- Nelson, R., Eisenberg, D., 2006a. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Current opinion in structural biology* 16, 260-265.
- Nelson, R., Eisenberg, D., 2006b. Structural models of amyloid-like fibrils. *Adv Protein Chem* 73, 235-282.
- Nelson, R., Eisenberg, D., 2006c. Structural models of amyloid-like fibrils. *Advances in protein chemistry* 73, 235-282.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riek, C., Grothe, R., Eisenberg, D., 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778.
- Nerelius, C., Alvelius, G., Jornvall, H., 2010. N-terminal segment of proinsulin C-peptide active in insulin interaction/desaggregation. *Biochemical and biophysical research communications* 403, 462-467.
- Nettleton, E.J., Tito, P., Sunde, M., Bouchard, M., Dobson, C.M., Robinson, C.V., 2000. Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry. *Biophysical journal* 79, 1053-1065.
- Nilsson, M.R., 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34, 151-160.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Nishi, M., Chan, S.J., Nagamatsu, S., Bell, G.I., Steiner, D.F., 1989. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5738-5742.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology* 302, 205-217.
- O'Donnell, C.W., Waldispuhl, J., Lis, M., Halfmann, R., Devadas, S., Lindquist, S., Berger, B., 2011. A method for probing the mutational landscape of amyloid structure. *Bioinformatics* 27, i34-42.
- Olafsson, I., Grubb, A., 2000. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 7, 70-79.
- Orlikowska, M., Jankowska, E., Kolodziejczyk, R., Jaskolski, M., Szymanska, A., 2011a. Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C. *Journal of structural biology* 173, 406-413.
- Orlikowska, M., Jankowska, E., Borek, D., Otwinowski, Z., Skowron, P., Szymanska, A., 2011b. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Val57 mutants of the amyloidogenic protein human cystatin C. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 67, 1608-1611.
- Palsdottir, A., Snorradottir, A.O., Thorsteinsson, L., 2006. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects. *Brain pathology* 16, 55-59.
- Patil, S.M., Xu, S., Sheftic, S.R., Alexandrescu, A.T., 2009. Dynamic alpha-helix structure of micelle-bound human amylin. *The Journal of biological chemistry* 284, 11982-11991.
- Paulsson, J.F., Andersson, A., Westermark, P., Westermark, G.T., 2006. Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia* 49, 1237-1246.
- Pavlopoulos, G.A., Hooper, S.D., Sifrim, A., Schneider, R., Aerts, J., 2011a. Medusa: A tool for exploring and clustering biological networks. *BMC research notes* 4, 384.
- Pavlopoulos, G.A., Secrier, M., Moschopoulos, C.N., Soldatos, T.G., Kossida, S., Aerts, J., Schneider, R., Bagos, P.G., 2011b. Using graph theory to analyze biological networks. *BioData mining* 4, 10.
- Pawlicki, S., Le Behec, A., Delamarche, C., 2008. AMYPdb: a database dedicated to amyloid precursor proteins. *BMC bioinformatics* 9, 273.
- Pedersen, J.S., Christensen, G., Otzen, D.E., 2004. Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *Journal of molecular biology* 341, 575-588.
- Pepys, M.B., 2006. Amyloidosis. *Annual review of medicine* 57, 223-241.
- Peterson, S.A., Klabunde, T., Lashuel, H.A., Purkey, H., Sacchettini, J.C., Kelly, J.W., 1998. Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12956-12960.
- Petta, I., Lievens, S., Libert, C., Tavernier, J., De Bosscher, K., 2016. Modulation of Protein-Protein Interactions for the Development of Novel Therapeutics. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24, 707-718.
- Polonsky, K.S., Given, B.D., Van Cauter, E., 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *The Journal of clinical investigation* 81, 442-448.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Polonsky, K.S., Licinio-Paixao, J., Given, B.D., Pugh, W., Rue, P., Galloway, J., Karrison, T., Frank, B., 1986. Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. *The Journal of clinical investigation* 77, 98-105.
- Poon, S., Rybchyn, M.S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Pankhurst, G.J., Wilson, M.R., 2002. Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *The Journal of biological chemistry* 277, 39532-39540.
- Poyner, D.R., Tomlinson, A.E., Gosling, M., Tough, I.R., Cox, H.M., 1993. Stimulation of chloride secretion and adenylate cyclase secretion in human colonic derived cell lines by calcitonin gene-related peptide. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 434S.
- Qiao, Z.S., Min, C.Y., Hua, Q.X., Weiss, M.A., Feng, Y.M., 2003. In vitro refolding of human proinsulin. Kinetic intermediates, putative disulfide-forming pathway folding initiation site, and potential role of C-peptide in folding process. *The Journal of biological chemistry* 278, 17800-17809.
- Randers, E., Erlandsen, E.J., 1999. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function--a review. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 37, 389-395.
- Rao, V.S., Srinivas, K., Sujini, G.N., Kumar, G.N., 2014. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *International journal of proteomics* 2014, 147648.
- Rasanen, O., Jarvinen, M., Rinne, A., 1978. Localization of the human SH-protease inhibitor in the epidermis. Immunofluorescent studies. *Acta histochemica* 63, 193-196.
- Ratner, R.E., Dickey, R., Fineman, M., Maggs, D.G., Shen, L., Strobel, S.A., Weyer, C., Kolterman, O.G., 2004. Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 21, 1204-1212.
- Rauscher, S., Baud, S., Miao, M., Keeley, F.W., Pomes, R., 2006. Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils. *Structure* 14, 1667-1676.
- Ravasz, E., Somera, A.L., Mongru, D.A., Oltvai, Z.N., Barabasi, A.L., 2002. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science* 297, 1551-1555.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1990. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of molecular evolution* 30, 60-71.
- Renko, M., Pozgan, U., Majera, D., Turk, D., 2010. Stefin A displaces the occluding loop of cathepsin B only by as much as required to bind to the active site cleft. *The FEBS journal* 277, 4338-4345.
- Revesz, T., Holton, J.L., Lashley, T., Plant, G., Frangione, B., Rostagno, A., Ghiso, J., 2009. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta neuropathologica* 118, 115-130.
- Rhodes, C.J., Alarcon, C., 1994. What beta-cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM? Some clues from recent advances made in understanding the proinsulin-processing mechanism. *Diabetes* 43, 511-517.
- Rhodes, D.R., Chinnaiyan, A.M., 2005. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nature genetics* 37 Suppl, S31-37.
- Rigler, R., Pramanik, A., Jonasson, P., Kratz, G., Jansson, O.T., Nygren, P., Stahl, S., Ekberg, K., Johansson, B., Uhlen, S., Uhlen, M., Jornvall, H., Wahren, J., 1999. Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13318-13323.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Rinne, A., Jarvinen, M., Rasanen, O., 1978. A protein reminiscent of the epidermal SH-protease inhibitor occurs in squamous epithelia of man and rat. *Acta histochemica* 63, 183-192.
- Ritter, C., Maddelein, M.L., Siemer, A.B., Luhrs, T., Ernst, M., Meier, B.H., Saupe, S.J., Riek, R., 2005. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* 435, 844-848.
- Rochet, J.C., Lansbury, P.T., Jr., 2000. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current opinion in structural biology* 10, 60-68.
- Rohne, P., Prochnow, H., Wolf, S., Renner, B., Koch-Brandt, C., 2014. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34, 1626-1639.
- Romhanyi, G., 1971. Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with congo red. *Virchows Archiv. A: Pathology. Pathologische Anatomie* 354, 209-222.
- Rose, P.W., Prlic, A., Altunkaya, A., Bi, C., Bradley, A.R., Christie, C.H., Costanzo, L.D., Duarte, J.M., Dutta, S., Feng, Z., Green, R.K., Goodsell, D.S., Hudson, B., Kalro, T., Lowe, R., Peisach, E., Randle, C., Rose, A.S., Shao, C., Tao, Y.P., Valasatava, Y., Voigt, M., Westbrook, J.D., Woo, J., Yang, H., Young, J.Y., Zardecki, C., Berman, H.M., Burley, S.K., 2017. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic acids research* 45, D271-D281.
- Rosenberg, M.E., Silkensen, J., 1995. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *The international journal of biochemistry & cell biology* 27, 633-645.
- Rostagno, A., Holton, J.L., Lashley, T., Revesz, T., Ghiso, J., 2010. Cerebral amyloidosis: amyloid subunits, mutants and phenotypes. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 581-600.
- Rowczenio, D.M., Noor, I., Gillmore, J.D., Lachmann, H.J., Whelan, C., Hawkins, P.N., Obici, L., Westermark, P., Grateau, G., Wechalekar, A.D., 2014. Online registry for mutations in hereditary amyloidosis including nomenclature recommendations. *Human mutation* 35, E2403-2412.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P., Vidal, M., 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437, 1173-1178.
- Rubenstein, A.H., Melani, F., Pilkis, S., Steiner, D.F., 1969. Proinsulin. Secretion, metabolism, immunological and biological properties. *Postgraduate medical journal* 45, Suppl:476-481.
- Ruberg, F.L., Berk, J.L., 2012. Transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *Circulation* 126, 1286-1300.
- Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Ripellino, J.A., Li, Y., Schmidt, S.D., Mathews, P.M., Fryer, J.D., Holtzman, D.M., Sigurdsson, E.M., Wisniewski, T., 2004. A synthetic peptide blocking the apolipoprotein E/beta-amyloid binding mitigates beta-amyloid toxicity and fibril formation in vitro and reduces beta-amyloid plaques in transgenic mice. *The American journal of pathology* 165, 937-948.
- Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M.R., Gingery, M., Eisenberg, D., 2005. Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* 437, 266-269.
- Sanchez de Groot, N., Pallares, I., Aviles, F.X., Vendrell, J., Ventura, S., 2005. Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC structural biology* 5, 18.
- Sanchorawala, V., 2006. Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 1, 1331-1341.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Sarell, C.J., Stockley, P.G., Radford, S.E., 2013a. Assessing the causes and consequences of co-polymerization in amyloid formation. *Prion* 7, 359-368.
- Sarell, C.J., Woods, L.A., Su, Y., Debelouchina, G.T., Ashcroft, A.E., Griffin, R.G., Stockley, P.G., Radford, S.E., 2013b. Expanding the repertoire of amyloid polymorphs by co-polymerization of related protein precursors. *The Journal of biological chemistry* 288, 7327-7337.
- Sastre, M., Calero, M., Pawlik, M., Mathews, P.M., Kumar, A., Danilov, V., Schmidt, S.D., Nixon, R.A., Frangione, B., Levy, E., 2004. Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiology of aging* 25, 1033-1043.
- Savitsky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Analytical Chemistry* 36, 1627-1639.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J., McFarlane, H.T., Madsen, A.O., Riek, C., Eisenberg, D., 2007. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453-457.
- Schwikowski, B., Uetz, P., Fields, S., 2000. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nature biotechnology* 18, 1257-1261.
- Scrocchi, L.A., Ha, K., Chen, Y., Wu, L., Wang, F., Fraser, P.E., 2003. Identification of minimal peptide sequences in the (8-20) domain of human islet amyloid polypeptide involved in fibrillogenesis. *Journal of structural biology* 141, 218-227.
- Scrocchi, L.A., Chen, Y., Waschuk, S., Wang, F., Cheung, S., Darabie, A.A., McLaurin, J., Fraser, P.E., 2002. Design of peptide-based inhibitors of human islet amyloid polypeptide fibrillogenesis. *Journal of molecular biology* 318, 697-706.
- Seidah, N.G., Chretien, M., 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain research* 848, 45-62.
- Seino, S., Bell, I.G., 2008. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* Springer, Japan.
- Selkoe, D.J., 2003. Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426, 900-904.
- Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F., Lindquist, S.L., 2000. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289, 1317-1321.
- Serpell, L.C., 2000. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1502, 16-30.
- Serpell, L.C., Sunde, M., Fraser, P.E., Luther, P.K., Morris, E.P., Sangren, O., Lundgren, E., Blake, C.C., 1995. Examination of the structure of the transthyretin amyloid fibril by image reconstruction from electron micrographs. *Journal of molecular biology* 254, 113-118.
- Shafiqat, J., Melles, E., Sigmundsson, K., Johansson, B.L., Ekberg, K., Alvelius, G., Henriksson, M., Johansson, J., Wahren, J., Jornvall, H., 2006. Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1805-1811.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13, 2498-2504.
- Sherman, M.Y., Goldberg, A.L., 2001. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Shim, S.H., Gupta, R., Ling, Y.L., Strasfeld, D.B., Raleigh, D.P., Zanni, M.T., 2009. Two-dimensional IR spectroscopy and isotope labeling defines the pathway of amyloid formation with residue-specific resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6614-6619.
- Shirahama, T., Cohen, A.S., 1965. Structure of amyloid fibrils after negative staining and high-resolution electron microscopy. *Nature* 206, 737-738.
- Shirahama, T., Cohen, A.S., 1967. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *The Journal of cell biology* 33, 679-708.
- Shobana, R., Pandaranayaka, E.P., 2014. ProADD: A database on Protein Aggregation Diseases. *Bioinformatics* 10, 390-392.
- Shtukenberg, A.G., Punin, Y.O., Gunn, E., Kahr, B., 2012. Spherulites. *Chem. Rev.* 112, 1805-1838.
- Siepen, J.A., Westhead, D.R., 2002. The fibril_one on-line database: mutations, experimental conditions, and trends associated with amyloid fibril formation. *Protein science : a publication of the Protein Society* 11, 1862-1866.
- Sigrist, C.J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A., Bucher, P., 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in bioinformatics* 3, 265-274.
- Silva, J.V., Yoon, S., Domingues, S., Guimaraes, S., Goltsev, A.V., da Cruz, E.S.E.F., Mendes, J.F., da Cruz, E.S.O.A., Fardilha, M., 2015. Amyloid precursor protein interaction network in human testis: sentinel proteins for male reproduction. *BMC bioinformatics* 16, 12.
- Sipe, J.D., 1992. Amyloidosis. *Annual review of biochemistry* 61, 947-975.
- Sipe, J.D., Cohen, A.S., 2000. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology* 130, 88-98.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., 2010. Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 17, 101-104.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 21, 221-224.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S.I., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., 2016. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 23, 209-213.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., Nomenclature Committee of the International Society of, A., 2012. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 19, 167-170.
- Smaoui, M.R., Orland, H., Waldispuhl, J., 2015. Probing the binding affinity of amyloids to reduce toxicity of oligomers in diabetes. *Bioinformatics* 31, 2294-2302.
- Smaoui, M.R., Poitevin, F., Delarue, M., Koehl, P., Orland, H., Waldispuhl, J., 2013. Computational assembly of polymorphic amyloid fibrils reveals stable aggregates. *Biophysical journal* 104, 683-693.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Snow, A.D., Wight, T.N., 1989. Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiology of aging* 10, 481-497.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M., Frangione, B., 1998. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nature medicine* 4, 822-826.
- Spodzieja, M., Rafalik, M., Szymanska, A., Kolodziejczyk, A.S., Czaplowska, P., 2013. Interaction of serum amyloid A with human cystatin C--assessment of amino acid residues crucial for hCC-SAA formation (part II). *Journal of molecular recognition : JMR* 26, 415-425.
- Spodzieja, M., Szymanska, A., Kolodziejczyk, A., Pradzinska, M., Maszota, M., Stefanowicz, P., Szewczuk, Z., Grubb, A., Czaplowska, P., 2012. Interaction of serum amyloid A with human cystatin C--identification of binding sites. *Journal of molecular recognition : JMR* 25, 513-524.
- Staniforth, R.A., Giannini, S., Higgins, L.D., Conroy, M.J., Hounslow, A.M., Jerala, R., Craven, C.J., Waltho, J.P., 2001. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *The EMBO journal* 20, 4774-4781.
- Stark, C., Breitkreutz, B.J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., Tyers, M., 2006. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic acids research* 34, D535-539.
- Steiner, D.F., 1969. Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *The New England journal of medicine* 280, 1106-1113.
- Steiner, D.F., 2004. The proinsulin C-peptide--a multirole model. *Experimental diabetes research* 5, 7-14.
- Steiner, D.F., Oyer, P.E., 1967. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57, 473-480.
- Steiner, D.F., Philipson, L.H., 2000. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*, in: L. J. De Groot, et al., Eds.), Endotext, South Dartmouth (MA).
- Steiner, D.F., Bell, G.I., Rubenstein, A.H., Chan, S.J., 2001. 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksoz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H., Wanker, E.E., 2005. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122, 957-968.
- Suk, J.E., Lokappa, S.B., Ulmer, T.S., 2010. The clustering and spatial arrangement of beta-sheet sequence, but not order, govern alpha-synuclein fibrillogenesis. *Biochemistry* 49, 1533-1540.
- Sun, N., Funke, S.A., Willbold, D., 2012. A survey of peptides with effective therapeutic potential in Alzheimer's disease rodent models or in human clinical studies. *Mini reviews in medicinal chemistry* 12, 388-398.
- Sunde, M., Blake, C., 1997. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advances in protein chemistry* 50, 123-159.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., Chapman, D., 1993. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394.
- Szymanska, A., Radulska, A., Czaplowska, P., Grubb, A., Grzonka, Z., Rodziewicz-Motowidlo, S., 2009. Governing the monomer-dimer ratio of human cystatin c by single amino acid substitution in the hinge region. *Acta biochimica Polonica* 56, 455-463.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Tabatabaei Ghomi, H., Topp, E.M., Lill, M.A., 2016. Fibpredictor: a computational method for rapid prediction of amyloid fibril structures. *Journal of molecular modeling* 22, 206.
- Taboada, P., Barbosa, S., Castro, E., Mosquera, V., 2006. Amyloid fibril formation and other aggregate species formed by human serum albumin association. *J Phys Chem B* 110, 20733-20736.
- Tanaka, M., Collins, S.R., Toyama, B.H., Weissman, J.S., 2006. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442, 585-589.
- Tartaglia, G.G., Vendruscolo, M., 2008. The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chemical Society reviews* 37, 1395-1401.
- Tartaglia, G.G., Cavalli, A., Pellarin, R., Caflisch, A., 2005. Prediction of aggregation rate and aggregation-prone segments in polypeptide sequences. *Protein Sci* 14, 2723-2734.
- Teng, P.K., Eisenberg, D., 2009. Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 22, 531-536.
- Teng, P.K., Anderson, N.J., Goldschmidt, L., Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Eisenberg, D., 2012. Ribonuclease A suggests how proteins self-chaperone against amyloid fiber formation. *Protein Sci* 21, 26-37.
- Tenidis, K., Waldner, M., Bernhagen, J., Fischle, W., Bergmann, M., Weber, M., Merkle, M.L., Voelter, W., Brunner, H., Kapurniotu, A., 2000. Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *Journal of molecular biology* 295, 1055-1071.
- Tenniswood, M.P., Guenette, R.S., Lakins, J., Mooibroek, M., Wong, P., Welsh, J.E., 1992. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer metastasis reviews* 11, 197-220.
- Terry, R.D., Gonatas, N.K., Weiss, M., 1964. Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *The American journal of pathology* 44, 269-297.
- Thangakani, A.M., Kumar, S., Nagarajan, R., Velmurugan, D., Gromiha, M.M., 2014. GAP: towards almost 100 percent prediction for beta-strand-mediated aggregating peptides with distinct morphologies. *Bioinformatics* 30, 1983-1990.
- Thangakani, A.M., Nagarajan, R., Kumar, S., Sakthivel, R., Velmurugan, D., Gromiha, M.M., 2016. CPAD, Curated Protein Aggregation Database: A Repository of Manually Curated Experimental Data on Protein and Peptide Aggregation. *PloS one* 11, e0152949.
- Thirumalai, D., Klimov, D.K., Dima, R.I., 2003. Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Current opinion in structural biology* 13, 146-159.
- Thirumalai, D., Reddy, G., Straub, J.E., 2012. Role of water in protein aggregation and amyloid polymorphism. *Accounts of chemical research* 45, 83-92.
- Thompson, M.J., Sievers, S.A., Karanicolas, J., Ivanova, M.I., Baker, D., Eisenberg, D., 2006. The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4074-4078.
- Tian, J., Wu, N., Guo, J., Fan, Y., 2009. Prediction of amyloid fibril-forming segments based on a support vector machine. *BMC bioinformatics* 10 Suppl 1, S45.
- Tian, X., Maftai, M., Kohlmann, M., Allinquant, B., Przybylski, M., 2007. Differential epitope identification of antibodies against intracellular domains of alzheimer's amyloid precursor protein using high resolution affinity-mass spectrometry. *Sub-cellular biochemistry* 43, 339-354.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., Nordstedt, C., 1996. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *The Journal of biological chemistry* 271, 8545-8548.
- Tomidokoro, Y., Lashley, T., Rostagno, A., Neubert, T.A., Bojsen-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Holton, J., Frangione, B., Revesz, T., Ghiso, J., 2005. Familial Danish dementia: co-existence of Danish and Alzheimer amyloid subunits (ADan AND A{beta}) in the absence of compact plaques. *The Journal of biological chemistry* 280, 36883-36894.
- Tourette, C., Li, B., Bell, R., O'Hare, S., Kaltenbach, L.S., Mooney, S.D., Hughes, R.E., 2014. A large scale Huntingtin protein interaction network implicates Rho GTPase signaling pathways in Huntington disease. *The Journal of biological chemistry* 289, 6709-6726.
- Tran, L., Ha-Duong, T., 2016. Effect of Post-Translational Amidation on Islet Amyloid Polypeptide Conformational Ensemble: Implications for Its Aggregation Early Steps. *International journal of molecular sciences* 17.
- Trougakos, I.P., Gonos, E.S., 2002. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 1430-1448.
- Trougakos, I.P., Gonos, E.S., 2009. Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *Advances in cancer research* 104, 171-210.
- Trovato, A., Seno, F., Tosatto, S.C., 2007. The PASTA server for protein aggregation prediction. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 20, 521-523.
- Tsigelny, I.F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G.M., Sharikov, Y., Mizuno, H., Spencer, B., Rockenstein, E., Trejo, M., Platoshyn, O., Yuan, J.X., Masliah, E., 2008. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PloS one* 3, e3135.
- Tsiolaki, P.L., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2015a. The pentapeptide LQVVR plays a pivotal role in human cystatin C fibrillization. *FEBS letters* 589, 159-164.
- Tsiolaki, P.L., Louros, N.N., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2015b. Exploring the 'aggregation-prone' core of human Cystatin C: A structural study. *Journal of structural biology* 191, 272-280.
- Tsiolaki, P.L., Nastou, K.C., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2017a. Mining databases for protein aggregation: a review. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 24, 143-152.
- Tsiolaki, P.L., Nastou, K.C., Louros, N.N., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2017b. Exploring Amyloidogenicity of Clusterin: A Structural and Bioinformatics Analysis. *Advances in experimental medicine and biology* 989, 93-107.
- Tsiolaki, P.L., Louros, N.N., Zompra, A.A., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2017c. Unraveling the aggregation propensity of human insulin C-peptide. *Biopolymers* 108.
- Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2013. A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PloS one* 8, e54175.
- Turk, V., Bode, W., 1991. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS letters* 285, 213-219.
- Tycko, B., Feng, L., Nguyen, L., Francis, A., Hays, A., Chung, W.Y., Tang, M.X., Stern, Y., Sahota, A., Hendrie, H., Mayeux, R., 1996. Polymorphisms in the human apolipoprotein-J/clusterin gene: ethnic variation and distribution in Alzheimer's disease. *Human genetics* 98, 430-436.
- Tycko, R., 2014. Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Sci* 23, 1528-1539.
- Tycko, R., 2015. Amyloid polymorphism: structural basis and neurobiological relevance. *Neuron* 86, 632-645.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Ulbrich, L., Cozzolino, M., Marini, E.S., Amori, I., De Jaco, A., Carri, M.T., Augusti-Tocco, G., 2014. Cystatin B and SOD1: protein-protein interaction and possible relation to neurodegeneration. *Cellular and molecular neurobiology* 34, 205-213.
- UniProt, C., 2014. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research* 42, D191-198.
- UniProt, C., 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research* 43, D204-212.
- Unnerstale, S., Maler, L., 2012. pH-Dependent Interaction between C-Peptide and Phospholipid Bicelles. *Journal of biophysics* 2012, 185907.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., Berendsen, H.J., 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26, 1701-1718.
- Vega, L., Arroyo, A.A., Taberner, A., Medina, J.M., 2009. Albumin-blunted deleterious effect of amyloid-beta by preventing the internalization of the peptide into neurons. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 17, 795-805.
- Velayudhan, L., Killick, R., Hye, A., Kinsey, A., Guntert, A., Lynham, S., Ward, M., Leung, R., Lourdasamy, A., To, A.W., Powell, J., Lovestone, S., 2012. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 28, 369-375.
- Ventura, S., Zurdo, J., Narayanan, S., Parreno, M., Mangues, R., Reif, B., Chiti, F., Giannoni, E., Dobson, C.M., Aviles, F.X., Serrano, L., 2004. Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7258-7263.
- Verchere, C.B., D'Alessio, D.A., Palmiter, R.D., Weir, G.C., Bonner-Weir, S., Baskin, D.G., Kahn, S.E., 1996. Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3492-3496.
- Verma, M., Vats, A., Taneja, V., 2015. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Annals of Indian Academy of Neurology* 18, 138-145.
- Vidal, M., 2005. Interactome modeling. *FEBS letters* 579, 1834-1838.
- Vinayagam, A., Zirin, J., Roesel, C., Hu, Y., Yilmazel, B., Samsonova, A.A., Neumuller, R.A., Mohr, S.E., Perrimon, N., 2014. Integrating protein-protein interaction networks with phenotypes reveals signs of interactions. *Nature methods* 11, 94-99.
- Virok, D.P., Simon, D., Bozso, Z., Rajko, R., Datki, Z., Balint, E., Szegedi, V., Janaky, T., Penke, B., Fulop, L., 2011. Protein array based interactome analysis of amyloid-beta indicates an inhibition of protein translation. *Journal of proteome research* 10, 1538-1547.
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., Snel, B., 2003. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic acids research* 31, 258-261.
- Wahlbom, M., Wang, X., Lindstrom, V., Carlemalm, E., Jaskolski, M., Grubb, A., 2007. Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping. *The Journal of biological chemistry* 282, 18318-18326.
- Wahren, J., Larsson, C., 2015. C-peptide: new findings and therapeutic possibilities. *Diabetes research and clinical practice* 107, 309-319.
- Wahren, J., Ekberg, K., Jornvall, H., 2007. C-peptide is a bioactive peptide. *Diabetologia* 50, 503-509.
- Wahren, J., Ekberg, K., Shafqat, J., Johansson, J., Johansson, B.L., Jörnvall, H., 2004. *Biological effects of C-peptide and proinsulin*. 3 ed. Wiley, Chichester.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Walsh, I., Seno, F., Tosatto, S.C., Trovato, A., 2014. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic acids research* 42, W301-307.
- Waterhous, D.V., Johnson, W.C., Jr., 1994. Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochemistry* 33, 2121-2128.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- Weiss, M.A., Frank, B.H., Khait, I., Pekar, A., Heiney, R., Shoelson, S.E., Neuringer, L.J., 1990. NMR and photo-CIDNP studies of human proinsulin and prohormone processing intermediates with application to endopeptidase recognition. *Biochemistry* 29, 8389-8401.
- Westermarck, G.T., Westermarck, P., 2008. Transthyretin and amyloid in the islets of Langerhans in type-2 diabetes. *Experimental diabetes research* 2008, 429274.
- Westermarck, G.T., Falkmer, S., Steiner, D.F., Chan, S.J., Engstrom, U., Westermarck, P., 2002. Islet amyloid polypeptide is expressed in the pancreatic islet parenchyma of the teleostean fish, *Myoxocephalus (cottus) scorpius*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 133, 119-125.
- Westermarck, P., Andersson, A., Westermarck, G.T., 2011. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews* 91, 795-826.
- Westermarck, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermarck, G.T., Betsholtz, C., 1990. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5036-5040.
- Westermarck, P., Li, Z.C., Westermarck, G.T., Leckstrom, A., Steiner, D.F., 1996. Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS letters* 379, 203-206.
- Westermarck, P., Eriksson, L., Engstrom, U., Enestrom, S., Sletten, K., 1997. Prolactin-derived amyloid in the aging pituitary gland. *The American journal of pathology* 150, 67-73.
- Westermarck, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C.L., Merlini, G., Saraiva, M.J., Sipe, J.D., Nomenclature Committee of the International Society of, A., 2005. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 12, 1-4.
- Wilhelmus, M.M., Boelens, W.C., Kox, M., Maat-Schieman, M.L., Veerhuis, R., de Waal, R.M., Verbeek, M.M., 2009. Small heat shock proteins associated with cerebral amyloid angiopathy of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type) induce interleukin-6 secretion. *Neurobiology of aging* 30, 229-240.
- Williamson, J.A., Miranker, A.D., 2007. Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Sci* 16, 110-117.
- Wiltzius, J.J., Sievers, S.A., Sawaya, M.R., Cascio, D., Popov, D., Riek, C., Eisenberg, D., 2008. Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci* 17, 1467-1474.
- Wolynes, P.G., Onuchic, J.N., Thirumalai, D., 1995. Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619-1620.
- Wood, E.H., 1994. MEDLINE: the options for health professionals. *Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA* 1, 372-380.
- Wozniak, P.P., Kotulska, M., 2015. AmyLoad: website dedicated to amyloidogenic protein fragments. *Bioinformatics* 31, 3395-3397.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Wright, C.F., Teichmann, S.A., Clarke, J., Dobson, C.M., 2005. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature* 438, 878-881.
- Wu, C., Shea, J.E., 2013. Structural similarities and differences between amyloidogenic and non-amyloidogenic islet amyloid polypeptide (IAPP) sequences and implications for the dual physiological and pathological activities of these peptides. *PLoS computational biology* 9, e1003211.
- Xiao Fan, W., Guanrong, C., 2003. Complex networks: small-world, scale-free and beyond. *IEEE Circuits and Systems Magazine* 3, 6-20.
- Xue, W.F., Hellewell, A.L., Hewitt, E.W., Radford, S.E., 2010. Fibril fragmentation in amyloid assembly and cytotoxicity: when size matters. *Prion* 4, 20-25.
- Yamada, M., 2000. Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 20, 8-22.
- Yan, J., Fu, X., Ge, F., Zhang, B., Yao, J., Zhang, H., Qian, J., Tomozawa, H., Naiki, H., Sawashita, J., Mori, M., Higuchi, K., 2007. Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils and protein A amyloid fibrils. *The American journal of pathology* 171, 172-180.
- Yang, J.O., Kim, W.Y., Jeong, S.Y., Oh, J.H., Jho, S., Bhak, J., Kim, N.S., 2009. PDbase: a database of Parkinson's disease-related genes and genetic variation using substantia nigra ESTs. *BMC genomics* 10 Suppl 3, S32.
- Yang, Y., Hua, Q.X., Liu, J., Shimizu, E.H., Choquette, M.H., Mackin, R.B., Weiss, M.A., 2010. Solution structure of proinsulin: connecting domain flexibility and prohormone processing. *The Journal of biological chemistry* 285, 7847-7851.
- Yerbury, J.J., Kumita, J.R., 2010. Protein chemistry of amyloid fibrils and chaperones: implications for amyloid formation and disease. *Current Chemical Biology* 4, 89-98.
- Yerbury, J.J., Poon, S., Meehan, S., Thompson, B., Kumita, J.R., Dobson, C.M., Wilson, M.R., 2007. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 2312-2322.
- Yoon, S., Welsh, W.J., 2004. Detecting hidden sequence propensity for amyloid fibril formation. *Protein Sci* 13, 2149-2160.
- Yosten, G.L., Kolar, G.R., Redlinger, L.J., Samson, W.K., 2013. Evidence for an interaction between proinsulin C-peptide and GPR146. *The Journal of endocrinology* 218, B1-8.
- Young, A., Pittner, R., Gedulin, B., Vine, W., Rink, T., 1995. Amylin regulation of carbohydrate metabolism. *Biochemical Society transactions* 23, 325-331.
- Young, L.M., Tu, L.H., Raleigh, D.P., Ashcroft, A.E., Radford, S.E., 2017. Understanding co-polymerization in amyloid formation by direct observation of mixed oligomers. *Chemical science* 8, 5030-5040.
- Zambrano, R., Conchillo-Sole, O., Iglesias, V., Illa, R., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Sabate, R., Daura, X., Ventura, S., 2015. PrionW: a server to identify proteins containing glutamine/asparagine rich prion-like domains and their amyloid cores. *Nucleic acids research* 43, W331-337.
- Zerovnik, E., 2009. The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *Bioessays* 31, 597-599.
- Zerovnik, E., Staniforth, R.A., Turk, D., 2010. Amyloid fibril formation by human stefins: Structure, mechanism & putative functions. *Biochimie* 92, 1597-1607.
- Zerovnik, E., Stoka, V., Mirtic, A., Guncar, G., Grdadolnik, J., Staniforth, R.A., Turk, D., Turk, V., 2011. Mechanisms of amyloid fibril formation--focus on domain-swapping. *The FEBS journal* 278, 2263-2282.

Κεφάλαιο V – Βιβλιογραφία

- Zerovnik, E., Zavasnik-Bergant, V., Kopitar-Jerala, N., Pompe-Novak, M., Skarabot, M., Goldie, K., Ravnikar, M., Musevic, I., Turk, V., 2002. Amyloid fibril formation by human stefin B in vitro: immunogold labelling and comparison to stefin A. *Biological chemistry* 383, 859-863.
- Zhong, L., Johnson, W.C., Jr., 1992. Environment affects amino acid preference for secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4462-4465.
- Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., Steiner, D.F., 1999. Proteolytic processing in the secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 20745-20748.
- Zhou, Y., Gu, G., Goodlett, D.R., Zhang, T., Pan, C., Montine, T.J., Montine, K.S., Aebersold, R.H., Zhang, J., 2004. Analysis of alpha-synuclein-associated proteins by quantitative proteomics. *The Journal of biological chemistry* 279, 39155-39164.
- Zibae, S., Makin, O.S., Goedert, M., Serpell, L.C., 2007. A simple algorithm locates beta-strands in the amyloid fibril core of alpha-synuclein, Abeta, and tau using the amino acid sequence alone. *Protein Sci* 16, 906-918.
- Zotenko, E., Mestre, J., O'Leary, D.P., Przytycka, T.M., 2008. Why do hubs in the yeast protein interaction network tend to be essential: reexamining the connection between the network topology and essentiality. *PLoS computational biology* 4, e1000140.
- Zuber, C., Fan, J.Y., Guhl, B., Roth, J., 2004. Misfolded proinsulin accumulates in expanded pre-Golgi intermediates and endoplasmic reticulum subdomains in pancreatic beta cells of Akita mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 917-919.

Κεφάλαιο VI

6. ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

6.1. Δημοσιεύσεις σε Επιστημονικά Περιοδικά με Σύστημα Κριτών

1. Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Tsiolaki, P.L., Chrysina, E.D., Baltatzis, G.E., Patsouris, E.S., Hamodrakas, S.J. (2014) “An N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) “aggregation-prone” segment involved in isolated atrial amyloidosis.” *FEBS Letters*, 558: 52-57.
2. Tsiolaki, P.L., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A. (2015) “The pentapeptide LQVVR plays a pivotal role in human cystatin C fibrillization.” *FEBS Letters*, 589: 159-164
3. Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Zompra, A.A., Pappa, E.V., Magafa, V., Pairas, G., Cordopatis, P., Cheimonidou, C., Trougagos, I.P., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J. (2015) “Structural studies and cytotoxicity assays of "aggregation-prone" IAPP8-16 and its non-amyloidogenic variants suggest its important role in fibrillogenesis and cytotoxicity of human amylin.” *Biopolymers*, 104: 196-205.
4. Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Griffin, M.D., Howlett, G.J., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A. (2015) “Chameleon 'aggregation-prone' segments of apoA-I: A model of amyloid

Κεφάλαιο VI – Λίστα Δημοσιεύσεων

- fibrils formed in apoA-I amyloidosis.”** *International Journal of Biological Macromolecules*, 79: 711-718.
5. Tsiolaki, P.L., Louros, N.N., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A. (2015) **“Exploring the 'aggregation-prone' core of human Cystatin C: A structural study.”** *Journal of Structural Biology*, 191(3): 272-280.
 6. Tsiolaki, P.L., Louros, N.N., Zompra, A.A., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A. (2016) **“Unravelling the aggregation propensity of the insulin C-peptide.”** *Biopolymers (Peptide Science)*, 102: e22882.
 7. Louros, N.N., Bolas G.M.P, Tsiolaki, P.L., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A. (2016) **“Curli Fiber Formation Is Initiated by the Intrinsic Aggregation Propensity of the CsgB Nucleator Protein.”** *Journal of Structural Biology*, 195(2): 179-189.
 8. Biza, K.V.*, Nastou, K.C.*, Tsiolaki, P.L.*², Mastrokalou, C.V., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A. (2017) **“The amyloid interactome: Exploring protein aggregation.”** *PLoS ONE*, 12(3): e0173163.
 9. Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Baltoumas, F.A., Chryssikos, G.D., Gionis, V., Hamodrakas, S.J. & Iconomidou, V.A. (2017) **“Tracking the amyloidogenic core of IAPP amyloid fibrils: Insights from micro-Raman spectroscopy.”** *Journal of Structural Biology*, 199(2):140-152.
 10. Tsiolaki P.L., Nastou K.C., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. (2017) **“Mining databases for protein aggregation: a review.”** *Amyloid*, 24(3):143-152.
 11. Tsiolaki P.L., Nasi G.I., Baltoumas F.A., Louros N.N., Magafa V., Hamodrakas S.J. & Iconomidou V.A. **“ α CGRP, another amyloidogenic member of the CGRP family”** *Journal of Structural Biology* (in press)

² * Equally contributing first author

Κεφάλαιο VI – Λίστα Δημοσιεύσεων

6.2. Κεφάλαια σε Βιβλία

12. Tsiolaki, P.L., Nastou K.C., Louros N.N., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. (2017) “Exploring amyloidogenicity of Clusterin: a structural and bioinformatics analysis.” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 989:93-107.

6.3. Εξώφυλλα σε Επιστημονικά Περιοδικά με Σύστημα Κριτών

“ A suggested model of stacked octamers for human Cystatin C fibrillization implicates two important “aggregation-prone” hotspots, CysC1 (⁴⁷LQVVR⁵¹, red) and CysC2 (⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵, blue). ”

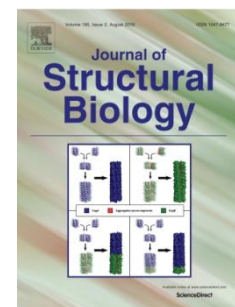


Journal of Structural Biology, Τόμος 191, Τεύχος 3



Journal of Structural Biology, Τόμος 192, Τεύχος 1

“ Proposed aggregation pathways of CsgA (blue) and CsgB (green), the major and minor protein components involved in curli amyloid assembly. Louros et al. find that increased aggregation potency drives CsgB into nucleation, with several aggregation-prone segments (red) contributing as vital parts of the amyloid core and suggest that both subunits are incorporated into amyloid fibrils through progressively stacked dimers. ”



Journal of Structural Biology, Τόμος 195, Τεύχος 2




“ A glimpse into the three-dimensional structure of human islet amyloid polypeptide (IAPP) amyloid fibrils. Louros et al. expose IAPP amyloid fibers to a micro-Raman laser line in distinct orientations and assess the structural moieties that contribute as vital parts of the amyloid fibril core. ”



Journal of Structural Biology, Τόμος 199, Τεύχος 2

*Δημοσιεύσεις της
συγγραφέως*

Mining databases for protein aggregation: a review

Paraskevi L. Tsiolaki* , Katerina C. Nastou* , Stavros J. Hamodrakas  and Vassiliki A. Iconomidou 

Section of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

ABSTRACT

Protein aggregation is an active area of research in recent decades, since it is the most common and troubling indication of protein instability. Understanding the mechanisms governing protein aggregation and amyloidogenesis is a key component to the aetiology and pathogenesis of many devastating disorders, including Alzheimer's disease or type 2 diabetes. Protein aggregation data are currently found "scattered" in an increasing number of repositories, since advances in computational biology greatly influence this field of research. This review exploits the various resources of aggregation data and attempts to distinguish and analyze the biological knowledge they contain, by introducing protein-based, fragment-based and disease-based repositories, related to aggregation. In order to gain a broad overview of the available repositories, a novel comprehensive network maps and visualizes the current association between aggregation databases and other important databases and/or tools and discusses the beneficial role of community annotation. The need for unification of aggregation databases in a common platform is also addressed.

Abbreviations: AD: Alzheimer's disease; AL: amyloidosis light chain amyloidosis; FTD: frontotemporal dementias; PD: Parkinson's disease

ARTICLE HISTORY

Received 2 February 2017
Revised 6 July 2017
Accepted 7 July 2017

KEYWORDS

Protein aggregation;
amyloid; amyloidosis;
amyloidogenesis; database

Introduction

From finding novel anti-amyloid drugs, to engineering solid biomaterials or designing successful biopharmaceutical products, a broad spectrum of questions remain to be answered, regarding the principles governing protein aggregation or amyloidogenicity [1–5]. The abnormal deposition of protein aggregates results in the disruption of the normal function of various tissues and organs and causes the onset and progression of a wide spectrum of diseases [6–8]. While the causal role of aggregation in disorders has not been established [9], the widespread phenomenon of protein aggregation interferes even with biotechnological routines [10]. Importantly, the same disease-related proteins (or peptides) may assemble to form amyloid fibrils *in vitro* [11] or during their physiological roles [12–14].

Protein aggregation indicates the biological processes by which stable complexes stem from an abnormal protein assembly. Under destabilizing conditions, proteins, unable to gain their proper native three-dimensional structure, are led to the formation of insoluble misfolded protein aggregates [15]. Aggregates are recorded as either "amorphous" or "ordered amyloid aggregates". Namely, amyloid fibrils refer to highly ordered protein aggregates characterized by typical cross- β diffraction patterns [16,17], unique morphologies [18] and specific tinctorial properties [19]. Their remarkable stability is the result of a rigid core structure, enhanced by cooperative hydrogen bonding [20].

The genesis of highly ordered amyloid aggregates is reported as amyloidogenesis or amyloidogenicity, while the underlying mechanisms of misfolding have long been studied with experimental [21], computational [22] and theoretical methods [23]. A wealth of detailed information about the structural conversion from a soluble protein into elongated β -sheet protein aggregates introduced different theories of protein fibrillation [24,25]. Putative models propose destabilization and unfolding of the native structure, triggering a cascade of time-dependent events where protected "aggregation-prone" regions become exposed and nucleate the aggregation process [26–28]. Other experimental kinetic studies revealed a mechanism analogous with the process of crystal growth, since intermediate species gradually polymerize to form oligomers, substructures such as filaments or protofibrils and subsequent mature amyloid fibrils [29].

Currently, a vast amount of information about protein aggregation and amyloidogenicity is deposited in separate online collections, but has not received yet a lot of attention in the field of protein aggregation research. Complete and up-to-date databases are essential for the biological and medicinal research [30,31]. In abstracted terms, biological databases embody repositories of organized biological knowledge, which are invaluable for the researchers, who attempt to quickly find the appropriate resources for resolving their research questions. The availability of specialized resources has changed the way biologists study the phenomenon of

protein misfolding, by broadening the focus from a single protein assay to the systematic analysis of aggregation.

In this review, we outline the repositories that are relevant with this field of research, by mining all freely and publicly available datasets and databases of amyloidogenic proteins, "aggregation-prone" peptides, aggregation disorders and amyloidoses. We also elucidate the interconnections between separate databases, by creating a network, defined by our own classification scheme, and discuss the challenges for developing a new and unified database of protein aggregation.

Protein aggregation databases

The scattered knowledge of protein aggregation data designates the outstanding need for introducing protein aggregation databases to the research community.

The need for protein aggregation databases

The phenomenon of protein aggregation and the subsequent formation of highly ordered aggregates attracted considerable attention and became an area of intense research [32]. Computational work over the past 15 years or so, assisted in the development of various tools, in an effort to predict and analyze the aggregation profile of proteins [33–35]. Since *in silico* methods were at the time based on selected data from random molecular databases or the ample existing literature, an imperative need for aggregation-related data to be organized, accessible, and easily retrieved, arises. Hence, the availability of data stored in ideally designed protein aggregation databases changed the way researchers study these aggregation phenomena and contributed to significant advances in biological, medical and – even – clinical processes.

Universal protein databases, such as UniProtKB [36], contain high-quality computationally analyzed records, enriched with automatic annotation and classification, but the extraction of information can be complex due to the large amount of data and the diversity of protein families. Commonly, fully annotated entries in general databases are tagged with controlled "vocabulary keywords" that can be used to retrieve particular subsets of entries [37].

However, advanced computational techniques should accompany this search procedure, in order to track down entries related, for example, to "amyloid formation" or "amyloidosis". Therefore, it emerges the essential need for specialized databases dedicated to protein aggregation.

Classification of protein aggregation repositories

A list of protein aggregation repositories was prepared and is presented in Table 1 and Table 2. Available details on repositories with experimental conditions are gathered in Table 3. Figure 1 maps all the interconnections between protein aggregation databases, analyzed and discussed below.

Amyloidogenic datasets

Amyloidogenic datasets were the primary repositories of protein aggregation data, originally helping to facilitate the development, validation or testing of new algorithms. Nowadays, with the avalanche of genomic and proteomic sequences generated in the postgenomic era, many of these datasets are deposited in various reference databases [38]. However, a vast amount of data can only be obtained through literature searches. Besides their exploitation in experimental research, collecting these data contributes to the study of amyloidogenic or "aggregation-prone" proteins, since they can act as scaffolds for developing powerful and efficient computational methods.

An early example of a collection of amyloidogenic peptides was designed by Lopez de la Paz and Serrano in 2003 [22], by systematically replacing residues of the *de novo* designed amyloidogenic peptide STVIIIE, with all known natural amino acids, in an attempt to elucidate the principles of amyloidogenicity. This dataset has proved extremely important for experimental researchers, a fact established from almost 274 citations. Two additional, individual sets of amyloidogenic peptides, AmylHex and AmylFrag, were gathered carefully to evaluate the 3D profile method [39]. The first dataset included peptides from the aforementioned Lopez de la Paz dataset, together with protein fragments derived from insulin, β_2 -microglobulin, amylin (also called IAPP) and tau, whereas the second exploited experimentally verified amyloidogenic peptides, identified by various researchers in the literature [40]. Another example, AmyloBase [41], a currently

Table 1. Amyloidogenic datasets of protein aggregation.

Dataset	Dataset Description	Reference
Lopez de la Paz Collection	Variations – mutants of the STVIIIE peptide	[22]
AmylHex	158 peptides; 67 amyloid-forming and 91 non-amyloid-forming peptides experimentally verified	[39]
AmylFrag	45 amyloidogenic fragments of proteins experimentally verified	[39]
AmyloBase	Experimentally determined kinetic data about oligomer or amyloid fibril formation	[41]
Hexpepset	2452 hexapeptides; 1226 amyloid-forming and 1226 non-amyloid-forming	[42]
TANGO Dataset	71 peptides derived from human disease-related proteins (prion protein, lysozyme and β_2 -microglobulin)	[65]
AGGRESKAN Dataset	160 natively globular proteins; 51 intrinsically disordered proteins; 38 soluble proteins, over-expressed in bacteria; 121 proteins forming inclusion bodies, overexpressed in bacteria; 57 amyloidogenic proteins	[44]
AMYPRED Dataset	12 amyloidogenic proteins with know 3D structures, exposing experimentally or computationally verified peptides	[27,45]

The majority of the datasets play a key role in the development, validation or testing of the reported algorithms, while others published independently as large-scale proteomic analyses. A brief description for each dataset is provided.

unavailable collection, was described as a nascent list of experimentally determined data, regarding oligomer or amyloid formation, which was created to support the development of future amyloid prediction methods. It should also be mentioned that datasets based on various rational concepts were created for many remarkable aggregation prediction methods (Pafig [42], TANGO [43], AGGRESCAN [44], AMYLPRED [45] and AMYLPRED2 [27]). It should be noted that, although datasets are usually hidden components of computational methods, they can prove to be extremely valuable assets to researchers. Well-known amyloidogenic datasets are listed in Table 1.

Protein-based databases

Protein-based libraries of aggregation and amyloidogenicity, introduced soon after the onset of protein aggregation research, are consistent protein repositories that improved the data access to specialized users.

Although amyloid fibrils from different proteins share common ultrastructures, the amino acid composition and native structures of the proteins, associated with amyloid diseases, have been found to be highly variable [46]. A significant first attempt to accumulate information of amyloidogenic proteins was the fibril_one online database, published back in 2002 [47]. The main idea behind the

Table 2. Classification of protein aggregation databases.

Category	Database	Database Contents	URL	Availability	User Annotation	Reference
Protein-based	fibril_one	250 mutations and experimental conditions, diseases associated with 22 amyloidogenic proteins	http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/group/online/fibril_one	N/A	N	[47]
	ZipperDB	Amyloidogenic profiles of proteins in 76 different genomes	https://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/	A	N	[40]
	AMYPdb	Amyloid precursor families of 600 organisms and their amino acid sequence signatures	http://amypdb.genouest.org/e107_plugins/amypdb_project/project.php	A	Y	[49]
	CreateFibril	Three-dimensional fibril models of HETs, A β and amylin	http://amyloid.cs.mcgill.ca/database/index.html	A	N	[51]
Fragment-based	WALTZ-DB	Experimentally characterized amyloid-forming and non-amyloid-forming hexapeptides	http://waltzdb.switchlab.org/	A	N	[58]
	CPAD	Peptides related to amorphous or amyloid aggregation	http://www.iitm.ac.in/bio-info/CPAD/	A	Y	[61]
	AmyLoad	Amyloidogenic and non-amyloidogenic protein fragments, experimentally or computationally characterized	http://comprec-lin.iar.pwr.edu.pl/amyload	A	Y	[63]
Disease-based	Mutations in Hereditary Amyloidosis	Mutations in hereditary amyloidoses related with 8 amyloidogenic proteins	www.amyloidosismutations.com	A	Y	[67]
	ALBase	Nucleotide and amino acid sequences of immunoglobulin light chains of patients with AL amyloidosis	http://albase.bumc.bu.edu/aldb/	A	N	[71]
	AlzGene	Genetic association studies in the field of Alzheimer's disease	http://www.alzgene.org/	A	N	[72]
	PDGene	Genetic association studies in the field of Parkinson's disease	http://www.pdgene.org/	A	N	[73]
	PDbase	Gene and genetic variations of Parkinson's disease	http://bioportal.kobic.re.kr/PDbase/	N/A	N	[74]
	AD&FTDMD	Mutations of the Alzheimer's disease and frontotemporal disorders, reported in the literature, directly submitted or communicated at scientific meetings	http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/	A	Y	[75]
	Amyloidosis Foundation	Informal data on selected forms of amyloidoses	http://www.amyloidosis.org/	A	N	–
	ProADD	Information for 600 proteins involved in 12 aggregation diseases	http://bicmku.in/ProADD	A	N	[76]

Databases are categorized as protein-based repositories, fragment-based repositories and disease-based repositories. The contents, the availability (N/A: not available; A: available) and the corresponding URL of each database are provided. User annotation availability is also included (Y: yes or N: no).

Table 3. Contents of aggregation datasets and databases with *in vitro* experimentally verified data.

Aggregation Repositories	Features		
	Methodology	Additional Data	Availability
Lopez de la Paz Collection	Transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray fibre diffraction, circular dichroism	Buffer name and concentration, peptide concentration, ionic strength, pH, temperature	A
AmyloBase	–	Kinetic details (seconds of lag phase, seconds of $t^{1/2}$, exp. value), mutation type, pH, temperature, ionic strength, solvent additives, solvent cofactors, protein/peptide concentration	N/A
fibril_one	–	–	N/A
WALTZ-DB	Transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, circular dichroism, ProteoStat dye	–	A
CPAD	Fluorescence, light scattering, immunofluorescence, turbidity measurements, thioflavin T dye, Congo red dye, thioflavin S dye	Mutation type, temperature range, pH range, buffer name and concentration, ionic name and strength, protein/peptide concentration, solvent additives	A
AmyLoad	Transmission electron microscopy, X-ray fibre diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, circular dichroism, ProteoStat dye, Congo red dye	Peptide concentration, pH, ionic strength	A

Features of experimental-derived repositories of protein aggregation are listed below. The availability of each repository is provided (N/A: not available; A: available).

creation of this collection was based on how different mutations affect fibrillogenesis of known amyloidogenic proteins. Nearly 250 mutations and 50 experimental conditions associated with 22 proteins constitute fibril_one, a database riddled with information, yet currently unavailable to the public.

The concept of deciphering the factors responsible to drive a protein into the amyloid state allowed Goldschmidt et al. in 2009 to introduce the amyloome, the "universe" of amyloidogenic proteins, by predicting the aggregation profile of every protein in 76 genomes. Notably, following UniProt's footsteps, ZipperDB [40] was created to store a large-scale amyloidogenic analysis on different genomes. All database entries are proteins segregated in computationally predicted, overlapping peptide segments. Structural modeling was used in order to evaluate the possibility that a particular protein stretch can form a tightly packed interface with an identical stretch and participate in the formation of a steric zipper [48]. This computationally derived repository is a unique approach, which uses solely structural information to predict protein stretches, "prone" to give rise to an amyloid spine. The user can browse the database for each genome or submit queries using a protein's name, a peptide sequence or a genome's name. Nonetheless, an account is necessary to perform any of the prior actions.

On the contrary, AMYPdb [49], a database of 31 selected amyloid precursor families, serves the purpose of *in silico* collecting all amyloidogenic peptide signatures among nearly 600 organisms. The idea that the propensity of a protein to aggregate into typical amyloid fibrils varies greatly, depending on the amino acid sequence or the cellular environment, enabled the development of a database, based on known PROSITE protein patterns [50]. Each precursor entry in AMYPdb is thoroughly analyzed and annotated, including a brief description, information about the primary and the secondary structure and finally, a list of sequences matching

the PROSITE pattern of the precursor protein. Among the available functions, an advanced search engine allows the complex navigation on the stored data, while implemented methods enable the calculation of several physicochemical parameters or the amyloidogenic profile of a query protein. The main advantage of AMYPdb is the benefit to create customized working sets of proteins, authorizing the interactive operation of the user. This repository is eventually a computational effort to extract accurate data of potential amyloidogenic proteins among different organisms.

Meanwhile, the prominence of amyloid deposits in many diseases raised the question of how misfolded proteins interact at atomic level, and thus, much effort has been spent on elucidating the three-dimensional structure of amyloid fibrils. Amyloid assemblies can be extremely diverse as a result of amyloid polymorphism, a common phenomenon even for fibrils formed from an identical sequence. An extremely specialized database of classified fibrillar shapes and hyperstructures of proteins well known to self-assemble into amyloid fibrils was constructed by Smaoui et al. [51]. CreateFibril database is basically a computationally calculated collection of stable polymorphic fibril models of HETs, A β and amylin proteins, along with their structural energy landscapes, produced by the CreateFibril tool [51].

Fragment-based databases

It has been generally established that short protein segments can nucleate the fibrillation of polypeptide chains, since they intrinsically exhibit the tendency to drive a native protein to the amyloid state [52]. The moment this observation emerged, the research interest redirected from the study of native proteins into short protein stretches [53–56]. Computational approaches for investigating the aggregation profile of proteins and detecting "aggregation-prone" segments in proteins have been explicitly reviewed [33–35,57]. Several biological databases are dedicated to such short

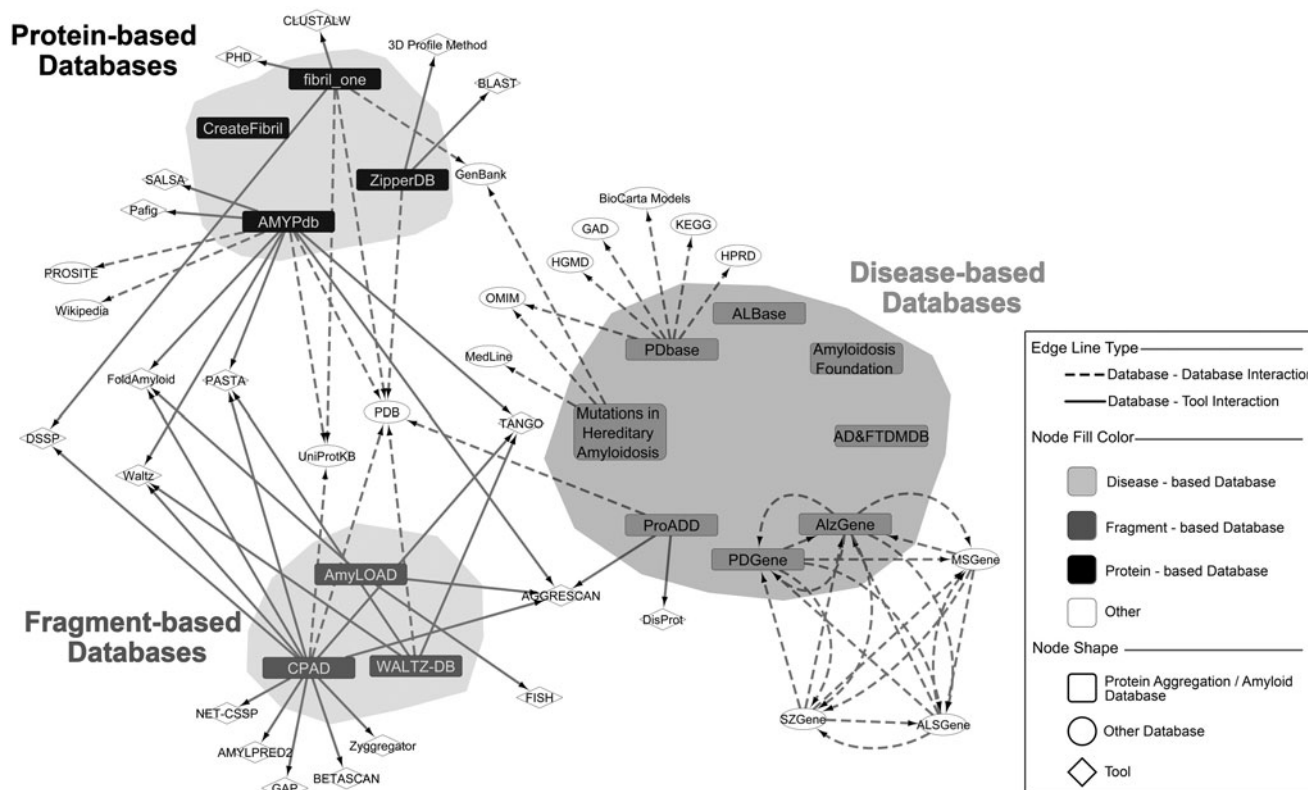


Figure 1. A directed network representing interconnections between protein aggregation databases with other databases and computational tools. Each database or computational tool is represented as a node, whereas interactions between neighbouring nodes are visualized as edges. Incoming and outgoing edges are used to describe the directed flow of information within the network. Protein aggregation databases are sorted in three distinct categories, as described in Classification of Protein Aggregation Repositories Section. Specifically, databases dedicated to amyloid disorders and other aggregation diseases are shown in light grey (group on the right), databases that provide information regarding “aggregation-prone” segments in protein sequences in dark grey (group on the bottom) and databases that contain amyloidogenic proteins in black (group on the top). The node shape is used to discern the different components of the network. Protein aggregation databases are depicted as rectangles (■), whereas other databases are depicted as circles (●). Noteworthy, prediction algorithms, presented as diamonds (◆), are computational tools utilized or implemented explicitly in the creation of aggregation databases and can be either relevant to protein aggregation or provide other important utilities for the repositories in which they are found, despite not being aggregation specific. Aggregation prediction algorithms presented in this figure are extensively reviewed in other works [33–35]. Dashed lines reveal the connections between databases, while solid lines are used to depict the connections between aggregation databases and computational tools. Two elements are considered connected when a hyperlink exists from the source element to the target. In particular, dashed lines connect aggregation databases with other databases and solid lines connect aggregation databases with computational tools. The visualization of the protein aggregation databases network was executed using the open source program Cytoscape [77]. Databases and tools that are not mentioned in the main text are referenced in Table 4.

segments; we describe these fragment-based repositories thoroughly below and in Table 2.

WALTZ-DB [58] is the first elaborate collection of amyloidogenic and non-amyloidogenic hexapeptides, inspired and created by the developers of Waltz algorithm [59]. This database assembles experimentally characterized peptides in one extended and detailed collection. The collection contains hexapeptides derived from different sources, yet annotated in detail, regarding their amyloidogenic capacities. The available experimental data, together with the structural characterization following Eisenberg’s classification [60], are a useful addition for peptide specialists. The accessibility on experimental details and/or experimental material, accompanying each peptide entry, allows researchers to independently evaluate the quality of data (Table 3). Among the advantages of WALTZ-DB is the choice of the user to filter information, by using the search engine and particularizing their query.

Moving a step further, Thangakani et al., recognizing the expanding interest of researchers in the field of protein aggregation, developed the Curated Protein Aggregation

Database (CPAD) [61]. This database ventured to assemble current information on peptide aggregation and thus is a collection of peptides that are related either to fibril formation or amorphous aggregation. Particularly, an accurate distinction between amyloid-forming peptides of different lengths and amorphous or non-amyloid-forming peptides is available, whereas additional structural information of peptides with known 3D structures is provided, with external links to PDB [62].

A great supplement in fragment-based databases is a repository aiming at bringing together amyloidogenic sequences from all major sources, in a common platform. AmyLoad consolidated a great majority of the currently available amyloidogenic and non-amyloidogenic sequences in an effort to collect all fragment data of amyloidogenesis [63]. Developers made a special effort to merge validation datasets of different prediction methods (AGGRESCAN [64], TANGO [65], AmylHex and AmylFrag [40]), along with data obtained from the literature. Entries are easily accessible and information is carefully organized, while interconnections with other available databases and

computational methods compose a user-friendly interface (see Database interconnections in [Figure 1](#)). For instance, for a given peptide, researchers can obtain in-depth information, such as the experimental preparation of the sample or the name of the disease related with each record. A major benefit for the research community is the availability of the experimental methodology, used for the verification of amyloidogenicity for each peptide entry ([Table 3](#)).

Disease-based databases

According to Sipe et al., amyloidogenic proteins can either give rise to distinct amyloidoses, or can play a pathological role in neurodegenerative or endocrine diseases that are actually not classified as amyloidosis, from a clinical viewpoint [8]. Amyloidoses constitute a remarkably heterogeneous group of diseases that have been studied extensively and undergone various classifications (localized or systemic, primary or secondary, mesenchymal or parenchymal) [66].

Hereditary amyloidosis is the type of disease, caused by inheriting a particular gene mutation. Mutations in Hereditary Amyloidosis database [67] merges the need of the clinical and scientific community for accessing information about new mutations and phenotypes in hereditary amyloidosis. The database contains information about genes, related to different forms of amyloidosis, and is enhanced with a brief description of known clinical phenotype or ethnicity, allowing a more complete understanding of the relationship between genes and the trait of a disease. External reference resources to Medline [68] and OMIM [69] assist in “spanning” clinical and available online knowledge on such amyloidoses.

A few databases have been designed to accumulate knowledge for specific disorders related to amyloid formation. Light chain amyloidosis (or AL amyloidosis) is the most common type of systemic amyloidosis, mainly associated with plasma cell dyscrasia [70]. The dominance of this systemic form in the developed world triggered the creation of the ALBase [71], a repository of the primary sequences of immunoglobulin light chains of patients with AL amyloidosis, containing 4364 nucleotide and amino acid sequences of immunoglobulin light chains. AlzGene [72], PDGene [73] and PDbase [74] are disease-based databases dedicated to the Alzheimer’s disease (AD) and Parkinson’s disease (PD). The aforementioned neurodegenerative diseases have high prevalence worldwide and are responsible for a great number of deaths globally in recent years. AlzGene and PDGene gather and comprehensively catalogue all genetic association studies in the field of Alzheimer’s and Parkinson’s disease, respectively, whereas PDbase present an in-depth collection of molecular characteristics, governing aggregation in Parkinson’s disease. Another approach in Alzheimer’s disease is available through the Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database (AD&FTDMD) [75], a platform that aims at collecting all known gene mutations related, in general, to the Alzheimer’s disease and frontotemporal dementias (FTD). Finally, Amyloidosis Foundation [60], known mainly as a forum rather than a scientific database, contains informal recorded information on selected forms of

amyloidoses and raises awareness for these rare forms of diseases to the general public.

While a range of overwhelming human diseases is known to be associated with the formation of highly organized protein aggregates, deposition of amorphous protein aggregates could also be related to the onset of other aggregation diseases. The tremendous impact of several amyloidoses worldwide, though, concealed the presence of other significant disorders, caused by protein aggregation. In contrast to the specialized amyloid databases above, ProADD holds details of around 600 proteins involved in aggregation diseases [76]. Proteins in ProADD are annotated and categorized as aggregating proteins or intrinsically disordered proteins, based on data gathered from literature or by utilizing available prediction algorithms. Unfortunately, the usefulness of this library is limited, as protein data are not currently available.

Interconnections between protein aggregation repositories

In order to further analyze the functional “interactions” between the above databases, we constructed a directed graph, utilizing Cytoscape [77]. A graph or network (interchangeably used terms) consists of a set of nodes, representing entities of interest, and a set of edges, signifying specific relationships between them. Namely, a directed graph has ordered pairs of edges with directions from a certain node to another and is mainly used to describe procedures with a specific flow of information.

Following a systematic approach, protein aggregation databases and their implemented or integrated tools were collected. Data were divided as protein aggregation/amyloid databases (rectangle node shape), other databases (circle node shape) and tools (diamond node shape). A number of well-known repositories and computational methods, not strictly related to protein aggregation, were intentionally gathered, so as to visualize the way repositories, dedicated to protein aggregation, implement other databases, methods or tools. Incoming and outgoing arrows were used to map the context-specific information propagation ([Figure 1](#)).

[Figure 1](#), illustrating connections between repositories and computational tools, provides a frame for the interpretation of links among protein aggregation repositories. This network-based representation is evidently presenting that there are no direct links between any of the databases dedicated to protein aggregation. AlzGene and PDGene are the only exception, since they depict extreme interconnectivity with other databases, compiling data from genetic association studies [78,79]. Fragment-based databases (dark grey rectangles) are strongly interconnected with aggregation prediction tools (Waltz, FoldAmyloid, PASTA, TANGO, etc.), a reasonable finding as predicted aggregation rates are the basis of discovering short protein segments. Protein-based collections (black rectangles) implement only a few prediction methods; however, they form connections with major protein databases (UniProtKB, PDB). In turn, databases related to aggregation diseases (light grey rectangles) exhibit extremely low

Table 4. Detailed interconnections between aggregation databases and other databases or tools, derived from the analysis of the directed network (Figure 1).

Aggregation Database	Other Database	Computational Tool
fibril_one	PDB [62] UniProtKB [36] GenBank [80]	CLUSTALW [81] PHD [82] DSSP [83]
ZipperDB	PDB [62]	Blast [84] 3D Profile method [39]
AMYPdb	Wikipedia PROSITE [50] UniProtKB [36] PDB [62]	Salsa [85] Pafig [42] Fold Amyloid [86] Waltz [59] PASTA [87] TANGO [43] AGGRESKAN [64]
WALTZ-DB	PDB [62]	TANGO [43] PASTA [87] Waltz
CPAD	UniProtKB [36] PDB [62]	NET-CSSP [88] GAP [89] AMYLPRED2 [27] BETASCAN [90] Zyggregator [91] DSSP [83] Waltz [59] PASTA [87] TANGO [43] AGGRESKAN [64] FoldAmyloid [86]
AmyLoad		AGGRESKAN [64] FoldAmyloid [86] FISH Amyloid [92]
Mutations in Hereditary Amyloidosis	GenBank [80] MedLine [68] OMIM [69]	
AlzGene	PDGene [93] SZGene [78] MSGene ALSGene [93]	
PDGene	AlzGene [72] SZGene [78] MSGene ALSGene [93]	
PDbase	BioCarta Models [79] GAD [94] HGMD [95] HPRD [96] KEGG [97] OMIM [69]	
ProADD	PDB [62] DisProt [98]	AGGRESKAN [64]

Each aggregation database, highlighted in bold, occupies the first column and is related to other databases and computational tools, listed in the second and third column, respectively. Apparently, the association between aggregation databases is poor, with the exception of AlzGene and PDGene, since only two aggregation databases are included in the second column.

connectivity with the entire network, since only three out of seven collections have external links to other computational tools or databases. UniProtKB [36] and PDB [62], two well-annotated and comprehensive resources, are the databases with external links from the majority of protein and fragment-based databases, since three (3) and six (6) incoming edges were recorded, respectively. However, neither of these databases has explicit or implicit links to amyloid-related repositories (no outgoing edges) (Table 4).

The graphical visualization of the aforementioned databases (Figure 1, Table 4) emphasizes the necessity to concentrate additional knowledge regarding protein aggregation and consequently create connections between them and other online resources, in order to make data mining more efficient for the scientific community. Our graph is believed to contribute towards putting forward alternative strategies in merging data between different groups of repositories.

Moving to aggregation-related data, more rigorous studies should take place, since data include a considerable amount of redundancy. Although it is unlikely that one database will be the collection of choice in all circumstances, a major restriction for researchers is that only few repositories keep key details on experimental conditions of protein aggregation (Table 3). A problem that needs to be solved is the heterogeneity of the records, even within the same group of aggregation databases. A potential format standardization would sustain the data usefulness and would allow the effortless comparison among data from different sources.

Advancements in computationally based or experimental-based databases from various research groups will upgrade the quality of data and will accelerate protein aggregation research worldwide. It is also expected that aggregation repositories will be valuable "partners" for the experimental community, when they will be able to provide a common protein aggregation platform of non-redundant data in a uniform way.

User annotation of protein aggregation

A stimulating and a particularly useful feature available in some of the aforementioned repositories is the choice of the

community annotation [49,61,63,67,75]. In general, the primary goal of a scientific database is the accurate and comprehensive demonstration of the data, along with the effortless accessibility for the scientific community. The ever-increasing demand of experimental data, though, necessitates the constant update of the available knowledge, a challenging attempt for specialized or "small-scale" repositories, such as databases dedicated to aggregation and amyloidogenicity. To address this issue, apart from the common database curation, the user annotation feature permits researchers to outsource their experimental or computational results and eventually supports the compilation of the available biological knowledge. Namely, five out of thirteen databases, reviewed herein, implement – to some extent – the user "interaction" and allow the submission of relevant data. The synergy between the database curators and the scientific community is a fruitful attempt to improve specialized repositories dedicated to protein aggregation. The user annotation availability for every database is presented in Table 2.

Conclusions

A field that is receiving renewed emphasis, both computationally and experimentally, is the elucidation of the molecular mechanisms that drive protein aggregation and amyloidogenesis. A variety of protein aggregation databases recently emerged, ranging from general collections of amyloidogenicity, to specialized disease databases, bearing various utilities. This review provides a brief analysis of available protein aggregation repositories that fulfil diverse needs and can be divided into four distinct categories, namely amyloidogenic datasets, protein-based repositories, databases dedicated to "aggregation-prone" fragments of proteins and, finally, disease-based collections (Table 1 and Table 2). A more clear representation of the association among the protein aggregation repositories is graphically displayed herein (Figure 1). Apparently, interconnections between various collections are scarce and thus, there are several limitations in the combined mining of the databases for information regarding protein aggregation (Table 4). Contrary to computational tools, databases require

continuous annotation and as a result, an existing problem is the need of incorporating protein aggregation data into ideally designed databases. The experimental and the computational community should universally join forces by exploiting user annotation, during the study of amyloidogenicity. It is hoped that, in years to come, databases containing protein aggregation data will undergo a unification and standardization, following the example of major biological databases such as UniProtKB, where protein sequence information, in its entirety, can be accessed through a single database.

Acknowledgements

The authors sincerely thank the Editor in Chief for properly handling this manuscript and both the Associate Editor and the anonymous reviewers for their very useful and constructive criticism, which helped to considerably improve the manuscript. We also thank the University of Athens for support.





Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest

Funding

This project was financially supported by the Greek State Scholarships Foundation, through the program “Research Projects for Excellence IKY/Siemens” (2015–2017).

ORCID

Paraskevi L. Tsiolaki  <http://orcid.org/0000-0002-9525-6433>
 Katerina C. Nastou  <http://orcid.org/0000-0003-3611-5726>
 Stavros J. Hamodrakas  <http://orcid.org/0000-0001-6280-1645>
 Vassiliki A. Ionomidou  <http://orcid.org/0000-0002-9472-5146>

References

- [1] Aguzzi A, O'Connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:237–248.
- [2] Eisele YS, Monteiro C, Fearn C, et al. Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14:759–780.
- [3] Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:298–306.
- [4] Mitraki A. Protein aggregation from inclusion bodies to amyloid and biomaterials. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2010;79:89–125.
- [5] Cherny I, Gazit E. Amyloids: not only pathological agents but also ordered nanomaterials. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47:4062–4069.
- [6] Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Nomenclature 2014: amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*. 2014;21:221–224.
- [7] Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:49–60.
- [8] Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*. 2016;23:209–213.
- [9] Ross CA, Poirier MA. Opinion: what is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:891–898.
- [10] Agrawal NJ, Kumar S, Wang X, et al. Aggregation in protein-based biotherapeutics: computational studies and tools to identify aggregation-prone regions. *J Pharm Sci*. 2011;100:5081–5095.
- [11] Fandrich M. Structure and formation of amyloid fibrils. *Acta Histochem*. 2003;105:379.
- [12] Hammer ND, Wang X, McGuffie BA, et al. Amyloids: friend or foe? *J Alzheimers Dis*. 2008;13:407–419.
- [13] Ionomidou VA, Vriend G, Hamodrakas SJ. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS Lett*. 2000;479:141–145.
- [14] Ionomidou VA, Chryssikos GD, Gionis V, et al. Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkworm chorion proteins. *FEBS Lett*. 2001;499:268–273.
- [15] Fandrich M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:2066–2078.
- [16] Sunde M, Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem*. 1997;50:123–159.
- [17] Geddes AJ, Parker KD, Atkins ED, et al. “Cross-beta” conformation in proteins. *J Mol Biol*. 1968;32:343–358.
- [18] Eichner T, Radford SE. A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Mol Cell*. 2011;43:8–18.
- [19] Ashkenazi Y, Hersko C, Gafni J, et al. Chemical aspects of amyloid-Congo red binding. *Isr J Med Sci*. 1967;3:572–574.
- [20] Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, et al. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol*. 1997;273:729–739.
- [21] Chiti F, Calamai M, Taddei N, et al. Studies of the aggregation of mutant proteins *in vitro* provide insights into the genetics of amyloid diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:16419–16426.
- [22] Lopez de la Paz M, Serrano L. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:87–92.
- [23] Knowles TP, Waudby CA, Devlin GL, et al. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*. 2009;326:1533–1537.
- [24] Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:384–396.
- [25] Kelly JW. Mechanisms of amyloidogenesis. *Nat Struct Biol*. 2000;7:824–826.
- [26] Castillo V, Ventura S. Amyloidogenic regions and interaction surfaces overlap in globular proteins related to conformational diseases. *PLoS Comput Biol*. 2009;5:e1000476.
- [27] Tsiolis AC, Papandreou NC, Ionomidou VA, et al. A consensus method for the prediction of ‘aggregation-prone’ peptides in globular proteins. *PLoS One*. 2013;8:e54175.
- [28] Nelson R, Eisenberg D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr Opin Struct Biol*. 2006;16:260–265.
- [29] Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:333–366.
- [30] Apweiler R, Bairoch A, Wu CH. Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol*. 2004;8:76–80.
- [31] Xenarios I, Eisenberg D. Protein interaction databases. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12:334–339.
- [32] Chiti F, Webster P, Taddei N, et al. Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:3590–3594.
- [33] Hamodrakas SJ. Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. *FEBS J*. 2011;278:2428–2435.
- [34] Ahmed AB, Kajava AV. Breaking the amyloidogenicity code: methods to predict amyloids from amino acid sequence. *FEBS Lett*. 2013;587:1089–1095.

- [35] De Baets G, Schymkowitz J, Rousseau F. Predicting aggregation-prone sequences in proteins. *Essays Biochem.* 2014;56:41–52.
- [36] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, et al. UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: how to use the entry view. *Methods Mol Biol.* 2016;1374:23–54.
- [37] UniProt C. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D193–D197.
- [38] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409:860–921.
- [39] Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, et al. The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:4074–4078.
- [40] Goldschmidt L, Teng PK, Riek R, et al. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:3487–3492.
- [41] Belli M, Ramazzotti M, Chiti F. Prediction of amyloid aggregation *in vivo*. *EMBO Rep.* 2011;12:657–663.
- [42] Tian J, Wu N, Guo J, et al. Prediction of amyloid fibril-forming segments based on a support vector machine. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:S45.
- [43] Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, et al. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol.* 2004;342:345–353.
- [44] de Groot NS, Castillo V, Grana-Montes R, et al. AGGRESCAN: method, application, and perspectives for drug design. *Methods Mol Biol.* 2012;819:199–220.
- [45] Frousios KK, Iconomidou VA, Karletidi CM, et al. Amyloidogenic determinants are usually not buried. *BMC Struct Biol.* 2009;9:44.
- [46] Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature.* 1992;360:672–674.
- [47] Siepen JA, Westhead DR. The fibril_one on-line database: mutations, experimental conditions, and trends associated with amyloid fibril formation. *Protein Sci.* 2002;11:1862–1866.
- [48] Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, et al. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature.* 2007;447:453–457.
- [49] Pawlicki S, Le Behec A, Delamarche C. AMYPdb: a database dedicated to amyloid precursor proteins. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:273.
- [50] Sigrist CJ, Cerutti L, Hulo N, et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinformatics.* 2002;3:265–274.
- [51] Smaoui MR, Poitevin F, Delarue M, et al. Computational assembly of polymorphic amyloid fibrils reveals stable aggregates. *Biophys J.* 2013;104:683–693.
- [52] Teng PK, Eisenberg D. Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng Des Sel.* 2009;22:531–536.
- [53] Tsiolaki PL, Louros NN, Hamodrakas SJ, et al. Exploring the 'aggregation-prone' core of human Cystatin C: a structural study. *J Struct Biol.* 2015;191:272–280.
- [54] Louros NN, Tsiolaki PL, Zompra AA, et al. Structural studies and cytotoxicity assays of 'aggregation-prone' IAPP(8-16) and its non-amyloidogenic variants suggest its important role in fibrillogenesis and cytotoxicity of human amylin. *Biopolymers.* 2015;104:196–205.
- [55] Louros NN, Tsiolaki PL, Griffin MD, et al. Chameleon 'aggregation-prone' segments of apoA-I: a model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis. *Int J Biol Macromol.* 2015;79:711–718.
- [56] Tsiolaki PL, Hamodrakas SJ, Iconomidou VA. The pentapeptide LQVVR plays a pivotal role in human cystatin C fibrillization. *FEBS Lett.* 2015;589:159–164.
- [57] Trainor K, Broom A, Meiering EM. Exploring the relationships between protein sequence, structure and solubility. *Curr Opin Struct Biol.* 2017;42:136–146.
- [58] Beerten J, Van Durme J, Gallardo R, et al. WALTZ-DB: a benchmark database of amyloidogenic hexapeptides. *Bioinformatics.* 2015;31:1698–1700.
- [59] Maurer-Stroh S, Debulpaep M, Kueemmerer N, et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat Meth.* 2010;7:237–242.
- [60] Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell.* 2012;148:1188–1203.
- [61] Thangakani AM, Nagarajan R, Kumar S, et al. CPAD, curated protein aggregation database: a repository of manually curated experimental data on protein and peptide aggregation. *PLoS One.* 2016;11:e0152949.
- [62] Rose PW, Prlic A, Altunkaya A, et al. The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D271–D281.
- [63] Wozniak PP, Kotulska M. AmyLoad: website dedicated to amyloidogenic protein fragments. *Bioinformatics.* 2015;31:3395–3397.
- [64] Conchillo-Sole O, de Groot NS, Aviles FX, et al. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:65.
- [65] Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, et al. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol.* 2004;22:1302–1306.
- [66] Pepys MB. Amyloidosis. *Annu Rev Med.* 2006;57:223–241.
- [67] Rowzenio DM, Noor I, Gillmore JD, et al. Online registry for mutations in hereditary amyloidosis including nomenclature recommendations. *Hum Mutat.* 2014;35:E2403–24E2412.
- [68] Wood EH. MEDLINE: the options for health professionals. *J Am Med Inform Assoc.* 1994;1:372–380.
- [69] Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:D514–D517.
- [70] Sanchowala V. Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1:1331–1341.
- [71] Bodi K, Prokaeva T, Spencer B, et al. AL-Base: a visual platform analysis tool for the study of amyloidogenic immunoglobulin light chain sequences. *Amyloid.* 2009;16:1–8.
- [72] Bertram L, McQueen MB, Mullin K, et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007;39:17–23.
- [73] Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: the PDGene database. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002548.
- [74] Yang JO, Kim WY, Jeong SY, et al. PDbase: a database of Parkinson's disease-related genes and genetic variation using substantia nigra ESTs. *BMC Genomics.* 2009;10:S32.
- [75] Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat.* 2012;33:1340–1344.
- [76] Shobana R, Pandaranayaka EP. ProADD: a database on protein aggregation diseases. *Bioinformatics.* 2014;10:390–392.
- [77] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13:2498–2504.
- [78] Allen NC, Bagade S, McQueen MB, et al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet.* 2008;40:827–834.
- [79] Buchel F, Rodriguez N, Swainston N, et al. Path2Models: large-scale generation of computational models from biochemical pathway maps. *BMC Syst Biol.* 2013;7:116.
- [80] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:15–18.

- [81] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947–2948.
- [82] Rost B. Review: protein secondary structure prediction continues to rise. *J Struct Biol*. 2001;134:204–218.
- [83] Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983;22:2577–2637.
- [84] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–410.
- [85] Zibae S, Makin OS, Goedert M, et al. A simple algorithm locates beta-strands in the amyloid fibril core of alpha-synuclein, Abeta, and tau using the amino acid sequence alone. *Protein Sci*. 2007;16:906–918.
- [86] Garbuzynskiy SO, Lobanov MY, Galzitskaya OV. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics*. 2010;26:326–332.
- [87] Walsh I, Seno F, Tosatto SC, et al. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:W301–W307.
- [88] Kim C, Choi J, Lee SJ, et al. NetCSP: web application for predicting chameleon sequences and amyloid fibril formation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:W469–W473.
- [89] Thangakani AM, Kumar S, Nagarajan R, et al. GAP: towards almost 100 percent prediction for beta-strand-mediated aggregating peptides with distinct morphologies. *Bioinformatics*. 2014;30:1983–1990.
- [90] Bryan AW Jr, Menke M, Cowen LJ, et al. BETASCAN: probable beta-amyloids identified by pairwise probabilistic analysis. *PLoS Comput Biol*. 2009;5:e1000333.
- [91] Tartaglia GG, Vendruscolo M. The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chem Soc Rev*. 2008;37:1395–1401.
- [92] Gasior P, Kotulska M. FISH Amyloid – a new method for finding amyloidogenic segments in proteins based on site specific co-occurrence of aminoacids. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:54.
- [93] Lill CM, Abel O, Bertram L, et al. Keeping up with genetic discoveries in amyotrophic lateral sclerosis: the ALSod and ALSGene databases. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011;12:238–249.
- [94] Becker KG, Barnes KC, Bright TJ, et al. The genetic association database. *Nat Genet*. 2004;36:431–432.
- [95] Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21:577–581.
- [96] Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, et al. Human Protein Reference Database—2009 update. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D767–D772.
- [97] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D480–D484.
- [98] Vucetic S, Obradovic Z, Vacic V, et al. DisProt: a database of protein disorder. *Bioinformatics*. 2005;21:137–140.

RESEARCH ARTICLE

The amyloid interactome: Exploring protein aggregation

Konstantina V. Biza[☯], Katerina C. Nastou[☯], Paraskevi L. Tsiolaki[☯], Chara V. Mastrokalou, Stavros J. Hamodrakas, Vassiliki A. Iconomidou*

Section of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece

☯ These authors contributed equally to this work.

* veconom@biol.uoa.gr



Abstract

Protein-protein interactions are the quintessence of physiological activities, but also participate in pathological conditions. Amyloid formation, an abnormal protein-protein interaction process, is a widespread phenomenon in divergent proteins and peptides, resulting in a variety of aggregation disorders. The complexity of the mechanisms underlying amyloid formation/amyloidogenicity is a matter of great scientific interest, since their revelation will provide important insight on principles governing protein misfolding, self-assembly and aggregation. The implication of more than one protein in the progression of different aggregation disorders, together with the cited synergistic occurrence between amyloidogenic proteins, highlights the necessity for a more universal approach, during the study of these proteins. In an attempt to address this pivotal need we constructed and analyzed the human amyloid interactome, a protein-protein interaction network of amyloidogenic proteins and their experimentally verified interactors. This network assembled known interconnections between well-characterized amyloidogenic proteins and proteins related to amyloid fibril formation. The consecutive extended computational analysis revealed significant topological characteristics and unraveled the functional roles of all constituent elements. This study introduces a detailed protein map of amyloidogenicity that will aid immensely towards separate intervention strategies, specifically targeting sub-networks of significant nodes, in an attempt to design possible novel therapeutics for aggregation disorders.

OPEN ACCESS

Citation: Biza KV, Nastou KC, Tsiolaki PL, Mastrokalou CV, Hamodrakas SJ, Iconomidou VA (2017) The amyloid interactome: Exploring protein aggregation. PLoS ONE 12(3): e0173163. doi:10.1371/journal.pone.0173163

Editor: Ina Maja Vorberg, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, GERMANY

Received: December 14, 2016

Accepted: February 15, 2017

Published: March 1, 2017

Copyright: © 2017 Biza et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This project was financially supported by the Greek State Scholarships Foundation, through the program: "RESEARCH PROJECTS FOR EXCELLENCE IKY/SIEMENS" (2015–2017).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The cellular and molecular mechanisms that underlie protein misfolding are a matter of major concern for studies conducted in several scientific centers all over the world. Under denaturing conditions, a growing number of proteins and peptides that fail to fold properly into their native structure, are led to the formation of highly ordered, insoluble aggregates, the so-called amyloid fibrils [1]. Amyloidogenicity, the ability of proteins to self-assemble into these well-defined fibrillar structures, was initially associated with a group of functionally unrelated proteins [2]. Meanwhile, targeted *in vitro* experiments revealed that amyloid formation is a universal phenomenon for polypeptide chains [3] and thus, this concept was the onset of a new

era in protein misfolding, since a great number of novel amyloidogenic proteins and peptides were uncovered [4]. Noteworthy, proteins, ranging from bacteria to humans, have been also found to adopt the same amyloid architecture, as part of their nature [5, 6]. A vast amount of data, regarding amyloid fibril formation, present both in pathological and physiological conditions, is currently organized into freely available databases [7–11].

Amyloid fibril formation is widely observed and directly linked to the pathology of a range of widespread human diseases, known as amyloidoses [2]. Amyloidoses are a group of aggregation-disorders, where full-length amyloidogenic proteins or fragments of larger amyloidogenic protein precursors, precipitate and deposit, forming amyloid plaques and resulting in organ or tissue dysfunction [12, 13]. Literature data indicate the implication of more than one amyloidogenic proteins in the evolution of different amyloidoses. In the case of Senile Systemic Amyloidosis, co-operation of several Apolipoproteins and ATTR is recorded [14, 15], whereas in Alzheimer's disease, apart from A β , proteinaceous components such as ACys, ATTR and AGel were found [16]. To date, the extent to which co-deposition in amyloid plaques has impacted the development of amyloidoses between putative unrelated amyloidogenic proteins, remains unclear.

Experimental work over the past ten years has revealed an intriguing, synergistic phenomenon between amyloidogenic proteins [17]. *In vitro* experiments highlighted the capacity of A β peptide under specific conditions to seed the polymerization process for α -synuclein [18], Tau [19] or APrp protein [20]. Similar experiments were performed on several well-characterized amyloidogenic proteins [21–23]. Further to *in vitro* assays, animal models demonstrated the co-deposition of A β and Tau proteins [24] or APrp protein [20] in transgenic models. However, a hidden perspective emerges from this molecular association; amyloid “cross-seeding” could explain mechanistically the way by which misfolded proteins co-deposit, and propose possible, attractive candidates for the development of novel therapeutic strategies of aggregation-related diseases. An apt example towards this direction is the protective role of the amyloidogenic ACys in neurodegenerative diseases [25].

The interactomes [26, 27], a systems biology approach, were viable complements to proteomics, in an attempt to look at “the big picture” of protein-protein interactions (PPIs). Gaining a proper understanding of PPIs contributed to several problems in the field of biological and medical research [28–30] and served as a reference for further targeted experimentation [31]. Systematic PPI studies are essential, in order to fully comprehend the molecular mechanisms that trigger human diseases [32, 33]. However, a subject poorly explored so far is deviating PPIs associated with amyloidogenic/amyloid forming proteins. To date, only a few studies utilized a protein interaction network framework, to obtain information regarding the Alzheimer's [34–36] or Huntington's disease [37] and to construct the Amyloid precursor protein interactome [38–40].

Incomplete knowledge on direct and/or indirect interactions of proteins “prone-to-misfold”, emphasizes the need to focus on the amyloid protein-protein interaction network. Here we introduce the amyloid interactome, a systematic approach to study “macroscopically” interactions between previously unrelated human amyloidogenic proteins, associated with distinct pathologies. Our ultimate goal was to find a common denominator for amyloid formation, unveil the relationships that govern amyloidogenicity and, subsequently, guide further experimental studies on protein misfolding.

Materials and methods

Amyloid classification

In order to classify amyloidogenic proteins, all protein-precursors were sorted into three categories:

- *in vivo* amyloid forming protein: the precursor protein, or a peptide segment–derived from the precursor protein–, self assembles into typical amyloid fibrils, affecting one or more tissues or organs in human. These proteins, from a clinical perspective, give rise to distinct amyloidoses or play a pathological role in neurodegenerative or endocrine diseases [2].
- *in vitro* amyloid forming protein: the precursor protein, or commonly a peptide segment–derived from the precursor protein–, that was reported to self assemble into amyloid-like fibrils, at experimental level. The amyloidogenicity of proteins comprising this list may be speculative. Only human precursor proteins are mentioned in this category.
- protein related to amyloid fibril formation: the protein is associated with other *in vivo* amyloid forming proteins, but has no amyloid properties recorded.

Amyloid interactome datasets

Amyloidogenic proteins were firstly obtained from a literature-curated dataset, peer-reviewed in 2014, by the International Society of Amyloidosis (<http://www.amyloidosis.nl/>). This list included human proteins known to self-assemble into typical amyloid fibrils *in vivo*, along with intracellular inclusions with known biochemical composition [2]. In addition to this, the set was enriched with proteins that form amyloid fibrils *in vitro* [41]. To expand this dataset, AmyLoad [7] was used as a source of supplementary proteins, characterized to form amyloid-like fibrils *in vitro* at experimental level. A final addition included several UniProtKB [42] entries, gathered elaborately to incorporate reviewed proteins related to amyloid fibrils. Overall, the dataset contained 145 non-redundant amyloidogenic protein precursors. S1 Table provides a detailed catalogue of the aforementioned proteins, mapped to a UniProtKB Accession Number (AC).

The subsequent construction of the network incorporated only well-characterized *in vivo* amyloidogenic proteins, published by Sipe et al. [2], excluding Enfurvitide an anti-retroviral peptide drug [43], as well as Immunoglobulin Light and Heavy Chains. In the case of Immunoglobulin chains (e.g. Bence Jones proteins [44]), their variety in human population did not allow the identification of a unique protein precursor, related to amyloid fibril formation. The final seed-dataset included 28 proteins, related to *in vivo* amyloid fibril formation (Table 1), which were subsequently used for the collection of protein-protein interactions. Protein nomenclature follows abbreviations established by Sipe et al. [2].

Assembling the protein-protein interaction dataset

UniProtKB ACs were used to query IntAct [45], BioGRID [46] and STRING [47] databases, in order to extract experimentally verified PPIs for the 28 proteins related to *in vivo* amyloid fibril formation (Table 1). This process resulted in three independent PPI datasets, derived from each database (data not shown). In general protein-protein interaction data contain experimentally verified interactions, along with data derived from prediction methods. These last data do not have the high reliability often attributed to them and thus, in order to avoid extracting automatic text-mining results from the plethora of scientific articles related to amyloid fibril formation, BioGRID and STRING datasets were excluded from any further analysis. IntAct PPIs, gather highly curated experimental data, which ensured the quality and consistency of information of our dataset [48].

The interaction data from IntAct (05–2016) were retrieved in a MITAB 2.5 format file [49], which is appropriate for Perl parsing, without the loss of information regarding PPIs. An editing process of the file allowed the removal of all the non-human interactions, and additional

Table 1. The dataset of 28 proteins related to in vivo amyloid fibril formation.

Protein Precursor Name*	Abbreviation	UniProtKB AC
Amyloid beta A4 protein	Aβ	P05067
Apolipoprotein A-I	AApoAI	P02647
Apolipoprotein A-II	AApoAII	P02652
Apolipoprotein A-IV	AApoAIV	P06727
Beta-2-microglobulin	Aβ2M	P61769
Calcitonin	ACal	P01258
Corneodesmosin	ACor	Q15517
Cystatin-C	ACys	P01034
Fibrinogen alpha chain	Afib	P02671
Galectin 7	AGal	P47929
Gelsolin	AGel	P06396
Insulin	AIns	P01308
Integral membrane protein 2B	ABri/ ADan	Q9Y287
Islet Amyloid Polypeptide	AIAPP	P10997
Kerato-epithelin	Aker	Q15582
Lactadherin	AMed	Q08431
Lactoferrin	ALac	P02788
Leukocyte cell-derived chemotaxin-2	ALECT2	O14960
Lysozyme C	Alys	P61626
Major prion protein	APrP	P04156
Natriuretic peptides A	AANF	P01160
Odontogenic Ameloblast-Associated Protein	AOAAP	A1E959
Prolactin	APro	P01236
Pulmonary surfactant associated protein C	APSP	P11686
Semenogelin-1	ASem1	P04279
Serum amyloid A-1	AA1	P0DJ18
Serum amyloid A-2	AA2	P0DJ19
Transthyretin	ATTR	P02766

*Protein nomenclature follows abbreviations published by Sipe *et al.*

doi:10.1371/journal.pone.0173163.t001

screening was performed to dismiss interactions with chemical compounds. The resulting set included 355 protein nodes with 762 edges.

In order to create a more robust network, the interactions deposited in IntAct between all 355 proteins were retrieved, whilst an extra processing allowed for the removal of self-loops and duplicated edges. Thus, a final dataset of 1178 PPIs between 353 human proteins was obtained, after the exclusion of two protein nodes that had only self interactions (See [Results and discussion](#)).

Visualization and analysis of the network

For the visualization and the analysis of the network we followed the protocol introduced by Nastou *et al.* [50]. Cytoscape 3.2.1 [51] was used to manipulate, analyze and visualize our data, since it ideally provides all the necessary and improved applications for the analysis of biological networks [52]. The analysis of simple and complex network topology parameters, was performed by NetworkAnalyzer [53]. The Cytoscape.js JavaScript library [54] was used to create interactive networks, is available at this link: http://83.212.109.111/amyloid_interactome.

Clustering analysis was performed with clusterMaker [55], utilizing the Markov Clustering algorithm (MCL), an optimal choice for biological interaction networks assembled from high-throughput experiments. Different inflation values, between 1.8 and 3.0, were used during the clustering process (data not shown). The inflation value was finally set to 1.8, as it has been proved to be the most suitable for biological networks [50, 56], in consistency with the observation that values above 1.8, result in extreme network fragmentation and the creation of clusters with minor biological significance (See [Results and discussion](#)).

BiNGO [57], an application for Cytoscape and WebGestalt [58], an online server, were both used to perform a functional enrichment analysis of the network. BiNGO determines Gene Ontology (GO) [59] categories that are statistically overrepresented in a set of proteins in a biological network (e.g. a cluster), and thus, aids in the detection of functional modules. WebGestalt was used to further supplement this analysis, since, besides GO term it can perform Disease Association and KEGG pathway analysis. The hypergeometric method was used, and significance was set at an adjusted P-value of <0.05 for BiNGO and <0.01 for WebGestalt (Benjamini and Hochberg method). Significant categories, driven by only two or less proteins, were discarded due to the high potential for false signals in such cases. [S1 Fig](#) outlines the overall study design of the amyloid interactome ([S1 Fig](#)).

Results and discussion

The study of the dynamics, structure and function of protein-protein interaction networks (PPINs) has proven crucial for the understanding of many biological phenomena [60–63]. Hence, network theory is a sophisticated approach to study the puzzling phenomenon of amyloidogenicity. The amyloid interactome displays the interacting partners of *in vivo* amyloid forming proteins in a flat and detailed protein map ([Fig 1](#)). The results presented in this work, combine interactions from specialized networks of protein aggregation [34, 35, 37–40, 64] and eventually, assemble a new set of functionally unconnected proteins into a network that would possibly fill the missing pieces of protein aggregation and shed light towards the exploitation of novel disease protein-targets.

Construction of the amyloid interactome

In an effort to build the human amyloid interactome, *in vivo* amyloid-forming proteins were obtained from a peer-review library, published by Sipe et al. [2] ([Table 1](#)). Overall the protein-protein interaction network contains 353 protein nodes and 1178 protein-protein interaction edges, between them ([Fig 1](#)). Surprisingly, among the proteins listed in the network, 23 amyloidogenic proteins construct a giant connected component ([Fig 1](#), red nodes), whereas 13 proteins ([Fig 1](#), yellow nodes), recorded as *in vitro* amyloid-forming proteins and proteins related to amyloid fibril formation ([S1 Table](#)), are also identified. A list of these significant proteins is available in [Table 2](#). Among them, proteins forming intracellular inclusions bodies were reported (Tau, Actin, NACP, HD) [2], while proteins, found as co-deposits in the Alzheimer's disease, emerged (Apo-E, PS-1, PS-2, Tau) [65].

Notably, APro, an anterior pituitary hormone known to self-assemble into amyloid fibrils [66], did not manage to join the giant connected component created by the other 23 amyloidogenic proteins in the network, whilst the only interactor identified was the prolactin receptor ([Fig 1](#), right). This “detachment” of an important hormone together with the absence of AIAPP should receive a renewed emphasis [67]. Namely, for AIAPP no experimental verified partners were recorded, since only speculative approaches attempted to describe possible interaction partners [68]. AA1 and AA2 proteins, which can form amyloid fibrils after partial proteolysis [69], are important components of the High Density Lipoprotein (HDL) complex

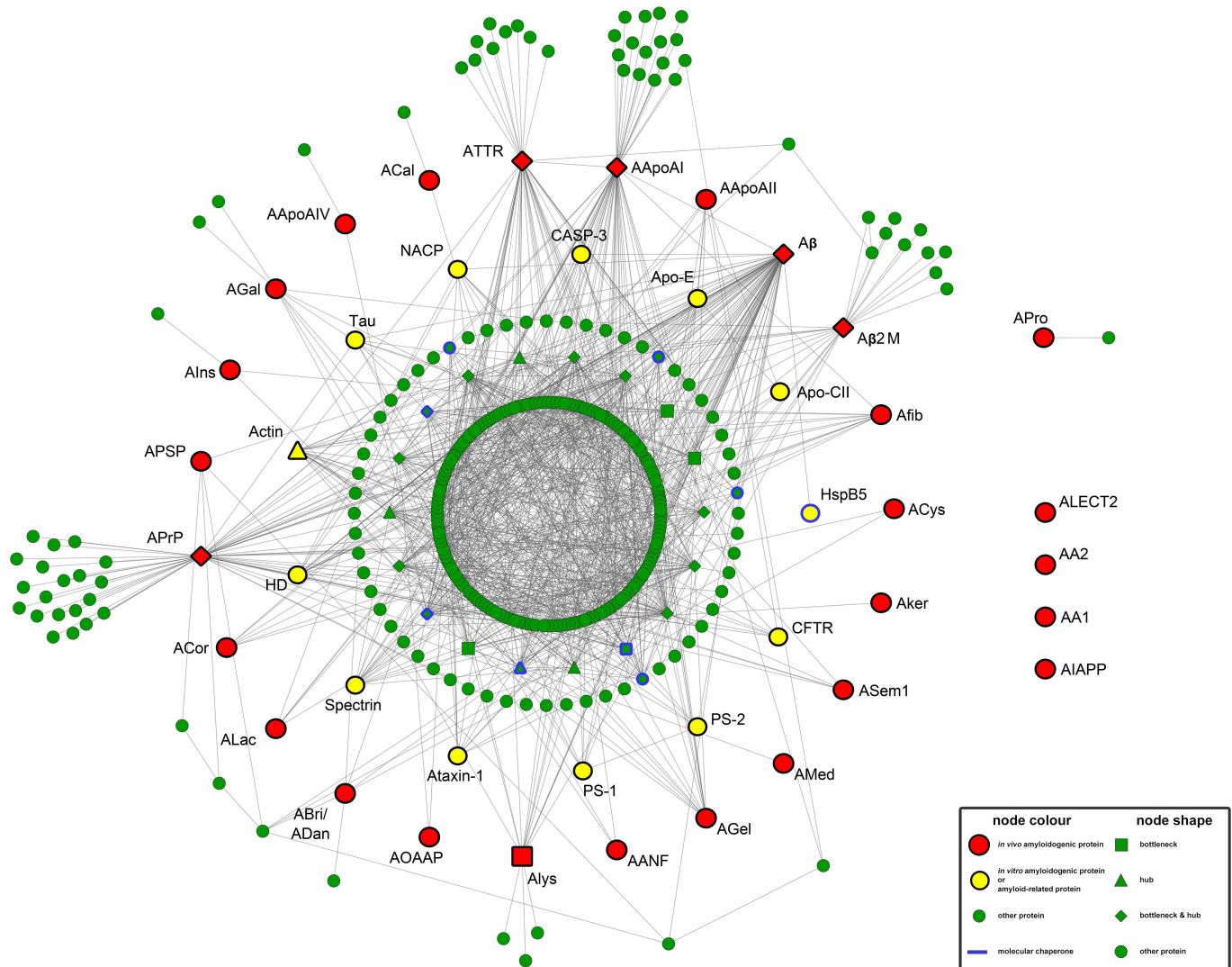


Fig 1. The amyloid interactome. Interaction data for the creation of this network were gathered from the publicly available database IntAct [45] and Cytoscape [51] was used as a visualization tool (Interactive network available at http://83.212.109.111/amyloid_interactome). The network consists of 353 nodes and 1178 edges. Proteins are depicted as nodes and interactions as edges. Red-coloured nodes represent known *in vivo* amyloidogenic proteins, whereas yellow-coloured nodes represent *in vitro* amyloid-forming proteins or proteins related to amyloid fibril formation (see also Tables 1 and 2). Green-coloured nodes are proteins, listed as other interaction partners. Hubs and bottlenecks are depicted as triangles (▲) and squares (■), respectively. Protein-nodes, which are both hubs and bottlenecks are shown as diamonds (◆). Important molecular chaperones are highlighted with a blue outline.

doi:10.1371/journal.pone.0173163.g001

[70]. However, direct interactions of AA1 and AA2 are not recorded in IntAct. Therefore, at first glance, the network which has emerged designates a correlation among the majority of otherwise unrelated *in vivo* and also *in vitro* amyloidogenic proteins, along with proteins related to amyloid fibril formation.

Network analysis based on graph theory

One of the most fruitful approaches to extract relative biological conclusions from the structure of the amyloid interactome is to computationally calculate its topological parameters.

Table 2. The dataset of 13 proteins related to amyloid fibril formation.

Protein Precursor Name*	Abbreviation	UniProt AC
<i>In vitro amyloid-forming protein precursors</i>		
alpha beta Crystallin (ABC)	HspB5	P02511
alpha-Synuclein	NACP	P37840
Apolipoprotein C-II	Apo-CII	P02655
Caspase-3 precursor	CASP-3	P42574
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	CFTR	P13569
Huntingtin (Polyq expanded)	HD	P42858
Presenilin 1	PS-1	P49768
Presenilin 2	PS-2	P49810
Spectrin SH3	Spectrin	Q13813
Tau	Tau	P10636
<i>Proteins related to amyloid fibril formation</i>		
Actin, cytoplasmic 1	Actin	P60709
Apolipoprotein E	Apo-E	P02649
Ataxin 1	Ataxin-1	P54253

*Protein nomenclature follows the most cited abbreviations in literature.

doi:10.1371/journal.pone.0173163.t002

Simple topology parameters. An assessment of simple topology parameters revealed intriguing information. A random graph with the same number of nodes and edges has been used as a “null model” to draw conclusions regarding certain topological traits of our network. In general, small-world graphs describe networks, where nodes can be reached from each other by traversing a small number of edges, and, thus their average path length is small and their clustering coefficient (transitivity) is high, compared to a random graph [71]. For the amyloid interactome, both the clustering coefficient (CC = 0.187) and the characteristic path length (CPL = 3.083) are higher and lower, respectively, than those of the corresponding random graph (CC = 0.003, CPL = 3.290), signifying that a small number of steps is needed, for one amyloidogenic protein to reach another. For example, Aβ can “reach” ATTR, by crossing AApoAI in only two (2) steps, verifying experimental data which pinpoint ATTR as a promising biomarker of the Alzheimer’s disease [72] (Fig 1, top). Furthermore, measuring the density of our network (0.019), a value lower than 0.1 was recorded, a result in accordance with other sparsely connected biological networks [73]. Since our network complies with all these criteria, we can safely conclude that it has small-world properties [74].

Complex topology parameters. In addition to having small-world features, biological networks are commonly scale-free [75]. The most important parameter to gain an insight on the scale-free nature of a biological network is the node degree distribution [76]. In our case, the distribution is of the following form:

$$P(k) = 117.86k^{-1.236} \tag{1}$$

decaying as a power law ($P(k) \sim k^{-\gamma}$). According to this finding, the network has scale-free properties [76] and specifically it consists of a few hubs (Fig 1, triangles and diamonds) connected with multiple nodes (S2A Fig). More importantly, hubs (S2 Table) seem to play a crucial role in our network, since the degree exponent (γ) is lower than 2 [77]. Generally, networks enriched with hubs, are robust against random node deletions [78, 79] as these disturbances do not affect the average path length severely (S2D Fig). Nevertheless, the removal of

particular hubs, such as the A β or APrP (Fig 1), can drastically alter the average path length and so, our network can be generally addressed as ‘robust yet fragile’ [80].

As shown in Fig 1, several proteins act as “bridges”, immediately connecting many, otherwise distantly or unconnected proteins in the network, thus, increasing the network’s interconnectivity (Fig 1, squares and diamonds). The influence of these “bridging” proteins is expressed with high betweenness centrality values, indicating their role as bottlenecks, key connectors for the communication of other important proteins in the interactome, like hubs [81, 82] (S2B Fig). S3 Table introduces the top 20 bottlenecks of the interactome.

Among the topological parameters mentioned above, node degree, and betweenness centrality distributions were carefully studied. Fifteen protein-nodes were identified as both hubs and bottlenecks, whereas 5 proteins have high degree (hubs) and 5 proteins have high betweenness centrality (bottlenecks). Impressively, 6 out of the 23 *in vivo* amyloidogenic proteins have a major contribution on the interactome, demonstrating their crucial role in the network (S2 and S3 Tables). Additionally, the amyloid interactome has an average clustering coefficient distribution, that follows approximately the scaling law $C(k) \sim k^{-1}$ (S2C Fig), indicating the ability of this network to form functional modules (clusters) with biological significance (See Clustering Analysis) [83]. Overall, the network analysis based on graph theory revealed that the amyloid interactome appears to be enriched with interactions between amyloidogenic proteins.

Finally, in order to further examine the role of selected and random perturbations in the stability of the amyloid interactome, we performed a “lethality” test [78]. A multistep procedure included the gradual removal of proteins, randomly (“failure”) and in descending order of node degree and betweenness centrality (“attacks”). The rapid increase in the network’s characteristic path length (CPL) during the targeted “attacks”, in contrast to the slow increase during its “failure”, puts emphasis on the significance of the removed proteins (S2D Fig).

The above analysis gave us valuable information regarding central components of the network (hubs and bottlenecks), ranging from single proteins to entire modules (S2 and S3 Tables). However, due to inevitable technical biases present in interaction data [84], all results produced from such analyses should be carefully examined. A β publication biases, for example, may lead to the overestimation of the role of certain constituents of the network, in expense of others. Graph theory based analysis combined with other validation approaches were utilized, in our case, to further address the aforementioned issues.

The amyloid interactome unravels interconnections between amyloidogenic proteins

In general, it is believed that disease-related proteins in a protein-protein interaction network are more interconnected than non-disease proteins [85], a claim in accordance with our findings. Fig 1 deciphers the complex interactions governing amyloidogenicity, by interconnecting well-characterized amyloidogenic proteins (red nodes) with a heterogeneous collection of proteins related to protein aggregation (yellow nodes). Nevertheless, it is possible to understand that not all proteins on the interactome were directly related, meaning that indirect links may occur. Consequently, amyloid forming proteins, such as Tau, NACP and HD, which were excluded from our initial seed-dataset (See Materials and methods), were ultimately retrieved during the interactome construction process (S3C Fig).

Impressively, the interaction network consolidates a number of human proteins, which have been shown to form amyloids *in vitro*. Frequently, *in vitro* aggregation assays are oriented towards protein segments, responsible to drive proteins from their native structure to the amyloid state, in place of full-length proteins [86]. Evidence at experimental level prove that

“aggregation-prone” segments are indeed sufficient to lure a protein precursor into forming typical amyloid fibrils, and thus, these full-length protein precursors are characterized as “amyloidogenic” [87]. Interconnections between *in vivo* (red nodes) and *in vitro* amyloid forming proteins or protein segments (HspB5, Apo-CII, PS-1, PS-2, Spectrin, See Table 2) may extend biological expectations, related to protein-aggregation (S3A Fig).

Looking deeper into the crowded topography of the amyloid interactome, a great variety of “amyloid-binding proteins” is included. These amyloid specific molecules are basically a list of divergent proteins, capable of interacting with assemblies, derived from amyloidogenic proteins [88–90]. A broad range of A β contributors, for example, includes molecular chaperones or co-chaperones, apolipoproteins and other amyloid-forming proteins, enhanced with various functional characteristics. Since cells have adapted a mechanism to avoid the accumulation of incorrectly folded proteins, the Gene Ontology (GO) term [59] enrichment analysis in the entire interactome revealed the overrepresentation of GO terms regarding regulatory mechanisms (positive or negative regulation), while the most important GO term recorded is “response to stress” (GO ID: 6950) (S4 Table and S4A Fig). In particular, knowledge of the biological role of non-amyloidogenic hubs and bottlenecks in our interactome (S3B Fig), is gathered and shown in S5 Table. As expected, proteins highly interconnected are involved in signal transduction and in several metabolic processes. Impressively, though, a vast amount of topologically important proteins is related with stress pathways, highlighting possible novel disease protein targets, mediating amyloidogenicity (See Rational Design of Protein Inhibitors).

The most abundant interaction detected is the one between amyloidogenic proteins and well-known regulatory proteins, the so-called chaperones (Fig 1). As Fig 1 illustrates, chaperones together with co-chaperones dynamically participate in the interactome (nodes with blue border). This finding was, more or less, an expected phenomenon, since molecular chaperones are molecules dedicated to suppress amyloid formation [91, 92] and usually have many interactors [93]. The expert review, by Yerbury & Kumita, presents an extended group of amyloid-specific chaperones and discusses their implications [94]. Our interaction network, apart from validating existing data, demonstrates that chaperones exhibit high connectivity and at the same time high betweenness centrality, meaning that a sudden removal of such a node would result to the elimination of many important interactions in the network (Fig 1 and S2D Fig). These findings are in accordance with previously published interaction networks, associated with aging [95] or stress [96], where chaperones participate as special constituents.

Clustering and functional enrichment analysis

Clustering analysis. The core of our study is the Amyloid Interactome, an interaction network represented as a large interconnected network with embedded functional sub-networks. Consequently, in order to further evaluate functional modules, a network clustering analysis was performed, utilizing the MCL algorithm [97]. The network was divided in 20 clusters, 11 of which composed of three or more nodes (Fig 2), while 9 contained only two proteins and were not further analyzed. The inflation value of 1.8 allowed the creation of compact clusters, preventing the network’s fragmentation.

The most important cluster, retrieved after the MCL implementation, consists of 186 protein-nodes (Fig 2, cluster 1). The results revealed the strong association between 7 *in vivo* amyloidogenic proteins (Fig 2, cluster 1—red nodes) and 13 proteins related to amyloid fibril formation (Fig 2, cluster 1—yellow nodes). Impressively, the full list of proteins included in the amyloid interactome and recorded as *in vitro* amyloid forming proteins or proteins related to amyloid fibril formation (Table 2), is solidly represented in this first cluster. This finding

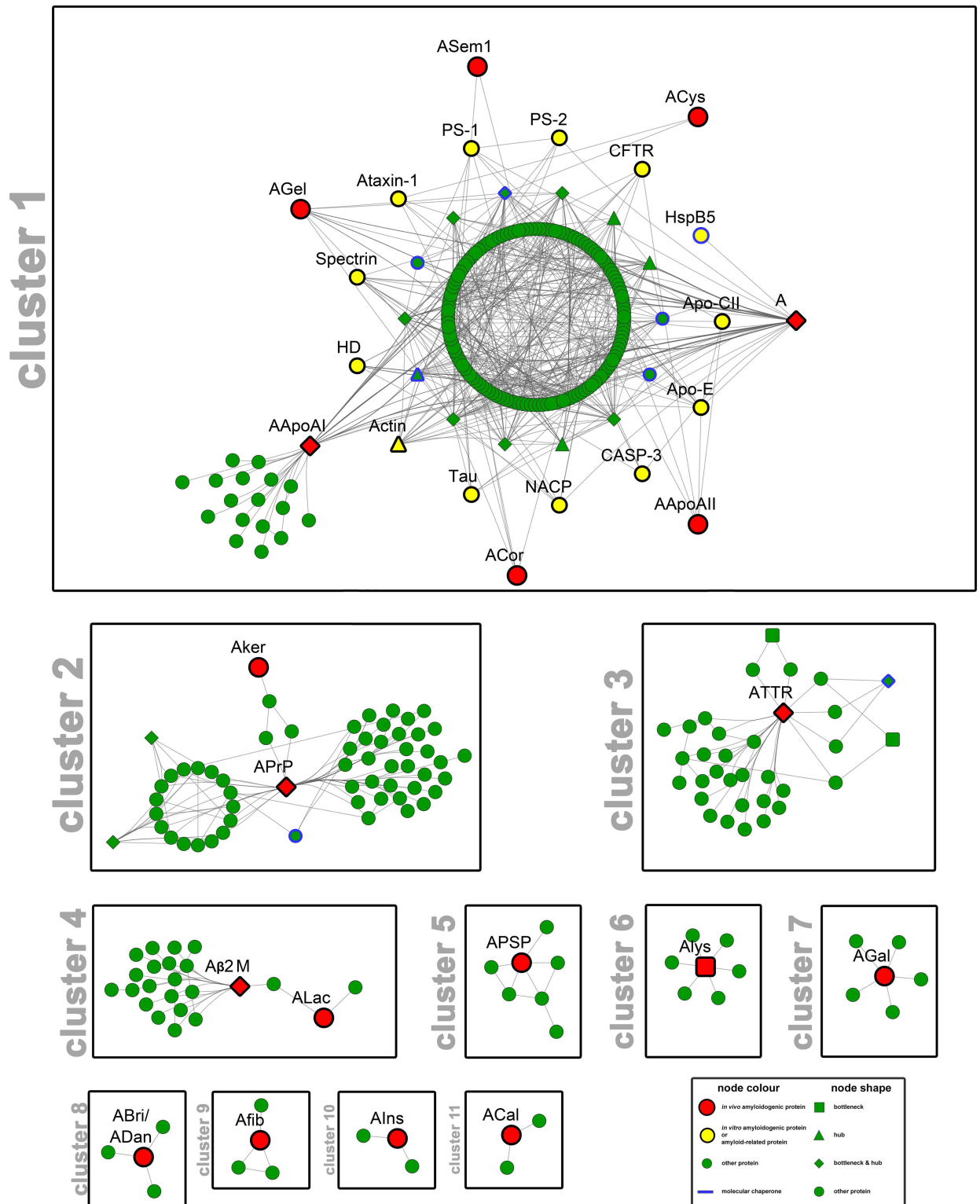


Fig 2. Clustering analysis of the amyloid interactome. The 11 clusters with 3 or more nodes of the amyloid interaction network, derived utilizing the MCL algorithm [97]. Cytoscape [51] was used as a visualization tool. The visual legend summarizes the shortcuts of node colour and node shape (See also Fig 1). The highly connected subnetwork of the first cluster within the amyloid interactome reveals the strong affinity between 7 amyloidogenic proteins (cluster 1—red nodes) and the integral representation of the proteins presented in Table 2 (cluster 1—yellow nodes) (Interactive cluster subnetworks available at http://83.212.109.111/amyloid_interactome).

doi:10.1371/journal.pone.0173163.g002

further validates the strong interconnection observed in our initial interaction network (Fig 1), implying that all these 13 proteins are likely important determinants of protein aggregation.

Notably, the most important subgroup of our interaction network (Fig 2, cluster 1) includes direct or indirect well-known amyloidogenic interaction partners of A β . Namely, amyloid forming Apolipoproteins (AApoAI, AApoAII) are catalytic binding partners [98], whereas ACys [16, 99] and AGel [100, 101] prevent A β from accumulation. Moreover, A β cooperated with 9 (HspB5, Spectrin, Actin, PS-1, PS-2, ApoE, CASP-3, Tau, NACP) out of the 13 proteins of Table 2, both in the entire network and the fragmented network, a finding that might stimulate new ideas about the nature of A β interactions.

The amyloidogenic proteins, APrP and AKer are located in the second cluster, together with Clusterin (Fig 2, cluster 2—node with blue border), an extracellular chaperone, present in disease-associated extracellular amyloid deposits [102] and a proteasome functional subunit (Proteasome subunit alpha type-3). The absence of Clusterin from cluster 1, though, has prompted increasing interest, since the well-studied molecular chaperone is an existing protein target for the Alzheimer's disease and so, we would expect a strong correlation with A β [103]. Nevertheless, MCL algorithm results point toward a possible relationship between Clusterin and Aker or APrp, a finding that remains to be elucidated. Additional proteins of this cluster are associated with transcriptional regulation and pre-mRNA splicing, since the over-expression of prions influences normal cellular proteins, participating in apoptosis or cell signaling [104]. Transthyretin, a potent inhibitor of A β [72], created a separate cluster together with Small ubiquitin-related modifier 3. The remaining complexes, consist of less than 7 nodes, where, with the exception of cluster 4, each one contains only one amyloidogenic protein (Fig 2, clusters 4–11).

Functional enrichment analysis. Functional interpretation of the data, derived from each cluster, was performed using BiNGO [57] and thus, statistically significant GO terms [59] were obtained for three functional categories (biological process, molecular function and cellular component). Due to the excess of information derived from this analysis, terms with great statistical and biological significance were manually selected to functionally characterize each cluster. Importantly, as mentioned before, similar subcategories with the entire network analysis resulted from the cluster functional analysis, and “response to stress” was the most significant function in the majority of the clusters (details of cluster 1 GO enrichment are shown in S6 Table). Therefore, it is apparent from all the above results that the amyloid interaction map locates in “spatial proximity” proteins related to stress (chaperones, co-chaperones and amyloidogenic proteins), which arise as a response to pathological conditions [88] (S4B Fig). Nevertheless, biological systems are dynamic, meaning that a complex succession of events may occur over the course of time, in contrast with a protein-protein interaction network. Therefore, certain events described on the amyloid interactome are based on a static system and thus, this analysis could produce certain artificial results that should be addressed carefully to draw biologically significant conclusions.

Pathway analysis and disease association. KEGG pathway analysis was performed, in an attempt to detect common metabolic pathways, in which the network's proteins participate. A complex series of signaling pathways including the MAPK signaling pathway, B-cell and T-cell signaling pathways and the insulin signaling pathway are associated with the network's proteins. Additional disease association analysis, conducted with WebGestalt [105], revealed significant associated disorders for every cluster. In the first cluster (Fig 2), for example, Tauopathies, Dementia and Alzheimer's disease constitute the most significant group of pathologies. Pinpointing the components of such disease pathways is a promising perspective and thus, a detailed analysis and a novel joined network of diseases related to amyloidoses is currently being under construction (research article in preparation).

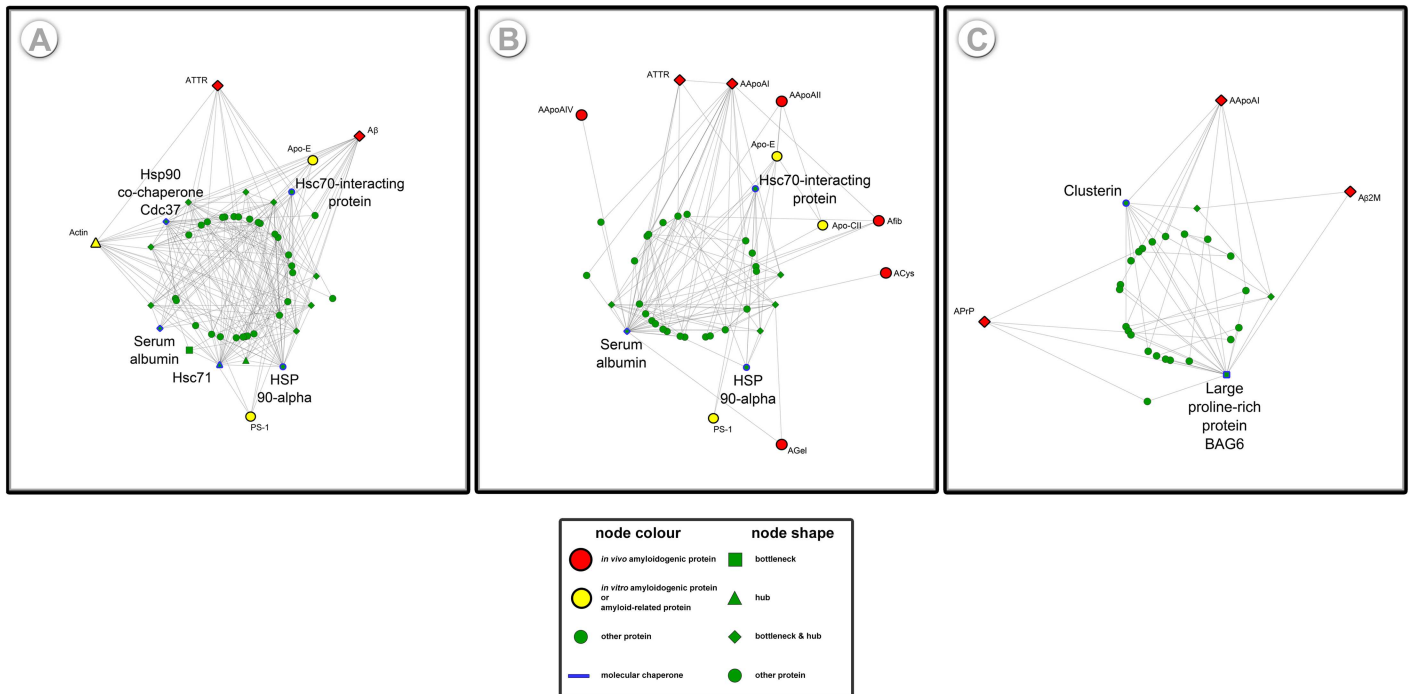


Fig 3. Subnetworks of molecular chaperones participating in the amyloid interactome. 3 important subnetworks were isolated from the entire amyloid interactome: (A) Subnetwork of Hsp90 co-chaperone Cdc37, Hsc70-interacting protein, Hsp 90-alpha, Hsc71 and their first neighbors, (B) Subnetwork of Serum albumin and Hsc70-interacting protein and their first neighbors and (C) Subnetwork of Clusterin, Large proline-rich protein BAG6 and their first neighbors. The aforementioned proteins, having chaperone or co-chaperone activity, were found to play a pivotal role in the integrity of the interactome (See section Network Analysis Based on Graph Theory). A highly selective and direct correlation of Serum albumin and 6 amyloidogenic proteins was observed (B), whereas indirect interactions between Serum albumin and 2 amyloidogenic proteins were recorded (A). Hsc70-interacting protein is a significant element of the interactome, since it conciliates interactions between Apolipoproteins and ACys or ATTR (A,B). Clusterin synergistically with Large proline-rich protein BAG6 interferes with APrp and Aβ2M (C). The finding that more than one chaperones mediate the interconnection between different amyloidogenic proteins deserves further investigation.

doi:10.1371/journal.pone.0173163.g003

It is important to note that a delicate feature of our interactome, and its subsequent fragmentation, is the vast amount of experimental data on Aβ peptide polymerization, owing to the worldwide prevalence of the Alzheimer’s disease and the shortage of data on other less studied amyloidogenic proteins.

Rational design of protein inhibitors

Moving a step forward it seems interesting to investigate the correlation between biological factors, participating in the amyloid interactome that could influence amyloidogenicity. To determine whether significant elements of the amyloid interactome might indicate common properties of good candidates to be targeted by therapy, hubs and bottlenecks were thoroughly examined (Fig 3).

An important group of proteins, dynamically participating in the interactome, is the group of molecular chaperones (S3D Fig). Their active role in controlling protein aggregation and their close relation to amyloidogenic proteins is the “hidden weapon” of the protein machinery and the reason why 4 out of 9 chaperones were recorded as hubs and bottlenecks in the amyloid interactome (Fig 1). The transient nature of real-time interactions between chaperones and their partners, though, results in unrealistic low connectivity, in signaling and mitochondrial protein–protein interaction networks [106].

Contradictory theories on whether chaperones are “guilty or innocent” during the protein aggregation process provoke an intense debate. In particular, several experimental studies revealed the co-localization of chaperones with various amyloidogenic proteins [107, 108], whereas other experimental work reported on the inhibitory properties of chaperones, when added during fibrillation [102, 109, 110]. Impressively, molecular chaperones have been shown to inhibit the formation of amyloid fibrils even when present at extremely sub-stoichiometric ratios, comparing to amyloid forming protein [111]. Fig 3 illustrates the interaction partners of selected molecular chaperones, prospect for the rational design of aggregation inhibitors. All characteristic path lengths for the subnetworks shown in Fig 3 are reduced approximately by one degree, in comparison with those of the entire amyloid interactome (CPL ~ 2.4). This result quantifies the great importance of chaperones as mediators of communication between amyloidogenic proteins.

Plasma proteins, on the other hand, is another promising group of protein-targets, considering that it includes proteins with many interaction partners, which have a wide range of physiological functions. Noteworthy, this group of proteins contains significant amyloidogenic components of the amyloid interactome, such as ATTR and A β 2M. Among them, Serum albumin is a co-chaperone with significant topological features in the amyloid interactome, since it acts both as a hub and a bottleneck (Fig 3A and 3B). As Fig 3 illustrates, Serum albumin interacts directly or indirectly with *in vivo* amyloidogenic proteins and proteins related to amyloid fibril formation (See Fig 3 legend for details).

Normally, Albumin is a prevalent transporter of human plasma, known to carry a wide range of molecules, but under *in vitro* conditions was found to self-assemble into typical amyloid fibrils [112]. Nevertheless, it is worth mentioning that Serum Albumin was absent from our initial non-redundant list of amyloidogenic proteins (S1 Table), since such an entry was not found recorded neither in our literature sources nor deposited in AmyLoad or UniProtKB. Despite the “aggregation-prone” nature of Albumin, the presence of this plasma protein promotes neuronal survival [113] or inhibits amyloid fibrillation in *in vitro* designed experiments [114], while according to the proteomic analysis, conducted by Hye et al., is an eligible biomarker for the Alzheimer’s Disease [115]. Therefore, because of its central role in the interactome (Fig 3A and 3B) and the previously recorded features as a potent inhibitor of fibrillation, it seems that human plasma Albumin is a challenging molecule, which might stimulate new ideas about the design of anti-amyloid drugs.

From the above discussion, we pinpointed hubs as the most competent candidates regarding the therapeutic intervention of amyloidogenicity. Opposing studies, though, suggest that proteins with low connectivity would be more efficient therapeutic targets for neurodegenerative diseases, since hubs are generally considered as “elegant features” for the robustness of an interactome [35]. Therefore, our computational approach should be followed by a variety of *in vitro*, cellular and *in vivo* experiments, in order to verify our speculations.

Conclusions

Given the complexity of the molecular mechanisms driving amyloid fibrillation, a frequently used strategy is directed towards studying amyloidogenicity at molecular level, although, this approach is not always feasible, due to the dynamics of protein misfolding. In this study, we attempted to answer the crucial question of amyloidogenicity, following the principles of systems biology, by assembling a group of “miscellaneous” proteins into a common biological interaction network. The amyloid interactome illustrates a united interaction network of critical hypotheses, regarding the irregular protein aggregation, since it represents an integrated protein map of *in vivo* amyloidogenic proteins, together with *in vitro* amyloid forming proteins

or proteins related to amyloid fibril formation. The amyloidogenic and non-amyloidogenic elements of the amyloid interactome eventually come together to form a complex “tapestry” of protein-protein interactions. Based on the complex network theory analysis, this network exhibits topological properties that are similar to other significant interaction networks. Surprisingly, our approach, apart from validating all previously experimentally verified direct or indirect protein interactions, allowed us to stress the importance of novel protein targets. Our integrated project has raised plentiful questions and could serve as the driving force to guide the experimental process in the challenging field of protein aggregation, even at the molecular level. Nevertheless, it should be addressed that the amyloid interactome was built based on the current knowledge of protein-protein interactions, meaning that there is a “publication bias” between over and understudied amyloidogenic proteins. Individual proteins should be carefully validated, utilizing the appropriate methodology, in order to enhance the significance of our observations. Therefore, the strength of the amyloid interactome lies in the perspective to identify key mediators of amyloidogenicity that could be targeted therapeutically.

Supporting information

S1 Fig. Study design workflow of the amyloid interactome. An overview of the basic protocol, used to create and analyze the amyloid interactome.
(TIF)

S2 Fig. Distributions for three complex topological parameters of the amyloid interactome and results from “Lethality Testing”. (A) **Node degree distribution** in log-log plot. The red line shows that the distribution decays as a power law ($P(k) = 117.86k^{-1.236}$). Nodes on the upper left corner of the chart (high node degree) are hubs in the amyloid interactome. (B) **Betweenness centrality distribution** with the horizontal axis in a logarithmic scale. Nodes on the right quarter of the chart (high betweenness centrality) are bottlenecks in the network. (C) **Average clustering coefficient distribution.** The red line shows that it follows approximately the scaling law ($C(k) = 0.816k^{-0.647}$), designating the network’s ability to form clusters. (D) **Lethality testing.** This chart shows the effect of the gradual removal of random nodes (blue circles) and the gradual removal of hubs (black triangles) and bottlenecks (grey squares), on the Characteristic Path Length (CPL) of the network (For detailed discussion please refer to [Results and discussion](#) section).
(TIF)

S3 Fig. Detailed features of the amyloid interactome. (A) Interactions between *in vivo* amyloidogenic proteins (red-coloured nodes) and *in vitro* amyloid forming proteins or proteins related to amyloid fibril formation (yellow-coloured nodes). (B) Yellow-coloured nodes represent *in vitro* amyloid forming proteins or proteins related to amyloid fibril formation and are a delicate feature of the amyloid interactome. (C) Representation of the key role of non-amyloidogenic hubs and bottlenecks in the amyloid interactome. Triangles are proteins acting as hubs, squares are proteins acting as bottlenecks and diamonds are proteins acting as both. (D) Nodes with blue borders represent proteins characterized as chaperones or co-chaperones (Interactive network available at http://83.212.109.111/amyloid_interactome).
(TIF)

S4 Fig. GO functional analysis of enriched terms in the biological process ontology for the entire amyloid interactome and the first cluster. Functionally grouped networks of enriched categories were generated both for the amyloid interactome (A) and cluster 1 (B). GO terms are represented as nodes. The colour gradient of each circle corresponds to the p-value of the associated GO term. White-coloured nodes are not statistically significant nodes, but are

parent nodes of statistically significant GO terms. Different node sizes are indicative of varying frequencies of the proteins correlated with each GO term (See [S4](#) and [S6](#) Tables).

(TIF)

S1 Table. The non-redundant, detailed catalogue of *in vivo* and *in vitro* amyloidogenic proteins or peptide fragments or proteins related to amyloid fibril formation. This extended list of proteins includes proteins known to self-assemble into typical amyloid fibrils *in vivo*, along with intracellular inclusions with known biochemical composition, published by Sipe *et al.* in 2014 [2]. In addition to this, the list includes proteins which form amyloid fibrils *in vitro* [45], protein segments obtained from AmyLoad [5] and finally, UniProtKB entries [46] of proteins related to amyloid fibril formation. A UniProtKB Accession Number is provided for each protein. The original source library of each protein is tagged with a cross (+). The Digital Object Identifier (DOI) code is provided, when it is available (See [Materials and methods](#)).
(PDF)

S2 Table. The top 20 hubs of the amyloid interactome. The 20 proteins with the highest node degrees are considered as hubs in the amyloid interactome. 6 of these proteins belong to the dataset of the amyloidogenic proteins, described in [S1 Table](#), whilst the rest of the hubs exhibit numerous functions, acting mainly as chaperones, signal transducers or structural constituent of the cell (See [Results and discussion](#)).
(PDF)

S3 Table. The top 20 bottlenecks of the amyloid interactome. The 20 proteins with the highest betweenness centralities are considered bottlenecks in the amyloid interactome. 6 of these proteins belong to the dataset of the amyloidogenic proteins, described in [S1 Table](#). 15 bottlenecks exhibit high node degree values and are also considered as hubs in this network ([S2 Table](#)).
(PDF)

S4 Table. Amyloid interactome GO term enrichment. A p-value of 10E-14 was set as a gathering threshold for Biological Process and Cellular Component, whereas a value of 10E-8 was set as threshold for Molecular Function. Proteins of the entire amyloid interactome were subjected to a GO term enrichment analysis using BiNGO [56]. The UniProtKB ACs of proteins that are characterized by overrepresented GO terms in the entire amyloid interactome are given in this table, along with their number and their frequency in the network. The adjusted p-value suggests the importance of these GO terms in the proteins of the amyloid interactome.
(PDF)

S5 Table. GO Terms enrichment of the 18 important, non-amyloidogenic hubs and bottlenecks identified on the amyloid interactome. The majority of proteins, which are characterised as hubs and bottlenecks are involved in signal transduction and in several metabolic processes. The most abundant GO term, though, is response to stress, in accordance with the most represented group of the amyloid interactome (See [S4 Table](#)).
(PDF)

S6 Table. Enriched GO categories of Cluster 1, derived from the amyloid interactome. Enriched categories for Biological Process are those with $p < 10E-12$, for Cellular Component with $p < 10E-14$ and for Molecular Function with $p < 10E-8$. Proteins of the first cluster of the amyloid interactome were subjected to a GO term enrichment analysis using BiNGO [56]. The UniProtKB ACs of proteins that are characterized by overrepresented GO terms in this cluster are given in this table, along with their number and their frequency in the network.

The adjusted p-value suggests the importance of these GO terms in the proteins of cluster 1. (PDF)

S1 File. Web application user guide. Detailed description of the structure of the interactive Amyloid Interactome–Web application is available at http://83.212.109.111/amyloid_interactome.

(PDF)

Acknowledgments

This project was financially supported by the Greek State Scholarships Foundation, through the Program: “RESEARCH PROJECTS FOR EXCELLENCE IKY/SIEMENS” (2015–2017).

Author Contributions

Conceptualization: PLT KCN SJH VAI.

Data curation: PLT KCN KVB.

Formal analysis: KCN KVB.

Funding acquisition: VAI.

Investigation: PLT KCN KVB CVM.

Methodology: PLT KCN.

Project administration: SJH VAI.

Resources: VAI.

Software: KCN.

Supervision: VAI.

Visualization: PLT KCN KVB.

Writing – original draft: PLT KCN KVB SJH VAI.

References

1. Fandrich M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2007; 64(16):2066–78. doi: [10.1007/s00018-007-7110-2](https://doi.org/10.1007/s00018-007-7110-2) PMID: [17530168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17530168/)
2. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, et al. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2014; 21(4):221–4.
3. Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(7):3590–4. PMID: [10097081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10097081/)
4. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2007; 159:1–77. doi: [10.1007/112_2007_0701](https://doi.org/10.1007/112_2007_0701) PMID: [17846922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17846922/)
5. Bergman P, Roan NR, Romling U, Bevins CL, Munch J. Amyloid formation: functional friend or fearful foe? *Journal of internal medicine*. 2016; 280(2):139–52. doi: [10.1111/joim.12479](https://doi.org/10.1111/joim.12479) PMID: [27151743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27151743/)
6. Iconomidou VA, Vriend G, Hamodrakas SJ. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS letters*. 2000; 479(3):141–5. PMID: [10981723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10981723/)

7. Wozniak PP, Kotulska M. AmyLoad: website dedicated to amyloidogenic protein fragments. *Bioinformatics*. 2015; 31(20):3395–7. doi: [10.1093/bioinformatics/btv375](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv375) PMID: [26088800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26088800/)
8. Pawlicki S, Le Behec A, Delamarche C. AMYPdb: a database dedicated to amyloid precursor proteins. *BMC bioinformatics*. 2008; 9:273. doi: [10.1186/1471-2105-9-273](https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-273) PMID: [18544157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18544157/)
9. Beerten J, Van Durme J, Gallardo R, Capriotti E, Serpell L, Rousseau F, et al. WALTZ-DB: a benchmark database of amyloidogenic hexapeptides. *Bioinformatics*. 2015; 31(10):1698–700. doi: [10.1093/bioinformatics/btv027](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv027) PMID: [25600945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25600945/)
10. Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, Ivanova MI, Baker D, Eisenberg D. The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(11):4074–8. doi: [10.1073/pnas.0511295103](https://doi.org/10.1073/pnas.0511295103) PMID: [16537487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16537487/)
11. Goldschmidt L, Teng PK, Riek R, Eisenberg D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(8):3487–92. doi: [10.1073/pnas.0915166107](https://doi.org/10.1073/pnas.0915166107) PMID: [20133726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133726/)
12. Uversky V, Talapatra A, Gillespie JR, Fink AL. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Part I. Systemic amyloidosis. *Medical Science Monitor*. 1999; 5(5):1001–12.
13. Uversky V, Talapatra A, Gillespie JR, Fink AL. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Part II. Localized amyloidosis and neurodegenerative disorders. *Medical Science Monitor*. 1999; 5(6):1238–54.
14. Bergstrom J, Murphy CL, Weiss DT, Solomon A, Sletten K, Hellman U, et al. Two different types of amyloid deposits—apolipoprotein A-IV and transthyretin—in a patient with systemic amyloidosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004; 84(8):981–8. doi: [10.1038/labinvest.3700124](https://doi.org/10.1038/labinvest.3700124) PMID: [15146166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15146166/)
15. de Sousa MM, Vital C, Ostler D, Fernandes R, Pouget-Abadie J, Carles D, et al. Apolipoprotein AI and transthyretin as components of amyloid fibrils in a kindred with apoAI Leu178His amyloidosis. *The American journal of pathology*. 2000; 156(6):1911–7. doi: [10.1016/S0002-9440\(10\)65064-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65064-X) PMID: [10854214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10854214/)
16. Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, et al. Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2001; 60(1):94–104. PMID: [11202179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11202179/)
17. Morales R, Moreno-Gonzalez I, Soto C. Cross-seeding of misfolded proteins: implications for etiology and pathogenesis of protein misfolding diseases. *PLoS pathogens*. 2013; 9(9):e1003537. doi: [10.1371/journal.ppat.1003537](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003537) PMID: [24068917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24068917/)
18. Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, Mizuno H, et al. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PloS one*. 2008; 3(9):e3135. doi: [10.1371/journal.pone.0003135](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003135) PMID: [18769546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18769546/)
19. Guo JP, Arai T, Miklossy J, McGeer PL. Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(6):1953–8. doi: [10.1073/pnas.0509386103](https://doi.org/10.1073/pnas.0509386103) PMID: [16446437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16446437/)
20. Morales R, Estrada LD, Diaz-Espinoza R, Morales-Scheihing D, Jara MC, Castilla J, et al. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010; 30(13):4528–35.
21. Yan J, Fu X, Ge F, Zhang B, Yao J, Zhang H, et al. Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils and protein A amyloid fibrils. *The American journal of pathology*. 2007; 171(1):172–80. doi: [10.2353/ajpath.2007.060576](https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060576) PMID: [17591964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17591964/)
22. Westermark GT, Westermark P. Transthyretin and amyloid in the islets of Langerhans in type-2 diabetes. *Experimental diabetes research*. 2008; 2008:429274. doi: [10.1155/2008/429274](https://doi.org/10.1155/2008/429274) PMID: [18825272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18825272/)
23. Ulbrich L, Cozzolino M, Marini ES, Amori I, De Jaco A, Carri MT, et al. Cystatin B and SOD1: protein-protein interaction and possible relation to neurodegeneration. *Cellular and molecular neurobiology*. 2014; 34(2):205–13. doi: [10.1007/s10571-013-0004-y](https://doi.org/10.1007/s10571-013-0004-y) PMID: [24234043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24234043/)
24. Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*. 2001; 293(5534):1491–5. doi: [10.1126/science.1062097](https://doi.org/10.1126/science.1062097) PMID: [11520988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11520988/)
25. Levy E. Cystatin C: a potential target for Alzheimer's treatment. *Expert review of neurotherapeutics*. 2008; 8(5):687–9. doi: [10.1586/14737175.8.5.687](https://doi.org/10.1586/14737175.8.5.687) PMID: [18457524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18457524/)
26. Cusick ME, Klitgord N, Vidal M, Hill DE. Interactome: gateway into systems biology. *Human molecular genetics*. 2005; 14 Spec No. 2:R171–81.

27. Bader S, Kuhner S, Gavin AC. Interaction networks for systems biology. *FEBS letters*. 2008; 582(8):1220–4. doi: [10.1016/j.febslet.2008.02.015](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.015) PMID: [18282471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18282471/)
28. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*. 2005; 122(6):957–68. doi: [10.1016/j.cell.2005.08.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.029) PMID: [16169070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16169070/)
29. Rhodes DR, Chinnaiyan AM. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nature genetics*. 2005; 37 Suppl:S31–7.
30. Gunsalus KC, Ge H, Schetter AJ, Goldberg DS, Han JD, Hao T, et al. Predictive models of molecular machines involved in *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis. *Nature*. 2005; 436(7052):861–5. doi: [10.1038/nature03876](https://doi.org/10.1038/nature03876) PMID: [16094371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16094371/)
31. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*. 2005; 437(7062):1173–8. doi: [10.1038/nature04209](https://doi.org/10.1038/nature04209) PMID: [16189514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16189514/)
32. Ge H, Walhout AJ, Vidal M. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends in genetics: TIG*. 2003; 19(10):551–60. doi: [10.1016/j.tig.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.08.009) PMID: [14550629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14550629/)
33. Petta I, Lievens S, Libert C, Tavernier J, De Bosscher K. Modulation of Protein-Protein Interactions for the Development of Novel Therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2016; 24(4):707–18.
34. Chen JY, Shen C, Sivachenko AY. Mining Alzheimer disease relevant proteins from integrated protein interactome data. *Pacific Symposium on Biocomputing Pacific Symposium on Biocomputing*. 2006:367–78.
35. Goni J, Esteban FJ, de Mendizabal NV, Sepulcre J, Ardanza-Trevijano S, Agirrezabal I, et al. A computational analysis of protein-protein interaction networks in neurodegenerative diseases. *BMC systems biology*. 2008; 2:52. doi: [10.1186/1752-0509-2-52](https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-52) PMID: [18570646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18570646/)
36. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *International journal of proteomics*. 2014; 2014:147648. doi: [10.1155/2014/147648](https://doi.org/10.1155/2014/147648) PMID: [24693427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24693427/)
37. Tourette C, Li B, Bell R, O'Hare S, Kaltenbach LS, Mooney SD, et al. A large scale Huntingtin protein interaction network implicates Rho GTPase signaling pathways in Huntington disease. *The Journal of biological chemistry*. 2014; 289(10):6709–26. doi: [10.1074/jbc.M113.523696](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523696) PMID: [24407293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24407293/)
38. Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, et al. The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2008; 7(1):15–34.
39. Silva JV, Yoon S, Domingues S, Guimaraes S, Goltsev AV, da Cruz ESEF, et al. Amyloid precursor protein interaction network in human testis: sentinel proteins for male reproduction. *BMC bioinformatics*. 2015; 16:12. doi: [10.1186/s12859-014-0432-9](https://doi.org/10.1186/s12859-014-0432-9) PMID: [25591988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25591988/)
40. Virok DP, Simon D, Bozso Z, Rajko R, Datki Z, Balint E, et al. Protein array based interactome analysis of amyloid-beta indicates an inhibition of protein translation. *Journal of proteome research*. 2011; 10(4):1538–47. doi: [10.1021/pr1009096](https://doi.org/10.1021/pr1009096) PMID: [21244100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21244100/)
41. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP. Amyloid peptides and proteins in review. In: Amara SG, Bamberg E, Fleischmann B, Gudermann T, Hebert SC, Jahn R, et al., editors. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 1–77.
42. UniProt C. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*. 2015; 43(Database issue): D204–12. doi: [10.1093/nar/gku989](https://doi.org/10.1093/nar/gku989) PMID: [25348405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25348405/)
43. D'Souza A, Theis JD, Vrana JA, Dogan A. Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration. *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2014; 21(2):71–5.
44. Isobe T. AA amyloidosis and AL amyloidosis. *Internal medicine*. 1993; 32(12):919–20. PMID: [8204969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8204969/)
45. Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Lewington C, Mudali S, Kerrien S, Orchard S, et al. IntAct: an open source molecular interaction database. *Nucleic acids research*. 2004; 32(Database issue): D452–5. doi: [10.1093/nar/gkh052](https://doi.org/10.1093/nar/gkh052) PMID: [14681455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14681455/)
46. Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic acids research*. 2006; 34(Database issue):D535–9. doi: [10.1093/nar/gkj109](https://doi.org/10.1093/nar/gkj109) PMID: [16381927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16381927/)
47. von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic acids research*. 2003; 31(1):258–61. Epub 2003/01/10. PMID: [12519996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12519996/)

48. Licata L, Orchard S. The MIntAct Project and Molecular Interaction Databases. *Methods in molecular biology*. 2016; 1415:55–69. doi: [10.1007/978-1-4939-3572-7_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3572-7_3) PMID: [27115627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27115627/)
49. Kerrien S, Orchard S, Montecchi-Palazzi L, Aranda B, Quinn AF, Vinod N, et al. Broadening the horizon—level 2.5 of the HUPO-PSI format for molecular interactions. *BMC biology*. 2007; 5:44. doi: [10.1186/1741-7007-5-44](https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-44) PMID: [17925023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17925023/)
50. Nastou KC, Tsaousis GN, Kremizas KE, Litou ZI, Hamodrakas SJ. The human plasma membrane peripherome: visualization and analysis of interactions. *BioMed research international*. 2014; 2014:397145. doi: [10.1155/2014/397145](https://doi.org/10.1155/2014/397145) PMID: [25057483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057483/)
51. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003; 13(11):2498–504. doi: [10.1101/gr.1239303](https://doi.org/10.1101/gr.1239303) PMID: [14597658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14597658/)
52. Lotia S, Montojo J, Dong Y, Bader GD, Pico AR. Cytoscape app store. *Bioinformatics*. 2013; 29(10):1350–1. Epub 2013/04/19. doi: [10.1093/bioinformatics/btt138](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt138) PMID: [23595664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23595664/)
53. Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*. 2008; 24(2):282–4. doi: [10.1093/bioinformatics/btm554](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm554) PMID: [18006545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006545/)
54. Franz M, Lopes CT, Huck G, Dong Y, Sumer O, Bader GD. Cytoscape.js: a graph theory library for visualisation and analysis. *Bioinformatics*. 2016; 32(2):309–11. doi: [10.1093/bioinformatics/btv557](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv557) PMID: [26415722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26415722/)
55. Morris JH, Apeltsin L, Newman AM, Baumbach J, Wittkop T, Su G, et al. clusterMaker: a multi-algorithm clustering plugin for Cytoscape. *BMC bioinformatics*. 2011; 12:436. doi: [10.1186/1471-2105-12-436](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-436) PMID: [22070249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22070249/)
56. Brohee S, van Helden J. Evaluation of clustering algorithms for protein-protein interaction networks. *BMC bioinformatics*. 2006; 7:488. doi: [10.1186/1471-2105-7-488](https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-488) PMID: [17087821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17087821/)
57. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005; 21(16):3448–9. doi: [10.1093/bioinformatics/bti551](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551) PMID: [15972284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15972284/)
58. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research*. 2013; 41(Web Server issue):W77–83. doi: [10.1093/nar/gkt439](https://doi.org/10.1093/nar/gkt439) PMID: [23703215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23703215/)
59. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 2000; 25(1):25–9. doi: [10.1038/75556](https://doi.org/10.1038/75556) PMID: [10802651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802651/)
60. Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell death and differentiation*. 2010; 17(6):901–11. doi: [10.1038/cdd.2010.35](https://doi.org/10.1038/cdd.2010.35) PMID: [20379196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20379196/)
61. Vinayagam A, Zirin J, Roesel C, Hu Y, Yilmazel B, Samsonova AA, et al. Integrating protein-protein interaction networks with phenotypes reveals signs of interactions. *Nature methods*. 2014; 11(1):94–9. doi: [10.1038/nmeth.2733](https://doi.org/10.1038/nmeth.2733) PMID: [24240319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24240319/)
62. Fukuyama H, Verdier Y, Guan Y, Makino-Okamura C, Shilova V, Liu X, et al. Landscape of protein-protein interactions in *Drosophila* immune deficiency signaling during bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110(26):10717–22. doi: [10.1073/pnas.1304380110](https://doi.org/10.1073/pnas.1304380110) PMID: [23749869](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23749869/)
63. Schwikowski B, Uetz P, Fields S. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nature biotechnology*. 2000; 18(12):1257–61. doi: [10.1038/82360](https://doi.org/10.1038/82360) PMID: [11101803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11101803/)
64. Rao L, Zhang IY, Guo W, Feng L, Meggers E, Xu X. Nonfitting protein-ligand interaction scoring function based on first-principles theoretical chemistry methods: development and application on kinase inhibitors. *Journal of computational chemistry*. 2013; 34(19):1636–46. doi: [10.1002/jcc.23303](https://doi.org/10.1002/jcc.23303) PMID: [23681957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23681957/)
65. Carter DB. The interaction of amyloid-beta with ApoE. *Sub-cellular biochemistry*. 2005; 38:255–72. PMID: [15709483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15709483/)
66. Westermark P, Eriksson L, Engstrom U, Enestrom S, Sletten K. Prolactin-derived amyloid in the aging pituitary gland. *The American journal of pathology*. 1997; 150(1):67–73. PMID: [9006323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9006323/)
67. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 2009; 325(5938):328–32. doi: [10.1126/science.1173155](https://doi.org/10.1126/science.1173155) PMID: [19541956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19541956/)
68. Wiltzius JJ, Sievers SA, Sawaya MR, Eisenberg D. Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2009; 18(7):1521–30.

69. Lu J, Yu Y, Zhu I, Cheng Y, Sun PD. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(14):5189–94. doi: [10.1073/pnas.1322357111](https://doi.org/10.1073/pnas.1322357111) PMID: [24706838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24706838/)
70. Eriksen N, Benditt EP. Isolation and characterization of the amyloid-related apoprotein (SAA) from human high density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980; 77(11):6860–4. PMID: [6161374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6161374/)
71. Fronczak A, Fronczak P, Holyst JA. Average path length in random networks. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2004; 70(5 Pt 2):056110. doi: [10.1103/PhysRevE.70.056110](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.70.056110) PMID: [15600695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15600695/)
72. Velayudhan L, Killick R, Hye A, Kinsey A, Guntert A, Lynham S, et al. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2012; 28(2):369–75. doi: [10.3233/JAD-2011-110611](https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110611) PMID: [22002789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22002789/)
73. Leclerc RD. Survival of the sparsest: robust gene networks are parsimonious. *Molecular systems biology*. 2008; 4:213. doi: [10.1038/msb.2008.52](https://doi.org/10.1038/msb.2008.52) PMID: [18682703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18682703/)
74. Xiao Fan W, Guanrong C. Complex networks: small-world, scale-free and beyond. *IEEE Circuits and Systems Magazine*. 2003; 3(1):6–20.
75. Li X, Chen H, Huang Z, Su H, Martinez JD. Global mapping of gene/protein interactions in PubMed abstracts: a framework and an experiment with P53 interactions. *Journal of biomedical informatics*. 2007; 40(5):453–64. doi: [10.1016/j.jbi.2007.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jbi.2007.01.001) PMID: [17317333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17317333/)
76. Barabasi AL, Albert R. Emergence of scaling in random networks. *Science*. 1999; 286(5439):509–12. PMID: [10521342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10521342/)
77. Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews Genetics*. 2004; 5(2):101–13. doi: [10.1038/nrg1272](https://doi.org/10.1038/nrg1272) PMID: [14735121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14735121/)
78. Albert R, Jeong H, Barabasi AL. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature*. 2000; 406(6794):378–82. doi: [10.1038/35019019](https://doi.org/10.1038/35019019) PMID: [10935628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10935628/)
79. Yook SH, Jeong H, Barabasi AL. Modeling the Internet's large-scale topology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(21):13382–6. doi: [10.1073/pnas.172501399](https://doi.org/10.1073/pnas.172501399) PMID: [12368484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12368484/)
80. Doyle JC, Alderson DL, Li L, Low S, Roughan M, Shalunov S, et al. The "robust yet fragile" nature of the Internet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(41):14497–502. doi: [10.1073/pnas.0501426102](https://doi.org/10.1073/pnas.0501426102) PMID: [16204384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204384/)
81. Jalili M, Askari Sichani O, Yu X. Optimal pinning controllability of complex networks: dependence on network structure. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2015; 91(1):012803. doi: [10.1103/PhysRevE.91.012803](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.91.012803) PMID: [25679653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25679653/)
82. Joy MP, Brock A, Ingber DE, Huang S. High-betweenness proteins in the yeast protein interaction network. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2005; 2005(2):96–103.
83. Ravasz E, Somera AL, Mongru DA, Oltvai ZN, Barabasi AL. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*. 2002; 297(5586):1551–5. doi: [10.1126/science.1073374](https://doi.org/10.1126/science.1073374) PMID: [12202830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12202830/)
84. Gillis J, Ballouz S, Pavlidis P. Bias tradeoffs in the creation and analysis of protein-protein interaction networks. *Journal of proteomics*. 2014; 100:44–54. doi: [10.1016/j.jprot.2014.01.020](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.020) PMID: [24480284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24480284/)
85. Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL. The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104(21):8685–90. doi: [10.1073/pnas.0701361104](https://doi.org/10.1073/pnas.0701361104) PMID: [17502601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17502601/)
86. Lopez de la Paz M, Serrano L. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(1):87–92. doi: [10.1073/pnas.2634884100](https://doi.org/10.1073/pnas.2634884100) PMID: [14691246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14691246/)
87. Teng PK, Eisenberg D. Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein engineering, design & selection: PEDS*. 2009; 22(8):531–6.
88. Huang L, Liu X, Cheng B, Huang K. How our bodies fight amyloidosis: effects of physiological factors on pathogenic aggregation of amyloidogenic proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2015; 568:46–55. doi: [10.1016/j.abb.2015.01.007](https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.007) PMID: [25615529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25615529/)
89. Calero M, Rostagno A, Ghiso J. Search for amyloid-binding proteins by affinity chromatography. *Methods in molecular biology*. 2012; 849:213–23. doi: [10.1007/978-1-61779-551-0_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-551-0_15) PMID: [22528093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22528093/)
90. Gunawardana CG, Mehrabian M, Wang X, Mueller I, Lubambo IB, Jonkman JE, et al. The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2015; 14(11):3000–14.

91. Carver JA, Rekas A, Thorn DC, Wilson MR. Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB life*. 2003; 55(12):661–8. doi: [10.1080/15216540310001640498](https://doi.org/10.1080/15216540310001640498) PMID: [14769002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14769002/)
92. Landreh M, Rising A, Presto J, Jornvall H, Johansson J. Specific chaperones and regulatory domains in control of amyloid formation. *The Journal of biological chemistry*. 2015; 290(44):26430–6. doi: [10.1074/jbc.R115.653097](https://doi.org/10.1074/jbc.R115.653097) PMID: [26354437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26354437/)
93. Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*. 1991; 60:321–47. doi: [10.1146/annurev.bi.60.070191.001541](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001541) PMID: [1679318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1679318/)
94. Yerbury JJ, Kumita JR. Protein chemistry of amyloid fibrils and chaperones: implications for amyloid formation and disease. *Current Chemical Biology*. 2010; 4(2):89–98.
95. Soti C, Csermely P. Aging cellular networks: chaperones as major participants. *Experimental gerontology*. 2007; 42(1–2):113–9. doi: [10.1016/j.exger.2006.05.017](https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.05.017) PMID: [16814508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16814508/)
96. Palotai R, Szalay MS, Csermely P. Chaperones as integrators of cellular networks: changes of cellular integrity in stress and diseases. *IUBMB life*. 2008; 60(1):10–8. doi: [10.1002/iub.8](https://doi.org/10.1002/iub.8) PMID: [18379988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18379988/)
97. van Dongen S. Graph clustering by flow simulation [PhD]: Universiteit Utrecht; 2000.
98. Koudinov AR, Berezov TT, Kumar A, Koudinova NV. Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1998; 270(2):75–84. PMID: [9544446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9544446/)
99. Tizon B, Ribe EM, Mi W, Troy CM, Levy E. Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2010; 19(3):885–94. doi: [10.3233/JAD-2010-1291](https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1291) PMID: [20157244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20157244/)
100. Chauhan VP, Ray I, Chauhan A, Wisniewski HM. Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999; 258(2):241–6. doi: [10.1006/bbrc.1999.0623](https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0623) PMID: [10329371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10329371/)
101. Ray I, Chauhan A, Wegiel J, Chauhan VP. Gelsolin inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils. *Brain research*. 2000; 853(2):344–51. PMID: [10640633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10640633/)
102. Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, et al. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007; 21(10):2312–22.
103. Wilhelmus MM, de Waal RM, Verbeek MM. Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-Beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*. 2007; 35(3):203–16. doi: [10.1007/s12035-007-0029-7](https://doi.org/10.1007/s12035-007-0029-7) PMID: [17917109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17917109/)
104. Antony H, Wiegman AP, Wei MQ, Chernoff YO, Khanna KK, Munn AL. Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2012; 31(1–2):1–19. doi: [10.1007/s10555-011-9325-9](https://doi.org/10.1007/s10555-011-9325-9) PMID: [22138778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22138778/)
105. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research*. 2005; 33(Web Server issue):W741–8. doi: [10.1093/nar/gki475](https://doi.org/10.1093/nar/gki475) PMID: [15980575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980575/)
106. Csermely P, Korcsmaros T, Kovacs IA, Szalay MS, Soti C. Systems biology of molecular chaperone networks. *Novartis Foundation symposium*. 2008;291:45–54; discussion -8, 137–40.
107. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*. 2001; 29(1):15–32. PMID: [11182078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11182078/)
108. Wilhelmus MM, Boelens WC, Kox M, Maat-Schieman ML, Veerhuis R, de Waal RM, et al. Small heat shock proteins associated with cerebral amyloid angiopathy of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type) induce interleukin-6 secretion. *Neurobiology of aging*. 2009; 30(2):229–40. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.001](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.001) PMID: [17629591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17629591/)
109. Arimon M, Grimminger V, Sanz F, Lashuel HA. Hsp104 targets multiple intermediates on the amyloid pathway and suppresses the seeding capacity of Aβeta fibrils and protofibrils. *Journal of molecular biology*. 2008; 384(5):1157–73. doi: [10.1016/j.jmb.2008.09.063](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.063) PMID: [18851977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18851977/)
110. Kudva YC, Hiddinga HJ, Butler PC, Mueske CS, Eberhardt NL. Small heat shock proteins inhibit in vitro Aβeta(1–42) amyloidogenesis. *FEBS letters*. 1997; 416(1):117–21. PMID: [9369246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9369246/)
111. Lee S, Carson K, Rice-Ficht A, Good T. Small heat shock proteins differentially affect Aβeta aggregation and toxicity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 347(2):527–33. doi: [10.1016/j.bbrc.2006.06.128](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.128) PMID: [16828710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16828710/)
112. Taboada P, Barbosa S, Castro E, Mosquera V. Amyloid fibril formation and other aggregate species formed by human serum albumin association. *The journal of physical chemistry B*. 2006; 110(42):20733–6. doi: [10.1021/jp064861r](https://doi.org/10.1021/jp064861r) PMID: [17048876](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17048876/)

113. Vega L, Arroyo AA, Tabernero A, Medina JM. Albumin-blunted deleterious effect of amyloid-beta by preventing the internalization of the peptide into neurons. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2009; 17(4):795–805. doi: [10.3233/JAD-2009-1093](https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1093) PMID: [19542622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19542622/)
114. Dominguez-Prieto M, Velasco A, Vega L, Tabernero A, Medina JM. Aberrant Co-localization of Synaptic Proteins Promoted by Alzheimer's Disease Amyloid-beta Peptides: Protective Effect of Human Serum Albumin. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2016; 55(1):171–82.
115. Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, et al. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*. 2006; 129(Pt 11):3042–50.

Exploring Amyloidogenicity of Clusterin: A Structural and Bioinformatics Analysis

Paraskevi L. Tsiolaki, Katerina C. Nastou, Nikolaos N. Louros, Stavros J. Hamodrakas, and Vassiliki A. Iconomidou

Abstract Clusterin, a multitasking glycoprotein, is a protein highly conserved amongst mammals. In humans, Clusterin is mainly a secreted protein, described as an extracellular chaperone with the capability of interacting with a broad spectrum of molecules. In neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, it is an amyloid associated protein, co-localized with fibrillar deposits in amyloid plaques in systemic or localized amyloidoses. An 'aggregation-prone' segment (*NFHAMFQ*) was located within the Clusterin α -chain sequence using AMYLPRED, a consensus method for the prediction of amyloid propensity, developed in our lab. This peptide was synthesized and was found to self-assemble into amyloid-like fibrils in vitro, as electron microscopy, X-ray fiber diffraction, Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Spectroscopy and Congo red staining studies reveal. All experimental results verify that this human Clusterin peptide-analogue, possesses high aggregation potency. Additional computational analysis highlighted novel and at the same time, unexplored features of human Clusterin.

Keywords Consensus algorithm • Aggregation-prediction algorithm • Clusterin • "Aggregation-prone" peptides • Alzheimer's disease • Neurodegenerative disease • Protein network

1 Introduction

A great number of proteins with divergent functions and different sequences and structures have been identified as causative agents of important neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Amyotrophic lateral

P.L. Tsiolaki • K.C. Nastou • N.N. Louros • S.J. Hamodrakas • V.A. Iconomidou (✉)
Section of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, 15701, Greece
e-mail: etsiolaki@biol.uoa.gr; katnastou@biol.uoa.gr; nlouros@biol.uoa.gr; shamodr@biol.uoa.gr; veconom@biol.uoa.gr

© Springer International Publishing AG 2017
P. Vlamos (eds.), *GeNeDis 2016*, Advances in Experimental Medicine and Biology 989, DOI 10.1007/978-3-319-57348-9_8

93

sclerosis (ALS). Amyloid fibrils, found in association with these medical disorders, are formed by normally soluble proteins, which accumulate to form closely packed and highly ordered insoluble aggregates. Emerging data suggest that several peptides and proteins, which had not previously been associated with “conformational diseases” have been proven to form amyloid-like fibrils *in vitro*, indicating that under appropriate conditions ordered self-aggregation may be an inherent property of proteins [1, 2].

Clusterin (Apolipoprotein J or ApoJ), a heterodimeric protein, is a highly conserved extracellular chaperon, expressed in almost all mammalian tissues. The precursor polypeptide, consists of 449 amino acids and after the proteolytical cleavage of the signal peptide, it is subsequently cleaved between residues 227 and 228 to generate α - and β -chains (Fig. 1a, dark red and blue respectively) [3]. In its predominant form mature Clusterin is a protein of ~ 80 kDa, which is highly glycosylated (Fig. 1a, red rectangles) and is covalently stabilized by five (5) interchain disulfide bonds (Fig. 1a, yellow dashed lines) [4]. Literature concerning Clusterin function is constantly enriched [5]. As a chaperon, Clusterin binds a large number of diverse ligands, including apolipoproteins, lipids and amyloid-forming proteins [6, 7]. Noteworthy, chaperone-like activity of Clusterin is similar to that of small heat shock proteins [8].

An increase in Clusterin expression is observed in numerous neurodegenerative conditions as a result of abnormal cell death or proliferation [9]. Complete cerebral ischemia, for example, could lead to the accumulation of Clusterin in neuronal cells and in onset of extracellular deposits close to microvessels [10]. Despite the fact that Clusterin has also been found co-localized with fibrillar deposits in amyloid plaques [11–13], there are no experimental data to verify that Clusterin itself self-aggregates into amyloid fibrils. However, contradictory studies point out another perspective, suggesting that co-localization with amyloid deposits may reveal protective properties of Clusterin [14].

AMYPRED [15, 16] is a consensus prediction algorithm for amyloid fibril favoring regions, the so-called “aggregation-prone” peptides, which was developed in our lab. Testing the Clusterin sequence by AMYPRED, 12 stretches were predicted as possible “aggregation-prone” peptides. Seven (7) oligopeptides with high aggregation propensity were predicted for Clusterin β -chain (Fig. 1b), whereas five oligopeptides were predicted for Clusterin α -chain (Fig. 1c). As a first step toward studying Clusterin amyloidogenicity, we focused on the *NFHAMFQ* peptide. This Clusterin heptapeptide is located at the edge of the α -chain (Fig. 1a, b, orange colour), a critical interaction site between α and β chains [8, 17], which deserves attention from a structural perspective (see Sect. 4). In this work, we report on the self-assembly properties of the crucial Clusterin heptapeptide *NFHAMFQ* and discuss the implications of the findings.

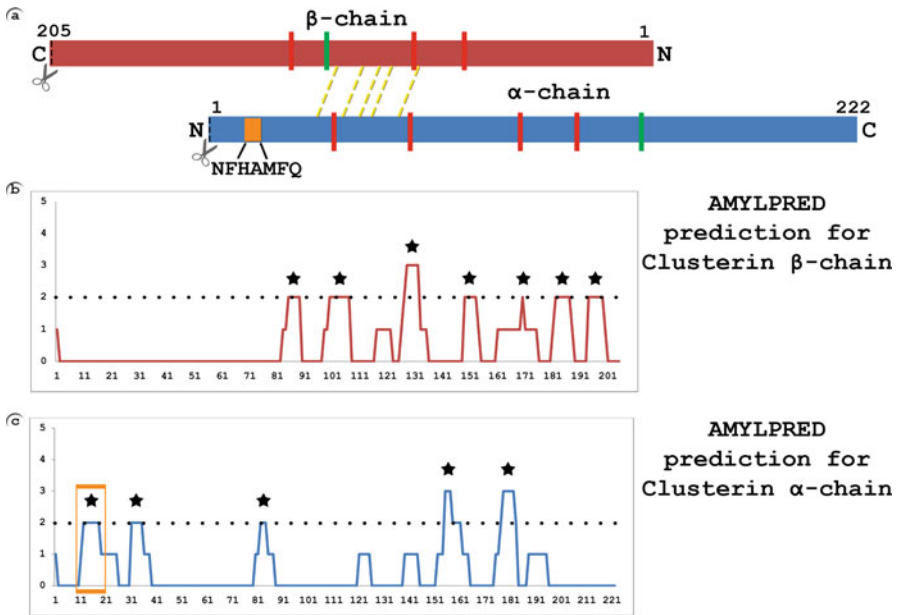


Fig. 1 (a) Schematic representation of mature human Clusterin (α -chain blue, β -chain dark red) depicts post translational modifications and annotations derived from UniprotKB (UniprotKB AC P10909) [18, 19]. Glycosylation sites are shown in red, phosphoserines are shown in green and disulfide bridges are marked with yellow dashed lines. Scissors represent the proteolytic cleavage sites in both α -chain and β -chain. The *NFHAMFQ* “aggregation prone” peptide, shown in orange, is located at the N-terminal of Clusterin α -chain (b), (c) “Amyloid propensity” prediction histograms of human Clusterin by AMYLPRED [15]. Five (5) and seven (7) peptides with aggregation propensity were predicted for α -chain (c) and β -chain (b) respectively, both chains present, though, a low overall amyloidogenic profile. “Aggregation-prone” regions are marked with a star and the default AMYLPRED threshold is shown with a dotted line. An orange box indicates the position of the *NFHAMFQ* peptide

2 Materials and Methods

2.1 Prediction of Potential “Aggregation-Prone” Peptides in Human Clusterin

AMYLPRED [15], as well as AMYLPRED2 [16], both consensus algorithms developed in our lab, were used to identify “aggregation-prone” segments in the amino acid sequence of human Clusterin (Uniprot AC: P10909). Our tools are publicly available for academic users in our website: <http://biophysics.biol.uoa.gr/>.

2.2 Peptide Synthesis and Preparation of Amyloid-Like Fibrils

The 7 amino acid Clusterin peptide-analogue (*NFHAMFQ*) (Fig. 1, red box) was synthesized by GeneCust[®] Europe, Luxembourg. The purity of the synthesized peptide was >98% (free N- and C-terminals). The synthesized peptide was dissolved in distilled water (pH 5.5), at a concentration of 10 mg ml⁻¹. After 1 week incubation at ambient (room) temperatures, *NFHAMFQ* peptide forms amyloid-like fibril-containing gels. Oriented fibers, suitable for X-ray diffraction, were obtained from suspensions of the peptide mature amyloid fibrils, as described below.

2.3 X-ray Diffraction

A droplet (~10 μ l) of mature fibril suspension was placed between two quartz capillaries covered with wax, spaced ~1.5 mm apart and mounted horizontally on a glass substrate, as collinearly as possible, to obtain an oriented fiber. The X-ray diffraction pattern from this fiber was collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator, equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operated at 50 kV, 0.8 mA. The specimen-to-film distance was set at 52 mm and the exposure time was set to 200 s. The X-ray patterns initially were viewed using the program CrysAlisPro and consequently measured with the aid of the program iMosFLM.

2.4 Negative Staining and Transmission Electron Microscopy

For negative staining, droplets (~3–5 μ l) of the *NFHAMFQ* peptide mature fibril suspensions were applied to glow- discharged 400-mesh carbon-coated copper grids for 60 s. The grids were stained with a droplet (5 μ l) of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. The grids were air-dried. The fibril-containing grids were examined with a Morgagni[™] 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11 Mpixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.5 Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (ATR FT-IR)

A 10- μ l droplet of *NFHAMFQ* peptide mature fibril suspension was cast on a front-coated Au mirror and left to dry slowly at ambient conditions to form a thin film. Infrared spectra were obtained from these films at a resolution of 4 cm⁻¹, utilizing

an IR microscope (IRScope II by Bruker Optics) equipped with a Ge attenuated total reflectance (ATR) objective lens (20 \times) and attached to a Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer (Equinox 55, by Bruker Optics).

2.6 Congo Red Staining and Polarized Light Microscopy

The *NFHAMFQ* peptide mature fibril suspensions were applied to glass slides and stained with a 10 mM Congo Red (Sigma) solution in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) for approximately 30 min. Then, they were washed several times with 90% ethanol and were left to dry approximately for 10 min. The samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope, equipped with a JVC GC-X3E camera.

2.7 Protein–Protein Interaction Network

Interactors of Clusterin and their interactions were identified using BioGRID [20], a public database that archives and disseminates genetic and protein interaction data from model organisms and humans. BioGRID currently contains the most comprehensive, and at the same time, well-annotated list of interactions for Clusterin. The interaction network created from this dataset was visualized using Cytoscape [21]. The network was further studied with functional and graph theory based analyses, using BinGO [22] and NetworkAnalyzer [23], two applications exclusively developed for Cytoscape. BinGO was used to detect overrepresented Gene Ontology terms in Biological Networks, while NetworkAnalyzer was used to evaluate topological simple and complex network parameters.

3 Results

After incubation for 1 week, the *NFHAMFQ* peptide self-assembles into amyloid-like fibrils, forming dense gels (upper right quarter of Fig. 2a). Electron micrographs (Fig. 2a) display the amyloid-like fibrils to be straight and unbranched with an indefinite length (several microns long) and a diameter of approximately 40–50 Å (Fig. 2a). Frequently, the fibrils wound around each other, forming supercoils (Fig. 2a, black arrows). This apparent morphological polymorphism has previously been established as a common characteristic of amyloid fibrils formed by several aggregation-prone peptides and proteins [24].

Amyloid deposits prepared as described above (see Sect. 2) bind Congo red, as it is clear under bright field illumination (Fig. 2b, upper) and exhibit a characteristic for amyloid fibrils yellow/green birefringence, when viewed under crossed polars (Fig. 2b, lower). The X-ray diffraction patterns of oriented fibres produced from the amyloid-like fibril suspensions of the *NFHAMFQ* peptide indicate a “cross- β ”

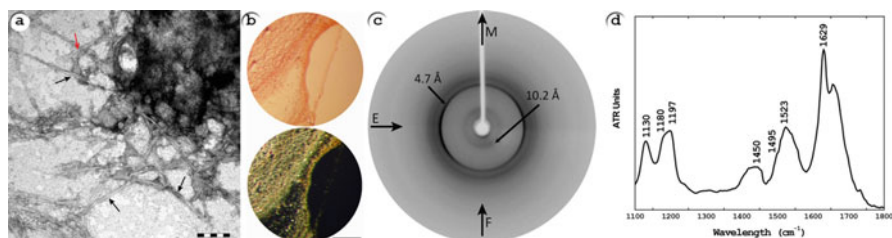


Fig. 2 Experimental results of the *NFHAMFQ* peptide self-aggregation (a) An electron micrograph of amyloid-like fibrils derived by self-assembly, from a 10 mg ml⁻¹ solution of the Clusterin peptide-analogue in distilled water. Amyloid-like fibrils appear straight, unbranched and of indefinite length with a diameter of each protofilament ca. 40–50 Å (red arrow). Protofilaments wound around each other, forming supercoils (black arrows). Scale bar 200 nm (b) Photomicrographs of an amyloid fibril containing gel, derived from *NFHAMFQ* peptide self-assembly, stained with Congo red. The Congo red dye is bound, as seen under bright field illumination (upper photomicrograph) and the apple-green birefringence that amyloids typically exhibit is clearly seen under crossed polars (lower photomicrograph). Bar 100 μm (c) X-ray diffraction pattern from an ‘oriented’ fiber of the Clusterin peptide-analogue amyloid-like fibrils. The fiber axis (F) is vertical (meridian, M), whereas the equator is horizontal (E). The “cross-β” structure is evident; a 4.7 Å reflection is due to the distance between successive hydrogen bonded β-strands and a 10.2 Å reflection is derived from the spacing between packed β-sheets (d) ATR FT-IR (1100–1800 cm⁻¹) spectrum is indicative of the preponderance of β-sheet secondary structure (see Table 1)

Table 1 Bands observed in the ATR FT-IR (1100–1800 cm⁻¹) spectrum produced from a hydrated film of the amyloidogenic *NFHAMFQ* peptide after self-assembly, and their tentative assignments (Fig. 2)

Band (cm ⁻¹)	Assignment
1130	TFA
1180	TFA
1197	TFA
1450	CH ₂ deformation
1495	Phe (F)
1523	Amide II (β-sheet)
1629	Amide I (β-sheet)

conformation, observed for most amyloids (Fig. 2c). The intense reflection on the equator (perpendicular to the fiber axis) corresponds to a periodicity of 4.7 Å. This periodicity refers to the distance between consecutive hydrogen bonded β-strands. The reflection on the meridian, corresponding to a repeat of 10.2 Å, is attributed to the packing distance between successive packed β-sheets, parallel to the fiber axis.

The ATR FT-IR spectrum from thin films produced by the Clusterin peptide fibril-containing solutions (Fig. 2d and Table 1) shows a prominent band at 1629 cm⁻¹ in the amide I region and a band at 1523 cm⁻¹ in the amide II, which are definitely due to β-sheet conformation [25]. Thus, the results from ATR FT-IR spectroscopy strongly support the evidence from X-ray diffraction experiments.

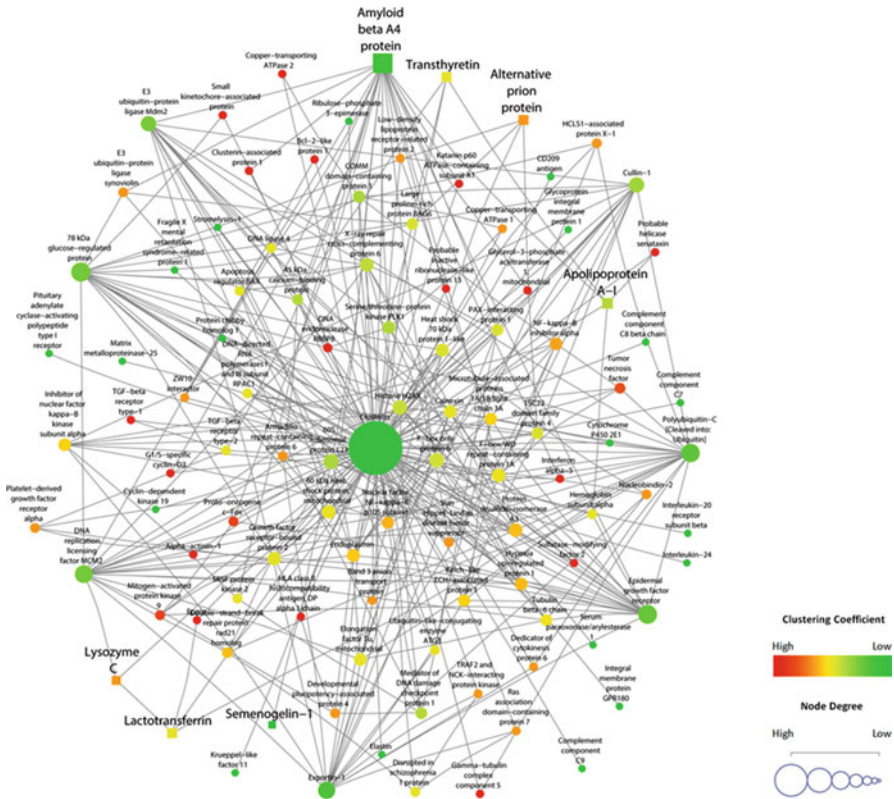


Fig. 3 The interaction network of human Clusterin. Interaction data for the creation of this network were gathered from the publicly available database BioGRID [20] and Cytoscape [21] was used as a visualization tool. The network consists of 103 nodes and 324 edges. The color gradient is visualized based on the clustering coefficient of each node and the size gradient based on the node degree. In darker colors are the “bottlenecks” of the network, while larger nodes correspond to “hubs”. Amyloidogenic proteins, depicted as *rectangles* are also present in the network (see also Table 2)

Moreover a computational analysis performed on the network of Clusterin and its interactors highlight the key role of Clusterin. The network includes 103 nodes (proteins, Fig. 3 coloured rectangles and circles) and 324 edges (interactions, Fig. 3 grey lines) and has a node degree distribution that decays as a power law and accentuates the scale-free properties of the network. The color gradient, shown in Fig. 3 is visualized based on the clustering coefficient of each node. In darker colours (red) are the nodes with the higher clustering coefficients, which are “bottleneck” proteins. These proteins are extremely important for the transduction of information across the entire network and thus its normal function, meaning that their removal would destroy many links between the currently connected proteins. Nodes with high degree are central nodes or “hubs”, which are also extremely important,

since they interact with many proteins in the network. “Attacks” on these proteins could have devastating effects on the network, due to the loss of many important interactions, leading to its impending failure (Fig. 3).

For a deeper understanding of the network’s functions, graph theory based analysis was performed, in order to detect the network’s topology and to investigate the contribution of certain nodes to the network stability. The network has a scale-free topology consistent with the relevant “network biology theory” [26]. This shows that this network has a few protein hubs and the majority of the protein nodes have a small number of interactions. As shown in Fig. 3 most of the amyloidogenic proteins in the network (rectangle nodes) act as hubs. Moreover, a functional analysis that was performed highlight that Clusterin and its interactors are linked to functions as response to stress, immune response and chaperone binding.

4 Discussion

Utilizing our consensus prediction algorithm, AMYLPRED [15, 16], 12 oligopeptides of human Clusterin were predicted as “aggregation-prone” segments (Fig. 1). In this work, we attempted to shed light on the *NFHAMFQ* peptide aggregation propensity and find out whether it intrinsically exhibits amyloidogenicity. Our experimental work clearly shows that fibrils formed from this Clusterin heptapeptide fulfills all basic structural and tinctorial criteria of amyloid fibrils [27].

Recent studies suggest that amyloidogenicity is due to short protein segments, whereas one of the first articles to report on short “aggregation-prone” peptides was published back in 2005 [28]. Much time and effort have been spent in tracing short “aggregation-prone” segments and, thus, a great number of algorithms during the last decade or so, attempted to predict such hotspot stretches in protein sequences. Extensive work has been dedicated towards the in vitro studies of short peptides that are sufficient to drive a native protein to the amyloid state [29–37].

Clusterin, a multitasking protein, is involved not only in physiological but also in pathological conditions. Although currently there aren’t Clusterin crystal structures available, several bioinformatics approaches elucidate intriguing structural properties. Previous sequence analysis predicted three amphipathic α -helical regions, along with long natively disordered regions for human Clusterin, reasonable secondary structures for a protein that mediates interactions with several hydrophobic molecules [4, 38, 39]. Surprisingly, the *NFHAMFQ* peptide, which according to our results self-aggregates forming characteristic amyloid structures, is located in the second putative amphipathic region, implying distinctive features of a possible chameleon sequence for this Clusterin heptapeptide.

Trying to identify and locate all functional epitopes of Clusterin, Lakins et al. thoroughly studied several cleavage products of Clusterin. Surprisingly, secreted Clusterin has three (3) distinct epitopes one of which interacts with unstressed ligands, such as $A\beta$ the peptide. Thus, experimental evidence, along with computational analysis demonstrated that these binding sites may involve the amphipathic

helices located at the C-terminal of the β -chain and the N-terminal of the α -chain [8] (Fig. 1a). This interaction should be carefully taken into account, since *NFHAMFQ* peptide, with remarkable aggregation properties, is located exactly at the N-terminal of the Clusterin α -chain (Fig. 1a, orange rectangle).

Noteworthy, an increase in either mRNA or Clusterin protein expression is referenced in several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's Disease [11], HCHWA-Dutch type [40] and familial British dementia [41]. A detailed catalogue of such pathological conditions is reviewed by Calero et al. [10]. Along with the co-localization with high density lipoproteins [42], Clusterin was found to participate as a key component in senile plaques in subjects with Alzheimer's Disease [43]. However, in general the principal role of proteins found co-localized in amyloid deposits remains unclear and remains to be examined whether co-deposits transition to the amyloid state.

To obtain crucial information on Clusterin interactions with proteins related to ageing and neurodegenerative diseases, we further analyzed a novel protein network (Fig. 3). The most well-known array of proteins that were listed as Clusterin partners are gathered together in recent excellent review articles [5, 6, 8, 44]. Our results are in accordance with data obtained from the literature, since all the known interactors of Clusterin are present in the network. Among other proteins, amyloidogenic proteins, as well as, amyloid associated proteins play a crucial role in the network's integrity (Table 2). "Amyloid beta A4", for example, is evidently an important node since it acts as a hub and interacts with many proteins in the network.

Contradictory theories on whether Clusterin is guilty or innocent in neurodegenerative diseases complicate the research process. Given the limitations of current therapies on neurodegenerative diseases, Thambisetty described the potential for developing treatments based on modulating peripheral levels of extracellular chaperones [14], suggesting another intriguing perspective on Clusterin. Novel aggregation characteristics of the *NFHAMFQ* heptapeptide together with its implications as a possible interacting epitope of A β peptide, should be carefully examined. Since protein-based products are rapidly entering the pharmaceutical industry as successful drugs, remedies/drugs designed to prevent aggregation of targeted Clusterin "aggregation-prone" peptides, such as *NFHAMFQ*, may prove to be of paramount importance in future work, following the example of recent studies on transthyretin amyloidosis [45].

Acknowledgments We thank the University of Athens for support. This project was financially supported by the Greek State Scholarships Foundation, through the Siemens Program: "IKY Fellowships of Excellence for Postgraduate Studies in Greece—Siemens Programme (2015–2017)". We thank Associate Professor Ioannis Trougakos for pointing out to us the role of Clusterin in neurodegenerative diseases. We thank our collaborator Dr. Evangelia D. Chrysinia for excellent assistance with the X-ray experiments and the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology at the National Hellenic Research Foundation for hospitality. Finally, we thank Dr. Georgios E. Baltatzis and Prof. Efstratios S. Patsouris for excellent assistance with Transmission Electron Microscopy experiments in the Department of Pathology, at the Medical School of the University of Athens.

Table 2 Proteins in the interaction network of Clusterin, with their respective UniProtKB ACs

Protein name	UniProtKB AC
HCLS1-associated protein X-1	O00165
Hypoxia up-regulated protein 1	Q9Y4L1
Interleukin-24	Q13007
Katanin p60 ATPase-containing subunit A1	O75449
ZW10 interactor	O95229
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	O15111
Gamma-tubulin complex component 5	Q96RT8
Glycoprotein integral membrane protein 1	Q9NU53
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor	P41586
Clusterin	P10909
COMM domain-containing protein 1	Q8N668
Cytochrome P450 2E1	P05181
Integral membrane protein GPR180	Q86V85
Epidermal growth factor receptor	P00533
Elastin	P15502
PAX-interacting protein 1	Q6ZW49
TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	Q9UKE5
Clusterin-associated protein 1	Q96AJ1
Probable helicase senataxin	Q7Z333
Cyclin-dependent kinase 19	Q9BWU1
Proto-oncogene c-Fos	P01100
X-ray repair cross-complementing protein 6	P12956
Protein chibby homolog 1	Q9Y3M2
Sulfatase-modifying factor 2	Q8NBJ7
F-box only protein 6	Q9NRD1
Disrupted in schizophrenia 1 protein	Q9NRI5
Growth factor receptor-bound protein 2	P62993
Protein disulfide-isomerase A3	P30101
Histone H2AX	P16104
Hemoglobin subunit alpha	P69905
CD209 antigen	Q9NNX6
HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha 1 chain	P20036
Heat shock 70 kDa protein 1-like	P34931
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	P98164
Lactotransferrin	P02788
Lysozyme C	P61626
DNA replication licensing factor MCM2	P49736
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	Q00987
Stromelysin-1	P08254
Probable inactive ribonuclease-like protein 13	Q5GAN3
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	P19838

(continued)

Table 2 (continued)

Protein name	UniProtKB AC
NF-kappa-B inhibitor alpha	P25963
Nucleobindin-2	P80303
45 kDa calcium-binding protein	Q9BRK5
Matrix metalloproteinase-25	Q9NPA2
Serine/threonine-protein kinase PLK1	P53350
Copper-transporting ATPase 1	Q04656
Interleukin-20 receptor subunit beta	Q6UXL0
Copper-transporting ATPase 2	P35670
Serum paraoxonase/arylesterase 1	P27169
Developmental pluripotency-associated protein 4	Q7L190
Mitogen-activated protein kinase 9	P45984
Transthyretin	P02766
Elongation factor Tu, mitochondrial	P49411
Complement component C7	P10643
Polyubiquitin-C [Cleaved into: Ubiquitin]	P0CG48
Complement component C8 beta chain	P07358
Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor	P40337
Complement component C9	P02748
Exportin-1	O14980
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	P51114
Large proline-rich protein BAG6	P46379
Ras association domain-containing protein 7	Q02833
TSC22 domain family protein 4	Q9Y3Q8
Calnexin	P27824
E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin	Q86TM6
Cullin-1	Q13616
Tubulin beta-6 chain	Q9BUF5
Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	Q9H492
Krueppel-like factor 11	O14901
Alpha-actinin-1	P12814
F-box/WD repeat-containing protein 1A	Q9Y297
G1/S-specific cyclin-D3	P30281
DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	O15160
Armadillo repeat-containing protein 6	Q6NXE6
60S ribosomal protein L23	P62829
Small kinetochore-associated protein	Q9Y448
Amyloid beta A4 protein	P05067
Kelch-like ECH-associated protein 1	Q14145
78 kDa glucose-regulated protein	P11021
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809

(continued)

Table 2 (continued)

Protein name	UniProtKB AC
Apolipoprotein A-I	P02647
Interferon alpha-5	P01569
Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	Q14676
DNA ligase 4	P49917
Double-strand-break repair protein rad21 homolog	O60216
Apoptosis regulator BAX	Q07812
DNA endonuclease RBBP8	Q99708
Bcl-2-like protein 1	Q07817
Ribulose-phosphate 3-epimerase	Q96AT9
Semenogelin-1	P04279
Platelet-derived growth factor receptor alpha	P16234
Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	Q9NT62
Band 3 anion transport protein	P02730
SRSF protein kinase 2	P78362
TGF-beta receptor type-1	P36897
TGF-beta receptor type-2	P37173
Tumor necrosis factor	P01375
Endoplasmin	P14625
Alternative prion protein	F7VJQ1
Eppin	O95925
Dedicator of cytokinesis protein 6	Q96HP0
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial	Q9HCL2

*Amyloidogenic proteins are highlighted in bold

References

1. Chiti, F., and C.M. Dobson. 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry* 75: 333–366. doi:[10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901).
2. Uversky, V.N., and A.L. Fink. 2004. Conformational Constraints for Amyloid Fibrillation: The Importance of Being Unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta* 1698 (2): 131–153. doi:[10.1016/j.bbapap.2003.12.008](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.12.008).
3. Fink, T.M., M. Zimmer, J. Tschopp, J. Etienne, D.E. Jenne, and P. Lichter. 1993. Human Clusterin (CLI) Maps to 8p21 in Proximity to the Lipoprotein Lipase (LPL) Gene. *Genomics* 16 (2): 526–528. doi:[10.1006/geno.1993.1222](https://doi.org/10.1006/geno.1993.1222).
4. de Silva, H.V., J.A. Harmony, W.D. Stuart, C.M. Gil, and J. Robbins. 1990. Apolipoprotein J: Structure and Tissue Distribution. *Biochemistry* 29 (22): 5380–5389.
5. Trougakos, I.P., and E.S. Gonos. 2009. Chapter 9: Oxidative Stress in Malignant Progression: The Role of Clusterin, a Sensitive Cellular Biosensor of Free Radicals. *Advances in Cancer Research* 104: 171–210. doi:[10.1016/S0065-230X\(09\)04009-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)04009-3).
6. Trougakos, I.P., and E.S. Gonos. 2002. Clusterin/Apolipoprotein J in Human Aging and Cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (11): 1430–1448.
7. Calero, M., A. Rostagno, B. Frangione, and J. Ghiso. 2005. Clusterin and Alzheimer's Disease. *Sub-Cellular Biochemistry* 38: 273–298.

8. Lakins, J.N., S. Poon, S.B. Easterbrook-Smith, J.A. Carver, M.P. Tenniswood, and M.R. Wilson. 2002. Evidence That Clusterin Has Discrete Chaperone and Ligand Binding Sites. *Biochemistry* 41 (1): 282–291.
9. Choi-Miura, N.H., and T. Oda. 1996. Relationship Between Multifunctional Protein “Clusterin” and Alzheimer Disease. *Neurobiology of Aging* 17 (5): 717–722.
10. Calero, M., A. Rostagno, E. Matsubara, B. Zlokovic, B. Frangione, and J. Ghiso. 2000. Apolipoprotein J (Clusterin) and Alzheimer’s Disease. *Microscopy Research and Technique* 50 (4): 305–315. doi:10.1002/1097-0029(20000815)50:4<305::AID-JEMT10>3.0.CO;2-L.
11. Choi-Miura, N.H., Y. Takahashi, Y. Nakano, T. Tobe, and M. Tomita. 1992. Identification of the Disulfide Bonds in Human Plasma Protein SP-40,40 (Apolipoprotein-J). *Journal of Biochemistry* 112 (4): 557–561.
12. Choi-Miura, N.H., Y. Ihara, K. Fukuchi, M. Takeda, Y. Nakano, T. Tobe, and M. Tomita. 1992. SP-40,40 is a Constituent of Alzheimer’s Amyloid. *Acta Neuropathologica* 83 (3): 260–264.
13. Nuutinen, T., T. Suuronen, A. Kauppinen, and A. Salminen. 2009. Clusterin: A Forgotten Player in Alzheimer’s Disease. *Brain Research Reviews* 61 (2): 89–104. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.05.007.
14. Thambisetty, M. 2010. Do Extracellular Chaperone Proteins in Plasma Have Potential as Alzheimer’s Disease Biomarkers? *Biomarkers in Medicine* 4 (6): 831–834. doi:10.2217/bmm.10.108.
15. Frousios, K.K., V.A. Iconomidou, C.M. Karletidi, and S.J. Hamodrakas. 2009. Amyloidogenic Determinants Are Usually Not Buried. *BMC Structural Biology* 9: 44. doi:10.1186/1472-6807-9-44.
16. Tsolis, A.C., N.C. Papandreou, V.A. Iconomidou, and S.J. Hamodrakas. 2013. A Consensus Method for the Prediction of ‘Aggregation-Prone’ Peptides in Globular Proteins. *PLoS One* 8 (1): e54175. doi:10.1371/journal.pone.0054175.
17. Bailey, R.W., A.K. Dunker, C.J. Brown, E.C. Garner, and M.D. Griswold. 2001. Clusterin, a Binding Protein with a Molten Globule-Like Region. *Biochemistry* 40 (39): 11828–11840.
18. UniProt Consortium 2014. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 42: D191–D198. doi:10.1093/nar/gkt1140.
19. UniProt Consortium 2015. UniProt: A Hub for Protein Information. *Nucleic Acids Research* 43: D204–D212. doi:10.1093/nar/gku989.
20. Chatri-Aryamontri, A., B.J. Breitkreutz, R. Oughtred, L. Boucher, S. Heinicke, D. Chen, C. Stark, A. Breitkreutz, N. Kolas, L. O’Donnell, T. Reguly, J. Nixon, L. Ramage, A. Winter, A. Sellam, C. Chang, J. Hirschman, C. Theesfeld, J. Rust, M.S. Livstone, K. Dolinski, and M. Tyers. 2015. The BioGRID Interaction Database: 2015 Update. *Nucleic Acids Research* 43: D470–D478. doi:10.1093/nar/gku1204.
21. Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* 13 (11): 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303.
22. Maere, S., K. Heymans, and M. Kuiper. 2005. BiNGO: A Cytoscape Plugin to Assess Overrepresentation of Gene Ontology Categories in Biological Networks. *Bioinformatics* 21 (16): 3448–3449. doi:10.1093/bioinformatics/bti551.
23. Assenov, Y., F. Ramirez, S.E. Schellhorn, T. Lengauer, and M. Albrecht. 2008. Computing Topological Parameters of Biological Networks. *Bioinformatics* 24 (2): 282–284. doi:10.1093/bioinformatics/btm554.
24. Kreplak, L., and U. Aebi. 2006. From the Polymorphism of Amyloid Fibrils to Their Assembly Mechanism and Cytotoxicity. *Advances in Protein Chemistry* 73: 217–233. doi:10.1016/S0065-3233(06)73007-8.
25. Surewicz, W.K., H.H. Mantsch, and D. Chapman. 1993. Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment. *Biochemistry* 32 (2): 389–394.
26. Barabasi, A.L., and Z.N. Oltvai. 2004. Network Biology: Understanding the Cell’s Functional Organization. *Nature Reviews Genetics* 5 (2): 101–113. doi:10.1038/nrg1272.

27. Sunde, M., and C.C. Blake. 1998. From the Globular to the Fibrous State: Protein Structure and Structural Conversion in Amyloid Formation. *Quarterly Reviews of Biophysics* 31 (1): 1–39.
28. Esteras-Chopo, A., L. Serran, and M. Lopez de la Paz. 2005. The Amyloid Stretch Hypothesis: Recruiting Proteins Toward the Dark Side. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46): 16672–16677. doi:10.1073/pnas.0505905102.
29. Tenidis, K., M. Waldner, J. Bernhagen, W. Fischle, M. Bergmann, M. Weber, M.L. Merkle, W. Voelter, H. Brunner, and A. Kapurniotu. 2000. Identification of a Penta- and Hexapeptide of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) with Amyloidogenic and Cytotoxic Properties. *Journal of Molecular Biology* 295 (4): 1055–1071. doi:10.1006/jmbi.1999.3422.
30. Teng, P.K., and D. Eisenberg. 2009. Short Protein Segments Can Drive a Non-fibrillizing Protein into the Amyloid State. *Protein Engineering Design & Selection* 22 (8): 531–536. doi:10.1093/protein/gzp037.
31. Iconomidou, V.A., D. Pheida, E.S. Hamodraka, C. Antony, A. Hoenger, and S.J. Hamdrakas. 2012. An Amyloidogenic Determinant in N-terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide (nt-Probnp): Implications for Cardiac Amyloidoses. *Biopolymers* 98 (1): 67–75. doi:10.1002/bip.21698.
32. Iconomidou, V.A., A. Leontis, A. Hoenger, and S.J. Hamdrakas. 2013. Identification of a Novel ‘Aggregation-Prone’/Amyloidogenic Determinant’ Peptide in the Sequence of the Highly Amyloidogenic Human Calcitonin. *FEBS Letters* 587 (6): 569–574. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.031.
33. Louros, N.N., V.A. Iconomidou, P.L. Tsiolaki, E.D. Chrysinia, G.E. Baltatzis, E.S. Patsouris, and S.J. Hamdrakas. 2014. An N-terminal Pro-Atrial Natriuretic Peptide (NT-proANP) ‘Aggregation-Prone’ Segment Involved in Isolated Atrial Amyloidosis. *FEBS Letters* 588 (1): 52–57. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.049.
34. Tsiolaki, P.L., S.J. Hamdrakas, and V.A. Iconomidou. 2015. The Pentapeptide LQVVR Plays a Pivotal Role in Human Cystatin C Fibrillization. *FEBS Letters* 589 (1): 159–164. doi:10.1016/j.febslet.2014.11.041.
35. Tsiolaki, P.L., N.N. Louros, S.J. Hamdrakas, and V.A. Iconomidou. 2015. Exploring the ‘Aggregation-Prone’ Core of Human Cystatin C: A Structural Study. *Journal of Structural Biology* 191 (3): 272–280. doi:10.1016/j.jsb.2015.07.013.
36. Louros, N.N., P.L. Tsiolaki, M.D. Griffin, G.J. Howlett, S.J. Hamdrakas, and V.A. Iconomidou. 2015. Chameleon ‘Aggregation-Prone’ Segments of apoA-I: A Model of Amyloid Fibrils Formed in apoA-I Amyloidosis. *International Journal of Biological Macromolecules* 79: 711–718. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.032.
37. Louros, N.N., P.L. Tsiolaki, A.A. Zompra, E.V. Pappa, V. Magafa, G. Pairas, P. Cordopatis, C. Cheimonidou, I.P. Trougakos, V.A. Iconomidou, and S.J. Hamdrakas. 2015. Structural Studies and Cytotoxicity Assays of “Aggregation-Prone” IAPP(8-16) and its Non-amyloidogenic Variants Suggest Its Important Role in Fibrillogenesis and Cytotoxicity of Human Amylin. *Biopolymers* 104 (3): 196–205. doi:10.1002/bip.22650.
38. Humphreys, D.T., J.A. Carver, S.B. Easterbrook-Smith, and M.R. Wilson. 1999. Clusterin Has Chaperone-Like Activity Similar to That of Small Heat Shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (11): 6875–6881.
39. de Silva, H.V., W.D. Stuart, Y.B. Park, S.J. Mao, C.M. Gil, J.R. Wetterau, S.J. Busch, and J.A. Harmony. 1990. Purification and Characterization of Apolipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 265 (24): 14292–14297.
40. Maat-Schieman, M.L., S.G. van Duinen, M. Bornebroek, J. Haan, and R.A. Roos. 1996. Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis-Dutch Type (HCHWA-D): II—A Review of Histopathological Aspects. *Brain Pathology* 6 (2): 115–120.
41. Matsubara, E., B. Frangione, and J. Ghiso. 1995. Characterization of Apolipoprotein J-Alzheimer’s A Beta Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7563–7567.
42. LaDu, M.J., S.M. Gilligan, J.R. Lukens, V.G. Cabana, C.A. Reardon, L.J. Van Eldik, and D.M. Holtzman. 1998. Nascent Astrocyte Particles Differ from Lipoproteins in CSF. *Journal of Neurochemistry* 70 (5): 2070–2081.

43. Kida, E., N.H. Choi-Miura, and K.E. Wisniewski. 1995. Deposition of Apolipoproteins E and J in Senile Plaques is Topographically Determined in Both Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Brain. *Brain Research* 685 (1–2): 211–216.
44. Poon, S., S.B. Easterbrook-Smith, M.S. Rybchyn, J.A. Carver, and M.R. Wilson. 2000. Clusterin is an ATP-Independent Chaperone with Very Broad Substrate Specificity That Stabilizes Stressed Proteins in a Folding-Competent State. *Biochemistry* 39 (51): 15953–15960.
45. Janin, J. 1997. Specific Versus Non-specific Contacts in Protein Crystals. *Nature Structural Biology* 4 (12): 973–974.



Tracking the amyloidogenic core of IAPP amyloid fibrils: Insights from micro-Raman spectroscopy



Nikolaos N. Louros^{a,1}, Paraskevi L. Tsiolaki^a, Fotis A. Baltoumas^a, Georgios D. Chryssikos^b, Vassilis Gionis^b, Stavros J. Hamodrakas^a, Vassiliki A. Iconomidou^{a,*}

^aSection of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

^bTheoretical and Physical Chemistry Institute, National Hellenic Research Foundation, Athens 116 35, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2017

Received in revised form 19 May 2017

Accepted 3 June 2017

Available online 14 June 2017

Keywords:

Amylin

Amyloidosis

Aggregation-prone peptides

Disulfide bonds

Type II diabetes

Raman Spectroscopy

ABSTRACT

Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) is the major protein component of extracellular amyloid deposits, located in the islets of Langerhans, a hallmark of type II diabetes. The underlying mechanisms of IAPP aggregation have not yet been clearly defined, although the highly amyloidogenic sequence of the protein has been extensively studied. Several segments have been highlighted as aggregation-prone regions (APRs), with much attention focused on the central 8–17 and 20–29 stretches. In this work, we employ micro-Raman spectroscopy to identify specific regions that are contributing to or are excluded from the amyloidogenic core of IAPP amyloid fibrils. Our results demonstrate that both the N-terminal region containing a conserved disulfide bond between Cys residues at positions 2 and 7, and the C-terminal region containing the only Tyr residue are excluded from the amyloid core. Finally, by performing detailed aggregation assays and molecular dynamics simulations on a number of IAPP variants, we demonstrate that point mutations within the central APRs contribute to the reduction of the overall amyloidogenic potential of the protein but do not completely abolish the formation of IAPP amyloid fibrils.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Islet amyloid polypeptide (IAPP), or amylin, is a 37-residue pancreatic hormone produced and secreted along with insulin as a response to high levels of glucose within the bloodstream. IAPP is a highly amyloidogenic peptide, primarily associated with the development of type II diabetes (Clark et al., 1987; Cooper et al., 1987). IAPP accumulation within the islets of Langerhans eventually causes β -cell dysfunction and death, consequently leading to reduced insulin secretion (Westermarck and Wilander, 1978; Westermarck et al., 1987a). The toxic effect of hIAPP is a subject of controversy, in which amyloid-mediated membrane damage is

Abbreviations: hIAPP, human IAPP; rIAPP, rat IAPP; APRs, aggregation-prone regions; STEM, scanning-transmission electron microscopy; ssNMR, solid-state Nuclear Magnetic Resonance; RMSF, root mean square fluctuation; ASA, accessible surface area; TERS, Tip-Enhanced Raman Spectroscopy.

* Corresponding author.

E-mail addresses: nlouros@biol.uoa.gr (N.N. Louros), etsiolaki@biol.uoa.gr (P.L. Tsiolaki), fbaltoumas@biol.uoa.gr (F.A. Baltoumas), gdchryss@eie.gr (G.D. Chryssikos), vgionis@eie.gr (V. Gionis), shamodr@biol.uoa.gr (S.J. Hamodrakas), veconom@biol.uoa.gr (V.A. Iconomidou).

¹ Present address: VIB Switch Laboratory, Department of Cellular and Molecular Medicine, VIB-KU Leuven, B-3000 Leuven, Belgium.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2017.06.002>

1047-8477/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

considered to play a key role. A two-fold mechanism of aggregation has been proposed, suggesting that initial membrane disruption is caused by early oligomeric IAPP species that can also template amyloid fiber formation on the membrane surface at a later stage, a process leading to subsequent fragmentation (Brender et al., 2012; Patel et al., 2014; Sciacca et al., 2016). The N-terminal 1–19 region of the peptide is primarily responsible for membrane binding by controlling the orientation and penetration depth of the molecule in respect to the membrane surface (Nanga et al., 2009). On the other hand, almost the entire sequence of human IAPP has been denoted as an aggregation-prone region (APR), suggesting that the aggregation effect of the protein may not be as straightforward as expected (Azriel and Gazit, 2001; Fox et al., 2010; Lutz, 2010; Marek et al., 2007). Several lines of evidence have focused at the aggregation potential of the 20–29 central segment. Comparison studies reveal significant differences in the structure, function and toxicity kinetics between the corresponding regions of human and rat IAPP sequences (hIAPP_{20–29} and rIAPP_{20–29}) (Brender et al., 2007, 2013). This is mostly attributed to the fact that the non-amyloidogenic rIAPP_{20–29} sequence comprises three individual Pro residues within this range, imparting its overall aggregation tendency (Christoffersen et al., 2015; Madine et al., 2008; Moriarty and Raleigh, 1999; Westermarck

et al., 1990). An amylin replacement has been developed based on this strategy and is currently administered along with insulin in patients with type I and II diabetes (Ratner et al., 2004).

Although accumulating evidence suggests that IAPP is intrinsically disordered or partially α -helical in its active and functional form (Nanga et al., 2011; Williamson and Miranker, 2007), the structural properties of IAPP monomers incorporated in amyloid fibrils are yet poorly understood. Detailed NMR structural studies on human and rat peptides have highlighted that the 1–19 region of the molecule is primarily α -helical, suggesting that helical intermediates promote the overall toxicity of IAPP by facilitating membrane disruption (Brender et al., 2010; Nanga et al., 2009). Up to date, a number of theoretical or experimental studies have proposed possible models regarding the fibrillar core of human IAPP amyloid fibrils. A parallel superpleated structure, composed of three individual β -strands was initially proposed (Kajava et al., 2005), followed by ssNMR and STEM observations suggesting that the 8–17 and 28–37 segments of the protein compose the main fibril core (Luca et al., 2007). This model was also supported subsequently by two-dimensional infrared spectroscopy (IR) studies (Shim et al., 2009). Finally, a third model has also been proposed, relying on the atomic structures of segments 21–27 and 28–33 which were suggested to form tight steric zippers with closely interdigitated side chains (Wiltzius et al., 2008).

In this work, we applied micro-Raman spectroscopy on aligned IAPP amyloid fibrils to extract information about the structural elements that are part of the amyloidogenic core, in addition to the conformational states and orientation of individual moieties, such as the N-terminally located intermolecular disulfide bridge, the β -sheet content and the C-terminal Tyr side chains of the IAPP monomers. Furthermore, we performed detailed aggregation assays on several variants focused around the major 8–17 and 20–29 APRs of the IAPP sequence. These results are complemented with Molecular Dynamics (MD) simulations and discussed in comparison with the existing reported models regarding IAPP amyloid fibrils.

2. Materials and methods

2.1. Aggregation propensity prediction

The aggregation propensity of human IAPP was investigated through sequence analysis, with the aid of the consensus aggregation propensity predictor, AMYLPRED2 (Tsolis et al., 2013). This consensus tool produces a multivariate prediction of sequence amyloidogenicity by incorporating individual algorithms, focused on identifying variable physicochemical properties associated with aggregation propensity, such as sequence hydrophobicity, packing density, “chameleon” segments and amyloidogenic sequence stretches (Conchillo-Sole et al., 2007; Fernandez-Escamilla et al., 2004; Kim et al., 2009; Tian et al., 2009).

2.2. Peptide synthesis

The synthesis of human wild type (WT) IAPP and its mutated derivatives (Fig. 1) was performed by GeneCust (Luxembourg). All peptides were prepared with amidated C-terminal ends and free N-terminals (purity >95%). IAPP_{1–12} (free N- and C-terminal) was prepared by solid phase methodology and Fmoc/Bu^t chemistry, using 2-chlorotrityl chloride resin as a solid support (Barlos et al., 1989). Analytical HPLC was utilized in order to determine peptide purity (>97%).

2.3. Preparation of peptide samples and oriented fibers

Solution samples of IAPP and its derivatives were prepared at a concentration of 0.5 mg/ml, in distilled water. The IAPP_{1–12} peptide

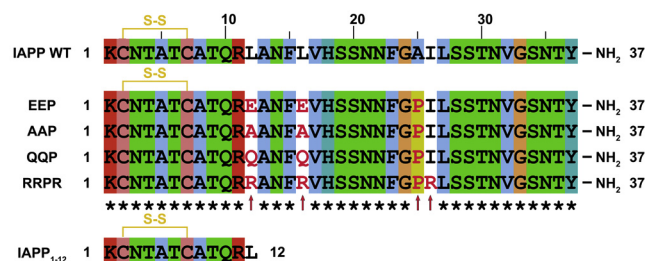


Fig. 1. Sequence of human IAPP and its mutated derivatives. Four different variants were designed by replacing residues L12 and L16 to charged, polar or other hydrophobic residues (EEP, RRPR, QQP and AAP peptides). All peptides have a single substitution of A25P, whereas the RRPR peptide also incorporates an additional I26R mutation. All variants were C-terminal amidated and contained an intramolecular disulfide bond (shown in yellow brackets). A peptide analogue of the N-terminal segment of IAPP was also designed (IAPP_{1–12}).

segment was dissolved at peptide concentrations up to 10 mg/ml. Oriented fibers containing more or less aligned amyloid fibrils were prepared after 1–2 weeks of incubation at ambient temperature, by applying a droplet (5 μ l) of each peptide solution between aligned glass rods with silicone-covered ends, spaced approximately 2 mm apart. The droplets were slowly air-dried at ambient conditions to produce oriented fibers suitable for X-ray diffraction and micro-Raman spectroscopic analysis. IAPP_{1–12} solutions were incubated for long periods of up to six months, however were incapable of forming well-oriented fibers. As a result, suspensions of this peptide were cast on a front-coated Au mirror and left to dry in ambient conditions to form films suitable for micro-Raman measurements.

2.4. Transmission electron microscopy

Suspensions of each peptide were placed on carbon-coated copper grids and allowed to sit for 60 s. Subsequently, the grids were flash-washed with distilled water and stained with a drop of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 45 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. A MorgagniTM 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV, was used for examination of prepared grids. Digital micrographs were acquired with an 11 Mpixel, side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.5. X-ray diffraction

X-ray diffraction patterns were collected from oriented fibers, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator, operated at 50 kV and 0.8 mA, equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418$ Å). Specimen-to-film distance was specified at 52 mm, whereas exposure time was set to 400 s. Initial viewing was performed using the program CrysAlisPro (Oxford Diffraction, 2009). The X-ray diffraction patterns were measured and displayed with the aid of iMosFLM (Leslie and Powell, 2007).

2.6. Congo red staining assays

Drops of all peptide solutions were applied to glass slides and air-dried at ambient conditions, producing hydrated films. A Congo red solution (1% w/v) was prepared in distilled water and used to stain the hydrated films, following previous protocols (Louros et al., 2014, 2015a; Romhanyi, 1971). Excess stain was removed by rinsing in water (Romhanyi, 1971). Stained samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, utilizing a Leica MZ7.5 polarizing stereomicroscope

equipped with a JVC GC-X3E camera. Congo Red spectrophotometric assays were also carried out for the WT and its corresponding variants. Absorption spectra ranging from 400 to 700 nm (every 50 nm) were recorded every 5 min at room temperature for a period of one (1) hour, following a detailed protocol (Nilsson, 2004). Congo Red spectra (50 μ M) were obtained as a reference, subsequently mixed with the peptide sample solution (10 μ M) and measured. Spectral acquisitions were performed by a BIO-RAD SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer (170–2501), with polystyrene disposable cuvettes (1 cm optical length).

2.7. Micro-Raman spectroscopy

Oriented fibers of IAPP and its mutant variants were measured by micro-Raman spectroscopy, in two distinct orientations (Fig. S1). Specifically, measurements were obtained for a parallel orientation between the fiber and laser line polarization axes. Measurements of a perpendicular orientation were also obtained, after switching the fiber axis by 90°, relative to the polarization axis. Micro-Raman spectra were recorded on a dispersive confocal Raman microscope (Renishaw InVia Reflex, 1200 L/mm). Data were collected through a 50 \times lens using a 785 nm diode laser line for excitation. Several spectra were obtained over the 450–1750 cm^{-1} Stokes range per sample and averaged. The total acquisition time was of the order of 1 h per sample to improve signal-to-noise ratio. Second derivative analysis was utilized in order to determine accurately the position of the sharp vibrational bands (Iconomidou et al., 2000).

2.8. Molecular dynamics simulations

Initial coordinates for IAPP in protofibril configuration were obtained from a previously described model structure, derived from ssNMR measurements and STEM observations (Luca et al., 2007). The model features ten copies of IAPP, organized in two pentamers interacting with one another in an antiparallel fashion, resulting in a final structure adopting a C2 rotational symmetry around the fibril axis. Protomers adopt a β -strand – loop – β -strand (U-bend) fold and form pentamers by interacting through intermolecular hydrogen bonds. The first β -strand is formed by residues in the 8–16 region, while the second strand is larger, involving the 27–37 region. Overall, approximately 55% of the structure adopts a β -sheet conformation.

System setup and modeling were performed using Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et al., 1996) and the CHARMM36 topology (Huang and MacKerell, 2013). Mutations were introduced through the *Mutate residue* function in VMD, followed by a short energy minimization to remove steric clashes. Disulfide bonds were formed between Cys-2 and Cys-7 and the protomer C-termini were amidated. Each protofibril model was embedded in a solvent box with a margin of at least 15 Å from the boundaries to any protofibril particle and a NaCl ion concentration of 0.15 M. The final size of each system was approximately ~64,000–65,000 particles.

Molecular Dynamics (MD) simulations were performed in the isothermal – isobaric (NPT) ensemble using periodic boundary conditions. Temperature was maintained at 310 K using Langevin dynamics with a damping coefficient of 1 ps^{-1} , while pressure was controlled at 1 atm using the Nosé-Hoover Langevin piston barostat, with an oscillation period of 100 fs and a decay rate of 50 fs (Feller et al., 1995). All covalently bonded hydrogen atoms were constrained with the RATTLE and SETTLE algorithms for proteins and water, respectively (Andersen, 1983; Miyamoto and Kollman, 1992; Ryckaert et al., 1977), enabling the use of a 2 fs time step. Short range non-bonded interactions were calculated using switching functions between 10 and 12 Å, while long range

electrostatic interactions were screened using the Particle Mesh Ewald (PME) method.

All simulations were performed using NAMD v. 2.11 (Phillips et al., 2005) and the CHARMM36 all-atom force field (Huang and MacKerell, 2013). The systems were subjected to 5000 steps of energy minimization and were gradually equilibrated over 1 ns, applying restraints of gradually decreasing strength on the protein atoms. Finally, each system was simulated without restraints for 100 ns. Two independent production simulations were performed per setup for validation, initialized with randomized velocity. The total simulation time of the study accumulates to approximately 1 μ s. Simulation results were analyzed using VMD and DSSP (Kabsch and Sander, 1983).

3. Results

3.1. Tracking the amyloidogenic potential of IAPP

Sequence analysis of IAPP revealed two major central regions with high aggregation potential. The prominent APR is composed primarily of residues of the 8–17 region, which has been previously highlighted as a major amyloidogenic segment along the IAPP sequence (Jaikaran et al., 2001; Laghaei et al., 2011; Louros et al., 2015b; Mao et al., 2016; Mazor et al., 2002; Scrocchi et al., 2003). The second segment, comprising residues 20–29, is one of the first documented APRs of the IAPP sequence (Christoffersen et al., 2015; Madine et al., 2008; Moriarty and Raleigh, 1999; Westermark et al., 1990). Minimal aggregation potency is observed for both the N-terminal and C-terminal regions of the protein, although previous aggregation assays have linked the C-terminal part of the protein with possible amyloidogenicity (Jaikaran et al., 2001).

Strategically placed mutations within the central APRs were predicted, with the aid of AMYLPRED2, to reduce the overall aggregation potency of the protein to a significant extent (Figs. 1 and 2). Previous theoretical and structural studies have indicated that the 8–17 region constitutes a hydrophobic interface which may be crucial for IAPP self-assembly (Fox et al., 2010; Guo et al., 2015; Laghaei et al., 2011; Louros et al., 2015a). Towards this end, IAPP variants were designed and synthesized, introducing a double replacement of the L12 and L16 residues of this hydrophobic interface. Variants with conserved substitutions, such as L12A-L16A (AAP) or, to a lesser extent, L12Q-L16Q (QQP), were predicted to have a mildly reduced amyloidogenic potential (Fig. 2). On the other hand, substitution of prominent hydrophobic residues by charged residues, such as L12E-L16E (EEP) or L12R-L16R-I26R (RRPR), was predicted to impart greater reduction in the overall amyloidogenicity of the protein (Fig. 2). The aggregation tendency of the 20–29 region was reduced by introducing an A25P mutation in all cases (Figs. 1 and 2), following the example of previous studies (Green et al., 2003; Wang et al., 2015).

3.2. Aggregation assays of hIAPP variants

The reduction in amyloidogenicity caused by mutations introduced in the central APRs was initially monitored with electron microscopy and X-ray diffraction. Electron microscopy studies revealed that all IAPP variants were actually capable of forming mature amyloid filaments through self-assembly (Fig. 3), in spite of the calculated reduction of their amyloidogenic potential. Impressively, the presence of charged residues did not interrupt the fibrillation process, since both the EEP and RRPR peptides form amyloid fibrils with morphologies comparable to those of the wild type hormone (Fig. 3B and E). More specifically, both peptides form 10–12 nm wide amyloid fibrils with a strong tendency for lateral

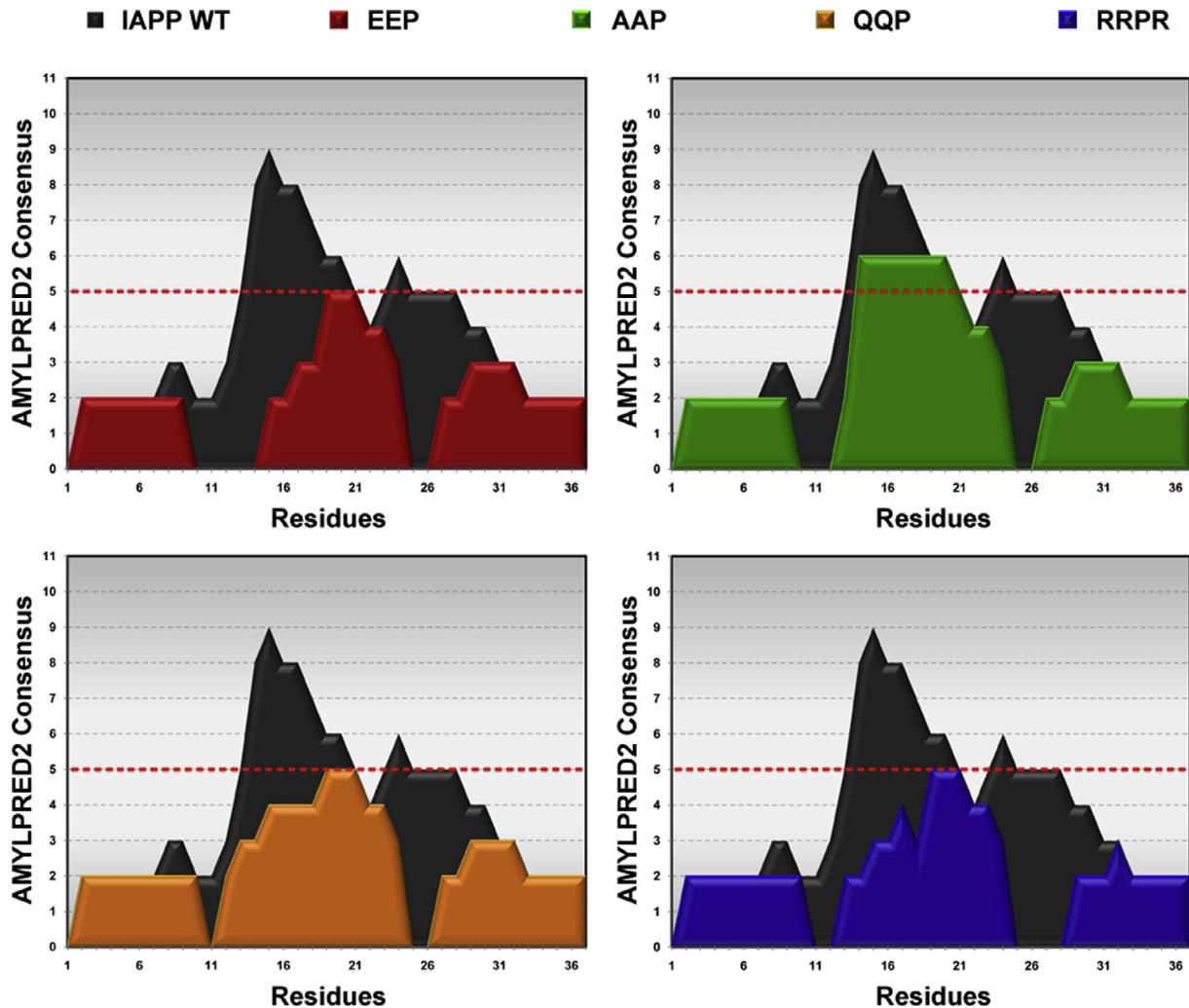


Fig. 2. Amyloidogenic potential of the four IAPP variants, compared to WT IAPP. The WT protein exhibits two major APRs, specifically regions 8–17 and 20–29. An A25P mutation, present in all mutants, significantly decreases the predicted amyloidogenic potential of the second APR. Substitution of the high scoring L12 and L16 residues also results in a reduction of the amyloidogenic potential of the 8–17 region, with the insertion of charged residues having the most significant effect, such as in the case of EEP (red) and RRPR (blue). Residue positions are indicated in the horizontal axis, whereas the AMYLPRED2 consensus prediction is shown on the vertical axis. Positive prediction by 5 out of 11 algorithms is set as a default cut-off value (shown in red lines).

attachments leading to the formation of thick fibrillar networks. This effect is intensified during the self-aggregation process of the QQP peptide which leads towards the formation of thick gels (Fig. 3D), suggesting that conserved substitutions might instead lead to an increase in the aggregation potential of the protein. It is noteworthy that, despite its increased amyloidogenicity, the AAP peptide forms shorter fibrous structures compared to the WT hormone (Fig. 3C). The above indicate that the structural and physicochemical alterations applied with the above mutations are not sufficient to inhibit the aggregation tendency of the central APRs found within the IAPP sequence, although a change in morphology occurs in some cases.

Although some studies suggest otherwise (Green et al., 2003), our results are in line with theoretical evidence indicating that all three proline substitutions found in pramlintide, the pharmaceutical replacement of IAPP (A25P-S28P-S29P), are required in order to successfully slow down IAPP aggregation (Chiu et al., 2013). Together, the aggregation assays indicate that the hydrophobic interface of the 8–17 central region may be an important but not binding factor during IAPP fibrillation, since even the presence of charged or bulky residues did not seem to impart the process to a full scale.

The “cross- β ” architecture of the fibrils formed by the self-aggregating variants was verified through X-ray diffraction. The specific amino acid substitutions do not seem to alter the overall structure of the IAPP amyloid fibril core, since all variants produce typical “cross- β ” patterns, similar to the diffraction pattern produced from WT IAPP amyloid fibrils (Fig. 3F–J). Specifically, a meridian reflection corresponding to the 4.7Å periodicity between hydrogen-bonded β -strands is observed in all cases. Surprisingly, a 10.1 Å equatorial reflection is also observed, indicating that substitution of the Leu residues does not result to significant changes in the packing distance between the corresponding successive β -sheet. However, the presence of charged Glu, and to a less extent Arg residues, disarranges the formed EEP and RRPR fibers, thus producing non-oriented diffraction patterns with reflections appearing as rings (Fig. 3G and J).

3.3. Congo red spectroscopy reveals differences in the aggregation kinetics between IAPP variants

Congo red has been shown to selectively bind on amyloid fibrils, producing a diagnostic yellow/green birefringence when viewed under crossed polars of a polarizing microscope (Divry and

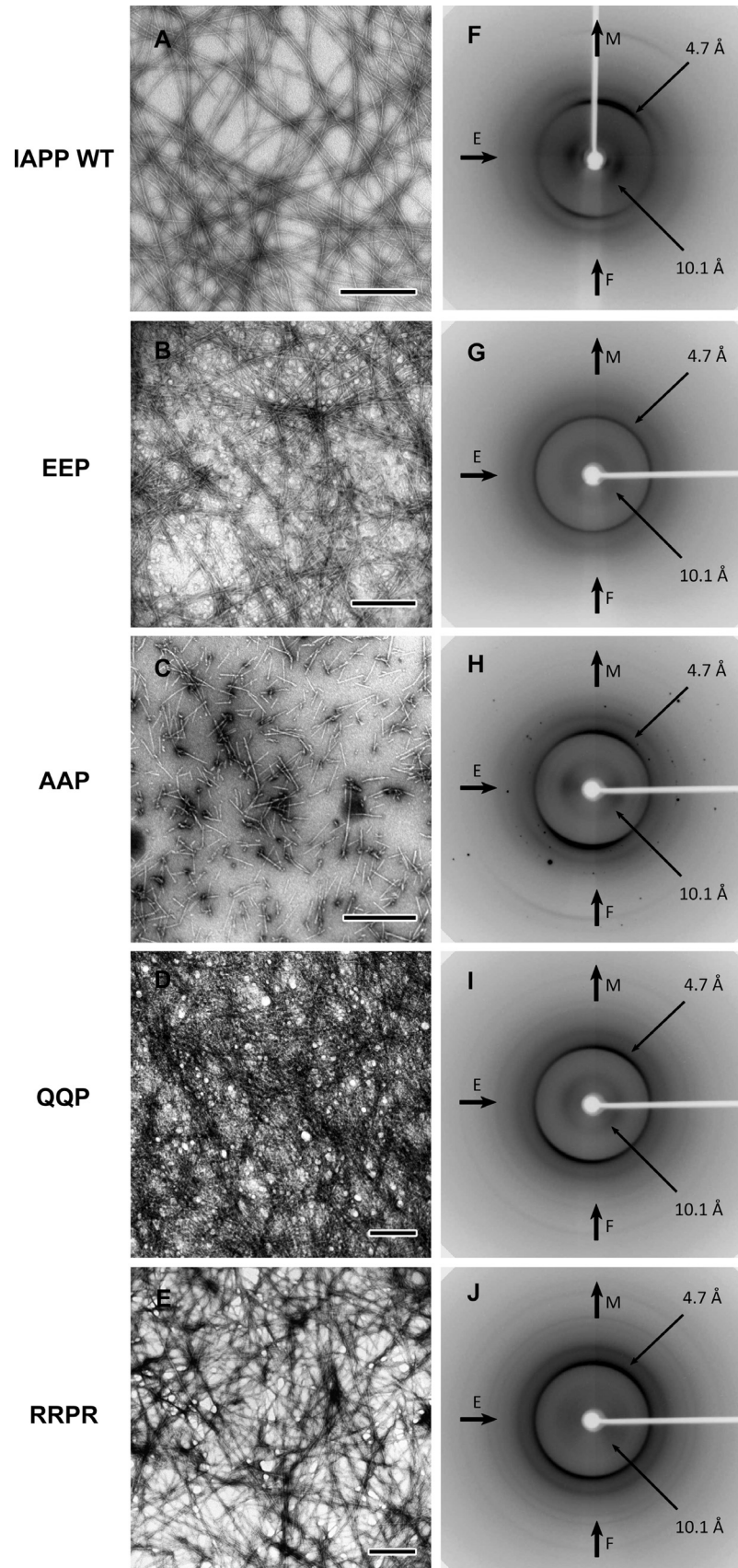


Fig. 3. Electron micrographs (A-E) and X-ray diffraction patterns (F-J) of amyloid fibrils formed by WT IAPP and the corresponding variants. Closely similar amyloid-like morphologies of 10–12 nm wide amyloid fibrils with no interconnections and indeterminate lengths are observed for the WT and variants, with the AAP peptide forming fibrils with shorter lengths (Scale bars 500 nm). Both the WT protein and the variants produce comparable cross- β patterns. Charged residues (G, J) affect the alignment of the formed fibers, resulting in a less oriented pattern with reflections appearing as rings (M: meridian; E: equator; F: fibril axis).

Florkin, 1927). Deposits containing the amyloid-like fibrils of all corresponding variants were capable of binding the Congo red dye, as viewed under bright field illumination (Fig. 4A). Moreover, when switched to crossed polars, the stained deposits clearly display characteristic apple-green birefringence, thus certifying the amyloidogenic properties of the fibrils. Congo red binding was also confirmed by spectroscopic kinetic analysis. The Congo red dye exhibits maximum absorbance at 500 nm, which was confirmed by control studies of a 50 μ M solution sample (Fig. 4B, black curves). However, when bound to the surface of amyloid fibrils, the dye exhibits an evident shift in its maximal absorbance to 540 nm. All IAPP variants were capable of shifting the absorbance maximum of the dye, after incubation for 60 min (Fig. 4B, dark blue line), suggesting that the formation of amyloid-like fibers has occurred, whereas no shift was witnessed immediately after dissolving the peptides (Fig. 4B, dark red line).

Similar kinetics were monitored for the QQP peptide with minimal differences, whereas the AAP shifting was completed after only the first 10 min of incubation, verifying that the L12A-L16A mutations increased the aggregation rate of the protein. On the other hand, although the presence of charged residues did not completely hinder the aggregation propensity of the protein, it did lead to a significant decrease in the rate of fibrillation. More specifically, shifting for the RRPR peptide occurs after 20 min, such as in the case of the QQP peptide, however no increase was observed at 540 nm after the first 10 min of incubation. As expected, the introduction of negatively charged residues, as in the case of the EEP peptide, resulted in a 3-fold decrease of the fibrillation rate compared to the WT hormone, since a shift was detected only after 50 min of incubation. The above indicate that the presence of charged residues within the APRs of IAPP produce less favorable aggregation interactions, in line with studies proposing that such residues may act as gatekeepers against amyloid aggregation (Beerten et al., 2012; Sant'Anna et al., 2014). However, even significant alterations of the physicochemical properties of the 8–17 APR are not able to suppress the aggregation propensity of the molecule, suggesting that the hydrophobic interface of the 8–17 region is probably not the only major driving force behind IAPP fibrillation.

3.4. Micro-Raman spectroscopy provides evidence of the aggregation-prone core of IAPP amyloid fibrils

Raman spectroscopy is a powerful non-invasive technique for the structural characterization of protein aggregates, including amyloids, where traditional methods, such as X-ray crystallography or NMR are inapplicable (Ortiz et al., 2007; Rodriguez-Perez et al., 2013; Sereda et al., 2015). This technique has been applied in the past to determine the orientation of individual structural units within the sample (Rousseau et al., 2004). Here, micro-Raman spectroscopy was applied on the oriented amyloid fibers of the IAPP variants (Fig. S2). This analysis enabled the study of the conformational properties of certain structural units of IAPP and yielded information about the orientation and contribution of these structures in the amyloid core of IAPP fibrils (Fig. 5).

3.4.1. Amide I region (1550–1750 cm^{-1})

As expected, the WT protein, as well as all the variants, exhibits a strong amide I band at 1671–1672 cm^{-1} , attributed to the well-ordered β -sheet secondary structure of the formed amyloid fibrils. Additional component bands located at \sim 1585 and \sim 1605 cm^{-1} are assigned to the ring modes of Phe and Tyr residues. Detailed evidence was also extracted regarding the uniformity and orientation level of the amyloid fibers formed by each peptide. The amide I Raman band depends primarily on the C=O stretching mode (Chen et al., 1994; Mirkin and Krimm, 1991). The C=O groups are ori-

ented more or less in a parallel fashion to the main fibril axis, since they take part in the formation of hydrogen bonds between successive β -strands composing the cross- β amyloid fibril core. Significant differences were observed between the intensities of the amide I bands for parallel and perpendicularly oriented WT, AAP and QQP fibers, indicating the formation of uniform and well-oriented fibers. This indication is in good agreement with the well-oriented diffraction patterns of the same samples (Fig. 3). In contrast, the EEP and RRPR peptides present no differences in the intensity of the amide I band between parallel and perpendicular orientations. This probably suggests a more or less random orientation of the constituent amyloid fibrils. It is noteworthy that identical intensities between the parallel and perpendicular orientations could also occur in the highly unlikely event of the total number of constituent fibrils aligned at exactly 45° relative to the polarization axis of the laser.

3.4.2. Tyrosine residues (800–900 cm^{-1})

Tyrosine residues are responsible for a doublet appearing in this range, due to Fermi resonance between the ring-breathing vibration and the overtone of an out-of-plane ring bending vibration of the *para*-substituted phenolic side chain (Siamwiza et al., 1975). Furthermore, the relative peak intensity ratio ($R = I_{850}/I_{830}$) strongly depends on the ionization state of the phenoxy group and is sensitive to its participation in H-bonding, therefore it is commonly used to inspect the burial or exposure of Tyr residues (Carey, 1982). All variants include a single Tyr right next to their C-terminal end and present a characteristic doublet, at 851–856 cm^{-1} and 830–838 cm^{-1} . For WT, EEP, AAP and QQP peptides, a $R \sim 1.25$ value indicates that the C-terminal Tyr acts as both a donor and an acceptor of moderate hydrogen bonds. The corresponding ratio on RRPR is just slightly lower than 1, indicating that in this case Tyr has a slightly stronger role as a hydrogen donor. R values ranging from 1.25 to 1.40 indicate that the Tyr residues are exposed and not buried, thus unlikely to contribute to the buried hydrophobic amyloid core (Carey, 1982). The WT peptide has a relatively unusual character, containing three distinct bands at 830, 841 and 856 cm^{-1} .

It has been reported previously that Tyr heterogeneity within aggregates could lead to a splitting of one of the vibrational modes, resulting in 3 peaks instead of the conventional doublet (Pandit et al., 2008). This is also supported by the increased ratio of the 841 cm^{-1} peak relative to the doublet in the perpendicular orientation, implying several conformations for the C-terminal Tyr residue between different protomers composing WT amyloid fibrils. Notably, this splitting event for the 841 cm^{-1} peak occurs at the expense of the 830 cm^{-1} band, a feature that is significantly stronger in the perpendicular orientation. No evidence for splitting was displayed by the variants. This could suggest that the corresponding substitutions may have a stabilizing effect in the conformation of the Tyr residue compared to the WT. On the other hand, this lack of splitting could be due to increased disorder (in comparison to the WT). Increased disorder may not allow for resolving the two components, causing instead, a shift of the derivative minimum within the 830–840 cm^{-1} range. Finally, no significant differences of the doublet intensity were observed between the two orientations. This observation supports the hypothesis that the C-terminally placed Tyr residue is not part of the stable vital cross- β core of IAPP amyloid fibrils.

3.4.3. Disulfide bonds (450–560 cm^{-1})

Vibrational modes in this range are directly affected by different conformations of disulfide bridges (Nakanishi et al., 1974; Van Wart et al., 1973). The presence of characteristic peaks at 489–492, 505–510 and 520–527 cm^{-1} verifies that the fibrillation process maintains but influences the disulfide bridge of the WT and

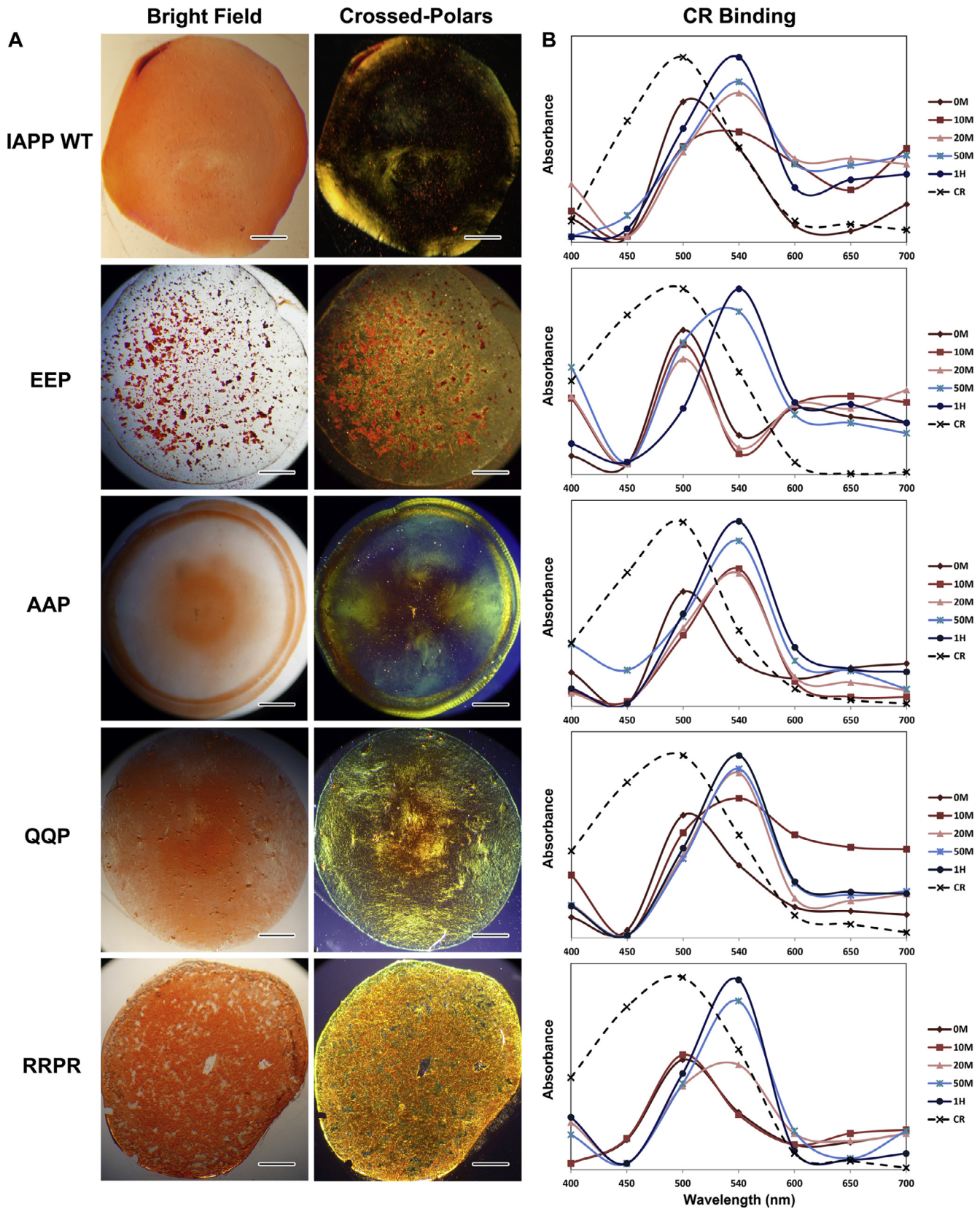


Fig. 4. Congo red binding assays of IAPP variants. (A) The amyloidogenic properties of the WT protein and its variants were confirmed by their ability to bind the CR, as seen under bright field illumination and the apple-green birefringence when switching to crossed-polars (Scale bars 400 μ m). (B) CR binding studies revealed slower rates of fibrillation for the EEP and RRPR peptides and an accelerated rate of fibril formation for the AAP peptide, compared to the WT protein. The CR reference curves, showing a maximum absorbance at 500 nm are shown in black dotted lines in each graph.

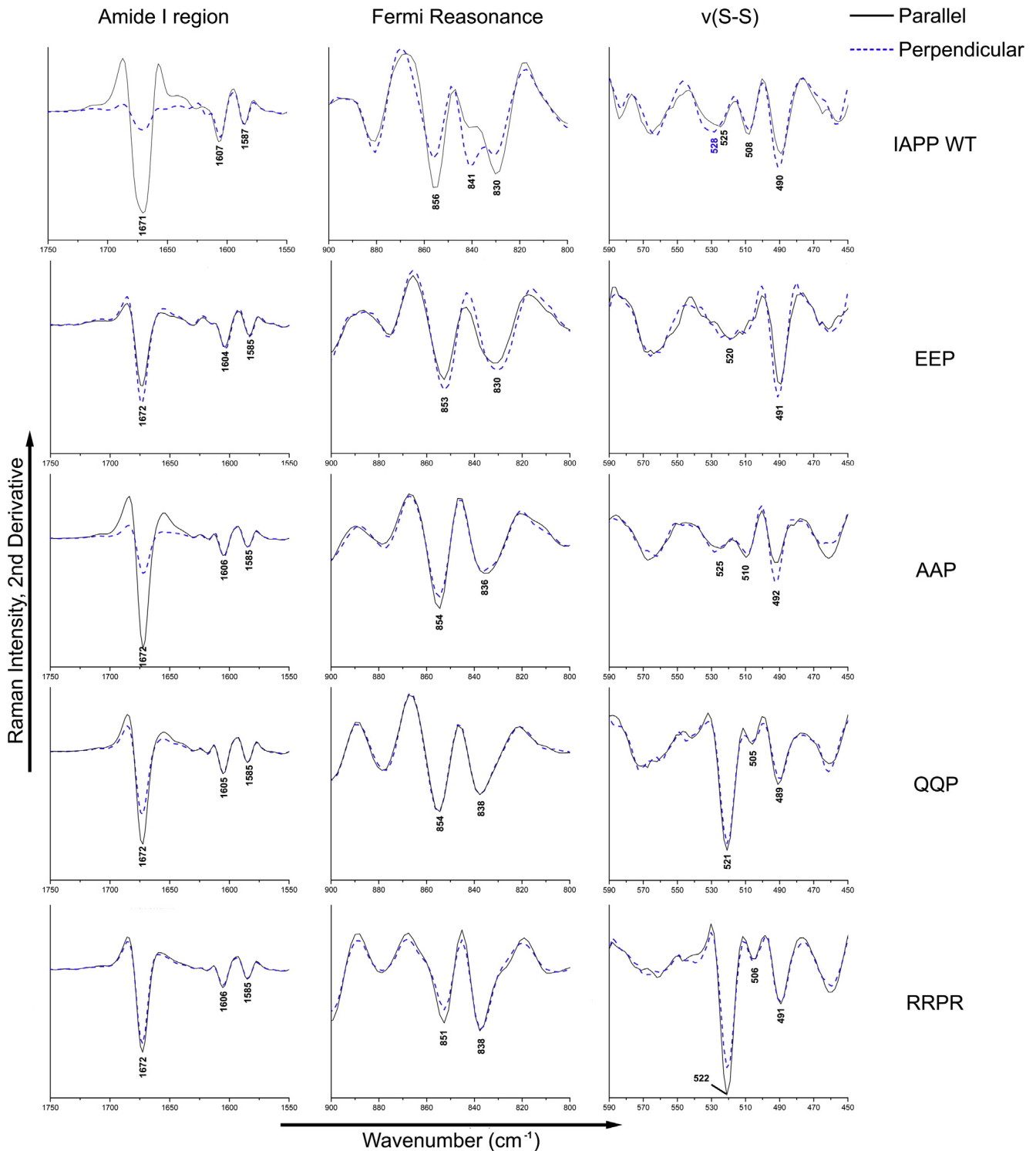


Fig. 5. Second derivative micro-Raman spectra obtained from parallel (black line) and perpendicular (blue line) arrangements between IAPP variant amyloid fibers and the laser polarization axis. Analysis of the amide I region reveals that all peptides participate in the formation of uniform and stable β -sheet structures. Noticeable intensity differences among orientations illustrate the formation of well-oriented fibers containing WT, AAP and QQP amyloid fibrils. The characteristic Fermi doublet ($800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) reveals that the C-terminal Tyr residue most probably serves as a donor and acceptor to the formation of moderate hydrogen bonds. I_{850}/I_{830} ratios suggest that the Tyr side chains are predominantly exposed rather than buried within the fibril core. The splitting event observed in the spectra of the WT peptide indicates high conformational heterogeneity between the Tyr side chains. The absence of differences in the intensities between parallel and perpendicular orientations of the well-oriented WT, AAP and QQP variants is clearly evident. Several bands are observed in the $450\text{--}560\text{ cm}^{-1}$ region of the spectra, suggesting multiple conformations for the disulfide bridges. The component at 490 cm^{-1} arises as a result of low CS-SC angles, signifying that the disulfide bridges are under mechanical strain. For visualization purposes, the $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ and $450\text{--}540\text{ cm}^{-1}$ regions are shown expanded by factors of 3.5x and 10x, respectively, relative to the amide I region.

its variants. The two latter peaks are assigned to S-S stretching vibrations (vS-S) of disulfide bridges found in a *gauche-gauche-*

gauche (ggg) and *gauche-gauche-trans* (ggt or tgg) conformation (Sugeta, 1975; Sugeta et al., 1972, 1973), indicating multiple con-

formations for the CS-SC group for protomers incorporated within the formed fibrils. The additional component located at $\sim 490\text{ cm}^{-1}$ has been suggested to arise from a CS-SC moiety with a low dihedral angle (Van Wart and Scheraga, 1976). Low disulfide bridge dihedral angles occur as a result of strain to the bond, suggesting that the formation of IAPP amyloid fibrils causes mechanical stress on the N-terminal disulfide bond of the WT protomers. The relative intensities of the three peaks in WT and EEP indicate that almost half of the monomers of the amyloid fibers contain strained disulfide bridges. The strain level is lower for the AAP peptide, where all three conformations seem to have a more or less equal contribution. Finally, the strain of the disulfide bond seems to be limited in the case of the QQP and RRPR peptides, where more than half of the bridges appear to adopt a ggt/tgg conformation.

The hypothesis concerning the association of fibrillation with the stress of the disulfide bond was further supported by the analysis of micro-Raman spectra derived from films formed by the IAPP₁₋₁₂ peptide segment (Fig. S3). Specifically, no band was observed close to $\sim 490\text{ cm}^{-1}$, suggesting that no strain was present in the absence of fibrillation (Table S1). However, multiple conformations of disulfide bridges were detected, as the presence of two bands disclosed, again with a preference for the ggt/tgg conformation ($\sim 3:5$ ratio) (Fig. S3). The aforementioned results indicate that the intramolecular disulfide bridges of the N-terminal segment of IAPP and the corresponding variants do not adopt a single conformation and are under stress during fibrillation, therefore most probably do not contribute as a pivotal part of the stable amyloid fibril core. The conformational instability of the disulfide bond is also evident through the spectral shift of the 525 cm^{-1} band to 528 cm^{-1} , observed between the two orientations for the hIAPP fiber (Fig. 5). Analysis of the data obtained between different orientations further support this hypothesis. Specifically, minimal or no changes were observed by comparing the intensities of the peaks between a parallel and a perpendicular orientation. This is a strong indication that, at least for the well oriented WT, AAP and QQP fibers, the N-terminal part of the monomers, containing the intramolecular disulfide bond, is not incorporated within the amyloid fibril core.

3.5. Comparison with existing models of IAPP fibril structures

Explicit solvent MD simulations were performed for the WT and variant protofibrils, adopting a previously suggested configuration (Luca et al., 2007). Analogous substitutions were performed for L12, L16 and A25 for the AAP, QQP and EEP systems, while an additional substitution of I26R was introduced in the RRPR system. Notably, the above residues are buried in the hydrophobic core with the exception of A25.

Simulations of the WT protofibril were reasonably stable, with minimal changes in the overall fold. The parallel, in-register β -strands and the U-shaped topology of the peptides were retained, with the monomers adopting a twist of $\sim 4\text{--}6^\circ$ between adjacent β -strands, in agreement with experimentally observed axial fibril twists (Fig. 6A). Tight packing of side chains was observed in the experimentally verified 8–17 and 20–29 APRs composing the first β -strand, the turn region and the beginning of the facing β -strand, proposing favorable interactions for these segments (Fig. 6A and B). Structural analysis of the modelled structure provides information on the importance of the Ser residue located in position 20 of the IAPP sequence. A S20G mutation is commonly associated with early onset type II diabetes in Asian populations (Sakagashira et al., 2000). Previous theoretical studies have suggested that the S20G mutation can possibly promote IAPP aggregation by destabilizing the early α -helical content of IAPP monomers, driving it towards an extended β -strand conformation (Duan et al., 2012; Wang et al., 2012). Furthermore, studies have also high-

lighted that the critical position of a S20G mutation is capable of inducing local flexibility and reducing the overall entropy cost for the assembly process (Xu et al., 2009), providing a possible explanation for the faster aggregation kinetics induced by the S20G mutation. The overall β -sheet content remains stable at approximately 55%. Orientation of the two pentamers was maintained, suggesting further favorable interactions between the 23–29 segments of two entities. An average Root Mean Square Deviation (RMSD) value of 5.3 \AA was measured for the final 10 ns of the simulations; this value is in good agreement with evidence from previous, shorter MD simulations of human IAPP protofibril pentamers (Liang et al., 2013a). Root Mean Square Fluctuation (RMSF) measurements (per-residue analysis) validated the order and stability of the 8–16 and 24–30 segments, which showed minimal fluctuations (Fig. S4) compared to the overall structure. In contrast, both the N- and C-termini displayed high RMSF and Accessible Surface Area (ASA) values accounting for extensive mobility of these regions (Figs. S4 and S5). Coupled with the slight disordering observed in the C-terminal 34–37 segment, these results further verify the notion that the N- and C-ends of the monomers are not vitally contributing in the stable IAPP amyloid fibril core.

Similar behaviors were observed during the AAP and QQP variant simulations, with both systems retaining their initial protofibril configurations. The overall packing and secondary structure elements were preserved, as revealed by β -sheet content (%) and ASA (\AA^2) analysis (Table 1). The conserved L12A and L16A substitutions did not disrupt the hydrophobic core of the steric zipper, thus allowing the system to incorporate the double mutation and remain stable. Furthermore, the A25P substitution located at the end of the turn connecting the facing strands allowed the incorporation of Pro residues stacked along the fibril axis, and facilitated the U-bend overall fold. During the QQP simulation, the protomers adopted specific features that allow the incorporation of stacked Gln residues in the hydrophobic core. More specifically, buried Q12 side chains increased the packing density of the steric zipper. This process was facilitated by the formation of a tight hydrogen bond network between stacked Q12 side chains, in close proximity to the equally buried T30 side chains of the facing β -strand, resulting in the formation of more stable pentamers (Fig. 6C). Both systems exhibited similar fluctuations, compared to the WT, indicating that they also contain amyloidogenic cores. In contrast to the above, significant disruptions for the protofibrils were observed in the RRPR and EEP simulations. In both cases the 8–17 β -strand of the protomers dissociated, with certain segments partially reverting to a helical structure, leading to an opening of the U-bend and destruction of the overall protofibril fold. These results highlight the inability of the system to accommodate buried charged side chains that disrupt the hydrophobic interior of the protofibril core. Taken together, these results would suggest that the proposed protofibril structure is not compatible with the fibril properties of EEP and RRPR. However, in both the EEP and the RRPR simulations, the β -sheets of the 24–30 segments and the packing of the pentamers remain intact, indicating that despite the applied substitutions, these particular regions retain their amyloid-like features. Furthermore, it is important to note that the initial model corresponds to a specific polymorph of hIAPP amyloid fibrils (Luca et al., 2007). Therefore, it is possible that IAPP self-assembly includes different stabilizing interactions between polymorphs with different properties, allowing variants such as the EEP and RRPR peptides to form amyloid fibrils with alternative morphologies. This notion is also supported by several studies showing that monomeric IAPP is capable of interconverting between various conformations during the initial stages of aggregation and is associated to a number of putative overlapping aggregation pathways (Chiu and de Pablo, 2015; Dupuis et al., 2011;

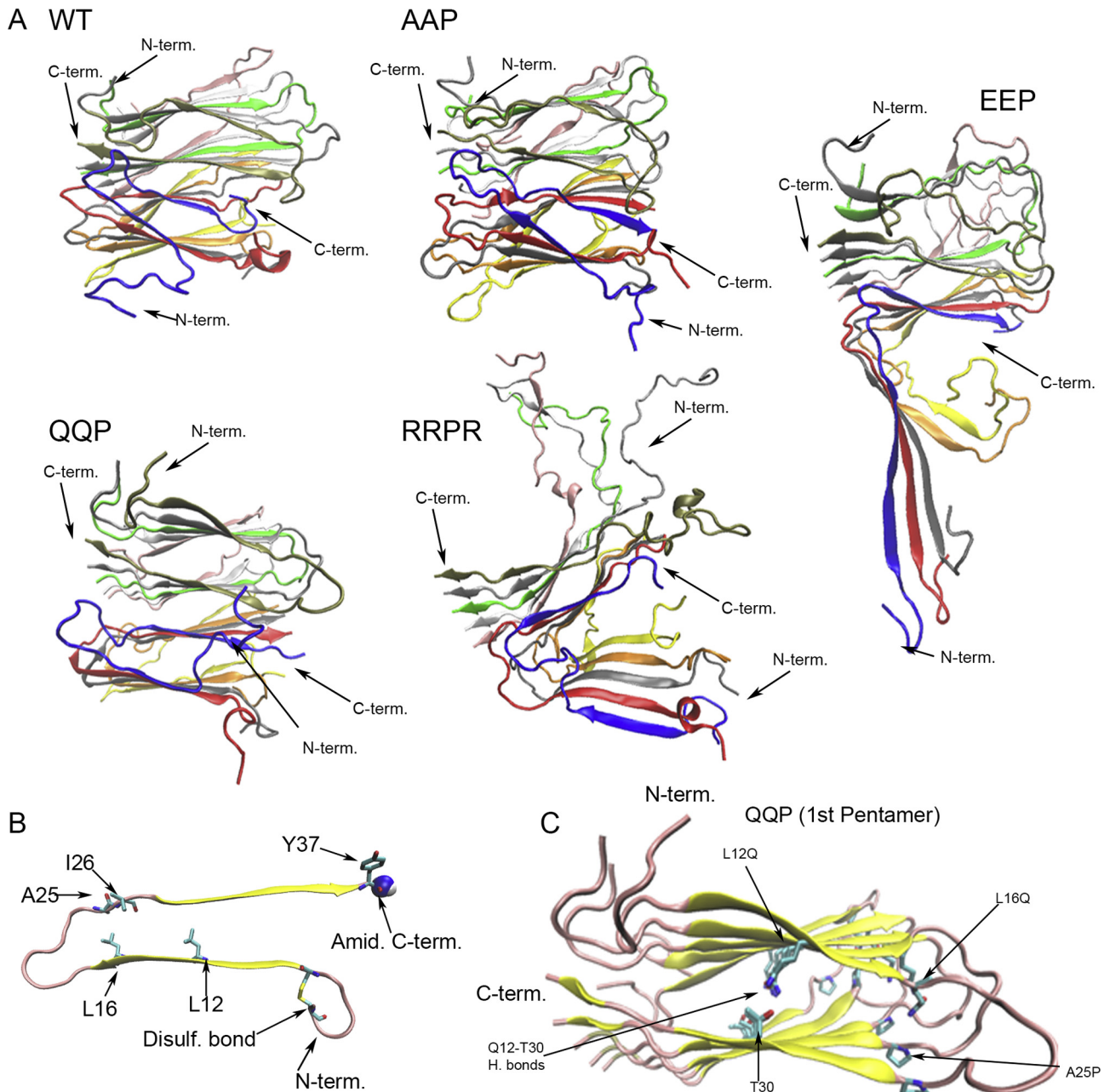


Fig. 6. Structural overview of the IAPP protofibril simulation systems. (A) Representations of the simulated WT and mutant protofibrils after 100 ns of MD simulations. All structures are shown in the same orientation using a cartoon representation, with each IAPP monomer colored differently. Solvent molecules are not rendered for clarity. N- and C-termini of the first protomer in each pentamer are labeled. (B) Features of IAPP, depicted upon the structure of an isolated monomer. The monomer is colored according to secondary structure elements, using yellow for β -strands and pink for unstructured regions. Positions of point mutations, the C2–C7 disulfide bond and the C-terminal Tyr are depicted as sticks and colored using cyan for carbon, blue for nitrogen and red for oxygen atoms. Hydrogen atoms were excluded for clarity. The amidated C-terminus is shown in sphere representation and colored blue for nitrogen and white for hydrogen atoms. (C) Close inspection of the first pentamer for the QQP simulation after 100 ns. Secondary structure elements and residue depictions are shown as in (B). Amino acid substitutions, as well as T30 are shown and labeled accordingly. The favorable packing of side chains and a potential hydrogen bond network between Q12 and T30 is indicated.

Table 1

Summary of simulation systems with structural characteristics, averaged over the last 10 ns of the simulations.

System	Substitutions	Number of particles	RMSD (Å)	Backbone hydrogen bonds	% β -sheet content	Normalized ASA (Å ²) ^a
WT	–	64545	5.30 ± 0.13	171 ± 4	56.54 ± 0.96	1736.70 ± 173.25
AAP	L12A-L16A-A25P	64224	5.65 ± 0.19	176 ± 3	55.14 ± 1.09	1743.03 ± 158.05
QQP	L12Q-L16Q-A25P	64328	4.95 ± 0.12	174 ± 4	56.15 ± 1.10	1663.16 ± 177.82
EEP	L12E-L16E-A25P	64322	18.60 ± 0.36	144 ± 4	39.63 ± 2.55	2184.23 ± 196.10
RRPR	L12R-L16R-A25P-I26R	64735	19.43 ± 0.37	137 ± 4	29.86 ± 2.86	2633.23 ± 237.76

^a Per-protomer Accessible Surface Area (ASA), averaged over all protomers in the protofibril.

Liang et al., 2013b). Both experimental and computational studies have highlighted that the 8–16 segment of IAPP, primarily α -helical in the initial fold, may participate in early dimerization events (Abedini and Raleigh, 2009; Laghaei et al., 2011), suggesting that the EEP and RRPR mutations could possibly influence the balance of the IAPP aggregation pathway, leading to the formation of fibrils with alternative morphological characteristics.

4. Discussion

Evidence accumulated over the years has linked several segments of human IAPP with its aggregation propensity. Early studies highlighted that human IAPP, as a member of the calcitonin gene related peptide family, shares reasonable sequence homology to α - and β -calcitonin gene related peptides (CGRPs), adrenomedullin and intermedin, especially at the N- and C-termini (Cooper et al., 1987; Westermark et al., 1987b). However, IAPP is the only documented member of the family capable of forming amyloid fibrils. IAPP differs from the members of the CGRP family primarily in the 20–29 region, suggesting that this region plays a vital role during its aggregation (Westermark et al., 1990). Supplementary experiments with rIAPP initially confirmed that IAPP amyloidogenicity is possibly controlled by this region, attributing the inability of the latter to aggregate to the presence of 3 Pro residues within this segment (Betsholtz et al., 1989). However, recent contradictory data reveal that the proline mutations do not completely inhibit IAPP aggregation, which still occurs but at slower rates (da Silva et al., 2016). The hydrophobic interface of the amphipathic 8–17 segment of IAPP is also considered as major driving force of IAPP fibrillogenesis, thus increasing further the complexity behind IAPP aggregation (Jaikaran et al., 2001; Laghaei et al., 2011; Louros et al., 2015b; Mao et al., 2016; Mazor et al., 2002; Scrocchi et al., 2003). Following the above, several studies focused at identifying specific mutations along the IAPP sequence which can eliminate its aggregation tendency (Abedini and Raleigh, 2006; Green et al., 2003; Koo et al., 2008), expanding the possible aggregation prone sites along its entire sequence (Fox et al., 2010). Even the end terminal regions of the protein, which were initially considered to be protective against IAPP fibrillation (Koo and Miranker, 2005; Tu et al., 2014) have been at some point associated to the formation of fiber-like structures (Cope et al., 2013; Jaikaran and Clark, 2001).

Sequence analysis utilizing AMYLPRED2 verified that the 8–17 and 20–29 segments of IAPP present the highest predicted amyloidogenic potential. Accordingly, mutations targeted to reduce the hydrophobic potential and amyloidogenic properties of the 8–17 and 20–29 segments were introduced. Impressively, significant alterations of the 8–17 segment were incapable of inhibiting IAPP aggregation, supporting the hypothesis that this is not the only segment controlling IAPP aggregation. However, the hydrophobic nature of this segment most probably participates in the formation of the amyloid fibril core, since the presence of charged residues leads to 3-fold slower rate of IAPP fibrillation, as shown by the CR kinetic experiments. On the other hand, the presence of a single Pro residue at position 25 also was not capable of reducing the amyloidogenic potential of the 20–29 segment, in line with supplementary evidence suggesting that the A25P substitution lowers the β -propensity of the protein, yet, retains some amyloidogenic characteristics (Chakraborty et al., 2013; Chiu et al., 2013). MD simulations highlighted that the cyclic structural features of its side chain, may allow the Pro residue occupying position 25 to promote the stability of the fibril core, by facilitating the turn region between the facing β -strands.

The main focus of this study was to identify which segments of human IAPP are indeed part of or excluded from the stable hydrophobic core of human IAPP amyloid fibrils. For this purpose,

micro-Raman spectroscopy was employed given its sensitivity to the single intramolecular disulfide bond (C2-C7) and the single Tyr residue (Y37) that occupy the N- and C-termini of the molecule, respectively. The micro-Raman spectra of the AAP and QQP fibers are very similar to those of the WT, suggesting that the specific mutations do not alter significantly the structural properties of the amyloid fibrils. On the other hand, the presence of charged residues affected the orientation and uniformity of the fibrils, indicating less favorable interactions than in the WT protein and suggesting that the 8–17 APR segment may be incorporated as part of the amyloid core.

Different conformations were observed for the disulfide bridges of all peptides, including WT. These data suggest that the N-terminal region of IAPP that contains the intermolecular disulfide bridge is not incorporated within the stable hydrophobic core. However, IAPP fibrillation was found to cause mechanical stress on the disulfide bridges of the peptide monomers, as revealed by the shifting of disulfide bands to lower energies, suggesting that this segment is directly affected by fibrillogenesis. Interestingly, the C2-C7 disulfide bridge is positioned next to the 8–17 APR along the IAPP sequence. Incorporation of this segment within the amyloid core could possibly explain the strain applied on the monomer disulfide bridges. These findings are in agreement with recent studies suggesting that the disulfide bond is important in containing IAPP aggregation, rather than being part of the fibril core (Iltchev et al., 2016).

Analysis of the Fermi resonance doublet revealed that the C-terminal Tyr is surface exposed, in agreement with recent TERS results (vandenAkker et al., 2015). Moreover, the micro-Raman spectra of the WT fibers were found to exhibit an unusual splitting event, attributed to the presence of different Tyr conformations. This variability suggests that the C-terminal residue of the protein is highly unlikely to be part of the stable amyloid core.

5. Conclusions

Micro-Raman spectroscopy provided valuable information regarding the structural features of human IAPP amyloid fibrils. The spectroscopic data validate the hypothesis that the hydrophobic core of human IAPP amyloid fibrils is most probably composed by the central APRs of the sequence, whereas the N- and C-terminal ends of the protein are more or less excluded. However, the alteration of the hydrophobic properties of the 8–17 APR segment, as well as a single Pro substitution of the 20–29 APR at position 25 did not prove sufficient to impart IAPP fibrillogenesis, suggesting that these factors are not sufficient for controlling IAPP aggregation. Future experiments should be focused on identifying the underlying forces that lead these central segments towards the formation of the IAPP amyloid fibril core.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

¹This research has been co-financed by the European Union (European Regional Development Fund – ERDF) and Greek national funds through the Operational Program ‘Competitiveness and Entrepreneurship’ of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (Project code 11SYN-1-1230, General Secretariat for Research and Technology of the Greek Ministry of Education and Religious Affairs, Culture and Sports). ²Research at TPCI/NHRF was supported through funds of its Applied Spectroscopy Laboratory. ³This work was supported by computational time granted

from the Greek Research & Technology Network (GRNET) in the National HPC facility – ARIS under project ID “PRO02041-S.C.S.M.P.”.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Sorin Luca and Dr. Robert Tycko for kindly providing the coordinates of the initial IAPP fibril model. We thank Assist. Prof. Vassiliki Magafa and Dr. Aikaterini Zompra from the University of Patras for the synthesis of the IAPP_{1–12} peptide. We thank Costas Tsiantos for expert technical assistance in Micro-Raman Spectroscopy. We thank the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology at National Hellenic Research Foundation for access to the X-ray diffraction facility. We acknowledge the help of Dr. Evangelia Chrysinia with the X-ray diffraction experiments. The help of Dr. George Baltatzis and Prof. Efstratios Patsouris and the use of the Morgagni Microscope at the 1st Department of Pathology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens are also gratefully acknowledged. Finally, we would like to thank the handling editor and the anonymous reviewers of this manuscript for their useful and constructive criticism.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2017.06.002>.

References

- Abedini, A., Raleigh, D.P., 2006. Destabilization of human IAPP amyloid fibrils by proline mutations outside of the putative amyloidogenic domain: is there a critical amyloidogenic domain in human IAPP? *J. Mol. Biol.* 355, 274–281.
- Abedini, A., Raleigh, D.P., 2009. A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 453–459.
- Andersen, H.C., 1983. Rattle: a “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* 52, 24–34.
- Azriel, R., Gazit, E., 2001. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J. Biol. Chem.* 276, 34156–34161.
- Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriou, P., Wenqing, Y., Schäfer, W., 1989. Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einsetzung substituierter triphenylmethyl-harze. *Tetrahedron Lett.* 30, 3943–3946.
- Beerten, J., Jonckheere, W., Rudyak, S., Xu, J., Wilkinson, H., De Smet, F., Schymkowitz, J., Rousseau, F., 2012. Aggregation gatekeepers modulate protein homeostasis of aggregating sequences and affect bacterial fitness. *Protein Eng. Des. Sel.* 25, 357–366.
- Betsholtz, C., Christmansson, L., Engstrom, U., Rorsman, F., Svensson, V., Johnson, K. H., Westermark, P., 1989. Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett.* 251, 261–264.
- Brender, J.R., Durr, U.H., Heyl, D., Budarapu, M.B., Ramamoorthy, A., 2007. Membrane fragmentation by an amyloidogenic fragment of human Islet Amyloid Polypeptide detected by solid-state NMR spectroscopy of membrane nanotubes. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2026–2029.
- Brender, J.R., Hartman, K., Nanga, R.P., Popovych, N., de la Salud Bea, R., Vivekanandan, S., Marsh, E.N., Ramamoorthy, A., 2010. Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8973–8983.
- Brender, J.R., Salamekh, S., Ramamoorthy, A., 2012. Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular perspective. *Acc. Chem. Res.* 45, 454–462.
- Brender, J.R., Heyl, D.L., Samisetti, S., Kotler, S.A., Osborne, J.M., Pesaru, R.R., Ramamoorthy, A., 2013. Membrane disordering is not sufficient for membrane permeabilization by islet amyloid polypeptide: studies of IAPP(20–29) fragments. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 8908–8915.
- Carey, P.R., 1982. *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. Academic Press.
- Chakraborty, S., Mukherjee, B., Basu, S., 2013. Pinpointing proline substitution to be responsible for the loss of amyloidogenesis in IAPP. *Chem. Biol. Drug Des.* 82, 446–452.
- Chen, X.G., Schweitzer-Stenner, R., Krimm, S., Mirkin, N.G., Asher, S.A., 1994. N-methylacetamide and its hydrogen-bonded water molecules are vibrationally coupled. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 11141–11142.
- Chiu, C.C., de Pablo, J.J., 2015. Fibrillar dimer formation of islet amyloid polypeptides. *AIP Adv.* 5, 092501.
- Chiu, C.C., Singh, S., de Pablo, J.J., 2013. Effect of proline mutations on the monomer conformations of amylin. *Biophys. J.* 105, 1227–1235.
- Christoffersen, H.F., Andreasen, M., Zhang, S., Nielsen, E.H., Christiansen, G., Dong, M., Skrydstrup, T., Otzen, D.E., 2015. Scaffolded multimers of hIAPP(20–29) peptide fragments fibrillate faster and lead to different fibrils compared to the free hIAPP(20–29) peptide fragment. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 1890–1897.
- Clark, A., Cooper, G.J., Lewis, C.E., Morris, J.F., Willis, A.C., Reid, K.B., Turner, R.C., 1987. Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes. *Lancet* 2, 231–234.
- Conchillo-Sole, O., de Groot, N.S., Aviles, F.X., Vendrell, J., Daura, X., Ventura, S., 2007. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinf.* 8, 65.
- Cooper, G.J., Willis, A.C., Clark, A., Turner, R.C., Sim, R.B., Reid, K.B., 1987. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8628–8632.
- Cope, S.M., Shinde, S., Best, R.B., Ghirlanda, G., Vaiana, S.M., 2013. Cyclic N-terminal loop of amylin forms non amyloid fibers. *Biophys. J.* 105, 1661–1669.
- da Silva, D.C., Fontes, G.N., Erthal, L.C., Lima, L.M., 2016. Amyloidogenesis of the amylin analogue pramlintide. *Biophys. Chem.* 219, 1–8.
- Divry, D., Florkin, M., 1927. Sur les propriétés optiques de l’amyloïde. *C. R. Soc. Biol.* 97, 1808–1810.
- Duan, M., Fan, J., Huo, S., 2012. Conformations of islet amyloid polypeptide monomers in a membrane environment: implications for fibril formation. *PLoS One* 7, e47150.
- Dupuis, N.F., Wu, C., Shea, J.-E., Bowers, M.T., 2011. The amyloid formation mechanism in human IAPP: dimers have β -strand monomer-monomer interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 7240–7243.
- Feller, S.E., Zhang, Y., Pastor, R.W., Brooks, B.R., 1995. Constant pressure molecular dynamics simulation: the Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* 103, 4613–4621.
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L., 2004. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotechnol.* 22, 1302–1306.
- Fox, A., Snollaerts, T., Errecart Casanova, C., Calciano, A., Nogaj, L.A., Moffet, D.A., 2010. Selection for nonamyloidogenic mutants of islet amyloid polypeptide (IAPP) identifies an extended region for amyloidogenicity. *Biochemistry* 49, 7783–7789.
- Green, J., Goldsbury, C., Mini, T., Sunderji, S., Frey, P., Kistler, J., Cooper, G., Aebi, U., 2003. Full-length rat amylin forms fibrils following substitution of single residues from human amylin. *J. Mol. Biol.* 326, 1147–1156.
- Guo, C., Cote, S., Mousseau, N., Wei, G., 2015. Distinct helix propensities and membrane interactions of human and rat IAPP(1–19) monomers in anionic lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* 119, 3366–3376.
- Huang, J., MacKerell Jr., A.D., 2013. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 34, 2135–2145.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14 (33–38), 27–38.
- Iconomidou, V.A., Chryssikos, D.G., Gionis, V., Pavlidis, M.A., Paipetis, A., Hamodrakas, S.J., 2000. Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *J. Struct. Biol.* 132, 112–122.
- Ilitchev, A.I., Giammona, M.J., Do, T.D., Wong, A.G., Buratto, S.K., Shea, J.E., Raleigh, D. P., Bowers, M.T., 2016. Human islet amyloid polypeptide N-terminus fragment self-assembly: effect of conserved disulfide bond on aggregation propensity. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, 1010–1018.
- Jaikaran, E.T., Clark, A., 2001. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1537, 179–203.
- Jaikaran, E.T., Higham, C.E., Serpell, L.C., Zurdo, J., Gross, M., Clark, A., Fraser, P.E., 2001. Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* 308, 515–525.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- Kajava, A.V., Aebi, U., Steven, A.C., 2005. The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J. Mol. Biol.* 348, 247–252.
- Kim, C., Choi, J., Lee, S.J., Welsh, W.J., Yoon, S., 2009. NetCSSP: web application for predicting chameleon sequences and amyloid fibril formation. *Nucleic Acids Res.* 37, W469–473.
- Koo, B.W., Miranker, A.D., 2005. Contribution of the intrinsic disulfide to the assembly mechanism of islet amyloid. *Protein Sci.* 14, 231–239.
- Koo, B.W., Hebdia, J.A., Miranker, A.D., 2008. Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Eng. Des. Sel.* 21, 147–154.
- Laghaei, R., Mousseau, N., Wei, G., 2011. Structure and thermodynamics of amylin dimer studied by Hamiltonian-temperature replica exchange molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* 115, 3146–3154.
- Leslie, A.G.W., Powell, H.R., 2007. Processing diffraction data with mosflm. In: Read, R., Sussman, J.L. (Eds.), *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 41–51.
- Liang, G., Zhao, J., Yu, X., Zheng, J., 2013a. Comparative molecular dynamics study of human islet amyloid polypeptide (IAPP) and rat IAPP oligomers. *Biochemistry* 52, 1089–1100.
- Liang, G., Zhao, J., Yu, X., Zheng, J., 2013b. Comparative Molecular Dynamics Study of Human Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) and Rat IAPP Oligomers. *Biochemistry* 52, 1089–1100.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Tsiolaki, P.L., Chrysinia, E.D., Baltatzis, G.E., Patsouris, E.S., Hamodrakas, S.J., 2014. An N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) ‘aggregation-prone’ segment involved in isolated atrial amyloidosis. *FEBS Lett.* 588, 52–57.

- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Griffin, M.D., Howlett, G.J., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2015a. Chameleon 'aggregation-prone' segments of apoA-I: a model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis. *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 711–718.
- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Zompra, A.A., Pappa, E.V., Magafa, V., Pairas, G., Cordopatis, P., Cheimonidou, C., Trougakos, I.P., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2015b. Structural studies and cytotoxicity assays of "aggregation-prone" IAPP(8–16) and its non-amyloidogenic variants suggest its important role in fibrillogenesis and cytotoxicity of human amylin. *Biopolymers* 104, 196–205.
- Luca, S., Yau, W.M., Leapman, R., Tycko, R., 2007. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. *Biochemistry* 46, 13505–13522.
- Lutz, T.A., 2010. The role of amylin in the control of energy homeostasis. *Am. J. Physiol.* 298, R1475–1484.
- Madine, J., Jack, E., Stockley, P.G., Radford, S.E., Serpell, L.C., Middleton, D.A., 2008. Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20–29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 14990–15001.
- Mao, Y., Yu, L., Yang, R., Ma, C., Qu, L.-B., Harrington, P.D.B., 2016. New insights into side effect of solvents on the aggregation of human islet amyloid polypeptide 11–20. *Talanta* 148, 380–386.
- Marek, P., Abedini, A., Song, B., Kanungo, M., Johnson, M.E., Gupta, R., Zaman, W., Wong, S.S., Raleigh, D.P., 2007. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology. *Biochemistry* 46, 3255–3261.
- Mazor, Y., Gilead, S., Benhar, I., Gazit, E., 2002. Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.* 322, 1013–1024.
- Mirkin, N.G., Krimm, S., 1991. Ab initio vibrational analysis of hydrogen-bonded trans- and cis-N-methylacetamide. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 9742–9747.
- Miyamoto, S., Kollman, P.A., 1992. Settle: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* 13, 952–962.
- Moriarty, D.F., Raleigh, D.P., 1999. Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin20–29. *Biochemistry* 38, 1811–1818.
- Nakanishi, M., Takesada, H., Tsuboi, M., 1974. Letter: conformation of the cystine linkages in bovine alpha-lactalbumin as revealed by its Raman effect. *J. Mol. Biol.* 89, 241–243.
- Nanga, R.P., Brender, J.R., Xu, J., Hartman, K., Subramanian, V., Ramamoorthy, A., 2009. Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment by solution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 8252–8261.
- Nanga, R.P., Brender, J.R., Vivekanandan, S., Ramamoorthy, A., 2011. Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2337–2342.
- Nilsson, M.R., 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34, 151–160.
- Ortiz, C., Zhang, D., Ribbe, A.E., Xie, Y., Ben-Amotz, D., 2007. Analysis of insulin amyloid fibrils by Raman spectroscopy. *Biophys. Chem.* 128, 150–155.
- Oxford diffraction, 2009. Chrysalis promotions. Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England.
- Pandit, A., Fay, N., Bordes, L., Valery, C., Cherif-Cheikh, R., Robert, B., Artzner, F., Paternostre, M., 2008. Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: the role of the aromatic residues. *J. Peptide Sci.* 14, 66–75.
- Patel, H.R., Pithadia, A.S., Brender, J.R., Fierke, C.A., Ramamoorthy, A., 2014. In search of aggregation pathways of IAPP and other amyloidogenic proteins: finding answers through NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 1864–1870.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802.
- Ratner, R.E., Dickey, R., Fineman, M., Maggs, D.G., Shen, L., Strobel, S.A., Weyer, C., Kolterman, O.G., 2004. Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabetic Med.* 21, 1204–1212.
- Rodriguez-Perez, J.C., Hamley, I.W., Squires, A.M., 2013. Determination of orientations of aromatic groups in self-assembled peptide fibrils by polarized Raman spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 13940–13950.
- Romhanyi, G., 1971. Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with congo red. *Virchows Arch.* 354, 209–222.
- Rousseau, M.E., Lefevre, T., Beaulieu, L., Asakura, T., Pezolet, M., 2004. Study of protein conformation and orientation in silkworm and spider silk fibers using Raman microspectroscopy. *Biomacromolecules* 5, 2247–2257.
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., Berendsen, H.J.C., 1977. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23, 327–341.
- Sakagashira, S., Hiddinga, H.J., Tateishi, K., Sanke, T., Hanabusa, T., Nanjo, K., Eberhardt, N.L., 2000. S20G mutant amylin exhibits increased in vitro amyloidogenicity and increased intracellular cytotoxicity compared to wild-type amylin. *Am. J. Pathol.* 157, 2101–2109.
- Sant'Anna, R., Braga, C., Varejao, N., Pimenta, K.M., Grana-Montes, R., Alves, A., Cortines, J., Cordeiro, Y., Ventura, S., Foguel, D., 2014. The importance of a gatekeeper residue on the aggregation of transthyretin: implications for transthyretin-related amyloidosis. *J. Biol. Chem.* 289, 28324–28337.
- Sciaccia, M.F., Lolicato, F., Di Mauro, G., Milardi, D., D'Urso, L., Satriano, C., Ramamoorthy, A., La Rosa, C., 2016. The role of cholesterol in driving IAPP-membrane interactions. *Biophys. J.* 111, 140–151.
- Scrocchi, L.A., Ha, K., Chen, Y., Wu, L., Wang, F., Fraser, P.E., 2003. Identification of minimal peptide sequences in the (8–20) domain of human islet amyloid polypeptide involved in fibrillogenesis. *J. Struct. Biol.* 141, 218–227.
- Sereda, V., Sawaya, M.R., Lednev, I.K., 2015. Structural organization of insulin fibrils based on polarized Raman spectroscopy: evaluation of existing models. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 11312–11320.
- Shim, S.H., Gupta, R., Ling, Y.L., Strasfeld, D.B., Raleigh, D.P., Zanni, M.T., 2009. Two-dimensional IR spectroscopy and isotope labeling defines the pathway of amyloid formation with residue-specific resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 6614–6619.
- Siamwiza, M.N., Lord, R.C., Chen, M.C., Takamatsu, T., Harada, I., Matsuura, H., Shimanouchi, T., 1975. Interpretation of the doublet at 850 and 830 cm⁻¹ in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. *Biochemistry* 14, 4870–4876.
- Sugeta, H., 1975. Normal vibrations and molecular conformations of dialkyl disulfides. *Spectrochim. Acta, Part A* 31, 1729–1737.
- Sugeta, H., Go, A., Miyazawa, T., 1972. S-S and C-S stretching vibrations and molecular conformations of dialkyl disulfides and cystine. *Chem. Lett.* 1, 83–86.
- Sugeta, H., Go, A., Miyazawa, T., 1973. Vibrational spectra and molecular conformations of dialkyl disulfides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 46, 3407–3411.
- Tian, J., Wu, N., Guo, J., Fan, Y., 2009. Prediction of amyloid fibril-forming segments based on a support vector machine. *BMC Bioinf.* 10 (Suppl. 1), S45.
- Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2013. A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PLoS One* 8, e54175.
- Tu, L.H., Serrano, A.L., Zanni, M.T., Raleigh, D.P., 2014. Mutational analysis of preamyloid intermediates: the role of his-tyr interactions in islet amyloid formation. *Biophys. J.* 106, 1520–1527.
- Van Wart, H.E., Scheraga, H.A., 1976. Raman spectra of strained disulfides. Effect of rotation about sulfur-sulfur bonds on sulfur-sulfur stretching frequencies. *J. Phys. Chem.* 80, 1823–1832.
- Van Wart, H.E., Lewis, A., Scheraga, H.A., Saeva, F.D., 1973. Disulfide bond dihedral angles from Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 2619–2623.
- vandenAkker, C.C., Deckert-Gaudig, T., Schleeper, M., Velikov, K.P., Deckert, V., Bonn, M., Koenderink, G.H., 2015. Nanoscale heterogeneity of the molecular structure of individual hIAPP amyloid fibrils revealed with tip-enhanced Raman spectroscopy. *Small* 11, 4131–4139.
- Wang, M., Yang, J., Wang, J., Wang, X., 2012. Structural effects of L16Q, S20G, and L16Q-S20G mutations on hIAPP: a comparative molecular dynamics study. *Chin. J. Chem.* 30, 241–248.
- Wang, H., Ridgway, Z., Cao, P., Ruzsicska, B., Raleigh, D.P., 2015. Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity. *Biochemistry* 54, 6704–6711.
- Westermark, P., Wilander, E., 1978. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15, 417–421.
- Westermark, P., Wernstedt, C., O'Brien, T.D., Hayden, D.W., Johnson, K.H., 1987a. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *A. J. Pathol.* 127, 414–417.
- Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D.W., O'Brien, T.D., Johnson, K.H., 1987b. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuroepithelial-like protein also present in normal islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3881–3885.
- Westermark, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermark, G.T., Betsholtz, C., 1990. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5036–5040.
- Williamson, J.A., Miranker, A.D., 2007. Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Sci.* 16, 110–117.
- Wiltzius, J.J., Sievers, S.A., Sawaya, M.R., Cascio, D., Popov, D., Riek, C., Eisenberg, D., 2008. Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.* 17, 1467–1474.
- Xu, W., Jiang, P., Mu, Y., 2009. Conformation preorganization: effects of S20G mutation on the structure of human islet amyloid polypeptide segment. *J. Phys. Chem. B* 113, 7308–7314.

Unraveling the Aggregation Propensity of Human Insulin C-Peptide

Paraskevi L. Tsiolaki,¹ Nikolaos N. Louros,¹ Aikaterini A. Zompra,² Stavros J. Hamodrakas,¹ Vassiliki A. Iconomidou¹

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, 15701, Greece

²Department of Pharmacy, University of Patras, Patras, 26504, Greece

Received 15 February 2016; revised 19 May 2016; accepted 31 May 2016

Published online 3 June 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22882

ABSTRACT:

Over the last 20 years, proinsulin C-peptide emerged as an important player in various biological events. Much time and effort has been spent in exploring all functional features of C-peptide and recording its implications in Diabetes mellitus. Only a few studies, though, have addressed C-peptide oligomerization and link this procedure with Diabetes. The aim of our work was to examine the aggregation propensity of C-peptide, utilizing Transmission Electron Microscopy, Congo Red staining, ATR-FTIR, and X-ray fiber diffraction at a 10 mg mL⁻¹ concentration. Our experimental work clearly shows that C-peptide self-assembles into amyloid-like fibrils and therefore, the aggregation propensity of C-peptide is a characteristic novel feature that should be related to physiological and also pathological conditions. © 2016 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers (Pept Sci)* 108: 1–8, 2017.

Keywords: insulin biosynthesis; proinsulin C-peptide; diabetes mellitus; amyloids; amyloidogenic peptides

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of any preprints from the past two calendar years by emailing the Biopolymers editorial office at biopolymers@wiley.com.

INTRODUCTION

Structural studies of peptides and proteins during the last few years revealed an increasing number of the so-called “amyloidogenic proteins”. A large number of human proteins, chemically and structurally divergent, may undergo general or partial refolding and may subsequently self-assemble into amyloid fibrils, causing degenerative diseases such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, prion diseases, or Diabetes type 2.^{1,2} Amyloid diseases are characterized by the presence of amyloid deposits composed mainly of one amyloidogenic protein. The 2014 Amyloid Fibril Protein Nomenclature List includes all well characterized amyloidogenic proteins to-date.³

C-peptide (Figure 1b) was for several years a forgotten parameter in insulin studies, but today has been proven to be a bioactive peptide.⁴ Proinsulin (Figure 1a), the truncated product of pre-proinsulin, consists of 86 amino acids, where C-peptide is the 31 amino acid linker (Figure 1a, blue color) between insulin A chain (Figure 1a, deep red color) and insulin B chain (Figure 1a, green color).^{5–7} During normal insulin biosynthesis in pancreatic β -cells, proinsulin is able to fold quickly into its correct three-dimensional structure, by forming three disulfide bridges, two interchain bonds and one intrachain bond (Figure 1a, yellow dashed lines).⁵ Following this folding process, proinsulin is transferred in clathrin coated immature secretory vesicles to the Golgi complex.⁸ Granule maturation is completed within 2 h after synthesis; at pH near acidic conditions (\sim 5.0–5.5), where prohormone serine endoproteases, convertase PC2 and convertase PC1/3 act in combination, and the clathrin coating is removed.^{9–11}

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Vassiliki A. Iconomidou; Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece; e-mail: veconom@biol.uoa.gr

Contract grant sponsor: University of Athens

Contract grant sponsor: European Union (European Regional Development Fund – ERDF), Greek national funds through the Operational Program “Competitiveness and Entrepreneurship” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (General Secretariat for Research and Technology of the Greek Ministry of Education and Religious Affairs, Culture and Sports)

Contract grant number: 11SYN-1-1230

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

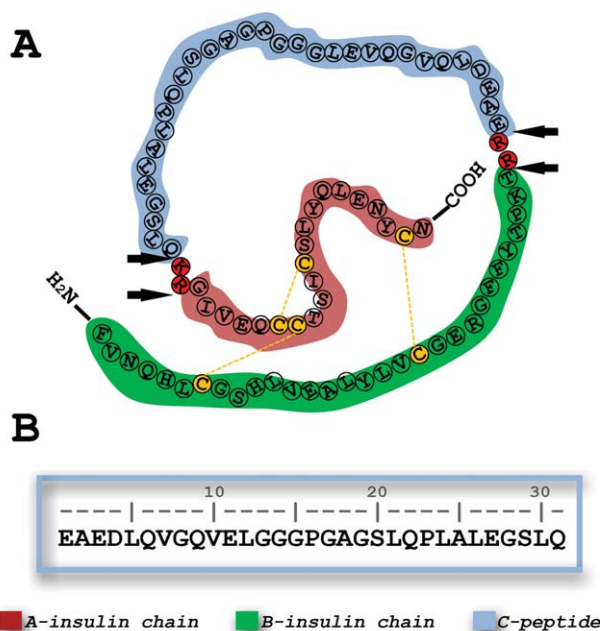


FIGURE 1 Schematic representation of human proinsulin and amino acid sequence of proinsulin C-peptide. A: A graphical representation of human proinsulin; insulin A chain and B chain are shown in red and green respectively and proinsulin C-peptide, the connecting peptide between A and B chains, is shown in blue. Cysteines are shown in yellow and disulfide bridges are marked with yellow dashed lines. Arrows indicate sites of proteolytic activity into β -cell granules (See Introduction). B: The amino acid composition of the 31 amino acid human proinsulin C-peptide (Uniprot AC: P01308).

The generation of native insulin and free C-peptide is accomplished by carboxypeptidase-E (CPE), which eliminates C-terminal basic amino acids exposed by the convertases (Figure 1a, black arrows).¹² This mechanism results in the retention of both insulin and C-peptide in the mature storage granules in equal amounts.¹³ However, mature β -cell granules also contain other peptides, including islet amyloid polypeptide (IAPP or amylin), chromogranins, other minor components and even small amounts of proinsulin or proinsulin intermediates and proIAPP.^{8,13,14} The final exocytotic release of insulin from the β -cell storage vesicles into the blood is an energy-dependent process, as a response to the sugar level in blood.¹⁵ Both insulin and C-peptide are released together into the circulation in equimolar amounts.¹³

Studies concerning proinsulin C-peptide function are constantly enriched.¹⁶ It is absolutely crucial in insulin biosynthesis, since C-peptide is the essential join between A and B chains. C-peptide participation in proinsulin structure fulfills the important biological role of facilitating the formation of the correct secondary and tertiary structure of insulin and preventing insulin aggregation.^{7,17} Recent studies have reported

several molecular interactions of C-peptide,^{18–20} cell signaling events,²¹ and pivotal effects in diabetic patients.²⁰

Apart from mature insulin, whose three dimensional structure was determined by X-ray crystallography, proinsulin and C-peptide adopt unordered structures in solution, as NMR spectroscopy confirmed^{22,23} and, interestingly, free insulin (chains A and B) displays similar overall conformation to that of proinsulin.²⁴ Although most researchers agree that the C-peptide structure is unordered under physiological conditions, a few studies reveal that C-peptide is not a random coil, but rather contains detectable ordered structure both when free or attached to insulin in proinsulin²⁵; the N-terminal part (1-EAEDLQVGQVE–11) may adopt an α -helical conformation at high concentrations of trifluoroethanol (TFE)²⁶ and Molecular Dynamics simulations suggest turn-like motifs in the middle part and the C-terminal of C-peptide.²⁷

It has been shown that C-peptide segments are related to its function: The N-terminal part of the proinsulin C-peptide acts as a chaperon and contributes to proper insulin folding, by preventing insulin aggregation.^{28–31} The C-terminal region contains an interaction epitope for binding to a G-protein coupled receptor,³² while the C-terminal pentapeptide 27-EGSLQ–31 specifically, simulates the way the full-length C-peptide binds to a cell surface.³³ The middle segment (residues 12–26) of proinsulin C-peptide, with a high turn propensity, is considered to be flexible due to its sequence composition and it is suggested to mediate C-peptide–membrane interactions at low pH.^{27,34}

C-peptide interferes with Diabetes mellitus; patients with type 2 Diabetes (T2D) produce reduced insulin, in contrast to patients with type 1 Diabetes (T1D), which have lost all of their capacity to secrete insulin.^{15,35} Since insulin and C-peptide are co-secreted in equimolar amounts, C-peptide release was first used as an independent “biomarker” (or diagnostic tool) of insulin secretory rate, *in vivo*, in diabetic patients.^{36,37} Moreover, in type 1 and type 2 Diabetes, where pancreatic β -cells are under stress and consequently malfunction, the incomplete proinsulin cleavage results in elevated circulating proinsulin levels.³⁸ Furthermore, C-peptide treatment was reported to be beneficial for diabetic subjects in combination with daily insulin injections. The most well-known therapeutic possibilities of C-peptide are gathered together in a recent excellent review article.³⁹

Several studies highlight the therapeutic potential of C-peptide in diabetes, only a few studies, though, unveil the formation of C-peptide oligomers^{31,40} and the accumulation of C-peptide in the vessel walls in early atherogenesis, in diabetic patients.⁴¹ Taking all the above studies into consideration, in the present study, we decided to test the propensity of C-peptide to self-assemble into amyloid fibrils, *in vitro*. The C-peptide was found to self-assemble into amyloid-like fibrils at a concentration of 10 mg ml⁻¹ in distilled water and,

therefore, here we discuss this novel important finding in relation to Diabetes and to physiological conditions.

MATERIALS AND METHODS

Peptide Synthesis

The 31 amino acid C-peptide (Figure 1b) was synthesized by GeneCust© Europe, Luxembourg. The purity of the synthesized peptide was 96.8% (free N- and C-terminals).

Preparation of Amyloid-Like Fibrils

The synthesized peptide was dissolved in distilled water (pH 5.5), at a concentration of 10 mg ml⁻¹, and after one week incubation at ambient (room) temperatures, C-peptide forms amyloid-like fibril-containing gels. Oriented fibers, suitable for X-ray diffraction, were obtained from suspensions of C-peptide mature amyloid fibrils, as described below.

X-Ray Diffraction

A droplet (~10 μ l) of mature fibril suspension was placed between two quartz capillaries covered with wax, spaced ~1.5 mm apart and mounted horizontally on a glass substrate, as collinearly as possible, to obtain an oriented fiber. The X-ray diffraction pattern from this fiber was collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK₂ high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418$ Å), operated at 50 kV, 0.8 mA. The specimen-to-film distance was set at 52 mm and the exposure time was set to 400 s. The X-ray patterns, initially were viewed using the program CrysAlisPro⁴² and consequently measured with the aid of the program iMosFLM.⁴³ Indexing ($h, k, l, d_{\text{obs}}, d_{\text{calc}}$) of C-peptide was done utilizing DICVOL06.⁴⁴

Negative Staining and Transmission Electron Microscopy

For negative staining, droplets (~3 – 5 μ l) of C-peptide mature fibril suspensions were applied to glow-discharged 400-mesh carbon-coated copper grids for 60 s. The grids were stained with a droplet (5 μ l) of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. The grids were air-dried. The fibril-containing grids were examined with a MorgagniTM 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11Mpixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (ATR FTIR) and Post-Run Computations of the Spectra

A 10- μ l droplet of C-peptide mature fibril suspension was cast on a front-coated Au mirror and left to dry slowly at ambient conditions to form a thin film. Infrared spectra were obtained from these films at a resolution of 4 cm⁻¹, utilizing an IR microscope (IRScope II by Bruker Optics) equipped with a Ge attenuated total reflectance (ATR)

objective lens (20x) and attached to a Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer (Equinox 55, by Bruker Optics). Internal reflection spectroscopy has several advantages compared with the more common KBr dispersion technique.⁴⁵ The choice of ATR was dictated by the need to exclude any possible spectroscopic and chemical interactions between the sample and the dispersing medium. Having a penetration depth ca. 1–2 μ m (1000 cm⁻¹, Ge), ATR is free of saturation effects, which may be present in the transmission spectra of thicker samples. Moreover, the use of a microscope facilitates the acquisition of data from small samples. Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the S/N ratio. The spectra are shown in the absorption mode after correction for the wavelength dependence of the penetration depth ($pd \sim \lambda$). Absorption band maxima were determined from the minima in the second derivative of the corresponding spectra. Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software and included smoothing by the Savitzky–Golay algorithm over a ± 8 cm⁻¹ range, around each data point. Smoothing over narrower ranges resulted in a deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence.

Congo Red Staining and Polarized Light Microscopy

C-peptide mature fibril suspensions were applied to glass slides and stained with a 10 mM Congo Red (Sigma) solution in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) for ~30 min. Then, they were washed several times with 90% ethanol and left to dry approximately for 10 min. The samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope, equipped with a JVC GC-X3E camera.

Congo Red Spectroscopic Assay

Totally, 10 μ l droplets of C-peptide (10 mg ml⁻¹ final concentration) were used to record spectra between 400 and 700 nm at room temperature for a period of 7 days, following previous protocols.⁴⁶ Congo Red stain was prepared as described above. Absorption spectra were collected by a BIO-RAD SmartSpecTM 3000 Spectrophotometer (170-2501), utilizing polystyrene disposable cuvettes (1 cm optical length). A 10 mM Congo Red spectrum was used as a reference (see Supporting Information data).

RESULTS

Transmission electron microscopy and negative staining clearly demonstrate that the C-peptide folds and self-assembles, after 1 week of incubation in distilled water at pH 5.5, forming a gel which mainly contains fibrils, which display the basic characteristics of amyloid fibrils: they appear to be straight and unbranched supercoils of indeterminate length and of different diameters. Each supercoil consists of protofibrils, with a diameter of ~50 Å (Figure 2, single arrow). The simplest such supercoils are helices (Figure 2, double arrows) and have a thickness of ca. 90 – 120 Å, whereas more complex supercoils, of various diameters, are frequently seen (Figure 2, triple arrows). Moreover, frequently, C-peptide amyloid-like fibrils tend to coalesce laterally to form bundles (Figure 2,

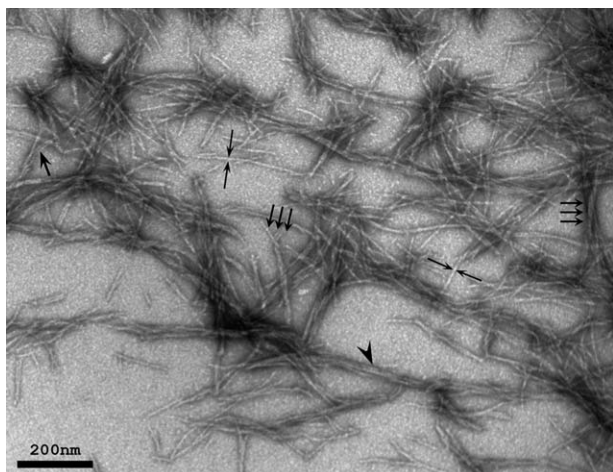


FIGURE 2 Transmission electron microscopy image of negatively stained proinsulin C-peptide amyloid-like fibrils. Proinsulin C-peptide self-assembles forming unbranched supercoils of undetermined length and different diameters (multiple arrows). Multi-stranded bundles were also observed for C-peptide (arrowhead). An individual protofibril is indicated with a single black arrow (ca. 50 Å in diameter). Bar is 200 nm.

arrowhead). Such polymorphism is common in amyloid fibril containing samples.^{47,48}

C-peptide fibrils show strong affinity for the Congo red dye and exhibit the characteristic red–green birefringence of amyloid fibrils, when viewed under crossed polars (Figure 3). Along with polarizing microscopy findings, a Congo Red spectrophotometric approach elucidates a spectral shift from 500 nm to 540 nm, indicating that Congo Red binding occurs as the concentration of C-peptide amyloid fibrils increases. Additional electron microscopy micrographs were obtained after 0, 3, and 7 days of incubation, respectively, which confirm the spectroscopic analysis. The absorption spectra of Congo Red solution and Congo Red – C-peptide mixture are shown in Supporting Information Figure S1.

The X-ray diffraction patterns of oriented fibres produced from the amyloid-like fibril suspensions of the C-peptide, indicate a powder-like pattern of a polycrystalline material (Figure 4). The intense meridional reflection at 4.68 Å is attributed to the distance between hydrogen-bonded β -strands within β -sheet. The strong, but diffuse, reflection corresponding to a 8.7 Å periodicity may be attributed to the side chain packing distance between adjacent β -sheets. The above reflections are characteristic of the “cross- β ” conformation,⁴⁹ and are observed for several amyloid-like fibrils,⁵⁰ in which the β -strands are perpendicular to the fiber axis and the sheets are packed parallel to the fiber axis (Figure 4). A list of the reflections observed in the X-ray pattern (Figure 4) is given in Table I. A full explanation of the polycrystalline diffraction pattern is given in the legend of Table

I, with a table of the d -spacings of the diffraction rings and a proposed unit cell for the C-peptide fiber/”crystallites”.

As shown in Figure 5 the ATR FTIR spectrum of C-peptide fibrils, cast as a thin-hydrated film, shows a prominent band at 1625 cm^{-1} in the amide I region and the two amide II bands at 1552 cm^{-1} and 1527 cm^{-1} , which are definitely due to β -sheet conformation.⁵¹ The amide I, high wavenumber component at 1697 cm^{-1} is an indication that the β -sheets are antiparallel.^{52–54} Other ATR FTIR bands and their tentative assignments are shown in Table II.^{54–56} Thus, the results from ATR FTIR spectroscopy strongly support the evidence from X-ray diffraction.

DISCUSSION

The objective of this study was to investigate the amyloidogenic propensity of proinsulin C-peptide *in vitro*. For this

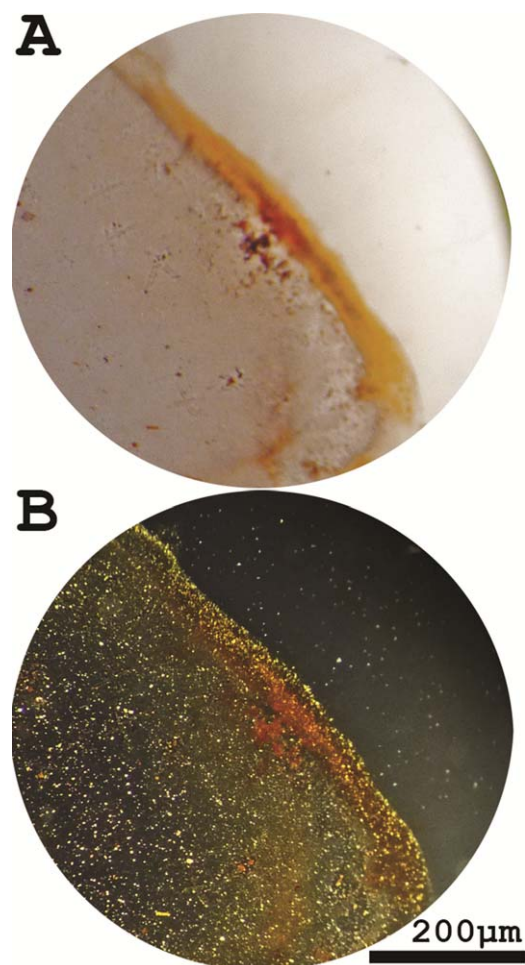


FIGURE 3 Proinsulin C-peptide Congo Red staining. A 10 mg ml^{-1} solution of C-peptide was incubated in distilled water (at ambient temperatures, pH 5.5), for ~ 7 days to produce mature amyloid-like fibrils. A hydrated thin film of C-peptide shows red–green birefringence in polarized light (b) after Congo red staining (a). (Bar 200 μm).

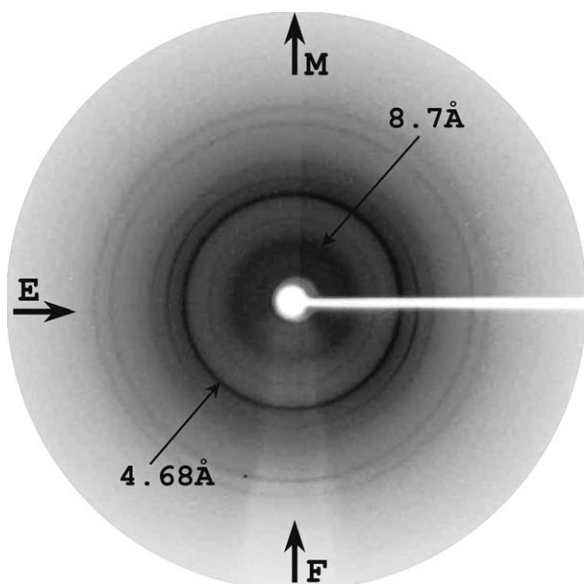


FIGURE 4 X-ray diffraction pattern from aligned C-peptide mature amyloid-like fibrils. Oriented fibers, derived from C-peptide amyloid-like fibrils, show a powder-like X-ray diffraction pattern of a polycrystalline material. Reflections with spacings at 4.68 Å and 8.7 Å, respectively, are indicated with arrows. Table I contains a list of d-spacings of the diffraction rings and a possible unit cell for the C-peptide fiber/crystallite is proposed.

reason, the 31 amino acid C-peptide was chemically synthesized and dissolved in distilled water. The results reported above suggest that C-peptide intrinsically exhibits the tendency to self-assemble into amyloid fibrils (Figure 2) and, further, fulfills all three characteristic, structural, and tinctorial features of amyloids (Figures 3–5).

Table I Spacings (d_{obs}) of the Reflections That Were Observed in the Polycrystalline X-Ray Diffraction Pattern, Taken From a Fiber of the C-Peptide Amyloid-Like Fibrils

h	K	l	d_{obs} (Å)	d_{calc} (Å)
0	3	0	8.70	8.69
4	2	0	7.60	7.60
3	2	2	6.00	5.99
8	0	0	4.68	4.67
3	6	0	4.12	4.11
2	7	0	3.67	3.67
9	6	0	3.01	3.00
10	6	1	2.80	2.80

Indexing (h, k, l, d_{obs} , d_{calc}) was done, utilizing DICVOL06 [44], a software for the automatic indexing of powder diffraction patterns by the successive dichotomy method, based on an orthorhombic unit cell, with unit cell parameters: $a = 37.50 \pm 0.02$ Å, $b = 26.18 \pm 0.01$ Å, $c = 16.10 \pm 0.01$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. This unit cell has a volume, $\text{Vol} = 15431.2 \text{ Å}^3$ and it is estimated to contain 4 molecules of C-peptide.

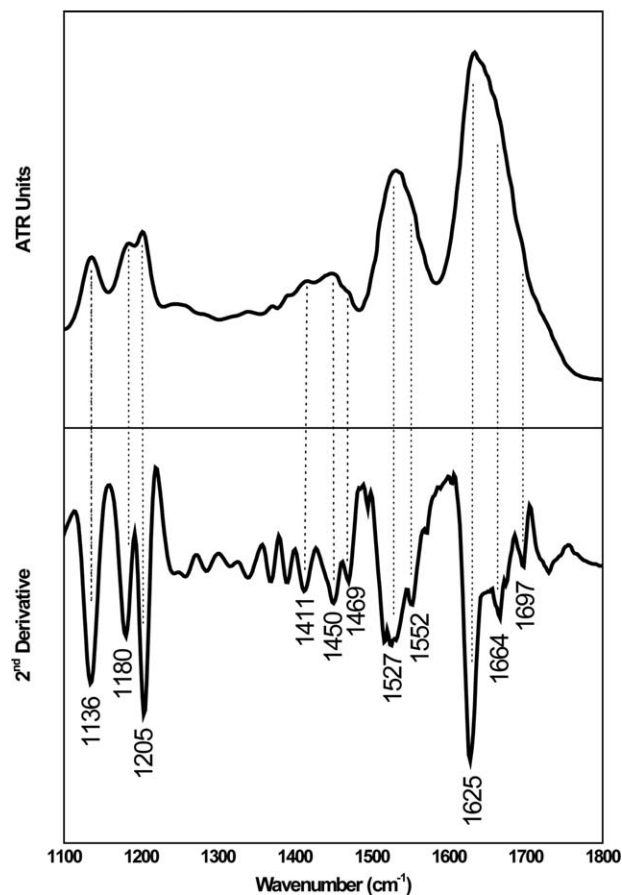


FIGURE 5 ATR FT-IR (1100–1800 cm^{-1}) spectrum of proinsulin C-peptide. Suspensions of mature amyloid fibrils derived from the C-peptide were cast on a flat stainless-steel plate (SpectRIM, Tienta Sciences, Inc. Indianapolis, USA) and left to air-dry slowly, at ambient conditions, in order to form a hydrated, thin film. Observed bands from the ATR FT-IR spectrum obtained from this film and their tentative assignments are given in Table II. A second derivative spectrum is also included.

Table II Bands Observed in the ATR FTIR (1100 – 1800 cm^{-1}) Spectrum Produced From a Hydrated Film of the Amyloidogenic C-Peptide After Self-Assembly, and Their Tentative Assignments (Figure 5)

Band (cm^{-1})	Assignment
1136	TFA
1180	TFA
1205	TFA
1411	Pro ^[55]
1450	CH ₂ ^[56] , Pro ^[55]
1469	CH ₂ ^[56]
1527	Amide II (β -sheet)
1552	Amide II (β -sheet)
1625	Amide I (β -sheet)
1664	TFA
1697	Amide I (antiparallel β -sheet)

These novel features of proinsulin C-peptide should be carefully taken into account, since early studies of C-peptide self-aggregation stated clearly that C-peptide on its own does not give rise to amyloid fibrils.⁵⁷ Several peptides and proteins, which had not previously been associated with amyloidoses, (as C-peptide in our case), have been proven to form amyloid-like fibrils *in vitro*, indicating that amyloid formation may be an inherent ability of proteins under specific conditions.^{1,2} Furthermore, *in vitro* studies using synthetic amyloidogenic proteins have been highly important for understanding the mechanisms by which proteins accumulate and subsequently may be involved in degenerative diseases.⁵⁸

Aiming at a better understanding of C-peptide aggregation, it is worth mentioning that, in general, the control of the oligomeric states of a peptide is being driven by the relative concentration of the protein. *In vitro* assays of C-peptide utilized initial concentrations, ranging from 1 mg ml⁻¹ to 40 mg ml⁻¹.^{17,31,57,59} Similar conditions are also commonly used at *in vitro* fibrillation assays of other “aggregation-prone” proteins and peptides.^{60–62} Importantly, C-peptide levels at physiological conditions, such as fasting and postprandial conditions, are low.⁶³ However, the growing literature on Diabetes highlights that high concentration of C-peptide is observed in overweight individuals⁶⁴ and subjects with type 2 Diabetes,⁶⁵ because of the increase of C-peptide biological half-life.³⁸ At the same time, in atherogenesis, C-peptide was found to accumulate and deposit in the vessel walls of diabetic patients.⁴¹

As observed in our previous studies,^{60,66} electron microscopy micrographs did not always show the presence of a polycrystalline material. However, several studies indicate structural similarities of diffracting features of protein fibrils and microcrystals.^{67,68} Interestingly, *in vitro* assembly assays on a highly amyloidogenic peptide revealed that thin, single fibrils transform into lamellar nano-crystals.^{60,69} Working systematically on elucidating amyloids at atomic level, Marshall and Serpell remark that “degree of order” is what really differentiates a crystal and a fibril-containing fiber.⁷⁰ In our case, C-peptide reflections appear as rings, indicating poor alignment of C-peptide constituent fibrils that lack higher molecular organization (Figure 4).

Further *in vitro* experiments on C-peptide detected a potent “amyloidogenic profile”. C-peptide oligomers, observed by SDS-PAGE, indeed bind Thioflavin T and thus, researchers proposed a possible β -sheet conformation in an attempt to describe C-peptide affinity to the “amyloid specific” dye.^{31,40} Moreover, to obtain structural clues on C-peptide, Lind et al. performed CD and ATR-IR spectroscopy on a mixture of C-peptide with SDS and in analogy to the results of our study, this publication was the first to mention that C-peptide oligomeric states are similar to other amyloidogenic peptides.⁴⁰

Interestingly, using electrospray mass spectrometry Nerelius et al. extensively studied homo-interactions and aggregation of C-peptide fragments and revealed that N- and C-terminal segments, corresponding to C-peptide residues 1-EAEDL–5 and 27-EGSLQ–31 respectively, are prone to homo-oligomerize.^{31,71} The use of our consensus secondary structure prediction algorithm SECSTR⁷² suggests a possible α -helix for residues 1-EAEDLQVGQV–10 (at least two methods out of six) and also predicts a second shorter α -helix formed by residues 22-QPLALE–27 (at least two methods out of six) (Supporting Information Figure S2). SECSTR, though, suggests an alternative prediction for a β -strand for residues 6-QVGQVE–11 (at least two methods out of six) and a weaker prediction for a β -strand for residues 21-LQPL–24, overlapping the above α -helical predicted segments. Thus, these results imply that N- and C- terminals of the C-peptide have all the distinctive features of “chameleon” sequences⁷³ and therefore intrinsically exhibit the tendency to ‘alter’ their conformation depending on the environmental conditions. Accordingly, recent evolutionary studies of mammalian C-peptide sequences (~30 amino acid each), utilizing the PSIPRED prediction algorithm,⁷⁴ predict a strong β -strand propensity for residues 8-GQVEL–12 and propose that due to the conformation of this part, C-peptide may possibly adopt a hairpin-like structure.⁷⁵

Another interesting issue to consider regarding the hidden amyloidogenic propensity of C-peptide is that homo-oligomerization is not connected with C-peptide chaperone-like effects on insulin.⁷¹ Ordinarily, the formation of stable Zn²⁺ insulin hexamers into β -cell secretory granules, where C-peptide plays a critical role, prevents mature insulin from misfolding and consequently, ensures pancreatic β -cell integrity. Taking into account proinsulin particular features, such as this propensity to assemble in order to form Zn²⁺ coordinate hexamers,⁵ Huang et al. performed Raman spectroscopy experiments on insulin fragments and suggested that the connecting peptide of proinsulin (35 amino acids), which corresponds to C-peptide (31 amino acids) including four dibasic residues (cleavage sites), decelerates the fibrillation procedure and, in other words, protects zinc-free insulin from misfolding.⁷⁶ Significantly though, both insulin and proinsulin (86 amino acids) form amyloid-like “structures” *in vitro*; mature insulin self-assembles at acidic conditions into amyloid fibrils which fulfill all amyloid criteria,^{59,77,78} in contrast to proinsulin, which forms an amorphous β -sheet-rich precipitate (neutral pH) rather than typical amyloid fibrils.⁷⁶

Biological effects, reviewed in the article [80], suggest that C-peptide may act as a parameter with a major contribution in metabolic “fine-tuning” of the tissues,⁷⁹ since it accomplishes an important role in the synthesis of insulin. According to our findings, previously undefined oligomeric forms in

atherogenesis of diabetic patients^{41,65} or overweight individuals⁶⁴ should be reconsidered. A critical question regarding the amyloidogenicity of C-peptide should definitely be raised in Diabetes mellitus, and further, more targeted experiments should be done. This approach is reasonable because, in the vast majority of amyloidoses, two or more abnormal proteins accumulate simultaneously, forming amyloid co-deposits.^{80,81}

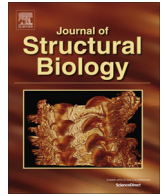
To date, protein-based products are rapidly entering the pharmaceutical industry as successful drugs,⁸² and therefore a better understanding on protein aggregation is needed.⁸³ Extensive studies shed light on several therapeutic aspects of C-peptide in Diabetes.^{39,84} Since fibrillation of insulin has long complicated its use in the treatment of Diabetes, causing Insulin-derived amyloidosis at injection site (Iatrogenic amyloidosis),^{78,85} aggregation propensity of C-peptide should also carefully be taken into account. Controlling C-peptide self-aggregation may allow an optimized design of a C-peptide-based treatment in type I Diabetes therapy, where preliminary clinical trials have indeed been promising.⁸⁶

The authors thank our collaborator Dr. Evangelia D. Chrysinina for excellent assistance with the X-ray experiments and the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology at the National Hellenic Research Foundation for hospitality. They thank Dr. Georgios E. Baltatzis and Prof. Efstratios S. Patouris for excellent assistance with Transmission Electron Microscopy experiments in the Department of Pathology, at the Medical School of the University of Athens. Finally, they would like to thank the handling editor and the reviewers of this manuscript for their very useful and constructive criticism.

REFERENCES

- Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu Rev Biochem* 2006, 75, 333–366.
- Uversky, V. N.; Fink, A. L. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1698, 131–153.
- Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.; Merlini, G.; Saraiva, M. J.; Westermark, P. *Amyloid* 2014, 21, 221–224.
- Wahren, J.; Ekberg, K.; Jornvall, H. *Diabetologia* 2007, 50, 503–509.
- Dodson, G.; Steiner, D. *Curr Opin Struct Biol* 1998, 8, 189–194.
- Steiner, D. F.; Oyer, P. E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967, 57, 473–480.
- Steiner, D. F. *N Engl J Med* 1969, 280, 1106–1113.
- Steiner, D. F.; Bell, G. I.; Rubenstein, A. H.; Chan, S. J. *Endocrinology*; W.B. Saunders: Philadelphia, 2006; Chapter 48.
- Seidah, N. G.; Chretien, M. *Brain Res* 1999, 848, 45–62.
- Muller, L.; Lindberg, I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1999, 63, 69–108.
- Zhou, A.; Webb, G.; Zhu, X.; Steiner, D. F. *J Biol Chem* 1999, 274, 20745–20748.
- Fricker, L. D.; Evans, C. J.; Esch, F. S.; Herbert, E. *Nature* 1986, 323, 461–464.
- Steiner, D. F.; Philipson, L. H. In *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*; De Groot, L. J., et al., Eds.; Endotext: South Dartmouth (MA), 2000.
- Lukinius, A.; Wilander, E.; Westermark, G. T.; Engstrom, U.; Westermark, P. *Diabetologia* 1989, 32, 240–244.
- Seino, S.; Bell, I. G. *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. Springer: Japan, 2008.
- Steiner, D. F. *Exp Diabetes Res* 2004, 5, 7–14.
- Shafqat, J.; Melles, E.; Sigmundsson, K.; Johansson, B. L.; Ekberg, K.; Alvelius, G.; Henriksson, M.; Johansson, J.; Wahren, J.; Jornvall, H. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63, 1805–1811.
- Johansson, J.; Ekberg, K.; Shafqat, J.; Henriksson, M.; Chibalin, A.; Wahren, J.; Jornvall, H. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 295, 1035–1040.
- Wahren, J.; Ekberg, K.; Shafqat, J.; Johansson, J.; Johansson, B. L.; Jornvall, H. *Biological Effects of C-Peptide and Proinsulin*, 3rd ed.; Wiley: Chichester, 2004.
- Landreh, M.; Jornvall, H. *FEBS Lett* 2015, 589, 415–418.
- Hills, C. E.; Brunskill, N. J. *Exp Diabetes Res* 2008, 2008, 635158.
- Munte, C. E.; Vilela, L.; Kalbitzer, H. R.; Garratt, R. C. *FEBS J* 2005, 272, 4284–4293.
- Yang, Y.; Hua, Q. X.; Liu, J.; Shimizu, E. H.; Choquette, M. H.; Mackin, R. B.; Weiss, M. A. *J Biol Chem* 2010, 285, 7847–7851.
- Weiss, M. A.; Frank, B. H.; Khait, I.; Pekar, A.; Heiney, R.; Shoelson, S. E.; Neuringer, L. *J Biochemistry* 1990, 29, 8389–8401.
- Brems, D. N.; Brown, P. L.; Heckenlaible, L. A.; Frank, B. H. *Biochemistry* 1990, 29, 9289–9293.
- Henriksson, M.; Shafqat, J.; Liepinsh, E.; Tally, M.; Wahren, J.; Jornvall, H.; Johansson, J. *Cell Mol Life Sci* 2000, 57, 337–342.
- Mares-Guia, T. R.; Maigret, B.; Martins, N. F.; Maia, A. L.; Vilela, L.; Ramos, C. H.; Neto, L. J.; Juliano, M. A.; dos Mares-Guia, M. L.; Santoro, M. M. *J Mol Graph Model* 2006, 25, 532–542.
- Chen, L. M.; Yang, X. W.; Tang, J. G. *J Biochem* 2002, 131, 855–859.
- Qiao, Z. S.; Min, C. Y.; Hua, Q. X.; Weiss, M. A.; Feng, Y. M. *J Biol Chem* 2003, 278, 17800–17809.
- Min, C. Y.; Qiao, Z. S.; Feng, Y. M. *Eur J Biochem* 2004, 271, 1737–1747.
- Jornvall, H.; Lindahl, E.; Astorga-Wells, J.; Lind, J.; Holmlund, A.; Melles, E.; Alvelius, G.; Nerelius, C.; Maler, L.; Johansson, J. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 391, 1561–1566.
- Yosten, G. L.; Kolar, G. R.; Redlinger, L. J.; Samson, W. K. *J Endocrinol* 2013, 218, B1–B8.
- Rigler, R.; Pramanik, A.; Jonasson, P.; Kratz, G.; Jansson, O. T.; Nygren, P.; Stahl, S.; Ekberg, K.; Johansson, B.; Uhlen, S.; Uhlen, M.; Jornvall, H.; Wahren, J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96, 13318–13323.
- Unnerstale, S.; Maler, L. *J Biophys* 2012, 2012, 185907.
- Kahn, S. E. *Diabetologia* 2003, 46, 3–19.
- Rubenstein, A. H.; Melani, F.; Pilgis, S.; Steiner, D. F. *Postgrad Med J* 1969, 45, 476–481.
- Polonsky, K. S.; Licinio-Paixao, J.; Given, B. D.; Pugh, W.; Rue, P.; Galloway, J.; Karrison, T.; Frank, B. *J Clin Invest* 1986, 77, 98–105.
- Rhodes, C. J.; Alarcon, C. *Diabetes* 1994, 43, 511–517.
- Wahren, J.; Larsson, C. *Diabetes Res Clin Pract* 2015, 107, 309–319.
- Lind, J.; Lindahl, E.; Peralvarez-Marin, A.; Holmlund, A.; Jornvall, H.; Maler, L. *FEBS J* 2010, 277, 3759–3768.
- Marx, N.; Walcher, D.; Raichle, C.; Aleksic, M.; Bach, H.; Grub, M.; Hombach, V.; Libby, P.; Zieske, A.; Homma, S.; Strong, J. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24, 540–545.

42. CrysAlis^{PRO}, 2014. Agilent Technologies, p. Software system, Agilent Technologies UK Ltd, Oxford, UK, pp. Software system.
43. Leslie, A. G. W.; Powell, H. R. 2007. Processing diffraction data with mosflm. Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands.
44. Boultif, A.; Louër, D. J Appl Crystallography 2004, 37, 724–731.
45. de Jongh, H. H.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J. M. Anal Biochem 1996, 242, 95–103.
46. Nilsson, M. R. Methods 2004, 34, 151–160.
47. Kreplak, L.; Aebi, U. Adv Protein Chem 2006, 73, 217–233.
48. Meinhardt, J.; Sachse, C.; Hortschansky, P.; Grigorieff, N.; Fandrich, M. J Mol Biol 2009, 386, 869–877.
49. Geddes, A. J.; Parker, K. D.; Atkins, E. D.; Beighton, E. J Mol Biol 1968, 32, 343–358.
50. Sunde, M.; Blake, C. Adv Protein Chem 1997, 50, 123–159.
51. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D. Biochemistry 1993, 32, 389–394.
52. Haris, P. I.; Chapman, D. Biopolymers 1995, 37, 251–263.
53. Jackson, M.; Mantsch, H. H. Crit Rev Biochem Mol Biol 1995, 30, 95–120.
54. Krimm, S.; Bandekar, J. Adv Protein Chem 1986, 38, 181–364.
55. Johnston, N.; Krimm, S. Biopolymers 1971, 10, 2597–2605.
56. Caswell, D. S.; Spiro, T. G. Biochim Biophys Acta 1986, 873, 73–78.
57. Westermark, P.; Li, Z. C.; Westermark, G. T.; Leckstrom, A.; Steiner, D. F. FEBS Lett 1996, 379, 203–206.
58. Kelly, J. W. Nat Struct Biol 2002, 9, 323–325.
59. Nettleton, E. J.; Tito, P.; Sunde, M.; Bouchard, M.; Dobson, C. M.; Robinson, C. V. Biophys J 2000, 79, 1053–1065.
60. Louros, N. N.; Tsiolaki, P. L.; Griffin, M. D.; Howlett, G. J.; Hamodrakas, S. J.; Iconomidou, V. A. Int J Biol Macromol 2015, 79, 711–718.
61. Luk, K. C.; Song, C.; O'Brien, P.; Stieber, A.; Branch, J. R.; Brunden, K. R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106, 20051–20056.
62. Liu, C.; Zhao, M.; Jiang, L.; Cheng, P. N.; Park, J.; Sawaya, M. R.; Pensalfini, A.; Gou, D.; Berk, A. J.; Glabe, C. G.; Nowick, J.; Eisenberg, D. Proc Natl Acad Sci USA 2012, 109, 20913–20918.
63. Kuzuya, H.; Blix, P. M.; Horwitz, D. L.; Rubenstein, A. H.; Steiner, D. F.; Faber, O. K.; Binder, C. Diabetes 1978, 27, 184–191.
64. Polonsky, K. S.; Given, B. D.; Van Cauter, E. J Clin Invest 1988, 81, 442–448.
65. Faber, O. K.; Hagen, C.; Binder, C.; Markussen, J.; Naithani, V. K.; Blix, P. M.; Kuzuya, H.; Horwitz, D. L.; Rubenstein, A. H.; Rossing, N. J Clin Invest 1978, 62, 197–203.
66. Louros, N. N.; Iconomidou, V. A.; Giannelou, P.; Hamodrakas, S. J. PLoS One 2013, 8, e73258.
67. Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Eisenberg, D. Nature 2007, 447, 453–457.
68. Diaz-Avalos, R.; Long, C.; Fontano, E.; Balbirnie, M.; Grothe, R.; Eisenberg, D.; Caspar, D. L. J Mol Biol 2003, 330, 1165–1175.
69. Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. Nature 2005, 435, 773–778.
70. Marshall, K. E.; Serpell, L. C. Biochem Soc Trans 2009, 37, 671–676.
71. Nerelius, C.; Alvelius, G.; Jornvall, H. Biochem Biophys Res Commun 2010, 403, 462–467.
72. Hamodrakas, S. J Comput Appl Biosci 1988, 4, 473–477.
73. Kabsch, W.; Sander, C. Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81, 1075–1078.
74. McGuffin, L. J.; Bryson, K.; Jones, D. T. Bioinformatics 2000, 16, 404–405.
75. Landreh, M.; Ostberg, L. J.; Jornvall, H. Biochem Biophys Res Commun 2014, 450, 1433–1438.
76. Huang, K.; Dong, J.; Phillips, N. B.; Carey, P. R.; Weiss, M. A. J Biol Chem 2005, 280, 42345–42355.
77. Jimenez, J. L.; Nettleton, E. J.; Bouchard, M.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M.; Saibil, H. R. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99, 9196–9201.
78. Brange, J.; Andersen, L.; Laursen, E. D.; Meyn, G.; Rasmussen, E. J Pharm Sci 1997, 86, 517–525.
79. Ghorbani, A.; Shafiee-Nick, R. World J Diabetes 2015, 6, 145–150.
80. Howlett, G. J.; Moore, K. J Curr Opin Lipidol 2006, 17, 541–547.
81. Kaur, G.; Levy, E. Front Mol Neurosci 2012, 5, 79.
82. Mullard, A. Nat Rev Drug Discov 2015, 14, 77–81.
83. Wang, W. Int J Pharm 2005, 289, 1–30.
84. Ludvigsson, J. Front Biosci (Elite Ed) 2013, 5, 214–223.
85. Gupta, Y.; Singla, G.; Singla, R. Indian J Endocrinol Metab 2015, 19, 174–177.
86. Landreh, M.; Johansson, J.; Jornvall, H. Horm Metab Res 2013, 45, 769–773.



Intrinsic aggregation propensity of the CsgB nucleator protein is crucial for curli fiber formation



Nikolaos N. Louros, Georgios M.P. Bolas, Paraskevi L. Tsiolaki, Stavros J. Hamodrakas, Vassiliki A. Iconomidou*

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2016
Received in revised form 26 May 2016
Accepted 28 May 2016
Available online 28 May 2016

Keywords:

'Aggregation-prone' peptides
Functional amyloid
Homology modeling
Amyloid fibril structure
Biofilms

ABSTRACT

Several organisms exploit the extraordinary physical properties of amyloid fibrils forming natural protective amyloids, in an effort to support complex biological functions. Curli amyloid fibers are a major component of mature biofilms, which are produced by many *Enterobacteriaceae* species and are responsible, among other functions, for the initial adhesion of bacteria to surfaces or cells. The main axis of curli fibers is formed by a major structural subunit, known as CsgA. CsgA self-assembly is promoted by oligomeric nuclei formed by a minor curli subunit, known as the CsgB nucleator protein. Here, by implementing AMYLPRED2, a consensus prediction method for the identification of 'aggregation-prone' regions in protein sequences, developed in our laboratory, we have successfully identified potent amyloidogenic regions of the CsgB subunit. Peptide-analogues corresponding to the predicted 'aggregation-prone' segments of CsgB were chemically synthesized and studied, utilizing several biophysical techniques. Our experimental data indicate that these peptides self-assemble in solution, forming fibrils with characteristic amyloidogenic properties. Using comparative modeling techniques, we have developed three-dimensional models of both CsgA and CsgB subunits. Structural analysis revealed that the identified 'aggregation-prone' segments may promote gradual polymerization of CsgB. Briefly, our results indicate that the intrinsic self-aggregation propensity of the CsgB subunit, most probably has a pivotal role in initiating the formation of curli amyloid fibers by promoting the self-assembly process of the CsgB nucleator protein.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Amyloids are an after-effect of deposition of ordered protein fibrillar arrangements, known as amyloid fibrils (Chiti and Dobson, 2006). Amyloid fibrils are formed by otherwise soluble proteins or peptides that convert under certain conditions into insoluble fibrous aggregates (Dobson, 1999). Impressively, several proteins with important but otherwise unrelated functions have been associated with amyloid deposition, although they have neither sequence nor structural apparent similarities (Sipe et al., 2014). A large number of widespread diseases, such as AL (Amyloid Light-chain), AA (Amyloid A) or ATTR (Transthyretin-related) amyloidosis, neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and Creutzfeldt-Jakob's disease among others), type II diabetes and many more are a consequence of unrestrained deposition of amyloid causing tissue damage and degeneration (Sipe et al., 2014). In contrast, accumulated evidence has shown that occasionally

organisms spanning from bacteria to humans exploit the extraordinary intrinsic properties of amyloids in order to support fundamental physiological processes (Iconomidou and Hamodrakas, 2008; Shewmaker et al., 2011). Typical examples of functional amyloid include the extracellular protective coats of several organisms (Iconomidou et al., 2000; Louros et al., 2013, 2014a, 2016b), the intracellular Pmel17 template which is utterly important for the biosynthesis of melanin (Fowler et al., 2006; Louros and Iconomidou, 2015; Louros et al., 2016a) and the formation of biofilms by gram negative bacteria (Hammar et al., 1995).

Bacteria are able to survive and colonize in a diverse variety of environments. Key feature to their resilience is their ability to grow in colonies and produce a complex matrix of extracellular polymeric substances (Donlan, 2002). Using this matrix, bacteria are able to sculpt three-dimensional structures, called biofilms, which shelter the inhabitants from environmental stress (Donlan, 2002). In the case of many *Enterobacteriaceae* such as *Escherichia coli* or *Salmonella enterica*, the major proteinaceous component of this matrix consists of fibers called *curli* that are involved in cell-surface and cell-cell contacts and adhesion (Barnhart and

* Corresponding author.

E-mail address: veconom@biol.uoa.gr (V.A. Iconomidou).

Chapman, 2006). Curli fibers exhibit characteristic properties of amyloid fibrils (Chapman et al., 2002) and are composed of two basic proteins; namely, a major structural subunit, known in *E. coli* as CsgA, and a minor subunit serving also as a nucleator protein, known as CsgB, both encoded by a common operon (Hammar et al., 1996, 1995). The two proteins are of identical size (151aa) and comprise similar structural segments (Hammar et al., 1996). Specifically, CsgA and CsgB are built up of three regions, namely a signal peptide, an N-terminal chaperone-binding peptide segment and five consecutive repeat subunits, composed of 22–23 residues, which constitute the amyloid core of curli fibers (Hammer et al., 2007; Wang and Chapman, 2008). Each repeat is composed of a strand-loop-strand motif predicted to form two parallel β -sheets (Wang and Chapman, 2008; Wang et al., 2008).

Both proteins are capable of forming fibers *in vitro*, however detailed evidence indicates that CsgB forms fibers with a significantly faster rate (Hammar et al., 1996). Additionally, the aggregation kinetics of CsgA is accelerated in the presence of CsgB (Hammer et al., 2012). However, *in vivo* curli fibers can only be formed in the presence of both subunits (Barnhart and Chapman, 2006; Blanco et al., 2012; Hammer et al., 2012; Wang et al., 2007), accumulated at ratios approximately 20:1 (CsgA:CsgB) (Van Gerven et al., 2015; White et al., 2001). Furthermore, detailed immunoelectron microscopy studies have shown that CsgB can form short polymers on the cell surface in the absence of CsgA (Bian and Normark, 1997). Finally, CsgB has been proposed to be responsible for creating the initial oligomers/nuclei acting as templates and inducing the polymerization of CsgA, which self-assembles forming the major axis of the curli fiber (Hammer et al., 2007; Shu et al., 2012).

Experimental and theoretical evidence has indicated that amyloid formation is induced by specific short sequence regions of a polypeptide chain that are prone to aggregation, hence regulating the overall aggregation tendency of the protein (Lopez de la Paz and Serrano, 2004; Louros et al., 2015a,b; Teng et al., 2012). In this work, we have identified six individual aggregation-potent regions of the minor curli subunit, by comparing the amyloidogenic profile of both CsgA and CsgB curli proteins of *E. coli*. Structural studies of peptide-analogues corresponding to the identified regions indicate their ability to self-assemble forming fibrils with characteristic amyloidogenic features. Our findings suggest that the ‘aggregation-prone’ segments could probably be responsible for the ability of CsgB to self-assemble in faster rates than CsgA, *in vitro*, and may also promote the nucleation capabilities of the former. Finally, based on our results, we propose a possible mechanism for both the *in vivo* and *in vitro* curli fiber self-assembly process, by attempting to shed some light on the vague and complicated nucleation process of curli fibers.

2. Materials and methods

2.1. Aggregation propensity sequence analysis of CsgA and CsgB

Protein sequences of CsgA and CsgB from *E. coli* were obtained from Uniprot (Accession Numbers: P28307 and P0ABK7). Initially, the Sec-signal peptide and the 22-residue long N-terminal domain that precedes 5 imperfect repeats in both CsgA and CsgB (Fig. S1) were removed. In order to track down the aggregation propensity of both curli subunits, we implemented AMYLPRED2, a consensus aggregation propensity prediction tool, which was developed by our lab (Tsolis et al., 2013), on the remaining sequence segments of CsgA and CsgB, corresponding to the 5 imperfect repetitive segments that have been associated with the formation of the curli fiber axis. As a consensus tool, AMYLPRED2 takes into account several properties in order to produce a multivariate prediction of

sequence amyloidogenicity. Among others, AMYLPRED2 incorporates algorithms which specialize in identifying sequence-specific segments with increased amyloidogenicity (Conchillo-Sole et al., 2007; Maurer-Stroh et al., 2010; Tian et al., 2009), algorithms focused in identifying beta-strand propensity or chameleon “conformational switches” (Hamodrakas, 1988; Kim et al., 2009), and prediction algorithms based on average packing density and hydrophobicity of sequence stretches (Fernandez-Escamilla et al., 2004; Galzitskaya et al., 2006).

2.2. Peptide synthesis and preparation of amyloid fibrils

Six regions of CsgB exhibiting increased aggregation propensity were predicted, namely AAIIGQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} (Fig. 1). As a result, peptide-analogues of the predicted segments were synthesized by GeneCust Europe, Luxembourg (purity >98%, free N- and C-terminals). The synthesized CsgB peptide-analogues were dissolved in distilled water (pH 5.75), at a concentration of 10 mg/ml. After incubation for 1–2 weeks, all peptides self-assembled forming either mature amyloid-like fibril-containing gels or lamellar microcrystals composed of such fibrils.

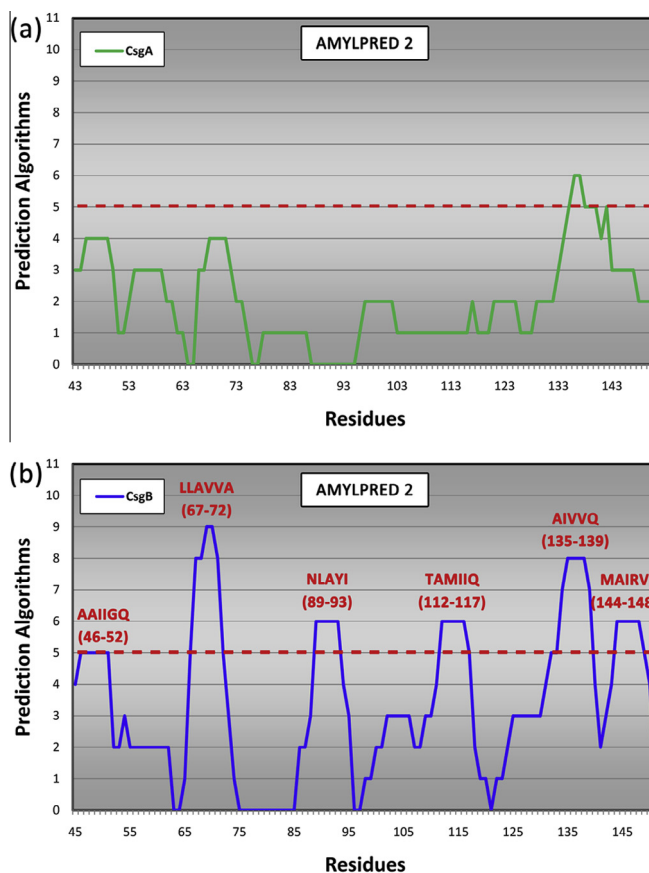


Fig. 1. Amyloidogenic profile of (a) CsgA (green line) and (b) CsgB (blue line). The horizontal axis indicates the number of residues corresponding to the amyloid-forming segments of CsgA and CsgB, containing five individual repetitive segments each, whereas the vertical axis corresponds to the number of individual prediction algorithms utilized by AMYLPRED2. AMYLPRED2 has a default cut-off value of successful aggregation propensity prediction by at least 5 out of 11 algorithms (shown by red line). CsgB has an apparent increased aggregation propensity, in comparison to CsgA where only minimal propensity is observed. Six individual, more or less hydrophobic, segments of CsgB are identified, namely AAIIGQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148}. The equivalent distance between the first 5 predicted segments (21–23 residues) implies that the individual repeats of CsgB have a common amyloidogenic profile.

2.3. Transmission electron microscopy (TEM) and negative staining

A drop (~5 μ l) of each fibril-containing solution was applied to glow-discharged 400-mesh carbon-coated copper grids, for 60 s. The grids were flash-washed with distilled water and stained with a drop of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. The fibril containing grids were initially air dried and examined with a Morgagni™ 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11 Megapixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.4. X-ray diffraction

A droplet (10 μ l) of each peptide solution, containing self-assembled amyloid-like fibrils, was placed between two aligned siliconized glass rods, spaced 2 mm apart. The droplets were allowed to dry slowly at ambient conditions, for approximately 1 h, to form oriented fibers suitable for X-ray diffraction. X-ray diffraction patterns for AAIIGQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72} and TAMIIQ_{112–117} peptides were collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, λ = 1.5418 Å), operated at 50 kV, 0.8 mA. The specimen-to-film distance was set at 52 mm. The exposure time was set to 400 s. The X-ray diffraction patterns were initially viewed using the program CrysAlisPro (Oxford Diffraction, 2009) and subsequently displayed and measured with the aid of the program iMosFLM (Leslie and Powell, 2007). The X-ray diffraction patterns for NLAYI_{89–93}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} were collected at the P14 beamline, at a wavelength of 1.23953 Å (Petra III, EMBL-Hamburg, Germany) using a PILATUS 6M detector. The detector distance was set to 225.11 mm and exposure times were set to 1 s. The X-ray diffraction patterns were displayed and measured using iMosFLM.

2.5. Congo red staining and polarized light microscopy

Fibril suspensions of each peptide-analogue solution were applied to glass slides and were air-dried at ambient conditions. The films produced, containing amyloid-like fibrils, were stained with a 1% Congo red solution in distilled water (pH 5.75) for 20 min (Louros et al., 2015a, 2014b; Romhanyi, 1971). Excess stain was removed through tap water washes (Romhanyi, 1971). The samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope equipped with a JVC GC-X3E camera.

2.6. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR FT-IR) and post-run spectra computations

Drops (~10 μ l) of the CsgB peptide-analogue solutions were cast on flat stainless steel plates coated with an ultrathin hydrophobic layer (SpectRIM, Tienta Sciences, Inc., Indianapolis, USA) and left to dry slowly at ambient conditions to form a thin film. IR spectra were obtained at a resolution of 4 cm^{-1} , utilizing an IR microscope (IRScope II, BrukerOPTICS, BrukerOptik GmbH, Ettlingen, Germany), equipped with a Ge ATR objective lens (20 \times) and attached to a FT-IR spectrometer (Equinox 55, BrukerOPTICS). Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the S/N ratio. All spectra are shown in the absorption mode, after correction for the wavelength-dependence of the penetration depth (d_p analogous λ). Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software including smoothing over a $\pm 13 \text{ cm}^{-1}$ range around each

data point, performed by the Savitsky-Golay algorithm (Savitsky and Golay, 1964). Smoothing over narrower ranges resulted in deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence. The minima in the second derivative were used to determine the corresponding absorption band maxima (data not shown).

2.7. Comparative modeling

Sequences of CsgA, CsgB (*E. coli*), AgfA and AgfB (*Salmonella enteritidis*) proteins (Accession Numbers: P28307, POABK7, POA1E7 and POA1E9, respectively) were extracted from Uniprot. Sequence alignment was performed using ClustalW (Thompson et al., 1994) (Fig. S2). Models of the three-dimensional structures of CsgA (Fig. S3) and CsgB (Fig. S4) were derived by performing sequence threading, utilizing MODELLER 9v2 (Eswar et al., 2006), using the previously proposed structural models of AgfA and AgfB (Collinson et al., 1999; White et al., 2001) as templates. Finally, the derived models were minimized utilizing the MMTK toolkit (Hinsen, 2000), included in the Chimera molecular graphics system (Pettersen et al., 2004) and subsequently evaluated with DSSP and the WHATIF package (Vriend, 1990).

2.8. Docking and nucleation modeling

The model of the CsgB protein was used to perform docking experiments, in order to evaluate the position of the predicted 'aggregation-prone' peptides as a potential interface for curli polymerization. The HADDOCK version 2.1 was used with unambiguously defined interaction restraints to drive the docking (de Vries et al., 2010). Initially, a CsgB dimer was constructed by specifying residues of the first and last repeat as active residues. Secondly, docking with defined interaction restraints based on our experimental results was also performed. Specifically, the self-aggregating AAIIGQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117}, AIVVQ_{135–139} motifs were defined as active residues. Finally, a set of docking experiments with defined interaction restraints was also performed for CsgA, specifying residues of the homologous to the identified CsgB 'aggregation-prone' regions as active residues. Monomer register was undefined during all docking procedures. Structure calculations were performed by CNS1.2 (Brunger et al., 1998), whereas non-bonded interactions were calculated with the OPLS force field (Jorgensen and Tirado-Rives, 1988) using an 8.5 Å cutoff. The solvated docking protocol was favored, since in comparison to unsolvated docking it may yield higher quality docking predictions (Kastritis et al., 2011).

3. Results and discussion

3.1. CsgB exhibits increased aggregation propensity compared to CsgA

The aggregation potency of both the major and minor subunit of *E. coli* curli fibers was calculated and analyzed utilizing AMYLPRED2. Impressively, although the aforementioned sequences share relatively high sequence homology, significant differences emerge regarding their aggregation tendency. As the results of AMYLPRED2 clearly indicate, severely lower aggregation potency was predicted for CsgA in comparison to CsgB, since the former only presents segments with an extraneous minor aggregation propensity (Fig. 1a). In contrast, CsgB presents six individual segments, with high self-aggregating potential, coinciding more or less with the aforementioned segments of the CsgA subunit (Fig. 1b). The CsgB segments are composed primarily of hydrophobic residues, the burial of which may promote the aggregation potency of CsgB. Remarkably, the homologous regions located in

CsgA have several polar or charged residues that may hinder a similar aggregation effect for the CsgA subunit. Finally, with the exception of the last predicted 'aggregation-prone' section (MAIRV_{144–148}), the predicted segments exhibit an evident repetition, emerging every 21–23 residues. By taking into account the fact that CsgB repeats comprise 22–23 residues, this observation indicates that the five repetitive units of CsgB have a similar amyloidogenic profile, therefore, could contribute equally to the aggregation potency of the minor curli subunit. In summary, it appears that the

increased intrinsic aggregation propensity of CsgB, compared to CsgA, corroborates its necessity for the nucleation process during curli fiber biogenesis.

3.2. A β -helical model reveals the formation of a potential CsgB 'aggregation-prone' interface

Previous elegant studies have reported a three-dimensional model of AgfA and AgfB curli subunits of *S. enteritidis* (Collinson

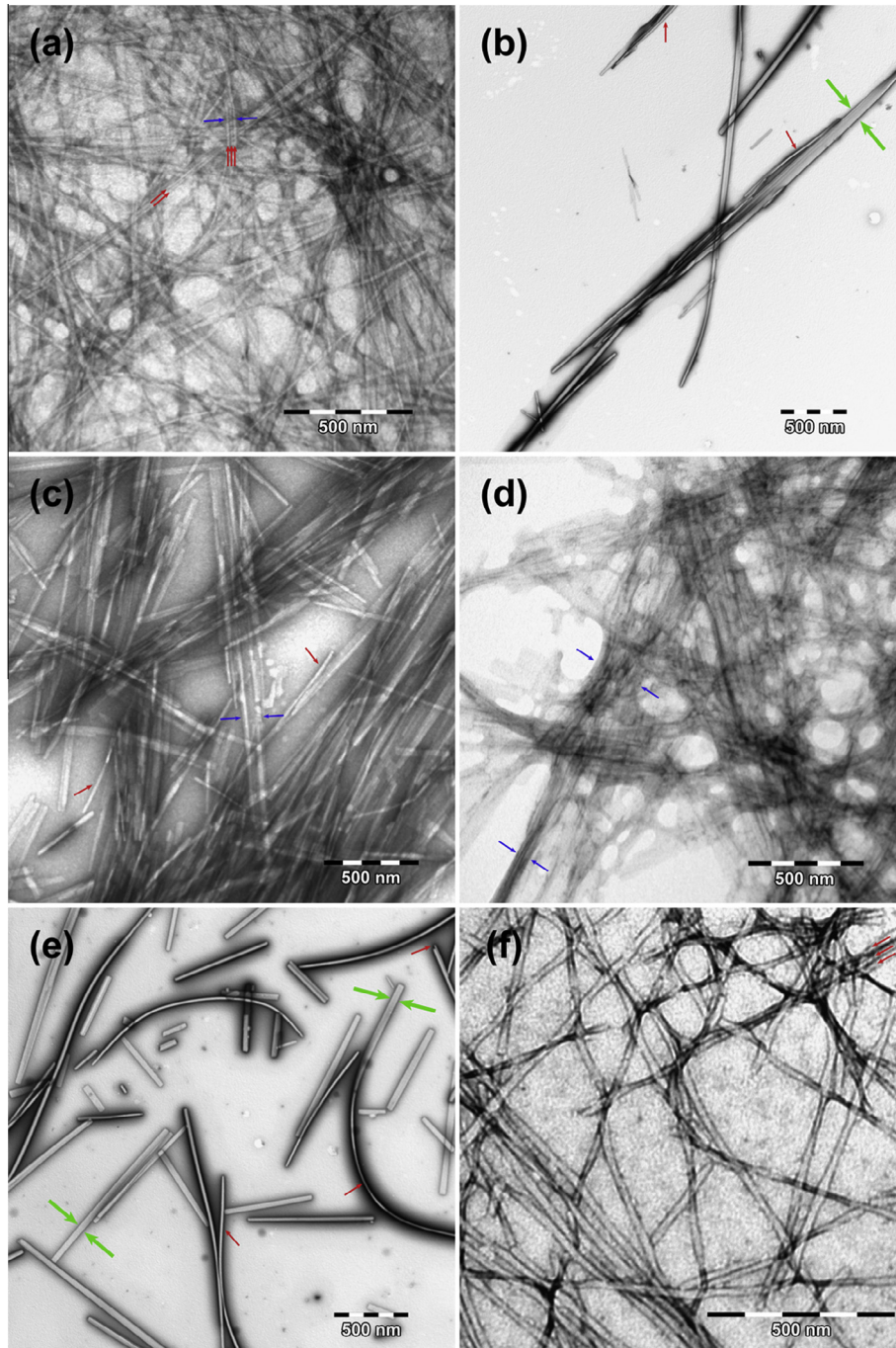


Fig. 2. Electron micrographs of amyloid-like fibrils formed after self-assembly of the (a) AAIIGQ_{46–52}, (b) LLAVVA_{67–72}, (c) NLAYI_{89–93}, (d) TAMIIQ_{112–117}, (e) AIVVQ_{135–139} and (f) MAIRV_{144–148} 'aggregation-prone' peptides. Amyloid-like fibrils composed of the (a) AAIIGQ_{46–52}, (c) NLAYI_{89–93}, (d) TAMIIQ_{112–117} and (f) MAIRV_{144–148} peptides appear straight and unbranched, with indeterminate lengths and a tendency to coalesce laterally forming fibril batches or ribbons with variable thickness (blue arrows). The widths of the AAIIGQ_{46–52} and NLAYI_{89–93} derived fibrils are approximately 100–120 Å, whereas for the TAMIIQ_{112–117} and MAIRV_{144–148} peptides they are approximately 150–200 Å, respectively (highlighted in red arrows). In the case of (b) LLAVVA_{67–72} and (e) AIVVQ_{135–139}, peptides, long and unconnected fibrils with diameters of 100–150 Å are formed (shown in red arrows). However, in both cases, the fibrils appear to have increased lateral attachments forming lamellar one-dimensional crystal-like structures of various diameters (shown in green arrows). Scale bars were set to 500 nm.

et al., 1999; White et al., 2001). These structural predictions were further supported by recent complementary evidence derived through sequence variation analysis (Tian et al., 2015). Based on the above and the fact that AgfA and AgfB share high sequence homology to CsgA and CsgB (Fig. S2), respectively (more than 70% sequence identity), a three-dimensional model of both the major and minor curli subunit of *E. coli* was derived, by performing sequence threading, utilizing the proposed AgfA and AgfB models as template structures. Analysis of the derived models indicates that both curli subunits fold into a right-handed β -helical structure composed of five individual structural segments (R1–R5) (Figs. S3 and S4). Each individual segment, corresponding to one of the five repetitive segments of CsgA and CsgB, has a β -hairpin-like structure (β -strand-loop- β -strand motif) and winds around the β -helix

axis forming two parallel facing β -sheets (Figs. S3 and S4). Both β -helical structures exhibit typical characteristics of the β -solenoid fold, since they have a compact hydrophobic core and are stabilized by the formation of individual hydrogen bond ladders (H-ladders), shaped by stacked conserved polar residues along the β -helical axis (Figs. S3 and S4). Specifically, two Gln and one Asn and Ser H-bond ladders are formulated in both CsgA and CsgB, with the Gln and Asn ladders formed at common conserved positions of both subunits (Figs. S3 and S4). Based on the above, both curli subunits apparently share several common structural characteristics. However, impressive differences emerge regarding their potential aggregation propensity. The predicted ‘aggregation-prone’ peptides of CsgB coincide with major parts of β -strands of each individual repeat. More specifically, five out of the six predicted

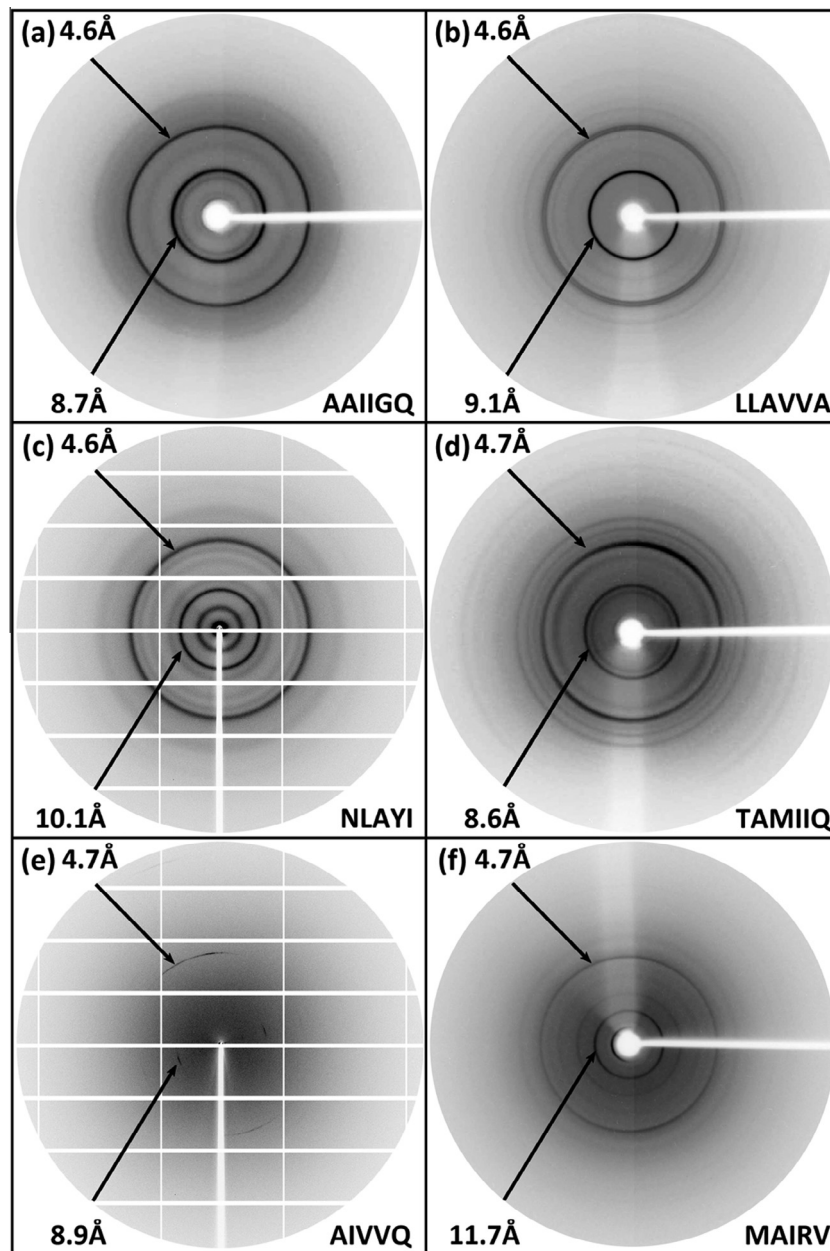


Fig. 3. X-ray diffraction patterns of oriented fibers, containing more or less aligned amyloid fibrils, derived by the self-assembled peptides. The patterns exhibit the typical to a ‘cross- β ’-like architecture reflections. Specifically, the 4.6–4.7 Å structural repeat arises from the distance between β -strands aligned perpendicularly to the fiber axis, whereas the 8.7, 9.1, 10.1, 8.6, 8.9 and 11.7 Å periodicities correspond to the packing distance of β -sheets running parallel to the fiber axis for the (a) AAIIGQ_{46–52}, (b) LLAVVA_{67–72}, (c) NLAYI_{89–93}, (d) TAMIIQ_{112–117}, (e) AIVVQ_{135–139} and (f) MAIRV_{144–148} ‘aggregation-prone’ peptides, respectively. Reflections may appear as rings due to poor alignment of the oriented fiber constituent fibrils.

segments, namely, AAIIQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117} and AIVVQ_{135–139} segments shape a potential hydrophobic interface, extended along the β -helical axis and running along the one β -sheet side of the CsgB β -solenoid structure (Figs. S4a and S5b). In CsgA, this hydrophobic interface is disrupted by the presence of polar and charged residues of the homologous segments (Fig. S5a, c and e). Certain of the aforementioned residues have been previously highlighted as possible gatekeeper residues modulating the aggregation tendency of CsgA (Wang et al., 2010). The increased hydrophobicity and aggregation potential of the CsgB interface may be the driving force behind nucleation of the minor curli subunit, thus rendering it utterly important for *in vivo* formation of curli fibers.

3.3. Formation of amyloid-like fibrils by CsgB ‘aggregation-prone’ segments

Based on our modeling results, we sought to experimentally investigate whether the predicted ‘aggregation-prone’ segments indeed possess the ability to self-aggregate into fibrils with amyloidogenic properties. For this reason, all predicted peptides were examined after synthesis and were found to form fibril-containing gels. Specifically, after incubation for 1–2 weeks in distilled water (pH 5.75), all peptide-analogues of CsgB self-aggregate forming fibrillar arrangements that appear straight and unconnected, with indeterminate lengths, and widths that range from 100 to 200 Å between different peptides, respectively (Fig. 2, red arrows). Amyloid-like fibrils formed by the AAIIQ_{46–52} peptide occasionally interact in a lateral fashion leading to the formation of striated ribbons composed of two to several fibrils, whereas in the case of NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117} and MAIRV_{144–148} peptides, individual fibrils interact laterally forming ribbons or batches of fibrils with variable thickness (Fig. 2, blue arrows). In respect to the LLAVVA_{67–72} and AIVVQ_{135–139} peptides, the derived amyloid-like fibrils have strong lateral attachments and as a result lead towards the formation of lamellar one-dimensional crystal-like structures (Fig. 2, green arrows), although no layer lines were reported through the X-ray diffraction analysis (Fig. 3). These observations are in line with studies suggesting that common mechanisms underlie behind amyloid fibrillation and protein crystallization events and with similar structures, which have been reported for several other amyloid fibril-forming segments in the past (Ivanova et al., 2009; Kitayama et al., 2013; Wiltzius et al., 2008).

3.4. Amyloid-like fibrils possess characteristics of a “cross- β ” structure

Aligned fibers, composed of oriented fibrils, derived from the self-assembling peptide solutions, produce X-ray diffraction patterns containing reflections of the typical “cross- β ” architecture of amyloid fibrils (Fig. 3) (Geddes et al., 1968; Sunde et al., 1997). More specifically, X-ray diffraction patterns derived from all ‘aggregation-prone’ peptides present a relatively strong meridional reflection, indicative of a 4.6–4.7 Å structural periodicity, which is assigned to the inter-chain distance between successive hydrogen bonded β -strands, ordered perpendicularly to the fibril axis. Moreover, a second strong equatorial reflection, appearing at 8.7, 9.1, 10.1, 8.6, 8.9 and 11.7 Å for the AAIIQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} peptides, respectively, is ascribed to the variable packing distance between packed β -sheets, aligned parallel to the fiber axis. Reflections of the AAIIQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, and NLAYI_{89–93} patterns appear as rings due to poor alignment of the oriented fiber constituent fibrils.

Complementary evidence was derived by spectral acquisition, utilizing ATR FT-IR spectroscopy, an experimental technique used for the analysis of the secondary structure of proteins or peptides

Table 1

Bands observed in the ATR FT-IR spectra produced from hydrated films of all the CsgB ‘aggregation-prone’ peptides, after self-assembly and formation of amyloid-like fibrils, and their tentative assignments (Fig. 4).

Bands (cm ⁻¹)						Assignment
AAIIQ	LLAVVA	NLAYI	TAMIIQ	AIVVQ	MAIRV	
1136	1138	1136	1136		1132	TFA
1180		1190			1180	TFA
1201	1209	1207	1204		1203	TFA
		1230				β -Sheet (Amide III)
		1516				Tyr
1531		1553	1541	1552	1537	β -Sheet (Amide II)
1632	1630	1636	1632	1630	1629	β -Sheet (Amide I)
1663	1678	1665	1663	1670	1670	TFA
1692	1692	1693	1692	1690	1693	Antiparallel β -sheet

associated with the formation of amyloid fibrils, without the drawbacks associated with more conventional vibrational techniques (Iconomidou et al., 2001; Kong and Yu, 2007). The ATR FT-IR spectra reveal a prominent amide I band, located at 1632, 1630, 1636, 1632, 1630 and 1629 cm⁻¹ for the AAIIQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} peptides, respectively, suggesting a β -sheet secondary structure (Table 1). The sharpness of the observed amide I bands is indicative of uniformity in the β -sheet structure, suggesting that the range of the phi and psi angles in the β -sheets is relatively limited (Fig. 4). The amide II components shown for the AAIIQ_{46–52}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} peptides (Table 1), also imply the presence of a β -sheet secondary structure (Cooper and Knutson, 1995; Krimm and Bandekar, 1986). Finally, the additional shoulders at 1690–1693 cm⁻¹, observed in each spectrum suggest that the β -sheets are arranged in an antiparallel fashion (Surewicz et al., 1993).

Deposits of fibrils from all the peptide-analogues were stained with the diagnostic Congo red dye, which is widely used in order to detect the presence of amyloid (Divry and Florkin, 1927; Missmahl and Hartwig, 1953). Evidently, as observed under bright field illumination of a polarizing microscope, all peptide deposits bind the amyloid-specific Congo red dye, therefore indicating the amyloidogenic properties of fibrils formed by the self-assembling peptides (Fig. 5). Furthermore, the amyloid properties of the fibrils are certified, under crossed polars of the polarizing microscope, where the characteristic apple/green birefringence, consistently shown from Congo red stained amyloid deposits, is exhibited (Fig. 5).

All identified ‘aggregation-prone’ segments of CsgB have an inherent ability to self-assemble forming structures with distinct amyloidogenic properties and a “cross- β ” structure. Following detailed studies suggesting that motifs composed of 6–8 residues, derived from β -continuous interfaces of oligomeric proteins, have an intrinsic self-aggregation propensity by retaining the polymerizing properties of their parental protein interfaces (Valery et al., 2013), our experimental results suggest that the parental hydrophobic CsgB interface could retain the characteristic amyloidogenic properties of its individual filial components, namely the AAIIQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117} and AIVVQ_{135–139} segments.

3.5. ‘Aggregation-prone’ segments possibly promote nucleation of CsgB

The β -solenoid fold has been extensively highlighted as a potent polymerization component of amyloid-forming proteins (Downing and Lazo, 1999; Lazo and Downing, 1998, 1999). This process has been proposed to take part through head-to-tail interactions formed between exposed terminal coils presenting increased

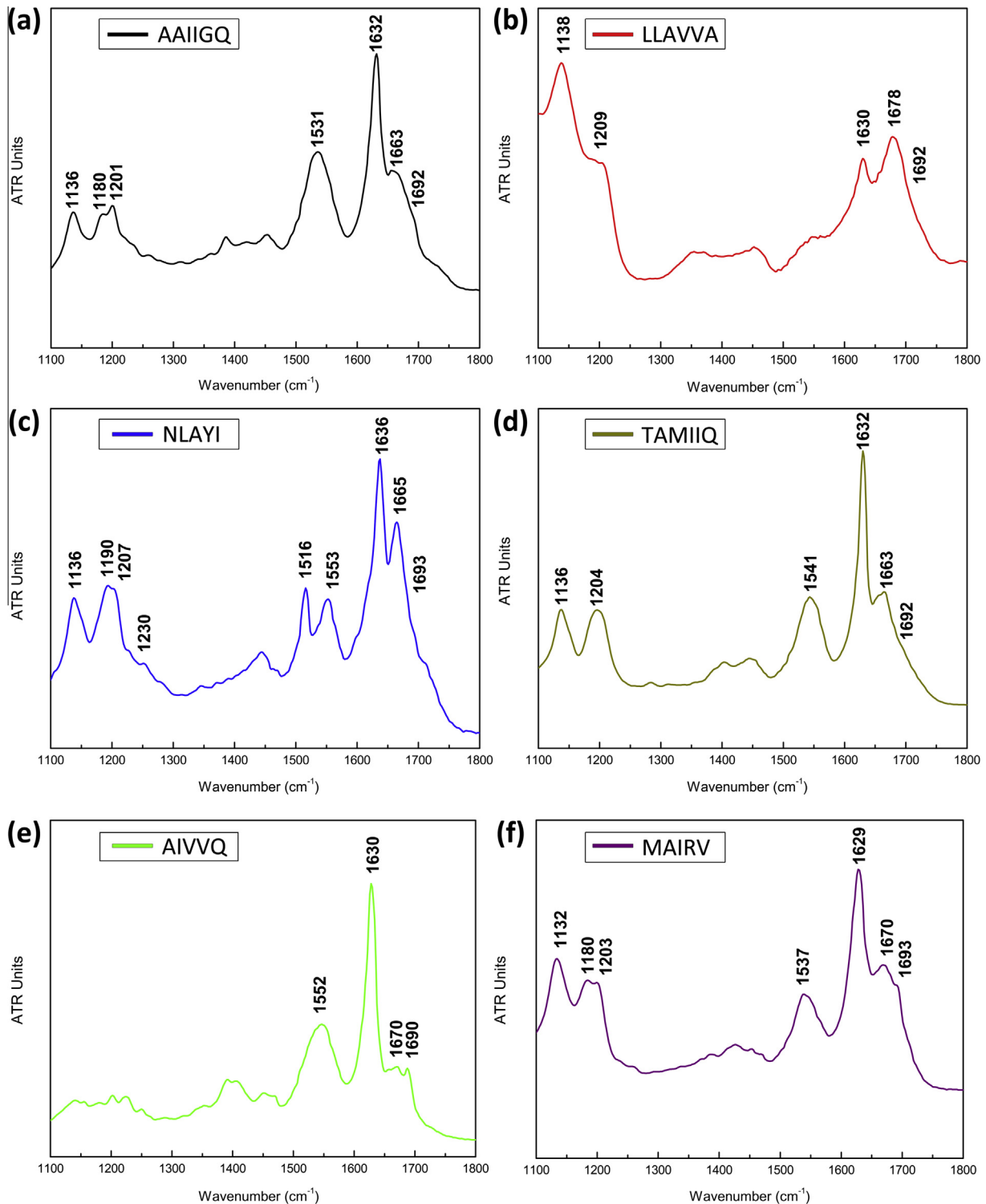


Fig. 4. ATR FT-IR (1100–1800 cm⁻¹) spectra. The derived spectra were obtained from thin hydrated-films containing amyloid-like fibrils, contained within solutions of the (a) AAIIGQ_{46–52}, (b) LLAVVA_{67–72}, (c) NLAYI_{89–93}, (d) TAMIQ_{112–117}, (e) AIVVQ_{135–139} and (f) MAIRV_{144–148} peptides, respectively. All resulting spectra are indicative of the preponderance of an antiparallel β -sheet secondary structure (Table 1).

H-bonding complementarity, leading to the formation of fibrils with indefinite length, such as amyloid fibrils (Kajava and Steven, 2006; Richardson and Richardson, 2002). This notion is also supported by accumulating evidence proposing that this process is frequently interrupted by the presence of capping motifs at the terminal repeat segments, composed of proline residues, β -bulges and other bulky moieties preventing integrative H-bonding

between monomers (Bryan et al., 2011; Richardson and Richardson, 2002). The amino acid composition of the CsgB N- and C-terminal repetitive segments does not introduce any of the above characteristics. Consequently, a CsgB dimer was constructed, clearly demonstrating that dimerization of the β -helical monomers occurs by hydrogen bond complementarity between the edge β -strands of the R1 and R5 repeats of each monomer (Fig. 6). Both

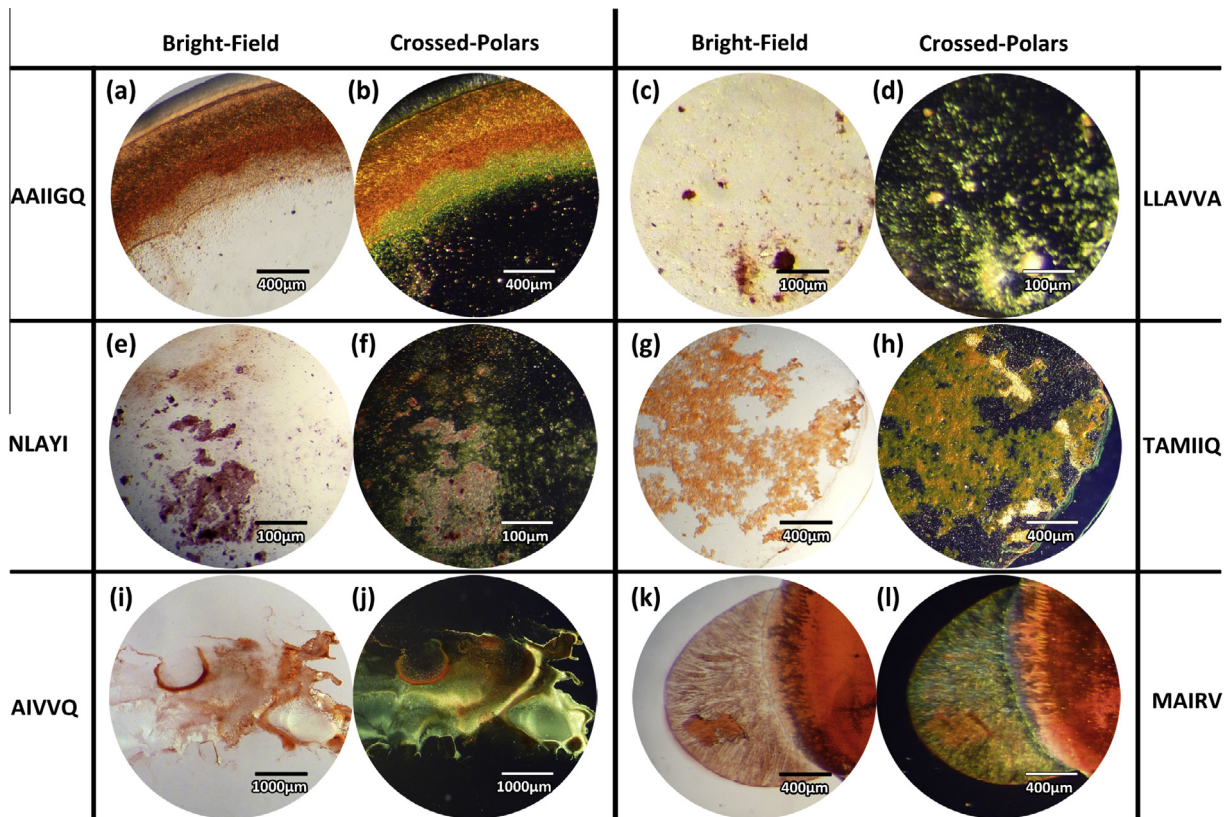


Fig. 5. Congo-red staining of (a, b) AAIIGQ_{46–52}, (c, d) LLAVVA_{67–72}, (e, f) NLAYI_{89–93}, (g, h) TAMIIQ_{112–117}, (i, j) AIVVQ_{135–139} and (k, l) MAIRV_{144–148}, peptide-derived amyloid deposits. (a, c, e, g, i, k) Fibril-containing gels from all peptides bind the amyloid-specific Congo red dye, as seen under bright-field illumination and (b, d, f, h, j, l) exhibit the characteristic for amyloid apple/green birefringence under crossed-polars of a polarizing microscope.

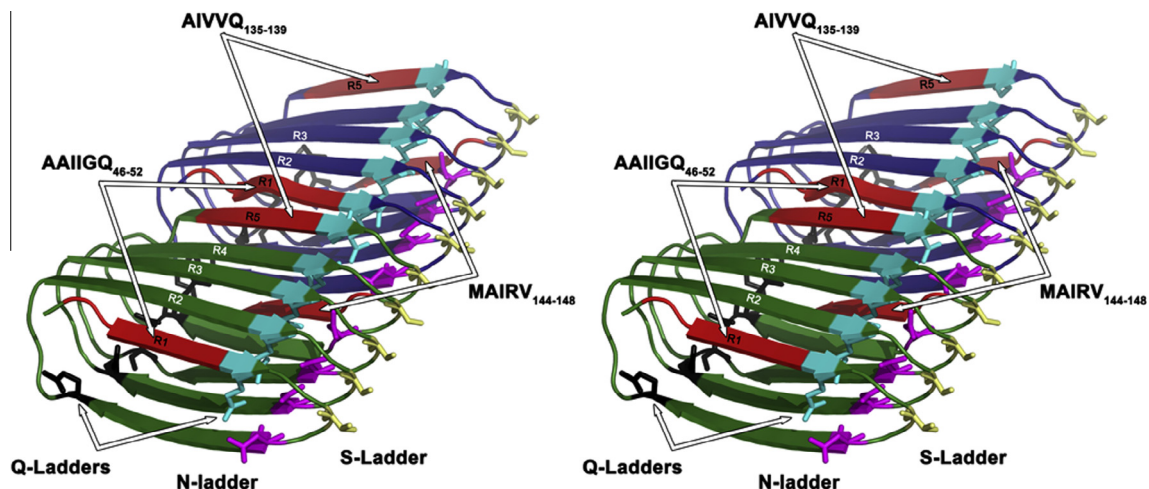


Fig. 6. Stereo view representation of CsgB dimers, derived by driven docking experiments, using HADDOCK, with residues of the first and last CsgB repeat, namely R1 and R5, as active residues. A β -solenoid structure is formed through head-to-tail interactions, forming complementary hydrogen bonds between the β -strands of the R1–R5 edge repetitive segments of individual monomers (shown in blue and green, respectively). It is intriguing that, three out of six identified ‘aggregation-prone’ segments, namely AAIIGQ_{48–52}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} (shown in red), are major parts of the edge segments participating in the dimerization. The β -solenoid axis is further stabilized by the extension of the four individual hydrogen bond ladders observed for the monomers, namely the N-ladder, S-ladder and Q-ladders, shown in sticks and colored in magenta (N-ladder), yellow (S-ladder), cyan (Q-ladder) and black (Q-ladder), respectively.

sections are composed mainly by ‘aggregation-prone’ segments, specifically the AAIIGQ_{46–52}, AIVVQ_{135–139} and MAIRV_{144–148} peptides which are major parts of the edge β -strands and possibly have an important role in the extension of the fibrillar axis. Moreover, the dimer is further stabilized by the extension of the four H-bond ladders of the individual monomers, suggesting that an

elongated fibrillar structure with “cross- β ” architecture could be formed along the axis of the β -solenoid through head-to-tail interactions between successively stacked monomers.

As already mentioned, five ‘aggregation-prone’ segments shape a potential hydrophobic interface running along one side of the CsgB β -solenoid structure. Residues corresponding to this specific

interface were set as active residues, during a second round of driven docking experiments. The derived docking results disclosed the formation of dimers sufficiently burying their ‘aggregation-prone’ interactive surfaces (Fig. S6b). More specifically, a tight hydrophobic core is formed, composed primarily of residues belonging to the identified ‘aggregation-prone’ region of CsgB, with favorable π -stacking interactions occurring within the center of the core, through stacking of the Y92 side chains of individual monomers. Furthermore, residues K66 and E74 form an intermolecular salt bridge, whereas D94 and K118 form an intramolecular salt bridge, located on each side of the dimer interface, isolating in that manner the tight hydrophobic core (Fig. S6b). In comparison, CsgA dimers are also formed by similar, yet less favorable interactions (Fig. S6a). More specifically, docking results indicated that the extensive polar and charged residues of the CsgA interface could possibly take part in dimerization by forming a network of salt bonds composed by residues D67, H73, D87, D91, R95, E112 and K116 of CsgA. In detail, intermolecular salt bonds could possibly be formed between facing residues D67–H73, D87–R95 and E112–K116, in addition to a possible intramolecular D91–K116 salt bridge (Fig. S6a). Future site-directed mutagenesis studies are required in

order to experimentally verify the presence of the aforementioned salt bonds. Although it is possible for both CsgA and CsgB to form dimers with a common interface, docking experiments indicate that more favorable hydrophobic interactions occur during CsgB dimer formation comparing to CsgA.

3.6. A possible *in vivo* and *in vitro* polymerization mechanism of curli proteins

A final model was formulated in detail, by combining both CsgB docking derived dimers. For clarity, this structural model was prolonged into a 16-meric model composed of two perpetual β -helical structures that interact via their ‘aggregation-prone’ interfaces (Fig. 7). The individual β -helical structures, comprising successively stacked CsgB subunits, wind around the main axis and are both stabilized by the extension of the four H-bond ladders reported for the individual monomers. This superstructure can be unlimitedly elongated along the axis of the β -solenoid, leading to the formation of fibrils with indeterminate length, a diameter of approximately 40–60 Å and ‘‘cross- β ’’ architecture (Fig. 7). The pitch of the β -helical arrangement is approximately 70 nm long

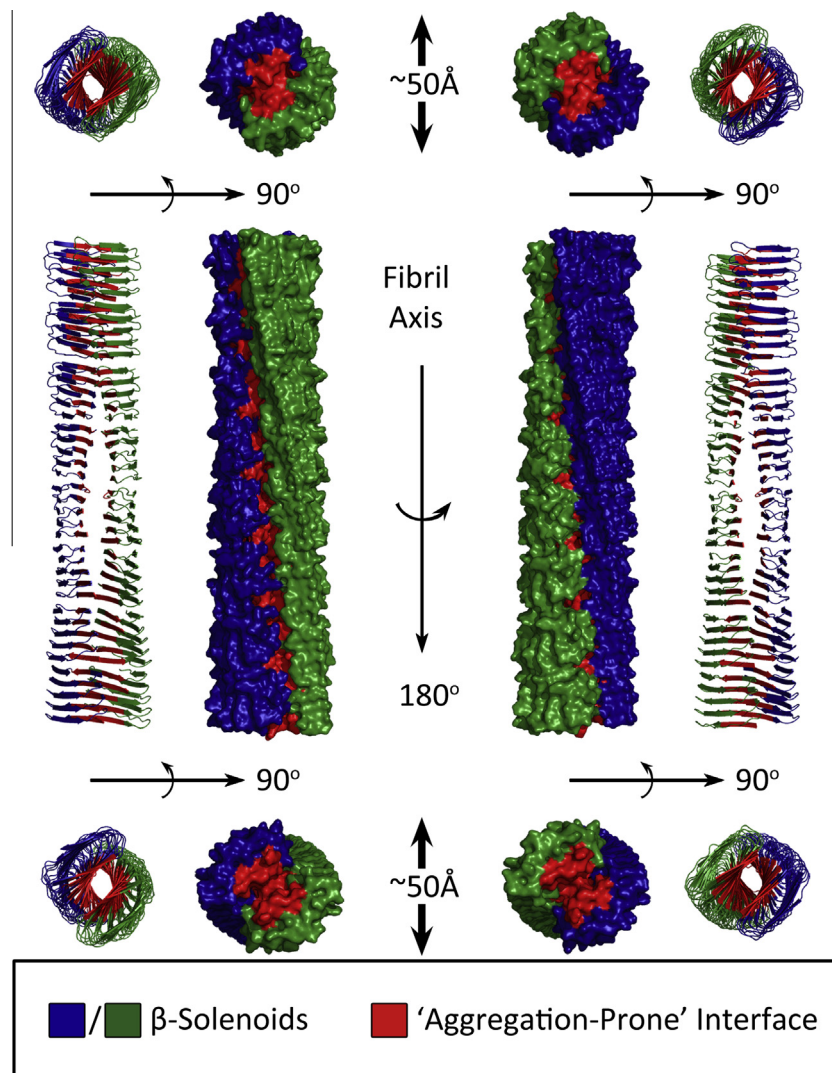


Fig. 7. A model of CsgB self-assembly. Successive CsgB monomers are stacked together with head-to-tail interactions prolonging a perpetual β -solenoid axis (shown in green and blue, as stated by the legend). The β -solenoids are brought together via their aggregation-potent interfaces, composed of the AAIIGQ_{46–52}, LLAVVA_{67–72}, NLAYI_{89–93}, TAMIIQ_{112–117} and AIVVQ_{135–139} ‘aggregation-prone’ peptides, formulating a superhelical structure with a diameter of approximately 50 Å and a ‘‘cross- β ’’ structure, all experimentally verified structural properties of curli amyloid fibers.

and corresponds to 28 successively stacked monomers. Similar properties are ascribed to curli fibers formed by the *Escherichia* and *Salmonella* species, with early and late studies indicating that curli fibers have an indefinite length and widths of approximately 4–6 nm (Cao et al., 2014; Howorka, 2011; Larsen et al., 2007; Shu et al., 2012). The derived model could possibly represent the structure of CsgB amyloid fibers formed *in vitro*, or it could suggest a possible mechanism for the formation of the initial CsgB oligomers, which are important during early nucleation stages of curli fiber biogenesis, by inducing polymerization of CsgA.

Experimental data have elucidated that CsgA and CsgB self-assemble *in vitro*, with the latter aggregating in a shorter lag period (Hammar et al., 1996). Based on the evident structural similarity between CsgA and CsgB (Evans and Chapman, 2013), both proteins may polymerize following a similar self-assembly mechanism (Figs. S7a and b), or by prolonging the initial nuclei formed due to the intrinsic aggregation propensity of CsgB (Figs. S7c). This notion is further supported by concomitant evidence revealing that *in vitro* CsgA polymerization is accelerated in the presence of CsgB (Hammer et al., 2012). Regarding *in vivo* curli fiber formation, studies have shown that the curli fiber axis is composed of both CsgA and CsgB (~20:1), with the former actively secreted to the extracellular matrix, whereas CsgB is mostly located close or bound to the cell surface (Loferer et al., 1997). CsgB localization to the outer membrane remains unknown, however studies reveal that at least one additional component facilitates this process, namely CsgF (Nenninger et al., 2009). Moreover, previous studies have suggested that the C-terminal repeat unit of CsgB has an important role in templating the nucleation process of curli fibers by interacting with the outer bacterial membrane, rendering CsgB important for the nucleation of CsgA (Hammer et al., 2012). Based on the above it could be suggested that, *in vivo*, CsgB initially forms nuclei due to its increased aggregation potency, close to or bound to the cell surface, which serve as templates promoting CsgA self-assembly (Fig. S7d). In any case, the identified high self-aggregation propensity of CsgB might possibly participate in curli fiber biogenesis by regulating the crucial initial nucleation phase of the minor curli subunit both *in vivo* and *in vitro*.

To summarize, the results presented provide insight into the complicated curli fiber formation process by proposing a possible CsgB nucleation mechanism. Information that could shed light into curli amyloid fibril formation are important, since curli fibers are the major template behind the formation of biofilms (DePas and Chapman, 2012) which are associated to antibiotic-resistant microbial strains and have an immense impact in the medical field (Bryers, 2008), in addition to countless biotechnological applications, such as remediation of water pollutants (Singh et al., 2006), pharmaceutical products (Edwards and Kjellerup, 2013), even microbial fuel cells (Zhang et al., 2011).

Funding

The research leading to these results has received partial funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under BioStruct-X (grant agreement N°283570). The infrastructure that the authors used for the present work is associated with the Greek National Research Infrastructure in Structural Biology, Instruct-EL.

Acknowledgements

We thank the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology at National Hellenic Research Foundation for hospitality. We acknowledge the help of Dr. Evangelia Chrysinas with the X-ray diffraction experiments. The help of Dr. George Baltatzis and

Prof. Efstratios Patsouris and the use of the Morgagni Microscope at the 1st Department of Pathology, Medical School, University of Athens are also gratefully acknowledged. We also thank the University of Athens for support. Finally, the authors sincerely thank the Editor-in-Chief for handling this manuscript and the anonymous reviewers for their very valuable and constructive criticism, which helped us to considerably improve the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.05.012>.

References

- Barnhart, M.M., Chapman, M.R., 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 131–147.
- Bian, Z., Normark, S., 1997. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 16, 5827–5836.
- Blanco, L.P., Evans, M.L., Smith, D.R., Badtke, M.P., Chapman, M.R., 2012. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol.* 20, 66–73.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., Warren, G.L., 1998. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
- Bryan Jr., A.W., Starner-Kreinbrink, J.L., Hosur, R., Clark, P.L., Berger, B., 2011. Structure-based prediction reveals capping motifs that inhibit beta-helix aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11099–11104.
- Bryers, J.D., 2008. Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1–18.
- Cao, B., Zhao, Y., Kou, Y., Ni, D., Zhang, X.C., Huang, Y., 2014. Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E5439–E5444.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., Hultgren, S.J., 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851–855.
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366.
- Collinson, S.K., Parker, J.M., Hodges, R.S., Kay, W.W., 1999. Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae. *J. Mol. Biol.* 290, 741–756.
- Conchillo-Sole, O., de Groot, N.S., Aviles, F.X., Vendrell, J., Daura, X., Ventura, S., 2007. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* 8, 65.
- Cooper, E.A., Knutson, K., 1995. Fourier transform infrared spectroscopy investigations of protein structure. *Pharm. Biotechnol.* 7, 101–143.
- de Vries, S.J., van Dijk, M., Bonvin, A.M., 2010. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat. Protoc.* 5, 883–897.
- DePas, W.H., Chapman, M.R., 2012. Microbial manipulation of the amyloid fold. *Res. Microbiol.* 163, 592–606.
- Divry, D., Florkin, M., 1927. Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *C.R. Soc. Biol.* 97, 1808–1810.
- Dobson, C.M., 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 329–332.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890.
- Downing, D.T., Lazo, N.D., 1999. Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem. J.* 343 (Pt 2), 453–460.
- Edwards, S.J., Kjellerup, B.V., 2013. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9909–9921.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudan, M.S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., Sali, A., 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics* (Editorial board, Andreas D. Baxevanis et al., Chapter 5, Unit 5 6).
- Evans, M.L., Chapman, M.R., 2013. Curli biogenesis: order out of disorder. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1551–1558.
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L., 2004. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotechnol.* 22, 1302–1306.
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., Kelly, J.W., 2006. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4, e6.
- Galzitskaya, O.V., Garbuzynskiy, S.O., Lobanov, M.Y., 2006. Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains. *PLoS Comput. Biol.* 2, e177.
- Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D., Beighton, E., 1968. “Cross-beta” conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343–358.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., Normark, S., 1995. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 18, 661–670.

- Hammar, M., Bian, Z., Normark, S., 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 6562–6566.
- Hammer, N.D., Schmidt, J.C., Chapman, M.R., 2007. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 12494–12499.
- Hammer, N.D., McGuffie, B.A., Zhou, Y., Badtke, M.P., Reinke, A.A., Brannstrom, K., Gestwicki, J.E., Olofsson, A., Almqvist, F., Chapman, M.R., 2012. The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation. J. Mol. Biol. 422, 376–389.
- Hamodrakas, S.J., 1988. A protein secondary structure prediction scheme for the IBM PC and compatibles. Comput. Appl. Biosci. 4, 473–477.
- Hinsen, K., 2000. The molecular modeling toolkit: a new approach to molecular simulations. J. Comput. Chem. 21, 79–85.
- Howorka, S., 2011. Molecular assembly in natural and engineered systems. Preface. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 103, xi–xii.
- Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2008. Natural protective amyloids. Curr. Protein Pept. Sci. 9, 291–309.
- Iconomidou, V.A., Vriend, G., Hamodrakas, S.J., 2000. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. FEBS Lett. 479, 141–145.
- Iconomidou, V.A., Chryssikos, G.D., Gionis, V., Vriend, G., Hoenger, A., Hamodrakas, S.J., 2001. Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkworm chorion proteins. FEBS Lett. 499, 268–273.
- Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Sawaya, M.R., Wall, J.S., Eisenberg, D., 2009. Molecular basis for insulin fibril assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 18990–18995.
- Jorgensen, W.L., Tirado-Rives, J., 1988. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. J. Am. Chem. Soc. 110 (6), 1657–1666.
- Kajava, A.V., Steven, A.C., 2006. Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins. Adv. Protein Chem. 73, 55–96.
- Kastritis, P.L., van Dijk, A.D., Bonvin, A.M., 2011. Explicit treatment of water molecules in data-driven protein-protein docking: the solvated HADDOCKing approach. Methods Mol. Biol. 819, 355–374.
- Kim, C., Choi, J., Lee, S.J., Welsh, W.J., Yoon, S., 2009. NetCSSP: web application for predicting chameleon sequences and amyloid fibril formation. Nucleic Acids Res. 37, W469–W473.
- Kitayama, H., Yoshimura, Y., So, M., Sakurai, K., Yagi, H., Goto, Y., 2013. A common mechanism underlying amyloid fibrillation and protein crystallization revealed by the effects of ultrasonication. Biochim. Biophys. Acta 1834, 2640–2646.
- Kong, J., Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai) 39, 549–559.
- Krimm, S., Bandekar, J., 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. Adv. Protein Chem. 38, 181–364.
- Larsen, P., Nielsen, J.L., Dueholm, M.S., Wetzel, R., Otzen, D., Nielsen, P.H., 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. Environ. Microbiol. 9, 3077–3090.
- Lazo, N.D., Downing, D.T., 1998. Amyloid fibrils may be assembled from beta-helical protofibrils. Biochemistry 37, 1731–1735.
- Lazo, N.D., Downing, D.T., 1999. Fibril formation by amyloid-beta proteins may involve beta-helical protofibrils. J. Pept. Res. 53, 633–640.
- Leslie, A.G.W., Powell, H.R., 2007. Processing diffraction data with mosflm. In: Read, R., Sussman, J.L. (Eds.), Evolving Methods for Macromolecular Crystallography, vol. 245. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 41–51.
- Loferer, H., Hammar, M., Normark, S., 1997. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. Mol. Microbiol. 26, 11–23.
- Lopez de la Paz, M., Serrano, L., 2004. Sequence determinants of amyloid fibril formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 87–92.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., 2015. Identification of an amyloid fibril forming segment of human Pmel17 repeat domain (RPT domain). Biopolymers 106, 133–139.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Giannelou, P., Hamodrakas, S.J., 2013. Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian Zona Pellucida formation. PLoS One 8 e73258.
- Louros, N.N., Petronikolou, N., Karamanos, T., Cordopatis, P., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2014a. Structural studies of “aggregation-prone” peptide-analogues of teleostean egg chorion ZPB proteins. Biopolymers 102, 427–436.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Tsiolaki, P.L., Chryssina, E.D., Baltatzis, G.E., Patsouris, E.S., Hamodrakas, S.J., 2014b. An N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) ‘aggregation-prone’ segment involved in isolated atrial amyloidosis. FEBS Lett. 588, 52–57.
- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Griffin, M.D., Howlett, G.J., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2015a. Chameleon ‘aggregation-prone’ segments of apoA-I: a model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis. Int. J. Biol. Macromol. 79, 711–718.
- Louros, N.N., Tsiolaki, P.L., Zompra, A.A., Pappa, E.V., Magafa, V., Pairs, G., Cordopatis, P., Cheimonidou, C., Trougakos, I.P., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2015b. Structural studies and cytotoxicity assays of “aggregation-prone” IAPP8-16 and its non-amyloidogenic variants suggest its important role in fibrillogenesis and cytotoxicity of human amylin. Biopolymers 104, 196–205.
- Louros, N.N., Baltoumas, F.A., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2016a. A beta-solenoid model of the Pmel17 repeat domain: insights to the formation of functional amyloid fibrils. J. Comput. Aided Mol. Des. 30, 153–164.
- Louros, N.N., Chryssina, E.D., Baltatzis, G.E., Patsouris, E.S., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2016b. A common ‘aggregation-prone’ interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins. FEBS Lett. 590, 619–630.
- Maurer-Stroh, S., Debulpaep, M., Kuemmerer, N., Lopez de la Paz, M., Martins, I.C., Reumers, J., Morris, K.L., Copland, A., Serpell, L., Serrano, L., Schymkowitz, J.W., Rousseau, F., 2010. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. Nat. Methods 7, 237–242.
- Missmahl, H.P., Hartwig, M., 1953. Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloidsubstanz. Virchows Arch. 324, 489–508.
- Nenninger, A.A., Robinson, L.S., Hultgren, S.J., 2009. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 900–905.
- Oxford Diffraction, 2009. Chrysalis promotions. In: Diffraction (Ed.). Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England.
- Petersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605–1612.
- Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2002. Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 2754–2759.
- Romhanyi, G., 1971. Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with Congo red. Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat. 354, 209–222.
- Savitsky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. Anal. Chem. 36, 1627–1639.
- Shewmaker, F., McGlinchey, R.P., Wickner, R.B., 2011. Structural insights into functional and pathological amyloid. J. Biol. Chem. 286, 16533–16540.
- Shu, Q., Crick, S.L., Pinkner, J.S., Ford, B., Hultgren, S.J., Frieden, C., 2012. The *E. coli* CsgB nucleator of curli assembles to beta-sheet oligomers that alter the CsgA fibrillation mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 6502–6507.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. Trends Microbiol. 14, 389–397.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., 2014. Nomenclature 2014: amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. Amyloid 21, 221–224.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., Blake, C.C., 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. J. Mol. Biol. 273, 729–739.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., Chapman, D., 1993. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. Biochemistry 32, 389–394.
- Teng, P.K., Anderson, N.J., Goldschmidt, L., Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Eisenberg, D., 2012. Ribonuclease A suggests how proteins self-chaperone against amyloid fiber formation. Protein Sci. 21, 26–37.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Tian, J., Wu, N., Guo, J., Fan, Y., 2009. Prediction of amyloid fibril-forming segments based on a support vector machine. BMC Bioinformatics 10 (Suppl. 1), S45.
- Tian, P., Boomsma, W., Wang, Y., Otzen, D.E., Jensen, M.H., Lindorff-Larsen, K., 2015. Structure of a functional amyloid protein subunit computed using sequence variation. J. Am. Chem. Soc. 137, 22–25.
- Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2013. A consensus method for the prediction of ‘aggregation-prone’ peptides in globular proteins. PLoS One 8 e54175.
- Valery, C., Pandey, R., Gerrard, J.A., 2013. Protein beta-interfaces as a generic source of native peptide tectons. Chem. Commun. 49, 2825–2827.
- Van Gerven, N., Klein, R.D., Hultgren, S.J., Remaut, H., 2015. Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. Trends Microbiol. 23, 693–706.
- Vriend, G., 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. J. Mol. Graph. Model. 8, 52–56, 29.
- Wang, X., Chapman, M.R., 2008. Sequence determinants of bacterial amyloid formation. J. Mol. Biol. 380, 570–580.
- Wang, X., Smith, D.R., Jones, J.W., Chapman, M.R., 2007. In vitro polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. J. Biol. Chem. 282, 3713–3719.
- Wang, X., Hammer, N.D., Chapman, M.R., 2008. The molecular basis of functional bacterial amyloid polymerization and nucleation. J. Biol. Chem. 283, 21530–21539.
- Wang, X., Zhou, Y., Ren, J.J., Hammer, N.D., Chapman, M.R., 2010. Gatekeeper residues in the major curli subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 163–168.
- White, A.P., Collinson, S.K., Banser, P.A., Gibson, D.L., Paetzl, M., Strynadka, N.C., Kay, W.W., 2001. Structure and characterization of AgfB from *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae. J. Mol. Biol. 311, 735–749.
- Wiltzius, J.J., Sievers, S.A., Sawaya, M.R., Cascio, D., Popov, D., Riek, C., Eisenberg, D., 2008. Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). Protein Sci. 17, 1467–1474.
- Zhang, L., Zhu, X., Li, J., Liao, Q., Ye, D., 2011. Biofilm formation and electricity generation of a microbial fuel cell started up under different external resistances. J. Power Sources 196, 6029–6035.



Exploring the ‘aggregation-prone’ core of human Cystatin C: A structural study



Paraskevi L. Tsiolaki, Nikolaos N. Louros, Stavros J. Hamodrakas, Vassiliki A. Iconomidou*

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2015

Received in revised form 21 July 2015

Accepted 30 July 2015

Available online 31 July 2015

Keywords:

Human Cystatin C

Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy

Stefin

3D-domain swapping

‘Aggregation-prone’ peptides

Amyloid fibrils

ABSTRACT

Amyloidogenic proteins like human Cystatin C (hCC) have been shown to form dimers and oligomers by exchange of subdomains of the monomeric proteins. Normally, the hCC monomer, a low molecular type 2 Cystatin, consists of 120 amino acid residues and functions as an inhibitor of cysteine proteases. The oligomerization of hCC is involved in the pathophysiology of a rare form of amyloidosis namely Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy, in which an L68Q mutant is deposited as amyloid in brain arteries of young adults. In order to find the shortest stretch responsible to drive the fibril formation of hCC, we have previously demonstrated that the LQVVR peptide forms amyloid fibrils, *in vitro* (Tsiolaki et al., 2015). Predictions by AMYLPRED, an amyloidogenic determinant prediction algorithm developed in our lab, led us to synthesize and experimentally study two additional predicted peptides derived from hCC. Along with our previous findings, in this work, we reveal that these peptides self-assemble, in a similar way, into amyloid-like fibrils *in vitro*, as electron microscopy, X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy and Congo red staining studies have shown. Further to our experimental results, all three peptides seem to have a fundamental contribution in forming the “aggregation-prone” core of human Cystatin C.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Under appropriate conditions, proteins or peptides undergo conformational changes leading from their soluble forms into ordered fibrillar aggregates, called amyloid fibrils. To date, 30 different proteins can form amyloids and although there is no apparent homology in their primary sequence or their 3D structure, they do share the propensity to self-assemble and form insoluble fibrils. The pathological consequences of the formation of amyloid fibrils are implicated in a wide range of divergent neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s, Parkinson’s, Creutzfeldt-Jacob’s and Huntington’s disease and many more, known as amyloidoses (Sipe et al., 2012).

Human Cystatin C (hCC), a 120-aminoacid protein (Fig. 1A) (Abrahamson et al., 1987), belongs to the Cystatin super-family (Barrett, 1986; Turk and Bode, 1991) and is a secretory type 2

Cystatin, expressed in all nucleated human cells (Abrahamson et al., 1986; Grubb, 2000). It is found in all tissues and body fluids (Abrahamson et al., 1986) and it is present at particularly high concentrations in cerebrospinal fluid (Abrahamson et al., 1987; Grubb and Lofberg, 1982).

hCC, belonging to the papain (C1) and legumain (C13) families (Grubb, 2000; Henskens et al., 1996; Turk and Bode, 1991), can normally inhibit cysteine proteases by an ideal binding epitope resulting from the characteristic Cystatin fold (Fig. 1B). This conformation is composed of a polypeptide that folds into a five-stranded β -sheet (β 1 to β 5 β -strands), which partially wraps around a central α -helix (α 1 helix). The N-terminal segment and the two hairpin loops L1 and L2 build the edge of the protein, which binds into the active site of cysteine proteases and blocks their proteolytic activity (Bode et al., 1988) (Fig. 1B, Supplementary Fig. S1). In 2010, Kolodziejczyk et al., created a monomer-stabilized human Cystatin C with an engineered disulfide bond [(L47C)-(G69C)] (Kolodziejczyk et al., 2010) and revealed for the first time the canonical structure features of hCC (Supplementary Fig. S1).

Aggregation and oligomerization of hCC accelerates a rare form of amyloidosis, called Hereditary Cystatin C Cerebral Amyloid Angiopathy (Icelandic Cerebral Angiopathy, HCCAA) (Gudmundsson et al., 1972). This angiopathy is an autosomal

Abbreviations: hCC, human Cystatin C; HCCAA, Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy; ATR FT-IR spectroscopy, attenuated total reflectance Fourier-transform spectroscopy.

* Corresponding author.

E-mail addresses: etsiolaki@biol.uoa.gr (P.L. Tsiolaki), nlouros@biol.uoa.gr (N.N. Louros), shamodr@biol.uoa.gr (S.J. Hamodrakas), veconom@biol.uoa.gr (V.A. Iconomidou).

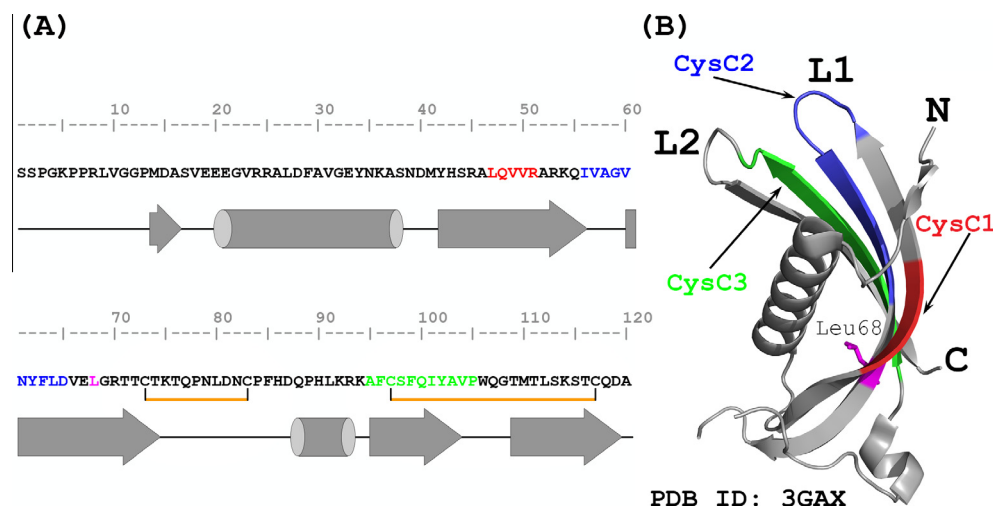


Fig. 1. Amino acid sequence and native structure of human Cystatin C (hCC). (A) A representation of the polypeptide sequence of human Cystatin C, which normally consists of 120 amino acid residues (Grubb, 2000). Predicted ‘aggregation-prone’ segments by AMYLPRED (Frousios et al., 2009), are shown in red (⁴⁷LQVVR⁵¹), blue (⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵) and green (⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵), respectively. Dark yellow lines point out existing disulfide bonds. (B) A monomer-stabilized human Cystatin C with an engineered disulfide bond (PDB ID: 3GAX) (Kolodziejczyk et al., 2010) reveals the canonical Cystatin fold, based on the crystal structure of chicken Cystatin (Bode et al., 1988). Colored regions in red, blue and green, illustrate the CysC1 (⁴⁷LQVVR⁵¹), CysC2 (⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵) and CysC3 (⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵) ‘aggregation-prone’ segments, respectively. The magenta region, presented as sticks, highlights a naturally occurring mutant of hCC at position 68 (L68Q). (N: N-terminal, C: C-terminal, L1: loop 1, L2: loop 2).

dominant disorder which forms amyloid deposits in brain arteries of young adults mainly originating from Iceland, leading to fatal cerebral hemorrhage (Asgeirsson et al., 1998; Olafsson and Grubb, 2000). Simultaneously, under denaturing conditions amyloid deposits of hCC are found in the leptomeninges, cerebral cortex and brainstem of older adults (Revesz et al., 2009). In addition to amyloidosis, it was demonstrated that human Cystatin C is co-deposited in the amyloid plaques of Alzheimer’s disease (Levy et al., 2001) and Down’s syndrome (Zerovnik, 2009) and it is also involved in tissue-degenerative diseases such as osteoporosis and periodontitis (Johansson et al., 2000).

Several crystal structures of human Cystatin C have been reported, but in all of them the protein exists in the form of symmetric three-dimensional, domain-swapped dimers (Janowski et al., 2004; Janowski et al., 2005; Janowski et al., 2001). Three-dimensional domain swapping (3D domain swapping), as a mechanism, requires partial unfolding of the monomer and subsequently separation of the exchanged domains in order to recombine and lead to the formation of an oligomer (Bennett et al., 1995; Liu and Eisenberg, 2002). A naturally occurring mutant of hCC substitutes a leucine to glutamine at position 68 (L68Q) and increases the propensity for amyloid formation through 3D domain swapping, since the substitution greatly affects the stability of the molecule (Rostagno et al., 2010) (Fig. 1B, Supplementary Fig. S1).

Based on this data, in order to find the shortest stretch responsible to drive the fibril formation of hCC, we extensively studied the structural properties of the predicted pentapeptide LQVVR and we demonstrated that this peptide has, on its own, the tendency to self-assemble forming amyloid-like fibrils, *in vitro* (Tsiolaki et al., 2015). Along with our previous findings, in this work, we report on the self-assembly properties of two (2) other hCC peptides and discuss the implications of our results.

2. Materials and methods

2.1. Prediction of potential aggregation prone peptides in human Cystatin C

AMYLPRED (Frousios et al., 2009), as well as AMYLPRED2 (Tsolis et al., 2013), both consensus algorithms developed in our lab, were

used to identify ‘aggregation-prone’ segments in the amino acid sequence of human Cystatin C (Uniprot AC: P01034). Our tools, are publicly available for academic users in our website: <http://bio-physics.biol.uoa.gr/>. In addition to the peptide segment ⁴⁷LQVVR⁵¹ (CysC1), which has shown to be pivotal for human Cystatin C oligomerization (Tsiolaki et al., 2015), two oligopeptides with high aggregation propensity were predicted (Supplementary Fig. S2). The decapeptide ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (CysC2) and the 11-residue peptide ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵ (CysC3) (Fig. 1, colors) are located in the hinge loop L1 and in the β_4 β -strand, respectively (see Section 1). It is well known that cysteine 97 in the sequence of human Cystatin C forms with cysteine 117 the one out of two disulfide bridges, in all type 2 Cystatins (Rawlings and Barrett, 1990).

2.2. Peptide synthesis

In case of ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵ prediction, we designed the analogue ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ (CysC3) by replacing the cysteine 97 residue with an alanine, in order to prevent the formation of undesirable, intermolecular disulfide bonds between cysteines. Additionally we omitted the C-terminal proline residue (P105) in order not to disrupt the structure that is going to be formed. We should mention that the peptide analogue ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ (CysC3) is also an ‘aggregation-prone’ peptide, according to AMYLPRED prediction (data not shown). Both peptides, ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (CysC2) and ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ (CysC3), were synthesized by GeneCust Europe, Luxembourg© (purity >98%, free N and C terminals).

2.3. Formation of amyloid-like fibrils

The synthesized peptide ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (CysC2) was dissolved (a) in distilled water, pH 5.5, at a concentration of 10 mg ml⁻¹ and (b) in distilled water, pH 5.5, at a concentration of 5 mg ml⁻¹. In both cases this peptide analogue was found to produce gels spontaneously after its dilution. Samples for electron microscopy were collected continuously on an everyday basis for 11 days (Supplementary Fig. S3). Similarly, the synthesized peptide ⁹⁵AFASFQIYAV¹⁰⁴ (CysC3) was dissolved in distilled water, pH 5.5, at a concentration of 10 mg ml⁻¹ and respectively gels were

formed after 1–2 weeks of incubation. In all cases, gels contained amyloid-like fibrils which are judged to be amyloids from their tinctorial, morphological and structural characteristics (see Section 3) were formed.

2.4. X-ray diffraction

In order to produce oriented fibers from both CysC2 and CysC3 peptides, a droplet (5 μl) of each mature fibril suspension at a concentration of 10 mg ml⁻¹ was placed between two properly aligned siliconized glass rods (~2 mm apart). Each droplet was allowed to dry slowly at ambient temperature and humidity for about 30 min to form an oriented fiber suitable for X-ray diffraction. The X-ray diffraction patterns were collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operated at 50 kV, 0.8 mA. For the CysC2 oligopeptide the specimen-to-film distance was set at 105 mm and the exposure time was set to 1800 s. For the CysC3 peptide-analogue the specimen-to-film distance was set at 55 mm and the exposure time was set to 600 s. The X-ray patterns, were initially viewed using the program CrysAlisPro (CrysAlis^{PRO}, 2014) and consequently measured with the aid of the program iMosFLM (Leslie and Powell, 2007). Indexing ($h, k, l, d_{\text{obs}}, d_{\text{calc}}$) of the X-ray diffraction pattern from the CysC2 peptide fiber was done utilizing DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004). Model hexapeptides corresponding to fragments of CysC2 were obtained from ZipperDB (Goldschmidt et al., 2010). The model coordinates of the CysC2 hexapeptides are the result of threading them onto the NNQQNY structure backbone, and energetically evaluating them utilizing the Rosetta-Design program (Kuhlman and Baker, 2000).

2.5. Negative staining

For negative staining, CysC2 and CysC3 peptide solutions were independently applied to glow-discharged 400-mesh carbon-coated copper grids for approximately 60 s. The grids were stained with a drop (5 μl) of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper and then the grids were air-dried. The fibril containing grids were examined with a MorgagniTM 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11 Mpixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.6. Congo red staining and polarized light stereomicroscopy

Fibril suspensions of the two peptide solutions were applied to glass slides and were allowed to air-dry. The film produced by CysC2 was stained with a 1% Congo red solution in distilled water (pH 5.75) at room temperature for approximately 20 min, as indicated by the Romhanyi protocol published in 1971 and excess stain was removed through tap water washes (Bely and Makovitzky, 2006; Romhanyi, 1971). The film formed by the CysC3 was stained with a 10 mM Congo red solution in phosphate-buffered saline (pH 7.4) for approximately 1 h (Divry and Florkin, 1927). Excess staining was removed by several washes with 90% ethanol and left to dry at room temperature. Subsequently, the samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope equipped with a JVC GC-X3E camera.

2.7. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR FT-IR) and post-run computations of the spectra

A drop (5 μl) of each of the hCC peptide analogues, CysC2 and CysC3, mature fibril suspensions were cast on a front-coated Au mirror and left to dry slowly at ambient conditions to form thin films. Infrared spectra were obtained from these films at a resolution of 4 cm⁻¹, utilizing an IR microscope (IRScope II by Bruker Optics) equipped with a Ge attenuated total reflectance (ATR) objective lens (20 \times) and attached to a Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer (Equinox 55, by Bruker Optics). Internal reflection spectroscopy has several advantages compared with the more common KBr dispersion technique (de Jongh et al., 1996). The choice of ATR was dictated by the need to exclude any possible spectroscopic and chemical interactions between the sample and the dispersing medium. Having a penetration depth ca. 1–2 μm (1000 cm⁻¹, Ge), ATR is free of saturation effects, which may be present in the transmission spectra of thicker samples. Moreover, the use of a microscope facilitates the acquisition of data from small samples. Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the S/N ratio. The spectra are shown in the absorption mode after correction for the wavelength dependence of the penetration depth ($pd \sim \lambda$). Absorption band maxima were determined from the minima in the second derivative of the corresponding spectra. Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software and included smoothing by the Savitzky–Golay algorithm (Savitsky and Golay, 1964) over a $\pm 8 \text{ cm}^{-1}$ range, around each data point. Smoothing over narrower ranges resulted in a deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence.

2.8. Structural analysis and figure preparation

Sequence alignments were performed using CLUSTALW (Larkin et al., 2007) and were illustrated using BioEdit (Hall, 1999). Cystatin C models were built by analyzing the PDB files 3GAX (Kolodziejczyk et al., 2010), 1R4C (Janowski et al., 2004) and 1TIJ (Janowski et al., 2005). 3GAX represents the fold of monomer-stabilized Cystatin C, whereas 1R4C and 1TIJ represent 3D domain swapped human Cystatin C of an orthorhombic and a tetragonal crystal, respectively. Figures were visualized and prepared using the PyMol software (Delano, 2005).

3. Results

Both peptides, predicted by AMYLPRED (Frousios et al., 2009) as segments of human Cystatin C with high aggregation propensity (Fig. 1, Supplementary Fig. S1), were studied in detail after synthesis and were found to self-assemble into amyloid like fibrils, forming gels after incubation for 1–2 weeks, in distilled water (see Section 2.1).

3.1. CysC2 experimental results

Solutions of peptide CysC2 (5 mg ml⁻¹ and 10 mg ml⁻¹) were prepared at pH 5.5 and incubated at ambient temperature for 2 weeks.

Aliquots of the dissolved CysC2 peptide, at a concentration of 5 mg ml⁻¹, were extracted every day and examined utilizing T.E.M. (Transmission Electron Microscopy) after negative staining. Fibrils were formed and the thinnest single fibril had a diameter of approximately 10 nm and it was observed immediately after the peptide dilution (Supplementary Fig. S3, Day0). These fibrils have the tendency to associate laterally even macroscopically on the

grid (data not shown). The discovery of these early forming species co-exists not only with fibril bundles during the first day (Day 1) of incubation but also with microcrystals approximately 20 nm in diameter (Supplementary Fig. S3). However, on the fourth day of incubation the number of microcrystals/fibrils has considerably increased. Actually, detailed observations reveal that microcrystals consist of typical amyloid-like fibrils (~ 10 nm, Fig. 2 thin arrow) which wound around each other and form larger helical assemblies (Supplementary Fig. S3, Day 4). As shown in Fig. 2A (thick arrows), a twisted ribbon-like microcrystal consists of coiled fibrils (~ 10 nm) with an axial crossover repeat of 250 nm. These helical

assemblies give rise to lamellar crystals, as seen in Supplementary Fig. S3 (Day 11) (Sawaya et al., 2007).

Congo red binds to mature fibrils derived from the CysC2 peptide, shown in the bright field panel in Fig. 2C (left) and subsequently exhibits a yellow to apple-green birefringence when placed between crossed polars (Fig. 2C, right).

The X-ray diffraction patterns of oriented fibers from CysC2 indicate a powder-like pattern of a polycrystalline material (Fig. 2E). This can easily be explained by looking at the EM photographs of CysC2 (Fig. 2A). Reflections appear as rings due to poor alignment of the constituent fibrils. The strong reflections

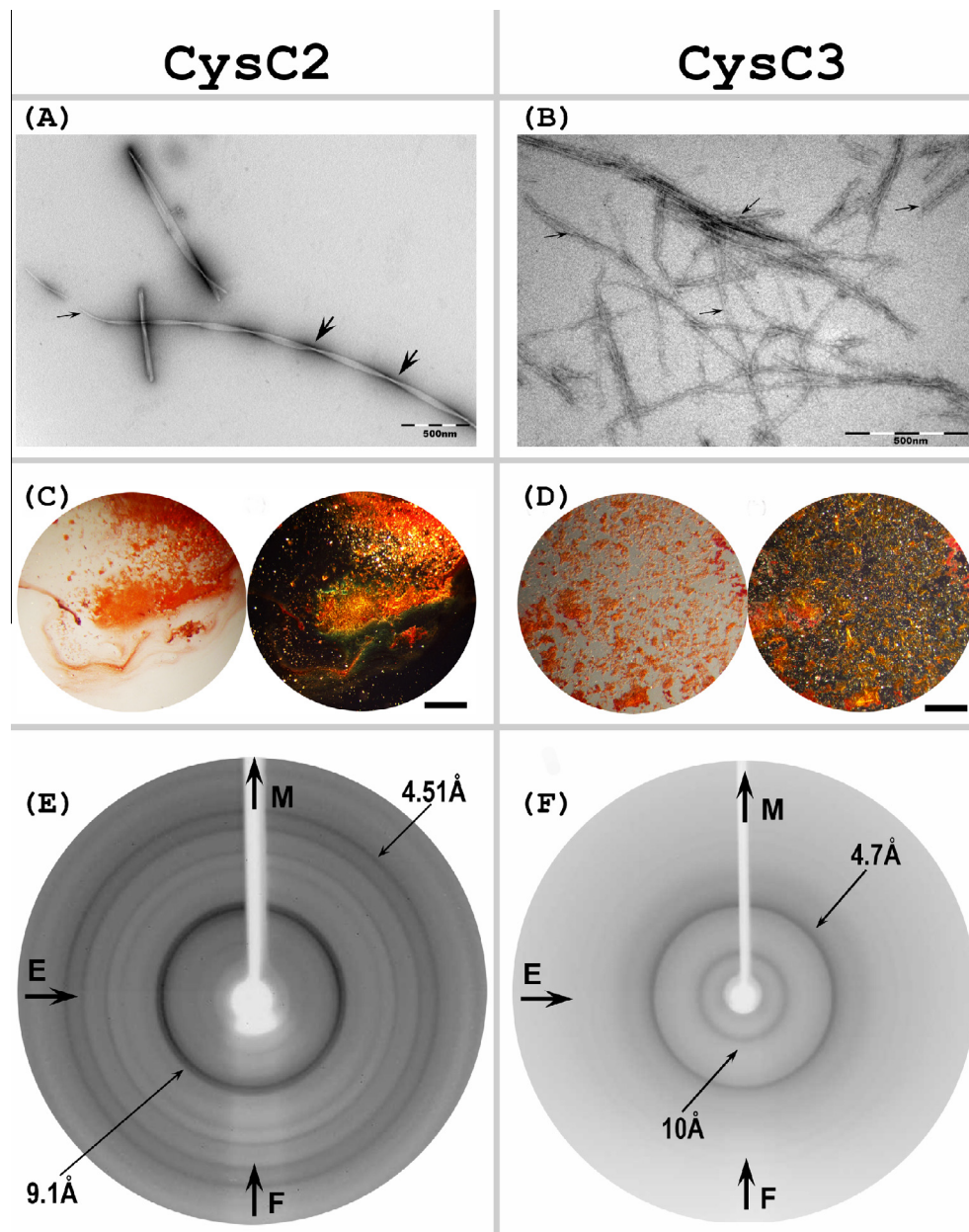


Fig. 2. Experimental results of CysC2 and CysC3 “aggregation-prone” peptides. (A) and (B) Electron micrographs of mature amyloid-like fibrils from CysC2 and CysC3 peptides, respectively. The samples were negatively stained with 2% uranyl acetate. Arrows show the fibrils (See Section 3). Bar 500 nm. (C) and (D) Photomicrographs of CysC2 and CysC3 peptide fibrils stained with Congo Red: bright field illumination (left), crossed polars (right). The yellow-green birefringence characteristic for amyloid fibrils is clearly seen under crossed polars (right) in both cases. Bar 500 μ m. (E) and (F) X-ray diffraction patterns from oriented fibers (F) of CysC2 and CysC3 amyloid-like fibrils. In this display, the meridian, M (direction parallel to the fiber axis) is vertical and the equator, E, is horizontal. Both patterns illustrate the typical “cross- β ” reflections. The 4.5–4.7 Å reflection corresponds to the spacing of adjacent beta-strands and the 9–12 Å spacing, which corresponds to the face-to-face separation (packing distance) of the β -sheets. The X-ray diffraction pattern of CysC2 (E) is not a typical “cross- β ” pattern since it shows rings instead of oriented reflections at the meridian and the equator. This indicates a random packing of the constituent amyloid fibrils in the fiber.

corresponding to periodicities of 4.51 Å and 9.14 Å may be attributed to the interstrand and inter-sheet distances of β -sheet arrangements, respectively. These reflections are characteristic of the “cross- β ” conformation (Geddes et al., 1968), and are observed for several amyloid-like fibrils (Sunde and Blake, 1997), in which the β -strands are perpendicular to the fiber axis and the sheets are packed parallel to the fiber axis. A list of the reflections observed in the X-ray pattern (Fig. 2E) is given in Table 1. A full explanation of the diffraction pattern is given in the legend of Table 1, with a table of the d -spacings of the diffraction rings and a proposed unit cell for the polycrystalline fiber. A possible packing arrangement of CysC2, resulting from our indexing utilizing DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004), illustrates the packing of the CysC2 peptide-analogue and all possible interactions between CysC2 peptides in an orthorhombic unit cell (Fraser et al., 1965). Following the steric zipper terminology proposed by Sawaya et al., 2007, we were led to suggest a Class 7 steric zipper with an up-up arrangement (Sawaya et al., 2007) (Supplementary Fig. S4, Table 1).

An ATR FTIR spectrum of a thin film cast from suspensions of the amyloid-like fibrils of CysC2 is shown in Fig. 3A (Table 2). The spectrum (Fig. 3A, Table 2) shows prominent bands at 1623 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} , and 1232 cm^{-1} in the amide I, II, and III regions, respectively, indicative of a β -sheet conformation. The high wavenumber band at 1696 cm^{-1} is an indication that β -sheets are antiparallel, whilst the sharp maximum peak at 1515 cm^{-1} is typically assigned to Tyr (Y) (C–C stretching vibration of the aromatic ring) (Haris and Chapman, 1995; Jackson and Mantsch, 1995; Krimm and Bandekar, 1986; Surewicz et al., 1993; Tremmel et al., 2005; Valenti et al., 2011). The resulting ATR FT-IR spectrum strongly supports the presence of an antiparallel β -sheet conformation.

3.2. CysC3 experimental results

The synthesized CysC3 peptide at a concentration of 10 mg ml^{-1} self-assembles into mature amyloid fibrils after 2 weeks of incubation in distilled water.

Electron micrographs show that they are linear unbranched fibrils of indeterminate length and uniform in diameter (ca. ~ 10 nm, arrows). They tend to aggregate laterally (“side by side”) and in register (Fig. 2B, thin arrows), forming bundles of fibrils.

These fibrils bind Congo red (Fig. 2D, left) showing the characteristic yellow-green birefringence when seen under crossed polars (Fig. 2D, right). In addition, X-ray diffraction patterns from fibers

Table 1

Spacings (d_{obs}) of the reflections that were observed in the X-ray diffraction pattern, taken from a fiber of the CysC2 peptide amyloid-like fibrils (Fig. 2, Supplementary Fig. S4). Indexing ($h, k, l, d_{\text{obs}}, d_{\text{calc}}$) was done, utilizing DICVOL06 (Boultif and Louër, 2004), a software for the automatic indexing of powder diffraction patterns by the successive dichotomy method, based on an orthorhombic unit cell, with unit cell parameters: $a = 8.98 \pm 0.02$ Å, $b = 36.23 \pm 0.01$ Å, $c = 18.16 \pm 0.01$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

h	k	l	d_{obs} (Å)	d_{calc} (Å)
0	0	2	9.14	9.13
1	3	0	7.24	7.24
0	0	3	6.07	6.08
1	0	3	5.04	5.04
2	0	0	4.51	4.50
2	2	2	3.94	3.94
2	0	3	3.61	3.62
1	10	1	3.31	3.31
1	5	5	3.06	3.06

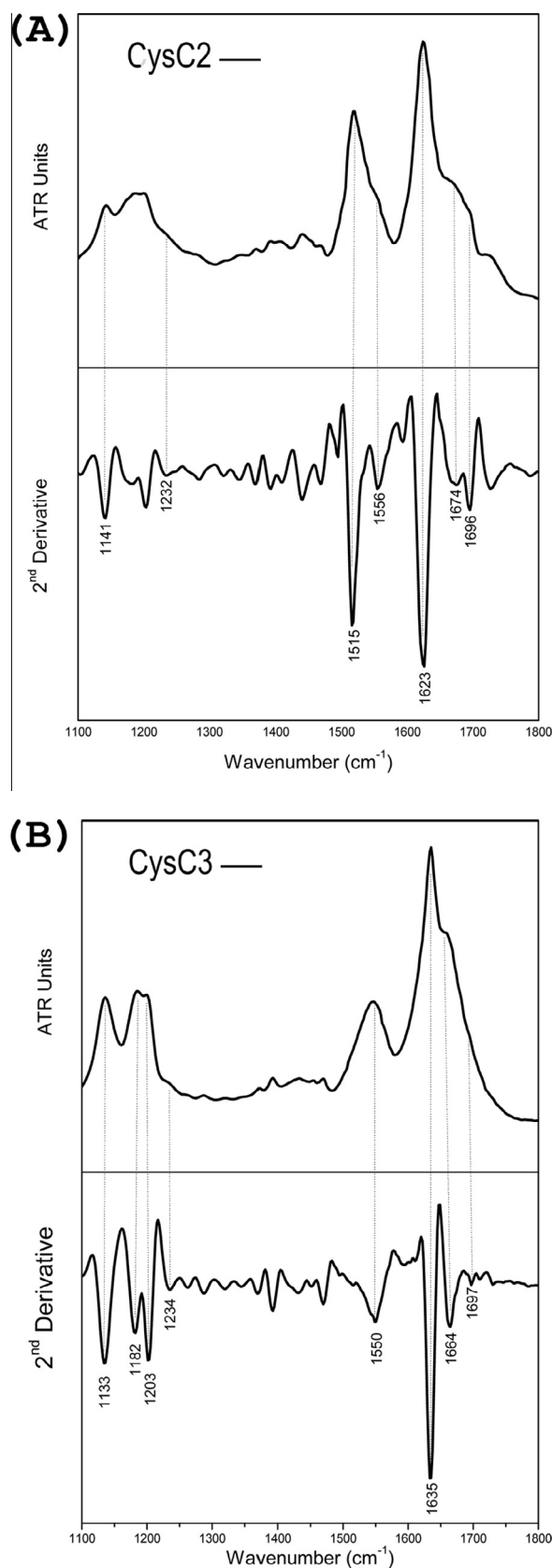


Fig. 3. ATR FT-IR (1100–1800 cm^{-1}) spectra, obtained from suspensions of fibrils, produced from the CysC2 (A) and CysC3 (B) peptides, cast on a flat stainless-steel plate and left to air-dry slowly, at ambient conditions, to form hydrated, thin films. Second derivative spectra are also included.

Table 2

Bands observed in the ATR FT-IR spectra obtained from thin-films, containing suspensions of fibrils, produced by the CysC2 Peptide and CysC3 peptides, respectively, and their tentative assignments.

CysC2		CysC3	
Band (cm ⁻¹)	Assignments	Band (cm ⁻¹)	Assignments
1141	TFA	1133, 1182, 1203	TFA
1232	Amide III (β-sheet)	1234	Amide III (β-sheet)
1515	Tyrosine side chain		
1556	Amide II (β-sheet)	1550	Amide II (β-sheet)
1623	Amide I (β-sheet)	1635	Amide I (β-sheet)
1674	TFA	1664	TFA
1696	Antiparallel β-sheet	1697	Antiparallel β-sheet

For details see text.

formed from CysC3 peptide fibrils show two strong reflections at 4.7 Å and 10 Å (Fig. 2F). These reflections appear as rings due to the poor alignment of the constituent fibrils. This is probably due to random packing of the fibrils, which adopt all possible orientations in the fiber. The strong reflection at 4.7 Å suggests that β-sheets are present and may be attributed to inter-strand distances. The weaker reflection at ~10 Å, most probably, corresponds to inter-sheet packing distances. These two reflections clearly indicate the existence of β-sheets and are characteristic of a cross-β-like conformation observed for several amyloid-like fibrils (Fig. 2B), not oriented, however, in this case.

The ATR FT-IR spectrum from thin films produced by the CysC3 peptide fibril-containing solutions (Fig. 3B, Table 2) shows a prominent band at 1635 cm⁻¹ in the amide I region, which is a band clearly due to β-sheet conformation and a weak shoulder at 1697 cm⁻¹, which is an indication that the β-sheets are antiparallel (Haris and Chapman, 1995; Jackson and Mantsch, 1995; Krimm and Bandekar, 1986; Surewicz et al., 1993; Valenti et al., 2011). Thus, the results from ATR FT-IR spectroscopy strongly support the evidence from X-ray diffraction.

4. Discussion

By its very definition the “amyloid stretch hypothesis” proposed that amyloid aggregation is actually driven by short fragments of misfolded proteins (Esteras-Chopo et al., 2005), and thus until today, scientists in structural biology have extensively been studying a great variety of amyloidogenic (or ‘aggregation-prone’) peptides (Iconomidou et al., 2013; Iconomidou et al., 2012; Louros et al., 2014; Teng and Eisenberg, 2009; Tenidis et al., 2000). These short amyloidogenic stretches of five or six amino acid residues do exhibit the potential to ‘guide’ amyloid fibril formation from a soluble globular domain (Lopez de la Paz and Serrano, 2004; Teng and Eisenberg, 2009). Therefore, several published algorithms during the last decade or so, based on various properties of polypeptide chains, attempt to predict such ‘aggregation-prone’ stretches. A relatively recent review of available software was published by Hamodrakas (2011).

Utilizing our consensus prediction algorithm of ‘aggregation-prone’ segments AMYLPRED (Frousios et al., 2009), three (3) peptides of hCC were predicted as ‘aggregation-prone’ segments; the pentapeptide ⁴⁷LQVVR⁵¹ (CysC1) and the peptides ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ (CysC2) and ⁹⁵AFCFSQIYAVP¹⁰⁵ (CysC3) (Fig. 1). Initially the LQVVR peptide was shown to have amyloidogenic properties and plays a crucial structural role in hCC fibrillation (Tsiolaki et al., 2015). In this work, we attempted to shed light on the two additional, predicted ‘aggregation-prone’ regions, the peptides CysC2 and CysC3, and find out whether they intrinsically exhibit amyloidogenicity. Our experimental work clearly shows

that twisted microcrystals formed from CysC2 peptide solutions and fibrils formed from CysC3 peptide solutions fulfill-in general-all three basic criteria of amyloid fibrils (see Section 3).

Several studies have reported undeniable similarities between a crystal and a fiber (Diaz-Avalos et al., 2003; Sawaya et al., 2007) and according to Marshall et al. a concrete concentration can drive the structural rearrangement of a fiber to finally form a crystal (Marshall et al., 2010). In fact, the crystals are nano-crystals with a thickness of approximately 200 nm which adopt a needle-shaped morphology (Nelson et al., 2005; Sawaya et al., 2007). In our case electron micrographs showed that the peptide CysC2, which consists of 10 amino acids, follows *in vitro* an assembly pathway where thin, single fibrils transform into lamellar nano-crystals within 10 days after dilution (Supplementary Fig. S3).

Besides electron micrographs, microcrystal structures are related to the diffraction patterns derived from samples derived from peptide CysC2. Our findings indicate a powder-like pattern of a polycrystalline material. Thus, except for the two diffraction spacings, which mainly correspond to the cross-β conformation, the diffraction spacings listed in Table 1 are thought to arise from the polycrystalline state of the samples from the peptide CysC2 (Supplementary Fig. S4). According to Sawaya et al., both peptides and microcrystals share common principal structure features and result in producing similar diffraction patterns (Sawaya et al., 2007).

A theoretical approach to a dataset of 12 amyloidogenic proteins has shown that segments with high aggregation propensity are usually exposed on the surface of the amyloidogenic proteins (Frousios et al., 2009). In a similar way, an intriguing finding of a computational analysis by Castillo and Ventura revealed that in the homo-oligomeric form of amyloidogenic proteins, protein-protein interactions and aggregation-prone segments of the surface overlap (Castillo and Ventura, 2009).

As we have previously demonstrated, CysC1 is both a Cystatin C-peptide with high aggregation propensity and, also, a crystal contact (Janin, 1997; Janowski et al., 2004; Tsiolaki et al., 2015). What is especially interesting is that adjacent tetramers interact through the CysC1 peptide not only in the orthorhombic crystal (PDB ID: 1R4C) (Janowski et al., 2004) but also in the tetragonal crystal (PDB ID: 1TIJ) (Janowski et al., 2005) (Supplementary Fig. S5). However, the overall shape of 1TIJ structure stresses the high plasticity capability of the hinge loop (L1 loop, see Section 1).

Similarly, CysC2, which contains the L1 loop, takes part in intermolecular interactions by stabilizing the long β-sheet between Cystatin C dimers and by forming a rich network of interactions of symmetry-related molecules (Janowski et al., 2004; Janowski et al., 2005). Remarkably, except from the ‘native-fold’ interactions between dimers, we are able to point out the significance of the intramolecular interactions between neighboring higher oligomers-such as octamers-, utilizing the information given by the Cystatin C crystal packing (Supplementary Fig. S6). Unlike its tetragonal form (PDB ID: 1TIJ), where only CysC1 interactions occur (Janowski et al., 2005), in the orthorhombic crystal structure 1R4C repeating interactions of both CysC1 and CysC2 formulate a large ordered (agglomerate) aggregate (Supplementary Fig. S6).

CysC2 is of great importance: firstly, the peptide contains the L1 loop (hinge loop, see Section 1), the linker region between β-strands β2 and β3, which is essential in hCC dimerization (Szymanska et al., 2009). The corresponding dimerization leads to a conformational change. Secondly, Orlikowska et al. has shown that specific mutations in the hinge loop can control the 3D domain swapping mechanism (Orlikowska et al., 2011). The mutated amino acid Val57 is part of our amyloidogenic determinant (⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵). Thirdly, additional studies have revealed that this region of the Cystatin fold is conformationally unstable,

mostly due to the Valine residue located near the top of the loop L1 (Val57 for hCC) (Abrahamson and Grubb, 1994; Nilsson et al., 2004).

Another equally important aspect is that human Cystatin C interacts with several amyloidogenic proteins such as Amyloid β (A β) and Serum Amyloid A (SAA). Specific interactions between Cystatin C and A β (Sastre et al., 2004) and Cystatin C and SAA (Bokarewa et al., 2007) had been found experimentally and, thus, had introduced two novel Cystatin C partners. Consecutive structural experiments were performed using selective proteolytic excision and high resolution mass spectrometry (Juszczak et al., 2009; Maftei et al., 2012; Tian et al., 2007) in order to identify the crucial binding 'hotspots' both in A β and SAA. Surprisingly, the identified interaction site of A β is located in the ¹⁰¹IYAVPWQGTMTLSKSTC¹¹⁷ hCC fragment (Juszczak et al., 2009), whereas the identified epitope on SAA is located in ⁹⁶FCSFQIY¹⁰² fragment (Spodzieja et al., 2013; Spodzieja et al., 2012). These studies highlight the importance of CysC3 peptide, which according to our experimental results exhibits the tendency to self assemble into amyloid-like fibrils.

Amyloidogenic proteins, which have the tendency to aggregate via 3D domain swapping, have been a major focus of interest in recent years. Interestingly, in 2008 an attempt to determine the core structure of Stefin B was performed by using hydrogen exchange and NMR (Morgan et al., 2008). Stefin B, as a member of the Cystatin superfamily, shares high sequence similarity with Cystatin C (Supplementary Fig. S7) and adopts the same general Cystatin fold (Jenko Kokalj et al., 2007). As a α/β protein, Stefin B needs a determining conformational transition, that leads to fibrillation through 3D domain swapping (Zerovnik et al., 2011).

In analogy to the model proposed by Morgan et al. (2008) we propose a hypothetical polymerization pathway, shown in Supplementary Fig. S8. We attempted to 'locate' our aggregation prone segments and propose a plausible mechanism for the formation of the amyloid fibrils formed by hCC. To our surprise, all three peptides, which have their own ability to self-assemble, according to our results, participate in the core beta structure of the model (Supplementary Fig. S8), suggesting, perhaps, an active role of CysC1, CysC2 and CysC3 in human Cystatin C aggregation and fibrillation. Importantly, Stefin B sequence analysis utilizing AMYLPRED2, indicated that the CysC2 homolog presents high aggregation potency, in addition to the CysC1 and CysC3 homologs presenting lower, yet significant, aggregation propensity (data not shown). However, an important note is that human Stefins, as type 1 Cystatins, lack native disulfide bonds, in contrast to human Cystatin C (Zerovnik et al., 2010) and thus, are more prone to partial misfolding or conformational change (Grana-Montes et al., 2012). Conclusively, future experiments are essential, such as series of point mutations in full-length Cystatin C, followed by aggregation assays, in order to experimentally verify the amyloid assembly mechanism of Cystatin C and the implication of the identified CysC1, CysC2 and CysC3 'aggregation-prone' segments.

5. Conclusions

Studies of hCC are of great importance. hCC was the first protein to exhibit the 3D domain swapping mechanism, which leads to oligomers. Until recently, hCC was a protein with no experimentally determined amyloidogenic regions. Our group revealed for the first time that the ⁴⁷LQVVR⁵¹ segment of Cystatin C (CysC1) exhibits the tendency to self-assemble and, most probably, drives the fibrillation of the protein by participating in a crucial structural region (Tsiolaki et al., 2015). In this work, utilizing electron microscopy, X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy and Congo red staining, we have shown that two additional 'aggregation-prone' segments of hCC, theoretically predicted by our

algorithm AMYLPRED, indeed self-assemble and might be active ingredients of hCC aggregation. Based on these results and on the published models of the Cystatin superfamily (Zerovnik et al., 2011) we propose a plausible sketchy model of hCC polymerization.

Author contributions

All authors conceived and designed the experiments. PLT and NNL performed the experiments. PLT performed the analysis and wrote the paper. VAI and SJH supervised the whole project and evaluated the results. All authors have read and approve the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank the University of Athens for support. This research has been co-financed by the European Union (European Regional Development Fund – ERDF) and Greek national funds through the Operational Program 'Competitiveness and Entrepreneurship' of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (Project code 11SYN-1-1230, General Secretariat for Research and Technology of the Greek Ministry of Education and Religious Affairs, Culture and Sports). We also thank our collaborator Dr. Evangelia D. Chrysina for excellent assistance with the X-ray experiments and the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology at National Hellenic Research Foundation for hospitality. We also thank Dr. Georgios E. Baltatzis and Prof Efstratios S. Patsouris for excellent assistance with Transmission Electron Microscopy experiments in the Department of Pathology, at the Medical School of the University of Athens. Finally, we should like to sincerely thank the handling editor and the reviewers of this manuscript for their very useful and constructive criticism.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.013>.

References

- Abrahamson, M., Grubb, A., 1994. Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68 → Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1416–1420.
- Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G., Grubb, A., 1986. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J. Biol. Chem.* 261, 11282–11289.
- Abrahamson, M., Grubb, A., Olafsson, I., Lundwall, A., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett.* 216, 229–233.
- Asgeirsson, B., Haebel, S., Thorsteinsson, L., Helgason, E., Gudmundsson, K.O., Gudmundsson, G., Roepstorff, P., 1998. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: monitoring the presence of the Leu-68 → Gln cystatin C variant in cerebrospinal fluids and monocyte cultures by MS. *Biochem. J.* 329 (Pt. 3), 497–503.
- Barrett, A.J., 1986. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta* 45, 1363–1374.
- Bely, M., Makovitzky, J., 2006. Sensitivity and specificity of Congo red staining according to Romhanyi. Comparison with Puchtler's or Bennhold's methods. *Acta Histochem.* 108, 175–180.
- Bennett, M.J., Schlunegger, M.P., Eisenberg, D., 1995. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci.* 4, 2455–2468.

- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V., 1988. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* 7, 2593–2599.
- Bokarewa, M., Abrahamson, M., Levshin, N., Egesten, A., Grubb, A., Dahlberg, L., Tarkowski, A., 2007. Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties. *J. Rheumatol.* 34, 1293–1301.
- Boultif, A., Louër, D., 2004. Powder pattern indexing with the dichotomy method. *J. Appl. Crystallogr.* 37, 724–731.
- Castillo, V., Ventura, S., 2009. Amyloidogenic regions and interaction surfaces overlap in globular proteins related to conformational diseases. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000476.
- CrysAlis^{PRO}, 2014. Agilent Technologies, pp. Software System, Version 1.171.37.31 ed. Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, UK.
- de Jongh, H.H., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., 1996. The different molar absorptivities of the secondary structure types in the amide I region: an attenuated total reflection infrared study on globular proteins. *Anal. Biochem.* 242, 95–103.
- Delano, W.L., 2005. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC400, Oyster Point Blvd., Suite 213, South San Francisco, CA 94080–1918, USA.
- Diaz-Avalos, R., Long, C., Fontano, E., Balbirnie, M., Grothe, R., Eisenberg, D., Caspar, D.L., 2003. Cross-beta order and diversity in nanocrystals of an amyloid-forming peptide. *J. Mol. Biol.* 330, 1165–1175.
- Divry, D., Florin, M., 1927. Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *Comptes Rendus de la Société de Biologie* 97, 1808–1810.
- Esteras-Chopo, A., Serrano, L., Lopez de la Paz, M., 2005. The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16672–16677.
- Fraser, R.D., Macrae, T.P., Stewart, F.H., Suzuki, E., 1965. Poly-L-alanyl-glycine. *J. Mol. Biol.* 11, 706–712.
- Frousios, K.K., Iconomidou, V.A., Karletidi, C.M., Hamodrakas, S.J., 2009. Amyloidogenic determinants are usually not buried. *BMC Struct. Biol.* 9, 44.
- Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D., Beighton, E., 1968. "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343–358.
- Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., Eisenberg, D., 2010. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 3487–3492.
- Grana-Montes, R., de Groot, N.S., Castillo, V., Sancho, J., Velazquez-Campoy, A., Ventura, S., 2012. Contribution of disulfide bonds to stability, folding, and amyloid fibril formation: the PI3-SH3 domain case. *Antioxid. Redox. Signal.* 16, 1–15.
- Grubb, A., Lofberg, H., 1982. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3024–3027.
- Grubb, A.O., 2000. Cystatin C – properties and use as diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem.* 35, 63–99.
- Gudmundsson, G., Hallgrímsson, J., Jonasson, T.A., Bjarnason, O., 1972. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. *Brain* 95, 387–404.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hamodrakas, S.J., 2011. Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. *FEBS J.* 278, 2428–2435.
- Haris, P.I., Chapman, D., 1995. The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 37, 251–263.
- Henskens, Y.M., Veerman, E.C., Nieuw Amerongen, A.V., 1996. Cystatins in health and disease. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377, 71–86.
- Iconomidou, V.A., Leontis, A., Hoenger, A., Hamodrakas, S.J., 2013. Identification of a novel 'aggregation-prone'/amyloidogenic determinant' peptide in the sequence of the highly amyloidogenic human calcitonin. *FEBS Lett.* 587, 569–574.
- Iconomidou, V.A., Pheida, D., Hamodrakas, E.S., Antony, C., Hoenger, A., Hamodrakas, S.J., 2012. An amyloidogenic determinant in n-terminal pro-brain natriuretic peptide (nt-probnp): implications for cardiac amyloidosis. *Biopolymers* 98, 67–75.
- Jackson, M., Mantsch, H.H., 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120.
- Janin, J., 1997. Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nat. Struct. Biol.* 4, 973–974.
- Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskolski, M., 2004. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *J. Mol. Biol.* 341, 151–160.
- Janowski, R., Kozak, M., Abrahamson, M., Grubb, A., Jaskolski, M., 2005. 3D domain-swapped human cystatin C with amyloid like intermolecular beta-sheets. *Proteins* 61, 570–578.
- Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M., Jaskolski, M., 2001. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat. Struct. Biol.* 8, 316–320.
- Jenko Kokalj, S., Guncar, G., Stern, I., Morgan, G., Rabzelj, S., Kenig, M., Staniforth, R.A., Waltho, J.P., Zerovnik, E., Turk, D., 2007. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. *J. Mol. Biol.* 366, 1569–1579.
- Johansson, L., Grubb, A., Abrahamson, M., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Grzonka, Z., Lerner, U.H., 2000. A peptidyl derivative structurally based on the inhibitory center of cystatin C inhibits bone resorption in vitro. *Bone* 26, 451–459.
- Juszczyk, P., Paraschiv, G., Szymanska, A., Kolodziejczyk, A.S., Rodziewicz-Motowidlo, S., Grzonka, Z., Przybylski, M., 2009. Binding epitopes and interaction structure of the neuroprotective protease inhibitor cystatin C with beta-amyloid revealed by proteolytic excision mass spectrometry and molecular docking simulation. *J. Med. Chem.* 52, 2420–2428.
- Kolodziejczyk, R., Michalska, K., Hernandez-Santoyo, A., Wahlbom, M., Grubb, A., Jaskolski, M., 2010. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J.* 277, 1726–1737.
- Krimm, S., Bandekar, J., 1986. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38, 181–364.
- Kuhlman, B., Baker, D., 2000. Native protein sequences are close to optimal for their structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10383–10388.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Leslie, A.G.W., Powell, H.R., 2007. Processing Diffraction Data with mosflm. Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands.
- Levy, E., Sastre, M., Kumar, A., Gallo, G., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., 2001. Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 94–104.
- Liu, Y., Eisenberg, D., 2002. 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci.* 11, 1285–1299.
- Lopez de la Paz, M., Serrano, L., 2004. Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 87–92.
- Louros, N.N., Iconomidou, V.A., Tsiolaki, P.L., Chrysina, E.D., Baltatzis, G.E., Patsouris, E.S., Hamodrakas, S.J., 2014. An N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) 'aggregation-prone' segment involved in isolated atrial amyloidosis. *FEBS Lett.* 588, 52–57.
- Maftai, M., Tian, X., Manea, M., Exner, T.E., Schwanzar, D., von Arnim, C.A., Przybylski, M., 2012. Interaction structure of the complex between neuroprotective factor humanin and Alzheimer's beta-amyloid peptide revealed by affinity mass spectrometry and molecular modeling. *J. Pept. Sci.* 18, 373–382.
- Marshall, K.E., Hicks, M.R., Williams, T.L., Hoffmann, S.V., Rodger, A., Dafforn, T.R., Serpell, L.C., 2010. Characterizing the assembly of the Sup35 yeast prion fragment, GNNQQNY: structural changes accompany a fiber-to-crystal switch. *Biophys. J.* 98, 330–338.
- Morgan, G.J., Giannini, S., Hounslow, A.M., Craven, C.J., Zerovnik, E., Turk, V., Waltho, J.P., Staniforth, R.A., 2008. Exclusion of the native alpha-helix from the amyloid fibrils of a mixed alpha/beta protein. *J. Mol. Biol.* 375, 487–498.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riekel, C., Grothe, R., Eisenberg, D., 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773–778.
- Nilsson, M., Wang, X., Rodziewicz-Motowidlo, S., Janowski, R., Lindstrom, V., Onnerfjord, P., Westermark, G., Grzonka, Z., Jaskolski, M., Grubb, A., 2004. Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *J. Biol. Chem.* 279, 24236–24245.
- Olafsson, I., Grubb, A., 2000. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Amyloid* 7, 70–79.
- Orlikowska, M., Jankowska, E., Kolodziejczyk, R., Jaskolski, M., Szymanska, A., 2011. Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C. *J. Struct. Biol.* 173, 406–413.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1990. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J. Mol. Evol.* 30, 60–71.
- Revesz, T., Holton, J.L., Lashley, T., Plant, G., Frangione, B., Rostagno, A., Ghiso, J., 2009. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol.* 118, 115–130.
- Romhanyi, G., 1971. Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with Congo red. *Virchows Arch. A Pathol. Pathol. Anat.* 354, 209–222.
- Rostagno, A., Holton, J.L., Lashley, T., Revesz, T., Ghiso, J., 2010. Cerebral amyloidosis: amyloid subunits, mutants and phenotypes. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 581–600.
- Sastre, M., Calero, M., Pawlik, M., Mathews, P.M., Kumar, A., Danilov, V., Schmidt, S.D., Nixon, R.A., Frangione, B., Levy, E., 2004. Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiol. Aging* 25, 1033–1043.
- Savitsky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J., McFarlane, H.T., Madsen, A.O., Riekel, C., Eisenberg, D., 2007. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453–457.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., 2012. Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 19, 167–170.
- Spodzieja, M., Rafalik, M., Szymanska, A., Kolodziejczyk, A.S., Czaplowska, P., 2013. Interaction of serum amyloid A with human cystatin C – assessment of amino acid residues crucial for hCC-SAA formation (part II). *J. Mol. Recognit.* 26, 415–425.
- Spodzieja, M., Szymanska, A., Kolodziejczyk, A., Pradzinska, M., Maszota, M., Stefanowicz, P., Szewczuk, Z., Grubb, A., Czaplowska, P., 2012. Interaction of serum amyloid A with human cystatin C – identification of binding sites. *J. Mol. Recognit.* 25, 513–524.
- Sunde, M., Blake, C., 1997. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* 50, 123–159.

- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., Chapman, D., 1993. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389–394.
- Szymanska, A., Radulska, A., Czaplewska, P., Grubb, A., Grzonka, Z., Rodziewicz-Motowidlo, S., 2009. Governing the monomer-dimer ratio of human cystatin c by single amino acid substitution in the hinge region. *Acta Biochim. Pol.* 56, 455–463.
- Teng, P.K., Eisenberg, D., 2009. Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 531–536.
- Tenidis, K., Waldner, M., Bernhagen, J., Fischle, W., Bergmann, M., Weber, M., Merkle, M.L., Voelter, W., Brunner, H., Kapurniotu, A., 2000. Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.* 295, 1055–1071.
- Tian, X., Maftai, M., Kohlmann, M., Allinquant, B., Przybylski, M., 2007. Differential epitope identification of antibodies against intracellular domains of Alzheimer's amyloid precursor protein using high resolution affinity-mass spectrometry. *Subcell. Biochem.* 43, 339–354.
- Tremmel, S., Beyermann, M., Oschkinat, H., Bienert, M., Naumann, D., Fabian, H., 2005. ¹³C-labeled tyrosine residues as local IR probes for monitoring conformational changes in peptides and proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 4631–4635.
- Tsiolaki, P.L., Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., 2015. The pentapeptide LQVVR plays a pivotal role in human cystatin C fibrillization. *FEBS Lett.* 589, 159–164.
- Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J., 2013. A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PLoS ONE* 8, e54175.
- Turk, V., Bode, W., 1991. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 285, 213–219.
- Valenti, L.E., Paci, M.B., De Pauli, C.P., Giacomelli, C.E., 2011. Infrared study of trifluoroacetic acid unpurified synthetic peptides in aqueous solution: trifluoroacetic acid removal and band assignment. *Anal. Biochem.* 410, 118–123.
- Zerovnik, E., 2009. The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *BioEssays* 31, 597–599.
- Zerovnik, E., Staniforth, R.A., Turk, D., 2010. Amyloid fibril formation by human stefins: structure, mechanism & putative functions. *Biochimie* 92, 1597–1607.
- Zerovnik, E., Stoka, V., Mirtic, A., Guncar, G., Grdadolnik, J., Staniforth, R.A., Turk, D., Turk, V., 2011. Mechanisms of amyloid fibril formation – focus on domain-swapping. *FEBS J.* 278, 2263–2282.

Structural Studies and Cytotoxicity Assays of “Aggregation-Prone” IAPP_{8–16} and its Non-Amyloidogenic Variants Suggest its Important Role in Fibrillogenesis and Cytotoxicity of Human Amylin

Nikolaos N. Louros,¹ Paraskevi L. Tsiolaki,¹ Aikaterini A. Zompra,² Eleni V. Pappa,² Vassiliki Magafa,² George Pairas,² Paul Cordopatis,^{2†} Christina Cheimonidou,¹ Ioannis P. Trougakos,¹ Vassiliki A. Iconomidou,¹ Stavros J. Hamodrakas¹

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

²Department of Pharmacy, University of Patras, Patras 26504, Greece

Received 26 December 2014; revised 10 March 2015; accepted 30 March 2015

Published online 25 April 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22650

ABSTRACT:

Amyloid deposits to the islets of Langerhans are responsible for the gradual loss of pancreatic β -cells leading to type II diabetes mellitus. Human mature islet amyloid polypeptide (hIAPP), a 37-residue pancreatic hormone, has been identified as the primary component of amyloid fibrils forming these deposits. Several individual segments along the entire sequence length of hIAPP have been nominated as regions with increased amyloidogenic potential, such as regions 8–20, 20–29, and 30–37. A smaller fragment of the 8–20 region, spanning residues 8–16 of hIAPP has been associated with the formation of early transient α -helical dimers that promote fibrillogenesis and also as a core part of hIAPP amyloid fibrils. Utilizing our aggregation propensity prediction tools AmylPred and AmylPred2, we have identified the high aggregation propensity of the 8–16 segment of hIAPP. A peptide analog corresponding to this segment was chemically synthesized and its amyloidogenic properties were vali-

dated using electron microscopy, X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy, and polarized microscopy. Additionally, two peptides introducing point mutations L12R and L12P, respectively, to the 8–16 segment, were chemically synthesized. Both mutations disrupt the α -helical properties of the 8–16 region and lower its amyloidogenic potential, which was confirmed experimentally. Finally, cytotoxicity assays indicate that the 8–16 segment of hIAPP shows enhanced cytotoxicity, which is relieved by the L12R mutation but not by the L12P mutation. Our results indicate that the chameleon properties and the high aggregation propensity of the 8–16 region may significantly contribute to the formation of amyloid fibrils and the overall cytotoxic effect of hIAPP. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers (Pept Sci)* 104: 196–205, 2015.

Keywords: islet amyloid polypeptide (IAPP); amylin; amyloid fibrils; peptide analogs; type II diabetes mellitus; cytotoxicity assays

[†]Deceased 10 October 2014.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Stavros J. Hamodrakas, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece; e-mail: shamodr@biol.uoa.gr

Disclosure: The authors declare no competing financial interests.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of any preprints from the past two calendar years by emailing the *Biopolymers* editorial office at biopolymers@wiley.com.

INTRODUCTION

Human islet amyloid polypeptide (hIAPP), also known as amylin, is a 37 residue peptide hormone expressed and secreted along with insulin through the secretory granules of the pancreatic β -cells.¹ It is initially expressed as an 89 amino acid pre-hormone containing a 22-residue signal peptide and two flanking peptides (9-aa and 16-aa, respectively), both cleaved during secretion.^{2,3} Mature hIAPP has an amidated C-terminal end and contains an intramolecular disulfide bond formed between C₂ and C₇ residues⁴ (Figure 1). The physiological role of hIAPP is not fully understood yet, however its functions seem to be mediated by binding to specific receptors of the calcitonin related peptides (CTRs).^{5,6} Proposed functions briefly include promotion of satiety⁷⁻⁹ and suppression of adiposity,¹⁰ gastric emptying,¹¹ regulation of glucose homeostasis,^{12,13} and vasodilation.¹⁴

A growing number of proteins and peptides with unrelated functions and no apparent sequence similarity have been associated with the creation of amyloid fibrils via self-aggregation procedures.¹⁵⁻¹⁷ Deposition of amyloid fibrils in several tissues and organs has been identified as the main cause of a category

of diseases, known as amyloidoses,¹⁸ the so-called ‘conformational diseases’. Like several polypeptide hormones, which are over-represented as amyloid-forming proteins, hIAPP can be deposited as amyloid.¹⁹ Specifically, hIAPP has been recognized as the major component of pancreatic amyloid deposits which lead to gradual loss of β cells.^{20,21} Destruction of the β cells results in a decrease in production of insulin and IAPP causing type 2 diabetes (T2D).^{22,23}

Extensive biophysical and computational studies have indicated that short sequence fragments with high aggregation propensity may promote the amyloidogenic propensity of a protein.^{15,16} Numerous, extensive studies focused on “aggregation-prone” segments have been performed in the case of hIAPP.²⁴⁻²⁸ Additional studies have implicated the 8–20 N-terminal region of IAPP with the formation of amyloid fibrils.^{29,30} These studies have also shown that fibrils formed by the aforementioned segment share several common characteristics to the fibrils formed by hIAPP. Later on, it was proposed that this region may be driven by the self-aggregating 15–20 segment.²⁸ Here by implementing our algorithms AmylPred and AmylPred 2 (Supporting Information Figure S1) on the sequence of hIAPP (see “Materials and Methods” section and

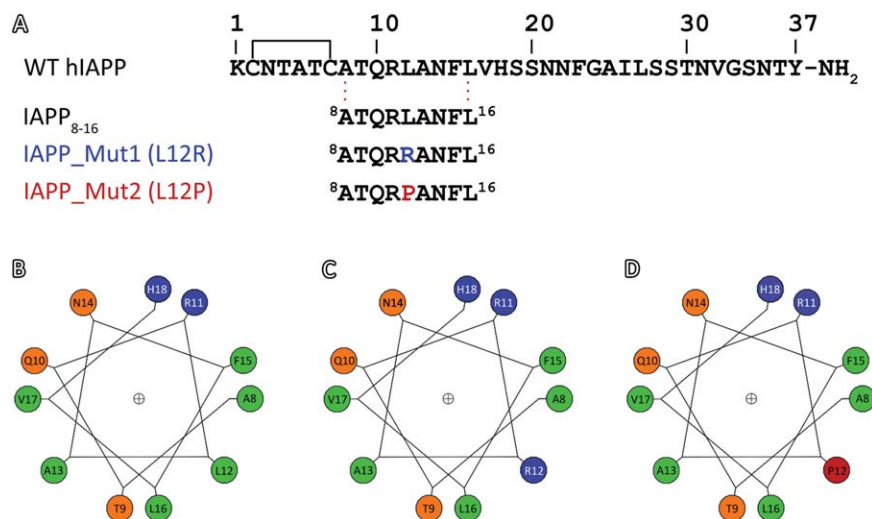


FIGURE 1 The amphipathic properties of the 8–16 α -helical segment of hIAPP. (A) A peptide analog IAPP₈₋₁₆ (ATQLANFL) was synthesized in order to study the aggregation properties of the 8–16 helical segment of hIAPP. Two additional peptides, containing point mutations: IAPP_Mut1 (L12R, shown in blue) and IAPP_Mut2 (L12P, shown in red) were also synthesized. (B) Helical wheel representation of the amphipathic 8–16 α -helical segment of hIAPP. The hydrophobic interface formed by residues A8, L12, F15, and L16 has been proposed to be important for early oligomerization of IAPP³¹. (C) Introduction of the L12R mutation disrupts the hydrophobic cluster and therefore might hinder the formation of early oligomers leading to amyloid fibril formation. (D) The L12P mutation introduces a kink in the central L12 position of the 8–16 α -helix, altering its structural integrity and polymerization potential. Aliphatic residues are shown as green circles, polar residues are shown as orange circles, positively charged residues are shown as blue circles and proline residues are shown as red circles, respectively. Helical wheels were constructed using the Helical Wheel program developed by Dr. Kael Fischer (<http://kael.net/helical.htm>).

Supporting Information), we identified and experimentally studied the aggregation propensity of the 8–16 segment of hIAPP, which has also been associated with the formation of early oligomerization events of IAPP.³¹ Our experimental results presented here, clearly show that the 8–16 segment of hIAPP self-assembles forming fibrils with amyloid properties similar to full length hIAPP and therefore verify the high amyloidogenic potential of this region, but may also imply that the 8–16 segment might actually be one of the stronger self-aggregating motifs that lead hIAPP to polymerization. Furthermore, two peptide analogs corresponding to variants of the same segment were also synthesized, introducing point mutations of the central L12 residue to R and P residues, respectively. Both peptides were experimentally tested and were found to have a significantly lower amyloidogenic propensity, since they do not form amyloid fibrils. Finally, cytotoxic assays performed for all three peptide analogs indicate that the peptide analog corresponding to the 8–16 segment of hIAPP has enhanced cell cytotoxicity. Interestingly, the peptide analog containing the L12P mutation also exhibits cytotoxicity regardless of its lowered amyloidogenic propensity, whereas the second variant containing the L12R mutation has no cytotoxic effects. These results indicate that the 8–16 segment of hIAPP may contribute in the overall toxicity of the molecule and therefore is an essential target for the development of inhibitory agents or novel treatments against T2D.

MATERIALS AND METHODS

Prediction of IAPP “Aggregation-Prone” Segments and its Nonamyloidogenic Variants

In order to successfully identify segments of human mature IAPP presenting a high aggregation tendency, we applied AmylPred and AmylPred2, two aggregation propensity consensus prediction tools, combining 5 and 11 individual algorithms, respectively, which were developed by our laboratory^{15,32} on the sequence of IAPP (Supporting Information Figure S1). As a result, a segment corresponding to residues 8–16 of hIAPP was identified with high aggregation propensity. Theoretical and experimental evidence reveal that this segment is also part of an α -helical segment following the C₂–C₇ disulphide bridge (Figure 1B).^{31,33–35} For this reason, we introduced two individual point mutations, L12R and L12P which lower the aggregation potency of the aforementioned area and significantly alter its structural integrity (Figures 1C and 1D). Both mutant peptides were also predicted to have a diminished self-polymerizing potential, compared to the native peptide (Supporting Information Figure S1).

Peptide Synthesis and Preparation of Amyloid-like Fibrils

To experimentally investigate the aggregation potential of the 8–16 segment, a peptide analog, ⁸ATQRLANFL¹⁶ (IAPP_{8–16}) was chemically

synthesized (Figure 1A). To further validate the calculated reduction in amyloidogenicity introduced by the L12R and L12P mutations, two additional peptide analogs were also synthesized, ⁸ATQRRANFL¹⁶ (IAPP_Mut1), and ⁸ATQRPANFL¹⁶ (IAPP_Mut2), respectively (Figure 1A). The peptides were synthesized by the solid phase methodology and Fmoc/^tBu chemistry, using 2-chlorotrityl chloride resin as a solid support.³⁶ The final products were determined to be at least 97% pure by analytical HPLC. Solutions of all three peptides were prepared in distilled water (pH 5.75) at a final concentration of 10 mg/ml, following previous structural studies of aggregation-prone peptides with amyloidogenic properties.^{25,26,29,37–40} After an incubation period of 7 days at ambient temperature, the IAPP_{8–16} peptide produced gels containing mature amyloid-like fibrils, as judged by electron microscopy (EM) studies (see below). In contrast, both mutant peptides did not produce amyloid fibrils even after a period of up to 8 months.

Transmission Electron Microscopy (Negative Staining)

Drops (~5 μ l) of all three peptide solutions were applied to 400-mesh glow-discharged and carbon-coated copper grids for 60–80 s. The grids were stained with a drop of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. The grids were initially air-dried and examined with a MorgagniTM 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11 Mpixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

Congo Red Staining and Polarized Light Microscopy

Films were formed by applying drops of each peptide solution to glass slides and subsequently air-dried at ambient temperatures and humidity. The films were then stained with a 1% Congo red solution in distilled water (pH 5.75) for 20 min, following the typical Romhanyi protocol,⁴¹ as previously shown.^{37,39} Excess stain was removed through tap water washes.⁴¹ Samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope equipped with a JVC GC-X3E camera.

X-Ray Fiber Diffraction

Droplets (10 μ l) of the peptide solutions were placed between two aligned capillaries with wax-covered ends (spaced 2 mm apart). The droplets were allowed to dry slowly at ambient temperature and humidity, for 30–60 min in order to form an oriented fiber suitable for X-ray diffraction. X-ray diffraction patterns were collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK _{α} high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operated at 50 kV, 0.8 mA. The specimen-to-film distance was set at 52 mm. The exposure time was set to 360 s. The X-ray diffraction patterns were initially viewed using the program CrysAlisPro⁴² and subsequently displayed and measured with the aid of the program iMosFLM.⁴³

Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Postrun Spectra Computations

Suspensions ($\sim 5 \mu\text{l}$) of the peptide solutions were cast on flat stainless-steel plates coated with an ultrathin hydrophobic layer (Spec-TRIM, Tienta Sciences, Indianapolis, USA) and left to dry slowly at ambient conditions to form thin films. IR spectra were obtained at a resolution of 4 cm^{-1} , utilizing an IR microscope (IRScope II, Bruker-OPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany), equipped with a Ge ATR objective lens (20 \times) and attached to a FT-IR spectrometer (Equinox 55, Bruker-OPTICS). Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the S/N ratio. Spectra are shown in the absorption mode, after correction for the wavelength dependence of the penetration depth (d_p analogs λ). Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software including smoothing over a $\pm 8 \text{ cm}^{-1}$ range around each data point, performed by the Savitsky–Golay algorithm.⁴⁴ Smoothing over narrower ranges resulted in deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence. The minima in the second derivative were used to determine the corresponding absorption band maxima.

Cytotoxicity Assays

Human PANC-1 cells (derived from a patient with epithelioid carcinoma in the pancreatic duct) were plated in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well. Cells were incubated for 24 h in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37° in 5% CO₂. Stock solutions of peptides IAPP_{8–16}, IAPP_Mut1, and IAPP_Mut2 were prepared in ddH₂O at a concentration of 10 mg/ml, similarly to the biophysical studies in order to keep track of the aggregation propensity of each peptide. Peptide toxicity was assessed after 1, 3, 15, and 30 days of incubation, respectively. The final concentration of peptides in the culture medium was set to 200 μM , based on similar previous cytotoxicity studies of IAPP fragment peptides.^{26,30,45–47} The MTT dye (1 mg/ml in phenol red free DMEM w/o FBS) was added 24 h after the addition of the peptides. Reduction of the dye by living cells was allowed to take place for 3–4 h. The MTT solution was discarded and isopropanol was added to dissolve the formazan crystals. Absorbance of the solution was measured at 570 nm wavelength. Survival of nontreated cells was set to 100%.

RESULTS

EM studies reveal that the IAPP_{8–16} peptide self-assembles forming ordered elongated fibrils, which appear unbranched and straight, with a tendency to wrap around each other forming twisted cords, approximately 100–120 Å in diameter (Figure 2A, arrows). In contrast, the IAPP_Mut1 peptide analog did not produce amyloid-like fibrils under the same conditions, even for longer incubation periods up to 8 months. Instead, the IAPP_Mut1 peptide forms small spherical aggregates or thin worm-like shaped aggregates that closely resemble prefibrillar aggregates as has been shown for other amyloidogenic proteins (Figure 2B).⁴⁸ The IAPP_Mut2 peptide did not produce

amyloid fibrils at similar conditions, as has theoretically been predicted. However, unlike the IAPP_Mut1 mutant peptide, in this case, only amorphous aggregates were formed (Figure 2C), indicating that the insertion of a proline residue might reduce the high amyloidogenic potential of the 8–16 segment of IAPP in a more drastic manner. Incubation for longer time periods up to 8 months did not result in any changes in the morphology of the aggregates formed by both the IAPP_Mut1 and IAPP_Mut2 peptides (see “Materials and Methods”).

The X-ray diffraction pattern produced from an oriented fiber containing aligned amyloid-like fibrils derived by self-assembly of the IAPP_{8–16} “aggregation-prone” peptide indicated that the fibrils adopt the typical for amyloids “cross- β ” structure (Figure 3). Specifically, the diffraction pattern presents a strong 4.7 Å reflection along the meridian axis (fibril axis), corresponding to the repetitive distance between perpendicularly to the axis of the fiber aligned, hydrogen bonded, β -strands and a 10.1 Å equatorial reflection that might be attributed to the packing distance of formed β -sheets. Both mutant peptide analogs, however, did not produce fibers under the same conditions, in agreement to the results of our EM studies, which suggest their inability to form amyloid fibrils.

Supporting evidence regarding the secondary structure of the IAPP_{8–16} peptide forming amyloid-like fibrils was obtained utilizing ATR FT-IR spectroscopy. The ATR FT-IR spectrum derived from a thin hydrated film containing amyloid-like fibrils from the IAPP_{8–16} peptide, strongly suggests that the peptide adopts an antiparallel β -sheet conformation, in agreement to the X-ray diffraction results (Figure 4). The spectrum contains a prominent 1622 cm^{-1} amide I band, accompanied by a 1539 cm^{-1} amide II band, both indicating the preponderance of a β -sheet secondary structure.^{49–52} The 1697 cm^{-1} shoulder most probably indicates that the β -strands are aligned in an antiparallel fashion (Table I).⁵³

Amyloid-like fibril samples have been shown to specifically bind the Congo red dye, showing the characteristic for amyloids red-green/apple birefringence, in a polarizing microscope under crossed polars.⁵⁴ Therefore, similar staining procedures were carried out for all three peptides: Clearly, films formed by the amyloid-like fibril containing solutions of the IAPP_{8–16} peptide (see Materials and Methods) bind the Congo red dye, as seen under bright field illumination and furthermore exhibit the characteristic apple/green birefringence of amyloids (Figure 5). Interestingly, multiple and variable in size spherical structures, known as spherulites are present in the solutions. These structures have a liquid crystalline texture and present characteristic “Maltese crosses”^{55,56} (Figure 5, arrows). In contrast, similar experiments that were performed for the two mutant peptides, IAPP_Mut1 and IAPP_Mut2 indicated their inability to bind the Congo red dye.

The cytotoxic effect of hIAPP fibrils on pancreatic cell lines has been extensively documented.^{57–59} Here, we investigated whether the 8–16 region of hIAPP may contribute to the cyto-

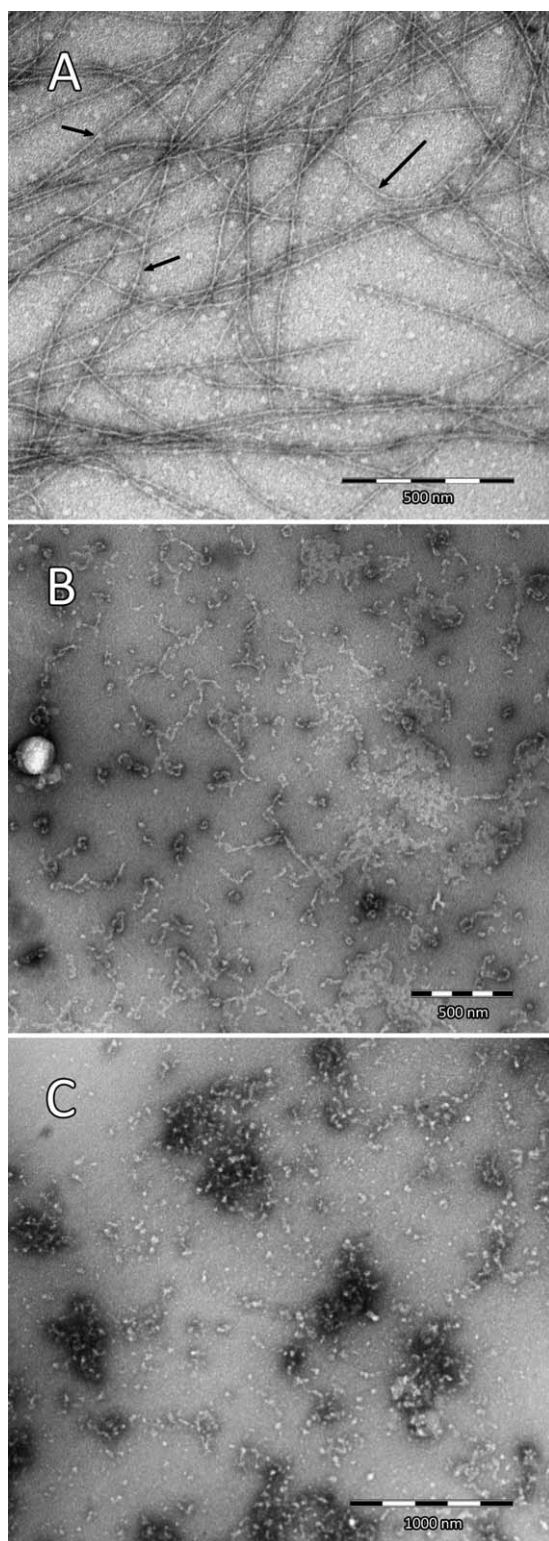


FIGURE 2.

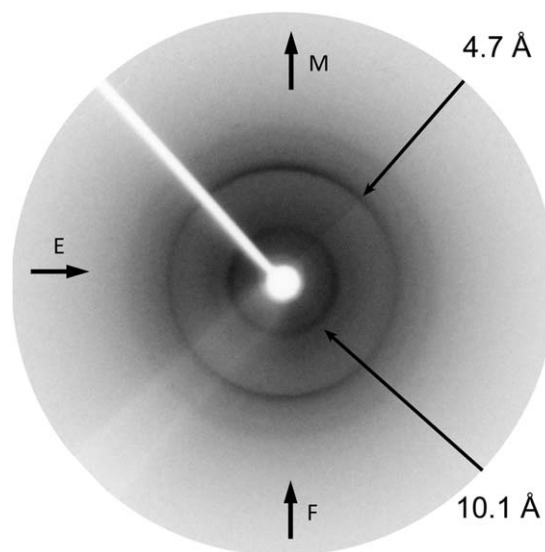


FIGURE 3 X-ray fiber diffraction pattern produced by an aligned fiber containing IAPP_{8–16} amyloid-like fibrils. A typical “cross- β ” diffraction pattern is shown from oriented fibers, derived from IAPP_{8–16} amyloid-like fibrils. The strong 4.7 Å meridional reflection (*M*) corresponds to the repeat distance of β -strands aligned perpendicularly to the fiber axis (*F*), whereas the 10.1 Å equatorial (*E*) reflection is attributed to the packing distance between β -sheets.

toxicity of the full length molecule by examining the cytotoxicity of the IAPP_{8–16} peptide, and, additionally, if the non-amyloidogenic mutants IAPP_Mut1 and IAPP_Mut2 present similar cytotoxic effects. Each peptide was added in PANC-1 cells after an incubation period of 1, 3, 15, and 30 days respectively, in order to assess the toxicity of the peptides at early and late stages of fibrillogenesis. Our results clearly indicate that the IAPP_{8–16} peptide induces a cytotoxic effect ($\sim 76\%$ cell survival in relation to the control) after 1 day of incubation

FIGURE 2 Electron microscopy studies of the aggregation propensity of IAPP_{8–16}, IAPP_Mut1 and IAPP_Mut2 peptide analogs. (A) Electron micrograph of amyloid-like fibrils formed by the self-aggregating IAPP_{8–16} peptide (10 mg/mL) following incubation for a period of 7 days. The fibrils are long and unconnected with a double helical morphology and a diameter of approximately 100–120 Å. Scale bar 200 nm. (B) Electron micrograph indicating the inability of the IAPP_Mut1 peptide to form amyloid-like fibrils, under similar conditions. After incubation for 1 week the peptide forms small spherically shaped or worm-like aggregates possibly resembling the morphology of prefibrillar aggregates.⁴⁸ However, incubation for longer periods (up to 8 months) did not result to any difference in morphology (data not shown). Scale bar 500 nm. (C) Electron micrograph indicating that the IAPP_Mut2 peptide does not form amyloid-like fibrils at the same conditions. Amorphous aggregates are formed, even after incubation for longer periods (up to 8 months) suggesting that the L12P mutation strongly inhibits the aggregation propensity of the 8–16 segment. Scale bar 1000 nm.

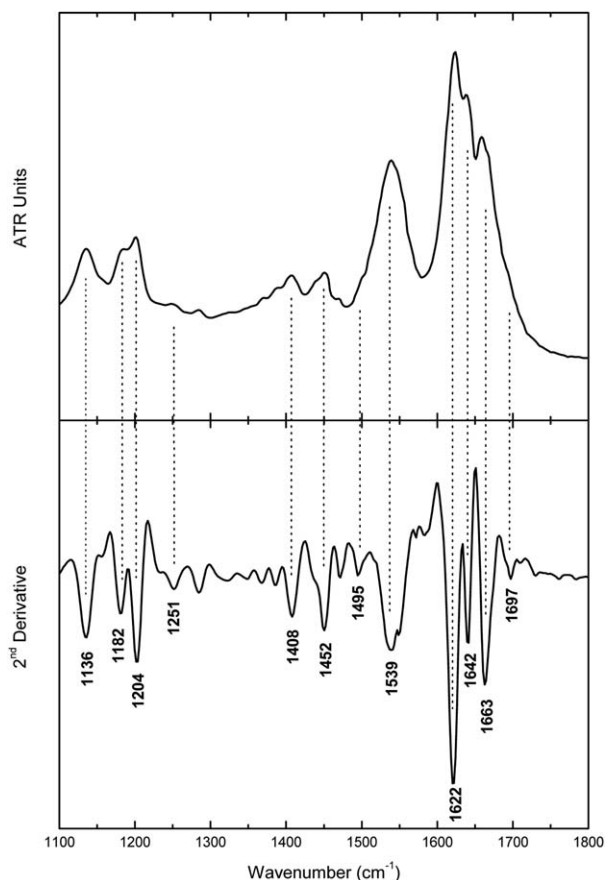


FIGURE 4 ATR FT-IR spectrum (1100–1800 cm^{-1}) obtained from a thin hydrated film containing IAPP_{8–16} amyloid-like fibrils. The derived spectrum indicates that the amyloid-like fibrils adopt an antiparallel β -sheet secondary structure. Identification of the band maxima and their tentative assignments was performed utilizing second derivative spectral analysis (Table I).

(Figure 6A) and more or less similar cytotoxicity after 3 (Figure 6B) and 30 days (Figure 6D) of incubation (~ 74 and 83% cell survival). Results obtained after 15 days of incubation (Figure 6C) indicate a slightly lower cytotoxicity ($\sim 92\%$ cell survival), however these results also exhibit an unusually large standard deviation in comparison to the rest, implying that the cytotoxic effect might actually be higher than that observed. These data suggest that the amyloidogenicity presented by the 8–16 region of hIAPP may play a vital role in the cytotoxic effect of the full length molecule.

Similar experiments indicate no significant cytotoxicity for the IAPP_Mut1 peptide (Figure 6). This apparently suggests that the L12R mutation that was found to inhibit fibrillogenesis, may also significantly lower the toxicity presented by the 8–16 region of hIAPP. In contrast, although the IAPP_Mut2 peptide did not exhibit any amyloidogenic properties, it does display enhanced cell toxicity, since it was found to be toxic after incubation for 1, 3, 15, and 30 days (~ 70 , 79, 72, and

Table I Bands Observed in the ATR FT-IR Spectrum Produced from a Hydrated Film of the ‘Aggregation-Prone’ IAPP_{8–16} Peptide, After Self-Assembly, and their Tentative Assignments (Figure 4)

Bands (cm^{-1})	Assignment
1136	TFA
1182	TFA
1204	TFA
1251	β -sheet (amide III)
1452	CH_2 deformation
1499	Phe
1539	β -sheet (amide II)
1622	β -sheet (amide I)
1642	β -sheet (amide I)
1663	TFA
1697	Antiparallel β -sheet

$\sim 89\%$ cell viability, respectively) (Figure 6). This finding suggests that the IAPP_Mut2 peptide is toxic to PANC-1 cells for unknown reasons, obviously not related to fibrillogenesis.

DISCUSSION

Several theoretical and experimental studies have focused on the amyloidogenic properties of short sequence fragments of amyloid-forming proteins indicating that specific regions are responsible for the fibrillogenetic potential of the full length protein.^{15,16} Our results indicate that the IAPP_{8–16} peptide analog self-assembles forming fibrils with an amyloid-like morphology, typical “cross- β ” architecture and the ability to bind the specific for amyloids Congo red dye. Importantly, EM studies performed by our lab on hIAPP indicate that amyloid fibrils with a comparable similarity to the IAPP_{8–16} fibrils are formed, since they frequently appear as straight and unconnected double helices, with a diameter of 100–120 Å and an indeterminate length (Supporting Information Figure S2A). These results are further supported by previous elaborate EM studies indicating that hIAPP leads to the formation of mature amyloid fibrils composed of supercoiled protofilaments with a 10 nm diameter.^{60–62} Furthermore, the X-ray diffraction pattern produced by an oriented fiber containing more or less aligned hIAPP amyloid fibrils (Supporting Information Figure S2B) is comparable to the one produced by the IAPP_{8–16} peptide, with a 4.7 Å meridian and a 10.1 Å equatorial reflection, respectively, as also previously shown,²⁹ indicating possible similarities in the “cross- β ” structure of amyloid fibrils formed in both cases. The above suggest that IAPP_{8–16} probably has a central role in the IAPP fibrillogenesis process.

hIAPP fibrillogenesis has been stated to be a multistage progressive process, beginning with the formation of initial

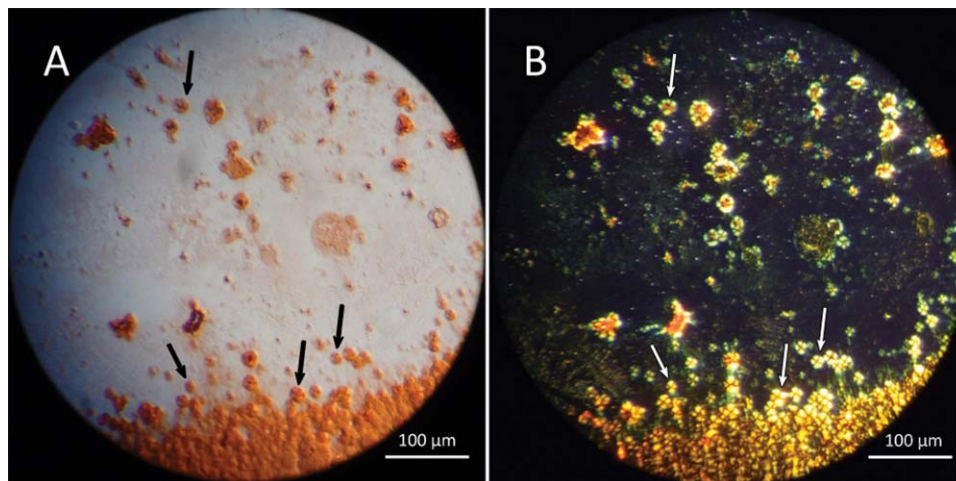


FIGURE 5 Dehydrated films derived from drops of the IAPP_{8–16} solution display Congo red birefringence, characteristic of amyloid fibrils. (A) Gels containing IAPP_{8–16} amyloid-like fibrils are positively stained with the Congo red dye, as seen under bright field illumination. Spherical aggregates known as spherulites are formed, which also successfully bind the Congo red dye (arrows). (B) Under crossed polars, a yellow to apple/green birefringence, characteristic of amyloids, is evident. Furthermore, the typical “Maltese crosses” of the spherulites are also viewed (arrows). Scale bars 100 μm .

metastable intermediates that develop to protofibrils which eventually give rise to the mature hIAPP amyloid fibrils.⁶¹ Our results also showed that IAPP_{8–16} amyloid fibril formation is a nucleation dependent process, since the peptide forms spherulites (Figure 5, arrows). These liquid crystalline spherical structures are ordered arrays of fibrils and have been nominated as prefibrillar species, probably cytotoxic, which are formed in early amyloidogenesis events of proteins associated both with functional⁵⁵ and pathological amyloids.^{38,56} Interestingly, impressive work by Fraser and co-workers has shown that proIAPP^{1–48} polymerizes forming amyloid fibrils, initially forming spherulites with typical Maltese crosses.⁶³ Therefore, the ability of the IAPP_{8–16} peptide to form spherulites indicates that this segment might contribute vitally in the early fibrillogenesis events of hIAPP.

Regarding the molecular mechanism of hIAPP aggregation, several models have been proposed previously. Early studies indicated that the 8–20 region may benefit hIAPP oligomerization into a triple β -stranded structure, in cooperation with the 20–29 and 30–37 segments.²⁹ A detailed model of the structure of hIAPP protofilaments was derived through solid-state NMR studies, which was also in agreement with STEM and AFM results presenting hIAPP protofilament morphologies.⁶⁴ This model proposes that hIAPP is folded in a β -hairpin structure with the β -strands formed by residues 8–17 (strongly overlapping the IAPP_{8–16} peptide) and 27–37.^{35,64} Concomitant evidence utilizing two-dimensional IR spectroscopy was obtained by Shim et al. verifying the aforementioned model.⁶⁵

Consequently, our results are in agreement with these models indicating a central role for the 8–16 fragment of hIAPP in the formation of amyloid fibrils, by elucidating the self-aggregation potency of the IAPP_{8–16} peptide analog.

Impressive evidence demonstrated that hIAPP dimer formation is an important step in the polymerization process.³¹ Specifically, it was shown that the 5–16 region of hIAPP, strongly overlapping the IAPP_{8–16} peptide of our study, has a high tendency to form dimers through α -helix- α -helix association,^{66,67} as previous NMR studies have also indicated.⁶⁸ This tendency was attributed to the presence of the L12, F15, and L16 residues that shape a hydrophobic interface which leads to the formation of α -helical dimers through intermolecular interactions.³¹ The same study proposed that these helical dimers play a vital role in the polymerization process of hIAPP, by acting as the early oligomers promoting the transition to the final amyloid “cross- β ” structure. A logical outcome of the above, dictates that destabilization of the α -helical dimer formation process could equally lead to destabilization of the amyloid fibril formation process. The L12 residue was shown to play a central role in dimerization through L12–F15 and L12–L16 hydrophobic interactions,³¹ therefore we attempted to test this assumption by introducing a charge at this site with the L12R mutation of the IAPP_Mut1 peptide (Figure 1C). Interestingly, our experimental results indicated that this mutation was sufficient enough to alleviate the aggregation propensity of the 8–16 hIAPP segment (Figure 2B). Furthermore, the L12P mutation, introducing a kink that would destabilize the

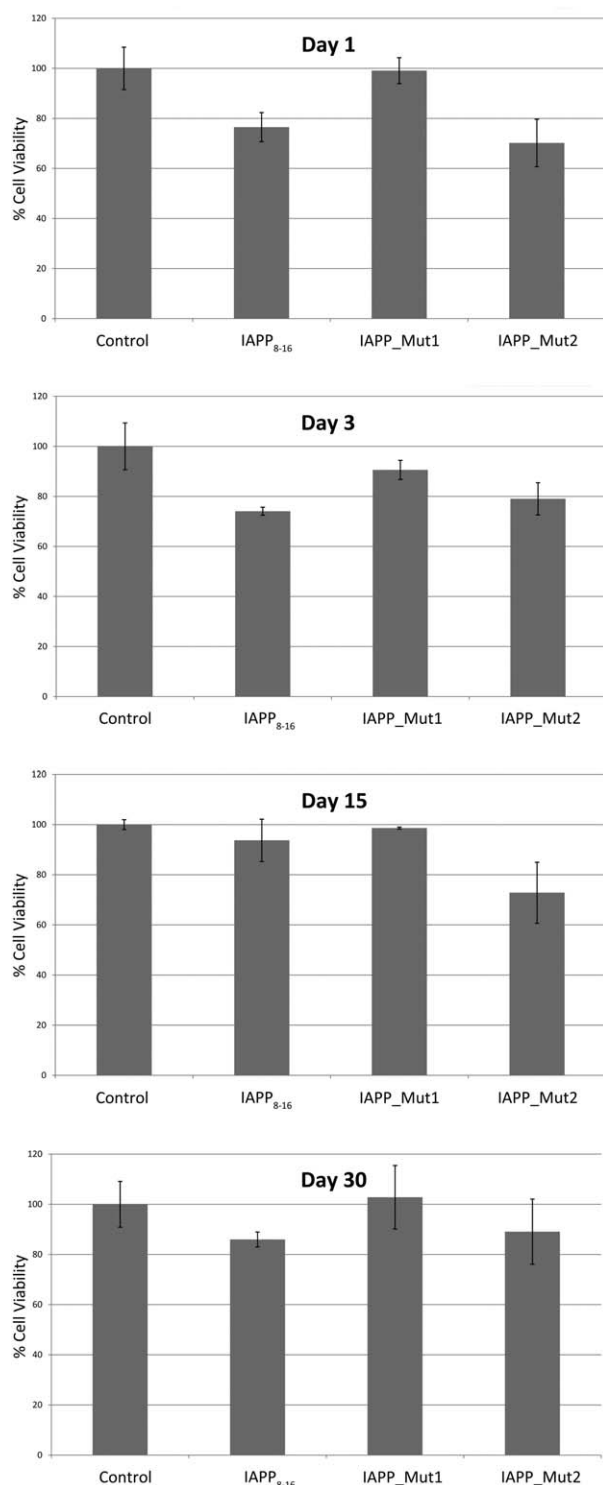


FIGURE 6 Cytotoxicity assays of peptides IAPP₈₋₁₆, IAPP_Mut1 and IAPP_Mut2 after incubation for (A) 1, (B) 3, (C) 15, and (D) 30 days, respectively. Results indicate that the IAPP₈₋₁₆ peptide has enhanced cytotoxicity even after 1 day of incubation. Comparably, although the IAPP_Mut2 peptide did not exhibit any amyloidogenic properties, it also exhibits significant cytotoxicity for unknown reasons. In contrast, the IAPP_Mut1 peptide did not exhibit any cytotoxicity even after 30 days of incubation.

early formed α -helical segment (Figure 1D), seemed to completely impede the self-aggregation process of the IAPP_Mut2 peptide, respectively (Figure 2C).

Extensive studies have previously indicated that hIAPP can induce a cytotoxic effect by forming either on-pathway amyloid fibrils that mechanically cause membrane fragmentation or by forming off-pathway intermediates that eventually lead to membrane disruption.⁶⁹⁻⁷² Several agents have been associated with this complicated process, such as zinc and calcium cations or insulin.⁷³⁻⁷⁷ Additional studies have shown that the 20-29 segment^{78,79} and the N-terminal 1-19 segment of hIAPP may play a crucial role in the cytotoxic effect of hIAPP.⁸⁰⁻⁸² NMR studies have reported the three-dimensional structures of both human and rat IAPP₁₋₁₉ (hIAPP₁₋₁₉ and rIAPP₁₋₁₉, respectively).⁸² Although hIAPP₁₋₁₉ differs in only one residue to rIAPP (H18R), it is significantly more toxic.⁸¹ These studies indicate that the observed difference is attributed to the presence of an extra positive charge in rIAPP that leads the peptide to adopt a nontoxic orientation, since it is bound to the membrane surface, in contrast to hIAPP which is inserted into the membrane, possibly in an oligomeric state, causing disruption.^{81,83,84} In agreement to the above, our results indicate that the 8-16 segment (core segment of the hIAPP₁₋₁₉ peptide) also has a severe cytotoxic effect. However, since the toxic levels of the peptide are not dependent on the incubation period (Figure 6), it seems possible that the toxicity may be attributed both to the formation of off-pathway oligomers at early stages and to mechanical disruption caused by amyloid fibril formation at late stages, due to its high aggregation propensity. The insertion of a positively charged residue in the case of the IAPP_Mut1 peptide completely diminished the cytotoxic effects of the 8-16 segment. However, since the additional charged residue concurrently lowered the aggregation potency of the segment, it is not clear whether the reduced toxicity is a result of inhibition of the fibrillogenesis process or the formation of toxic off-pathway intermediates, such as in the case of rIAPP₁₋₁₉. Finally, the results obtained in the case of the IAPP_Mut2 peptide indicate that the cytotoxic effect of the peptide remains although fibrillogenesis is diminished. These results imply that the toxicity of the 8-16 segment of hIAPP may not be a result of the formation of amyloid fibrils but instead relies to off-pathway events. Further experiments need to be performed in order to elucidate the role of the 8-16 segment in the toxicity of hIAPP, however, it seems that this segment vitally contributes in the cell toxicity of the full length molecule at any case.

Conclusively, our results reveal that the IAPP₈₋₁₆ fragment forms fibrils with similar amyloidogenic properties to hIAPP. Additionally, we showed that mutations which destabilize the

chameleon conformational properties of this segment and concurrently lower its aggregation propensity significantly hinder the amyloid fibril formation process. Our cytotoxicity experiments clearly showed that the 8–16 segment of hIAPP exhibits enhanced cytotoxicity and could therefore importantly contribute to the cytotoxic effect of the full length molecule (Supporting Information Figure S3). The L12R mutation diminished the amyloidogenic properties of the 8–16 segment and concurrently alleviated the cytotoxic properties exhibited by the same segment, whereas the L12P mutation did not, for unknown reasons. Summarizing, our results reveal that the IAPP_{8–16} fragment may significantly contribute both in the overall aggregation propensity and cytotoxicity of hIAPP. Combining previous results indicating that the same segment shows a prominent binding affinity for hIAPP,²⁸ it appears that this part of the molecule is of great interest since it may actually be an effective target for drug designing studies or other targeted remedies that will help in preventing hIAPP amyloid deposition or cytotoxicity and therefore help treat or inhibit the progression of T2D.

We should like to thank Dr. Evangelia Chrykina for help with the X-ray experiments and the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation for allowing us to use the X-ray protein crystallography facility. The help of Dr. George Baltatzis and Prof. Efstratios Patsouris and the use of the Morgagni Microscope at the 1st Department of Pathology, Medical School, University of Athens are also gratefully acknowledged. We also thank the University of Athens for support. The authors sincerely thank the Editor in Chief and the Managing Editor for properly handling this manuscript and the anonymous reviewers for their very useful and constructive criticism, which helped us to considerably improve the manuscript. This research has been co-financed by the European Union (European Regional Development Fund–ERDF) and Greek national funds through the Operational Program “Competitiveness and Entrepreneurship” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) (Project Code 11SYN-1–1230). We should like to devote this manuscript, in memory of our great friend and collaborator Prof. Paul Cordopatis, a Master in the field of Peptide Science, recently deceased.

REFERENCES

- Sanke, T.; Bell, G. I.; Sample, C.; Rubenstein, A. H.; Steiner, D. *F. J Biol Chem* 1988, 263, 17243–17246.
- Betsholtz, C.; Svensson, V.; Rorsman, F.; Engstrom, U.; Westermark, G.T.; Wilander, E.; Johnson, K.; Westermark, P. *Exp Cell Res* 1989, 183, 484–493.
- Mosselman, S.; Hoppener, J.W.; Lips, C.J.; Jansz, H.S. *FEBS Lett* 1989, 247, 154–158.
- Westermark, P.; Andersson, A.; Westermark, G. T. *Physiol Rev* 2011, 91, 795–826.
- McLatchie, L. M.; Fraser, N. J.; Main, M. J.; Wise, A.; Brown, J.; Thompson, N.; Solari, R.; Lee, M. G.; Foord, S. M. *Nature* 1998, 393, 333–339.
- Muff, R.; Buhlmann, N.; Fischer, J. A.; Born, W. *Endocrinology* 1999, 140, 2924–2927.
- Lutz, T. A. *Diabetes Obes Metab* 2012, 15, 99–111.
- Reidelberger, R. D.; Haver, A. C.; Arnelo, U.; Smith, D. D.; Schaffert, C. S.; Permert, J. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol* 2004, 287, R568–574.
- Potes, C. S.; Lutz, T. A. *Physiol Behav* 2010, 100, 511–518.
- Lutz, T. A. *Handb. Exp Pharmacol* 2012, 231–250.
- Kong, M. F.; King, P.; Macdonald, I. A.; Stubbs, T. A.; Perkins, A. C.; Blackshaw, P. E.; Moyses, C.; Tattersall, R. B. *Diabetologia* 1997, 40, 82–88.
- Lutz, T. A. *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, 298, R1475–R1484.
- Lutz, T. A. *Cell. Mol. Life Sci* 2011, 69, 1947–1965.
- Abedini, A.; Schmidt, A. M. *FEBS Lett* 2013, 587, 1119–1127.
- Frousios, K. K.; Iconomidou, V. A.; Karletidi, C. M.; Hamodrakas, S. J. *BMC Struct Biol* 2009, 9, 44.
- Lopez de la Paz, M.; Serrano, L. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, 87–92.
- Valery, C.; Pandey, R.; Gerrard, J. A. *Chem Commun* 2013, 49, 2825–2827.
- Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.; Merlini, G.; Saraiva, M. J.; Westermark, P. *Amyloid* 2012, 19, 167–170.
- Clark, A.; Cooper, G. J.; Lewis, C. E.; Morris, J. F.; Willis, A. C.; Reid, K. B.; Turner, R. C. *Lancet* 1987, 2, 231–234.
- Rocken, C.; Linke, R. P.; Saeger, W. *Virchows Arch. A Pathol Anat Histopathol* 1992, 421, 339–344.
- Westermark, P.; Wilander, E.; Westermark, G. T.; Johnson, K. H. *Diabetologia* 1987, 30, 887–892.
- Schneider, H. M.; Storkel, S.; Will, W. *Dtsch Med Wochenschr* 1980, 105, 1143–1147.
- Westermark, P.; Johnson, K. H. *BioEssays* 1988, 9, 30–33.
- Westermark, P.; Engstrom, U.; Johnson, K. H.; Westermark, G. T.; Betsholtz, C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 5036–5040.
- Nilsson, M. R.; Raleigh, D. P. *J Mol Biol* 1999, 294, 1375–1385.
- Tenidis, K.; Waldner, M.; Bernhagen, J.; Fischle, W.; Bergmann, M.; Weber, M.; Merkle, M. L.; Voelter, W.; Brunner, H.; Kapurniotu, A. *J Mol Biol* 2000, 295, 1055–1071.
- Azriel, R.; Gazit, E. *J Biol Chem* 2001, 276, 34156–34161.
- Mazor, Y.; Gilead, S.; Benhar, I.; Gazit, E. *J Mol Biol* 2002, 322, 1013–1024.
- Jaikaran, E. T.; Higham, C. E.; Serpell, L. C.; Zurdo, J.; Gross, M.; Clark, A.; Fraser, P. E. *J. Mol Biol* 2001, 308, 515–525.
- Scrocchi, L. A.; Ha, K.; Chen, Y.; Wu, L.; Wang, F.; Fraser, P. E. *J Struct Biol* 2003, 141, 218–227.
- Laghaei, R.; Mousseau, N.; Wei, G. *J Phys Chem B* 2011, 115, 3146–3154.
- Tsolis, A. C.; Papandreou, N. C.; Iconomidou, V. A.; Hamodrakas, S. J. *PLoS ONE* 2013, 8, e54175.
- Liu, G.; Prabhakar, A.; Aucoin, D.; Simon, M.; Sparks, S.; Robbins, K. J.; Sheen, A.; Petty, S. A.; Lazo, N. D. *J Am Chem Soc* 2010, 132, 18223–18232.
- Wiltzius, J. J.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Eisenberg, D. *Protein Sci* 2009, 18, 1521–1530.
- Mao, X. B.; Wang, C. X.; Wu, X. K.; Ma, X. J.; Liu, L.; Zhang, L.; Niu, L.; Guo, Y. Y.; Li, D. H.; Yang, Y. L.; Wang, C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108, 19605–19610.

36. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiou, G.; Sotiriou, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. *Tetrahedron Lett* 1989, 30, 3943–3946.
37. Louros, N. N.; Iconomidou, V. A.; Giannelou, P.; Hamodrakas, S. J. *PLoS ONE* 2013, 8, e73258.
38. Louros, N. N.; Iconomidou, V. A.; Tsiolaki, P. L.; Chrysina, E. D.; Baltatzis, G. E.; Patsouris, E. S.; Hamodrakas, S. J. *FEBS Lett* 2013, 588, 52–57.
39. Louros, N. N.; Petronikou, N.; Karamanos, T.; Cordopatis, P.; Iconomidou, V. A.; Hamodrakas, S. J. *Biopolymers* 2014, 102, 427–436.
40. Iconomidou, V. A.; Pheida, D.; Hamodraka, E. S.; Antony, C.; Hoenger, A.; Hamodrakas, S. J. *Biopolymers* 2011, 98, 67–75.
41. Romhanyi, G. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1971, 354, 209–222.
42. Oxford Diffraction. Chrysalis Promotions; In: *Diffraction*, Ed.; Oxford Diffraction Ltd.: Abingdon, Oxfordshire, England, 2009.
43. Leslie, A. G. W.; Powell, H. R., 2007. *Processing Diffraction Data with Mosflm*; (In: Read, R.; Sussman, J. L., Eds.; p. 41–51), *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*; Springer, Dordrecht, Vol. 245, pp. 41–51.
44. Savitsky, A.; Golay, M. J. E. *Anal Chem* 1964, 36, 1627–1639.
45. Tomasello, M. F.; Sinopoli, A.; Attanasio, F.; Giuffrida, M. L.; Campagna, T.; Milardi, D.; Pappalardo, G. *Eur J Med Chem* 2014, 81, 442–455.
46. Zhang, X.; Cheng, B.; Gong, H.; Li, C.; Chen, H.; Zheng, L.; Huang, K. *FEBS Lett* 2011, 585, 71–77.
47. Andrews, M. E.; Inayathullah, N. M.; Jayakumar, R.; Malar, E. J. *J Struct Biol* 2009, 166, 116–125.
48. Mezzenga, R.; Fischer, P. *Rep Prog Phys* 2013, 76, 046601.
49. Cai, S.; Singh, B. R. *Biophys Chem* 1999, 80, 7–20.
50. Haris, P. I.; Chapman, D. *Biopolymers* 1995, 37, 251–263.
51. Krimm, S.; Bandekar, J. *Adv Protein Chem* 1986, 38, 181–364.
52. Kong, J.; Yu, S. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007, 39, 549–559.
53. Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Crit. Rev Biochem Mol Biol* 1995, 30, 95–120.
54. Divry, D.; Florkin, M. *Comptes Rendus de la Societe de Biologie* 1927, 97, 1808–1810.
55. Hamodrakas, S. J.; Hoenger, A.; Iconomidou, V. A. *J Struct Biol* 2004, 145, 226–235.
56. Iconomidou, V. A.; Leontis, A.; Hoenger, A.; Hamodrakas, S. J. *FEBS Lett* 2013, 587, 569–574.
57. Janciauskiene, S.; Ahren, B. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 251, 888–893.
58. Janson, J.; Ashley, R. H.; Harrison, D.; McIntyre, S.; Butler, P. C. *Diabetes* 1999, 48, 491–498.
59. Lorenzo, A.; Razzaboni, B.; Weir, G. C.; Yankner, B. A. *Nature* 1994, 368, 756–760.
60. Goldsbury, C.; Kistler, J.; Aebi, U.; Arvinte, T.; Cooper, G. J. *J Mol Biol* 1999, 285, 33–39.
61. Kaye, R.; Bernhagen, J.; Greenfield, N.; Sweimeh, K.; Brunner, H.; Voelter, W.; Kapurniotu, A. *J Mol Biol* 1999, 287, 781–796.
62. Goldsbury, C.; Goldie, K.; Pellaud, J.; Seelig, J.; Frey, P.; Muller, S. A.; Kistler, J.; Cooper, G. J.; Aebi, U. *J Struct Biol* 2000, 130, 352–362.
63. Exley, C.; House, E.; Patel, T.; Wu, L.; Fraser, P. E. *J Inorg Biochem* 2010, 104, 1125–1129.
64. Luca, S.; Yau, W. M.; Leapman, R.; Tycko, R. *Biochemistry* 2007, 46, 13505–13522.
65. Shim, S. H.; Gupta, R.; Ling, Y. L.; Strasfeld, D. B.; Raleigh, D. P.; Zanni, M. T. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106, 6614–6619.
66. Abedini, A.; Raleigh, D. P. *Protein Eng Des Sel* 2009, 22, 453–459.
67. Abedini, A.; Raleigh, D. P. *Phys Biol* 2009, 6, 015005.
68. Mishra, R.; Geyer, M.; Winter, R. *Chembiochem* 2009, 10, 1769–1772.
69. Brender, J. R.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A. *Acc Chem Res* 2011, 45, 454–462.
70. Patel, H. R.; Pithadia, A. S.; Brender, J. R.; Fierke, C. A.; Ramamoorthy, A. *J Phys Chem Lett* 2015, 5, 1864–1870.
71. Suzuki, Y.; Brender, J. R.; Hartman, K.; Ramamoorthy, A.; Marsh, E. N. *Biochemistry* 2012, 51, 8154–8162.
72. Soong, R.; Brender, J. R.; Macdonald, P. M.; Ramamoorthy, A. *J Am Chem Soc* 2009, 131, 7079–7085.
73. Sciacca, M. F.; Brender, J. R.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A. *Biochemistry* 2012, 51, 7676–7684.
74. Brender, J. R.; Hartman, K.; Nanga, R. P.; Popovych, N.; de la Salud Bea, R.; Vivekanandan, S.; Marsh, E. N.; Ramamoorthy, A. *J Am Chem Soc* 2010, 132, 8973–8983.
75. Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Messina, G. M.; Deb, A.; Vivekanandan, S.; La Rosa, C.; Penner-Hahn, J. E.; Ramamoorthy, A. *Chem Commun (Camb)* 2013, 49, 3339–3341.
76. Sciacca, M. F.; Milardi, D.; Messina, G. M.; Marletta, G.; Brender, J. R.; Ramamoorthy, A.; La Rosa, C. *Biophys J* 2013, 104, 173–184.
77. Brender, J. R.; Lee, E. L.; Hartman, K.; Wong, P. T.; Ramamoorthy, A.; Steel, D. G.; Gafni, A. *Biophys J* 2011, 100, 685–692.
78. Brender, J. R.; Heyl, D. L.; Samisetti, S.; Kotler, S. A.; Osborne, J. M.; Pesaru, R. R.; Ramamoorthy, A. *Phys Chem Chem Phys* 2013, 15, 8908–8915.
79. Brender, J. R.; Durr, U. H.; Heyl, D.; Budarapu, M. B.; Ramamoorthy, A. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1768, 2026–2029.
80. Brender, J. R.; Lee, E. L.; Cavitt, M. A.; Gafni, A.; Steel, D. G.; Ramamoorthy, A. *J Am Chem Soc* 2008, 130, 6424–6429.
81. Brender, J. R.; Hartman, K.; Reid, K. R.; Kennedy, R. T.; Ramamoorthy, A. *Biochemistry* 2008, 47, 12680–12688.
82. Nanga, R. P.; Brender, J. R.; Xu, J.; Veglia, G.; Ramamoorthy, A. *Biochemistry* 2008, 47, 12689–12697.
83. Nanga, R. P.; Brender, J. R.; Vivekanandan, S.; Ramamoorthy, A. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1808, 2337–2342.
84. Nanga, R. P.; Brender, J. R.; Xu, J.; Hartman, K.; Subramanian, V.; Ramamoorthy, A. *J Am Chem Soc* 2009, 131, 8252–8261.



Chameleon ‘aggregation-prone’ segments of apoA-I: A model of amyloid fibrils formed in apoA-I amyloidosis

Nikolaos N. Louros^a, Paraskevi L. Tsiolaki^a, Michael D.W. Griffin^b, Geoffrey J. Howlett^b, Stavros J. Hamodrakas^a, Vassiliki A. Iconomidou^{a,*}

^a Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, The University of Melbourne, Parkville, VIC 3010, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2015

Received in revised form 20 May 2015

Accepted 22 May 2015

Available online 3 June 2015

Keywords:

Familial apolipoprotein A-I amyloidosis
“Aggregation-prone” peptide-analogues
Amyloid fibrils

ABSTRACT

Apolipoprotein A-I (apoA-I) is the major component of high density lipoproteins and plays a vital role in reverse cholesterol transport. Lipid-free apoA-I is the main constituent of amyloid deposits found in atherosclerotic plaques, an acquired type of amyloidosis, whereas its N-terminal fragments have been associated with a hereditary form, known as familial apoA-I amyloidosis. Here, we identified and verified four “aggregation-prone” segments of apoA-I with amyloidogenic properties, utilizing electron microscopy, X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy and polarized light microscopy. These segments may act as conformational switches, possibly controlling the transition of the α -helical apoA-I content into the “cross- β ” architecture of amyloid fibrils. A structural model illuminating the structure of amyloid fibrils formed by the N-terminal fragments of apoA-I is proposed, indicating that two of the identified chameleon segments may play a vital part in the formation of amyloid fibrils in familial apoA-I amyloidosis.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human mature apolipoprotein A-I (apoA-I) is a 243 amino acid long protein expressed mainly in the liver and the small intestine [1]. It is encoded by exons 3 and 4 of the homonym gene located at chromosome 11, in the form of a 267-residue pre-pro-protein [2]. Following cleavage of the signal peptide, it is secreted as pro-apoA-I into plasma where it is finally cleaved into its mature form [3]. The apoA-I^{1–43} N-terminal portion is expressed by exon 3 and contains three 11-mer repetitive segments, named G1, G2 and G3, following the first 10 sequence residues [4]. The apoA-I^{44–261} part is expressed by exon 4 and is composed of 10 tandem 11/22-mer repeats which lead to the formation of amphipathic α -helices [5,6]. ApoA-I is the major protein constituent of high density lipoproteins (HDL), contributing in reverse cholesterol transport by promoting efflux of cholesterol and phospholipid from peripheral tissues [7]. Moreover, it serves as an activator of the enzyme lecithin:cholesterol

acyltransferase (LCAT) [8]. However, a small percentage of lipid-free apoA-I is also found in plasma with suggested cardioprotective abilities [9].

Apart of its functional properties, apoA-I has been associated with a hereditary and a non-hereditary or acquired type of amyloidosis. Several autosomal dominant mutations, most of them occurring within the first 100 residues of the N-terminal part of apoA-I have been associated with the former type, known as familial apoA-I amyloidosis [10]. Most of the known mutations seem to favor the proteolytic cleavage of apoA-I at a region spanning residues 83–100, after a putative β -breaking motif (EKETEG) encompassing residues 76–81 (Fig. 1) [11]. The resulting, variable in size, N-terminal fragments are co-deposited within amyloid deposits found in various organs and tissues causing neuropathies, nephropathies, hepatopathies and cardiomyopathies [12]. Additionally, *in vitro* studies have also indicated the ability of apoA-I^{1–93}, which is the main constituent of apoA-I fibrillar deposits located in the heart [12], to form amyloid fibrils at acidic conditions [13]. However, wild-type apoA-I is also associated with a non-hereditary type of amyloidosis, since it produces amyloid deposits, commonly located within atherosclerotic plaques [14]. Notably, oxidative conditions induce full length apoA-I aggregation thus further promoting atherogenesis [15].

Abbreviations: ApoA-I, apolipoprotein A-I; ApoC-II, apolipoprotein C-II; HDL, high density lipoprotein; LCAT, lecithin:cholesterol acyltransferase; ATR FT-IR spectroscopy, attenuated total reflectance Fourier-transform spectroscopy.

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7274871; fax: +30 210 7274254.

E-mail address: veconom@biol.uoa.gr (V.A. Iconomidou).

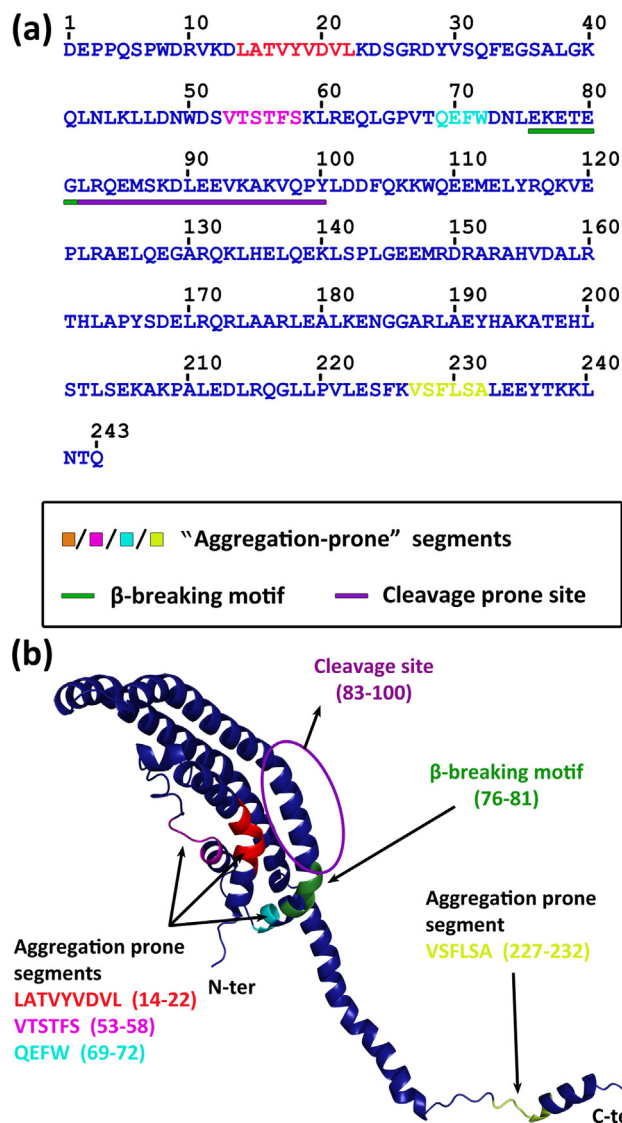


Fig. 1. Prediction of amyloidogenic regions within the apoA-I sequence. (a) The primary structure of human apoA-I. Three “aggregation-prone” regions are located close to the N-terminal part of the protein, 14 LATVYVDVL 22 (shown in red), 53 VTSTFS 58 (shown in magenta) and 69 QEFW 72 (shown in cyan), whereas a fourth segment 227 VSFLSA 232 (shown in yellow) is located close to the C-terminal. (b) Representation of the pseudo full length lipid free apoA-I structure, derived by modeling techniques combining the crystal structures $\Delta(185-243)$ apoA-I (residues 1–184) (PDB ID: 3R2P) [46] and $\Delta(1-43)$ apoA-I (residues 185–243) (PDB ID: 1AV1) [47], as proposed by Mei and Atkinson [46]. The two individual protein domains are oriented relatively arbitrary and do not depict the actual conformation of the full length protein, since recent MD simulations indicate that the C-terminal domain adopts a dynamic conformation and is loosely wrapped around the N-terminal four helix bundle [48]. Location of all four predicted “aggregation-prone” regions is shown, in addition to the proposed β -breaking motif and the cleavage prone site of the apoA-I N-terminal domain [24]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Extensive experimental data have consistently indicated that amyloid fibril formation is initiated by short sequence regions, which possess significant self-aggregation propensity and as a result mediate the aggregation tendency of a protein [16–21]. Detailed studies have been performed in order to locate similar “aggregation-prone” segments within the apoA-I sequence. Synthetic N-terminal fragments, such as apoA-I $^{9-28}$, apoA-I $^{1-43}$, apoA-I $^{46-59}$, apoA-I $^{44-65}$ and apoA-I $^{66-83}$ have been shown to lead to the formation of amyloid fibrils in various *in vitro* conditions [22–24]. Moreover, recent impressive work has shown

that hydrophobic clusters comprising residues 9–24, 45–63 and the C-terminal segment 221–239 of apoA-I form amyloid fibrils *in vitro* [25]. Finally, recent computational analysis by Gursky and coworkers, utilizing PASTA [26] and two consensus algorithms AMYLPRED and AMYLPRED2 [27,28], developed by our lab, successfully identified four short “aggregation-prone” peptide segments, 14 LATVYVDVL 22 , 53 VTSTFS 58 , 69 QEFW 72 and 227 VSFLSA 232 that may act as amyloidogenic “hot spots”, facilitating N-terminal and full length apoA-I polymerization in familial and acquired apoA-I amyloidosis, respectively [24]. In this study, we attempt to verify this assumption experimentally by applying transmission electron microscopy, Congo red staining and polarizing microscopy, X-ray fiber diffraction and ATR FT-IR Spectroscopy studies. Our results clearly indicate that these short stretches act as the core aggregation elements of apoA-I, which may potentially lead in the formation of amyloid fibrils both in familial and acquired apoA-I amyloidosis. Finally, a detailed three-dimensional model of the structure of amyloid fibrils formed by the amyloidogenic N-terminal fragments of apoA-I is proposed indicating that two of the aforementioned “aggregation-prone” peptides, 14 LATVYVDVL 22 and 53 VTSTFS 58 may vitally contribute in the formation of amyloid fibrils associated with familial apoA-I amyloidosis.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis and sample preparation

Two consensus tools for the prediction of sequence aggregation propensity, AMYLPRED and AMYLPRED2 [27,28], were applied on the apoA-I sequence. Consequently, three “aggregation-prone” segments, 14 LATVYVDVL 22 , 53 VTSTFS 58 and 69 QEFW 72 , close to the N-terminal of the protein were predicted, in addition to the segment 227 VSFLSA 232 which resides close to the C-terminal, respectively (see Fig. 1). As a result, three peptide analogues, resembling the aforementioned segments 14 LATVYVDVL 22 , 53 VTSTFS 58 and 227 VSFLSA 232 were chemically synthesized. A fourth peptide was also synthesized, containing the “aggregation-prone” 69 QEFW 72 segment, in addition to the preceding V67 and T68 residues in the N-terminus (67 VTQEFW 72). This decision was based on the fact that both residues display a weaker prediction of aggregation propensity and are also strong β -formers; therefore they may vitally contribute in the formation of a “cross- β ” structure. Peptide synthesis was carried out by GeneCust Europe, Luxembourg (purity >98%, free N- and C-terminals). Peptide solutions of all lyophilized peptides were prepared in distilled water (pH 5.75) at a concentration of 10 mg/ml. After incubation for a period of 14 days at ambient temperature, all samples produced gels containing mature amyloid-like fibrils, as judged by negative staining studies (see below).

2.2. Transmission electron microscopy (negative staining)

Drops ($\sim 5 \mu\text{l}$) of fibril containing solutions of the “aggregation-prone” peptides were applied to 400-mesh glow-discharged and carbon-coated copper grids for 60–80 s. The grids were stained with a drop of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. The grids were initially air-dried and examined with a MorgagniTM 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11 Mpixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.3. Congo red staining and polarized light microscopy

Films containing amyloid fibrils were formed by applying drops of each peptide solution to glass slides and subsequently air-dried

at ambient temperature and humidity. The films were then stained with a 1% Congo red solution in distilled water (pH 5.75) for 20 min, following the typical Romhanyi protocol [29]. Excess stain was removed through tap water washes [29]. All samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope equipped with a JVC GC-X3E camera.

2.4. X-ray fiber diffraction

Droplets (10 μ l) of the fibril containing solutions were placed between two aligned capillaries with wax-covered ends (spaced 2 mm apart). The droplets were allowed to dry slowly at ambient temperature and humidity, for 30–60 min in order to form oriented fibers suitable for X-ray diffraction. X-ray diffraction patterns were collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operated at 50 kV, 0.8 mA. The specimen-to-film distance was set at 52 mm. Exposure times were set to 240, 200, 220 and 200 s for peptides $^{14}\text{LATVYVDVL}^{22}$, $^{53}\text{VTSTFS}^{58}$, $^{67}\text{VTQEFW}^{72}$ and $^{227}\text{VSFLSA}^{232}$, respectively. The X-ray patterns, initially viewed using the program CrysAlisPro [30] were displayed and measured with the aid of the program iMosFLM [31].

2.5. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy and post-run spectra computations

Drops (5 μ l) of the fibril suspensions were cast on flat stainless-steel plates, coated with an ultrathin hydrophobic layer (SpectRIM, Tienta Sciences, Inc. Indianapolis, USA) and were left to air-dry slowly at ambient conditions, to form thin hydrated films. IR spectra were obtained at a resolution of 4 cm^{-1} , utilizing an IR microscope (IRScope II, BrukerOPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany), equipped with a Ge ATR objective lens (20 \times) and attached to a FT spectrometer (Equinox 55, BrukerOPTICS). Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the sound/noise (S/N) ratio. All spectra are shown in the absorption mode after correction for the wavelength-dependence of the penetration depth (d_p analogous to λ). Absorption band maxima were determined from the minima in the second derivative of the corresponding spectra. Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software, including smoothing over a $\pm 8 \text{ cm}^{-1}$ range around each data point, performed by the Savitsky–Golay algorithm [32]. Smoothing over narrower ranges resulted in deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence. The minima in the second derivative were used to determine the corresponding absorption band maxima.

2.6. Modeling of apoA-I amyloid fibrils

A detailed solenoid-like structure has been previously proposed to depict the structure of amyloid fibrils formed by apolipoprotein C-II (apoC-II). This β -strand–loop– β -strand structure, derived through multiple structural and biophysical methods and using MD simulations, suggests that parallel in-register β -sheets are formed along the axis of the fibril which is formulated by progressively stacked monomers [33]. Luo et al. [34] suggested that the G1, G2 and G3 11-mer repeats of apolipoproteins have been derived through triplication of an initial 11-mer segment. Therefore, it is obvious that all the G-block repeats of apolipoproteins exhibit an apparent sequence homology. Additionally, it has been suggested that the 22-mer repeats of apoA-I have derived through successive

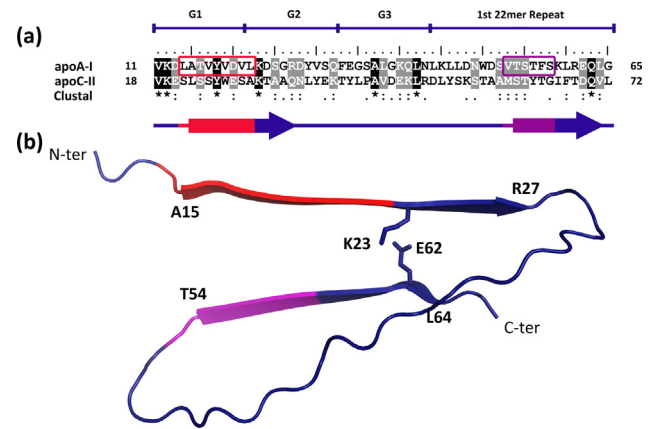


Fig. 2. (a) Sequence alignment of the apoA-I^{11–65} fragment containing the N-terminal 11-mer G1, G2, G3 repeats and the succeeding first 22-mer repeat of apoA-I with the relative G1, G2, G3 repeats and C-terminal remnant of apoC-II. The “aggregation-prone” peptides $^{14}\text{LATVYVDVL}^{22}$ and $^{53}\text{VTSTFS}^{58}$ are labeled with red and purple boxes, respectively. (b) Structural representation of the apoA-I^{11–65} modeled monomer. Residues K23 and E62 which are shown in sticks participate in the formation of intermolecular salt bonds between successive monomers. The “aggregation-prone” $^{14}\text{LATVYVDVL}^{22}$ and $^{53}\text{VTSTFS}^{58}$ peptides correspond to major parts of the facing β -strands extending between residues A15–R27 and T54–L64 of the monomer (shown in red and magenta, respectively). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

evolutionary duplication events of the primary 11 residue long C-terminal part of apoC-I which was initially duplicated forming the 22 residue long C-terminal fragment in apoC-II [35]. Based on the above, apoC-II^{18–72} evidently exhibits a high sequence homology with the G1, G2, G3 and first 22-mer repeat of apoA-I (Fig. 2a), a region encompassing residues 11–65 of apoA-I. The amino acid sequence of human apoA-I and apoC-II were extracted from Uniprot (Accession Nos. P02647 and P02655, respectively) [36]. Sequence alignment was performed for the sequence segments 11–65 and 18–72 of apoA-I and apoC-II, respectively, containing the proposed G1, G2 and G3 11-mer repeats along with the first 22-mer repetitive unit of both proteins (Fig. 2a) [35] using ClustalW [37]. Sequence threaded modeling was carried out utilizing Modeller9v12 [38], based on the aforementioned alignment and by using the proposed model structure of apoC-II as a template. As a result, a three-dimensional structure of the 11–65 region of apoA-I was constructed (Fig. 2b) (coordinates are available upon request). The derived model was minimized utilizing the MMTK toolkit [39], which is included in the Chimera molecular graphics system [40] and further evaluated using DSSP and the WHATIF package [41].

3. Results

All three N-terminal ($^{14}\text{LATVYVDVL}^{22}$, $^{53}\text{VTSTFS}^{58}$, $^{67}\text{VTQEFW}^{72}$) and the C-terminal ($^{227}\text{VSFLSA}^{232}$) peptide-analogues were found to self-assemble into mature amyloid-like fibrils, after an incubation period of 2 weeks. The fibrils were judged to be mature observing the samples for shorter and longer periods than 2 weeks. Amyloid-like fibrils derived by self-aggregation of peptides $^{14}\text{LATVYVDVL}^{22}$ and $^{67}\text{VTQEFW}^{72}$ appear as straight and unbranched uniform fibrils with an indeterminate length, presenting a small difference in width, since $^{14}\text{LATVYVDVL}^{22}$ fibrils have a larger diameter of approximately 100–120 \AA (Fig. 3a), whereas $^{67}\text{VTQEFW}^{72}$ are about 70–90 \AA in diameter (Fig. 3c), respectively. Comparably, self-polymerization of the $^{53}\text{VTSTFS}^{58}$ peptide and the C-terminal $^{227}\text{VSFLSA}^{232}$ peptide leads to the formation of protofibrils, which also appear straight and

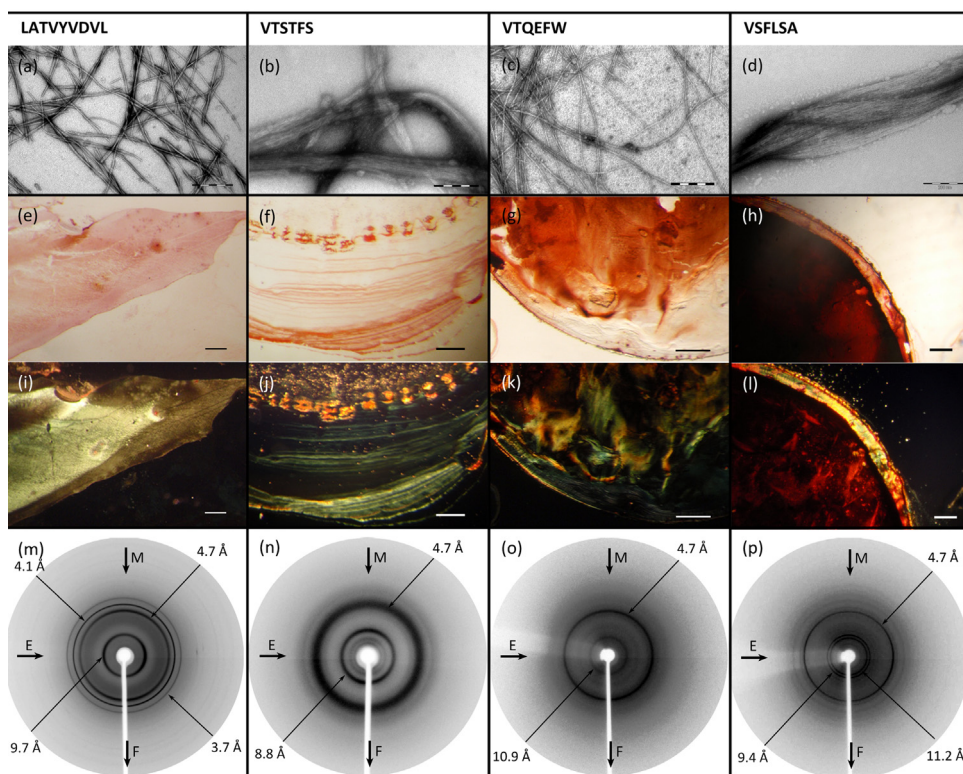


Fig. 3. Amyloidogenic properties of the 14 LATVYVDVL 22 , 53 VTSTFS 58 , 67 VTQEFW 72 and 227 VSFLSA 232 “aggregation-prone” peptides. (a–d) The peptide-analogues self-assemble forming straight and unbranched amyloid-like fibrils with an indeterminate length (Scale bars 200 nm). (e–h) Fibril-containing gels bind the Congo red dye as seen under bright field illumination (Scale bars 400 μ m). (i–l) An apparent apple/green birefringence, characteristic for amyloid deposits, is clearly seen under crossed polars (Scale bars 400 μ m). (m–p) X-ray fiber diffraction patterns exhibit the typical to a “cross- β ”-like architecture reflections, with a 4.7 Å repeat corresponding to the distance of hydrogen bonded β -strands aligned perpendicularly to the fiber axis and the 9.7, 8.8, 10.9 and 11.2 Å reflections representing the distance between the packed β -sheets that are aligned parallel to the same axis. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

unconnected, but they have smaller diameters, approximately 30–50 Å. Furthermore, they present a high tendency to coalesce in a lateral fashion, forming thick and variable in size ribbons of protofibrils (Fig. 3b, d).

Gels containing amyloid-like fibrils, derived by self-aggregation of all four peptide-analogues, were stained with the Congo red dye. Congo red has been shown to specifically bind on amyloid fibrils and produce a characteristic yellow/green birefringence, when viewed under crossed polars in a polarizing microscope. In all cases, deposits of amyloid-like fibrils of the peptide-analogues bind the Congo red dye, as seen under bright field illumination (Fig. 3e–h). Furthermore, the typical for amyloid yellow/green birefringence is evident when viewed under crossed polars (Fig. 3i–l).

X-ray diffraction experiments were performed on fibers containing amyloid-like fibrils, derived by self-assembly of each peptide-analogue. The X-ray patterns derived by fibers from each peptide indicate that amyloid fibrils formed by the peptide-analogues possess the typical “cross- β ”-like architecture of amyloid fibrils. A strong reflection is present in all cases, corresponding to a 4.7 Å structural repetition, attributed to the interstrand distance between successive hydrogen bonded β -strands that are aligned perpendicularly to the fibril axis (Fig. 3m–p). The relatively strong reflections, located at 9.7, 8.8, 10.9 and 11.2 Å, for peptides 14 LATVYVDVL 22 , 53 VTSTFS 58 , 67 VTQEFW 72 and 227 VSFLSA 232 , respectively, are attributed to the varying packing distance between consecutive β -sheets that are aligned parallel to the fiber axis (Fig. 3m–p). This observed variation is possibly explained by the fact that different side chains intervene between the packed β -sheets, in each case. The additional observed 3.7 and 4.1 Å reflections in the 14 LATVYVDVL 22 pattern (Fig. 3m) may be

attributed to the wax head of the capillary (Fig. S1) used to obtain an aligned fiber (see Section 2), whereas the 9.4 Å reflection observed in the 227 VSFLSA 232 pattern is most probably a second order of the 4.7 Å reflection. Reflections appear as rings due to poor alignment of the oriented fiber constituent fibrils.

Evidence supporting the X-ray fiber diffraction results were derived by ATR FT-IR spectroscopy studies. ATR FT-IR spectra indicate a predominant β -sheet secondary structure for amyloid fibrils derived by the “aggregation-prone” peptide analogues (Fig. 4a–d). Specifically, a dominant amide I β -sheet band at 1626, 1630, 1631 and 1626 cm^{-1} is seen for 14 LATVYVDVL 22 , 53 VTSTFS 58 , 67 VTQEFW 72 and 227 VSFLSA 232 peptides, respectively (Fig. 4). Additionally, a strong shoulder located at 1693, 1696, 1697 and 1696 cm^{-1} , respectively, may suggest that the β -sheets are in fact antiparallel (Table 1). The ATR FT-IR data regarding the 14 LATVYVDVL 22 and 53 VTSTFS 58 peptides are strongly correlated to the FT-IR data derived by studies of the 1–43 (containing the 14 LATVYVDVL 22 peptide) and 44–65 (containing the 53 VTSTFS 58 peptide) segments, recently reported by Adachi and coworkers [23]. However, FT-IR data derived from the same study indicated that the 66–83 segment of WT apoA-I (containing the 67 VTQEFW 72 peptide) does not lead to the formation of amyloid fibrils but instead retains an α -helical conformation [23].

4. Discussion

The experimental results presented in this work clearly indicate that the four segments of apoA-I identified by our algorithms AMYLPRED and AMYLPRED2, have an intrinsic high aggregation

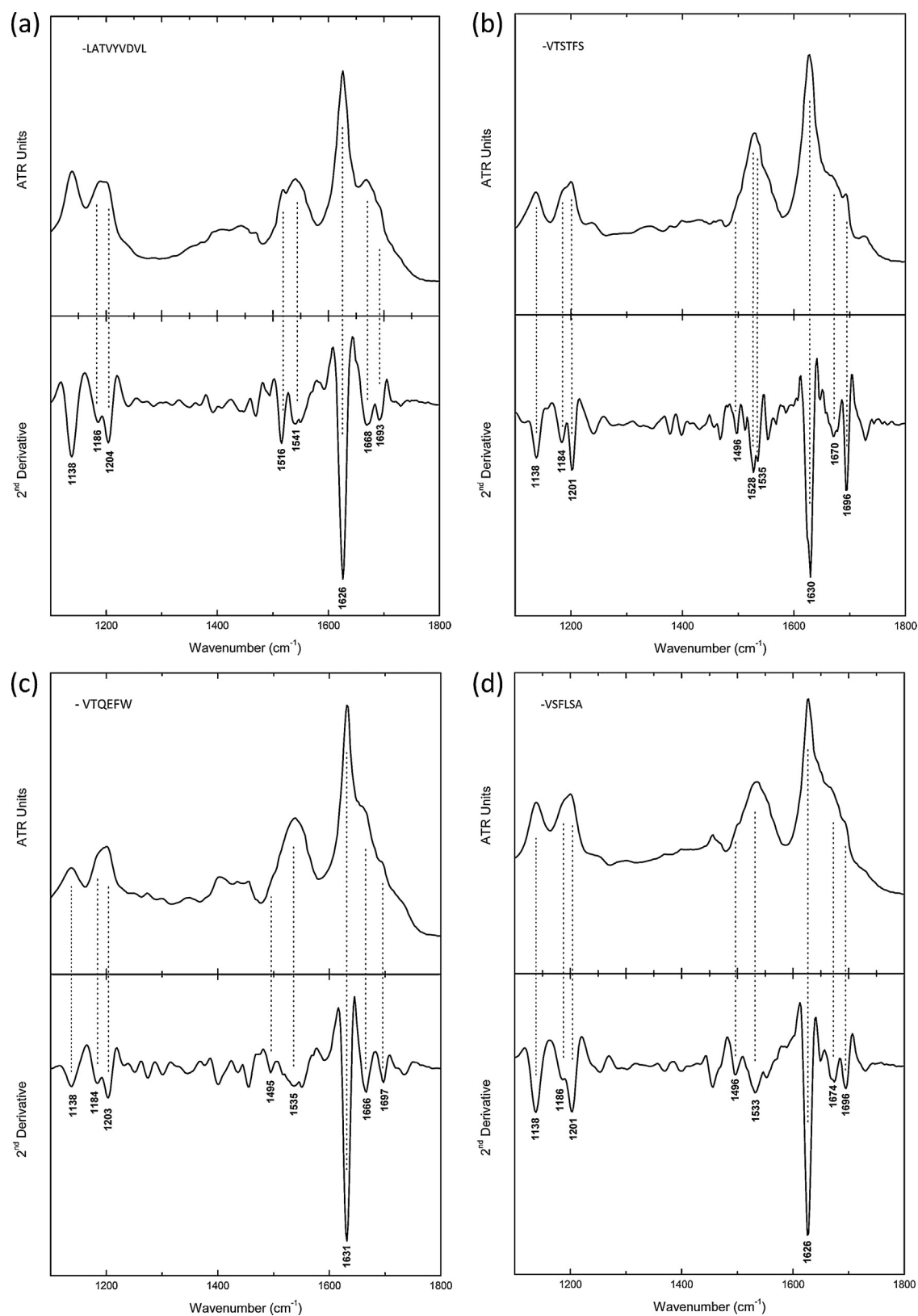


Fig. 4. ATR FT-IR (1100–1800 cm⁻¹) spectra obtained from thin hydrated-films containing amyloid-like fibrils. The thin hydrated-films, formed from fibril solutions of the peptides (a) ¹⁴LATVYVDVL²², (b) ⁵³VTSTFS⁵⁸, (c) ⁶⁷VTQEFW⁷² and (d) ²²⁷VSFLSA²³², respectively, were cast on flat stainless-steel plates coated with an ultra thin hydrophobic layer (see Section 2). Second derivative spectra are included and were used for the exact identification of the band maxima and their tentative assignments. All resulting spectra are indicative of the preponderance of an antiparallel β -sheet secondary structure (Table 1).

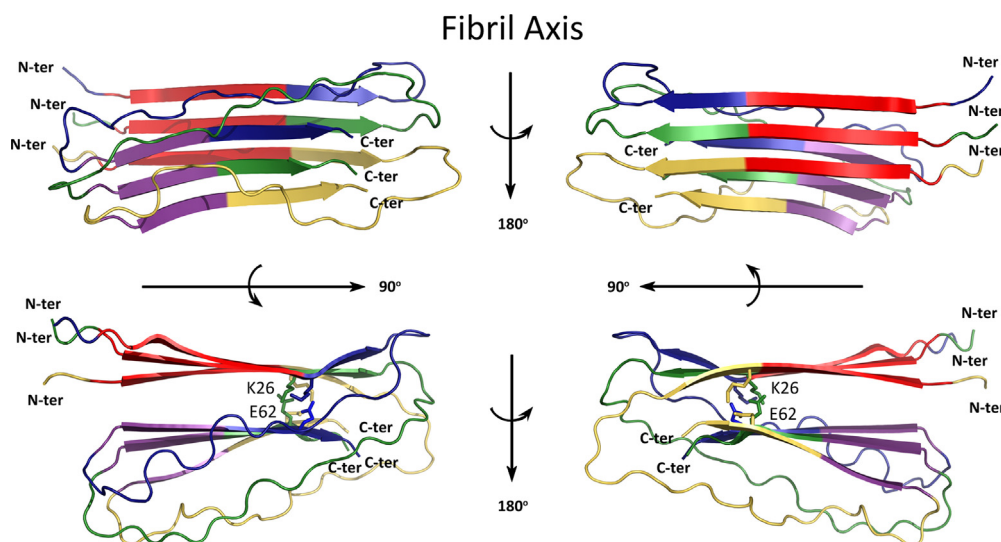


Fig. 5. A hypothetical mechanism of apoA-I amyloid fibril formation in familial apoA-I amyloidosis by the core 11–65 segment containing the “aggregation-prone” ¹⁴LATVYVDVL²² and ⁵³VTSTFS⁵⁸ peptides. Structural representation of the proposed model (for clarity, three successive monomers are shown in blue, green and yellow, respectively). apoA-I^{11–65} monomers stack along the fibril axis forming two facing β -sheets. Salt bonds formed between residues K23 of each monomer and E62 of the successive monomer further stabilize the overall structure. The “aggregation-prone” peptides ¹⁴LATVYVDVL²² (shown in red) and ⁵³VTSTFS⁵⁸ (shown in magenta) constitute the major part of the first and second β -strand of each monomer, respectively. Model co-ordinates are available upon request.

tendency, since they lead to the formation of fibrils presenting all basic characteristics of amyloid fibrils.

A possible polymerization model for the apoA-I^{1–93} N-terminal fragment and the full length protein was recently proposed [24]. This analysis was based on previous experimental data indicating that the three N-terminal “aggregation-prone” segments are somewhat protected within the lipid-free structure of apoA-I from self-polymerizing, due to interactions that stabilize the four- α -helix bundle fold [42]. Additionally, the ²²⁷VSFLSA²³² peptide is protected from polymerization, since it is located at the C-terminal end of the protein which is usually bound to lipids. However, when fragmented or found under acidic conditions, these amyloidogenic sequences are allowed to self-assemble leading either apoA-I^{1–93} or the native protein to the formation of amyloid fibrils. Our results support this assumption by indicating that all four peptide-analogues have the tendency to self-polymerize forming amyloid-like filaments.

Computational analysis of the secondary structure of apoA-I was performed utilizing the consensus algorithm SecStr [43] combining six individual secondary structure prediction methods, developed at our lab and NetCSSP which calculates contact-dependent secondary structure propensity [44]. Results indicate that the apoA-I sequence has an eminent propensity to form α -helices, however

Table 1

Bands observed in the ATR FT-IR spectra produced from hydrated films of all the “aggregation-prone” peptides, after self-assembly, and their tentative assignments (Fig. 4).

Bands (cm ⁻¹)				Assignment
LATVYVDVL	VTSTFS	VTQFEW	VSFLSA	
1138	1138	1138	1138	TFA
1186	1184	1184	1186	TFA
1204	1201	1203	1201	TFA
–	1496	1495	1496	Phe
1516	–	–	–	Tyr
1541	1528–1535	1535	1533	β -Sheet (amide II)
1626	1630	1631	1626	β -Sheet (amide I)
1668	1670	1666	1674	TFA
1693	1696	1697	1696	Antiparallel β -sheet

it also exhibits a smaller propensity to form interrupted β -strands along its full length (Figs. S2 and S3). Furthermore, as indicated by both algorithms, all four “aggregation-prone” stretches have a relatively strong β -structure prediction, implying that they may act as conformational switches. Corroborative evidence suggests that the N- and C-terminal ends of the protein have a higher propensity for a disordered conformation, especially when found within hydrophilic media and/or in the absence of lipid surfaces [25]. These disorder-prone flanking ends were proposed to have a higher propensity to develop a transition from an α -helical to an ordered β -structure, which is facilitated by the presence of specific hydrophobic sequence stretches. The N-terminal ¹⁴LATVYV¹⁹ and ⁵²VTSTFS⁵⁸ and the C-terminal ²²⁷VSFLSA²³³ segments were proposed as core elements of the flanking hydrophobic stretches, encompassing more or less three of the sequence segments of our study. These regions were proposed to lead to the formation of steric zippers, a notion that is supported by our results indicating that these chameleon segments self-assemble forming amyloid-like fibrils.

A three-dimensional model of the region encompassing residues 11–65 of apoA-I was derived utilizing the previously described model of apoC-II fibrils as template, assuming that the two proteins form similar fibrillar arrangements. The topology of the individual apoC-II monomers comprise a β -strand–loop– β -strand structure, with each monomer contributing two β -strands, one to each β -sheet of the fibril. The model derived by threading the apoA-I sequence onto that of apoC-II suggests that a significant part (11–65) of the amyloidogenic apoA-I^{1–93} fragment may contribute to the formation of a cross- β structure. The two β -strands face each other and are formed by residues 15–27 and 54–64 of the individual apoA-I^{11–65} monomers, respectively. Successively stacked monomers along the fibril axis lead to the formation of two facing β -sheets running parallel towards the same axis, as in the apoC-II model (Fig. 5). Stacking of consecutive apoA-I monomers may be stabilized by the formation of intermolecular salt bonds, formed between K23 of the first β -strand of each monomer and E62 located at the second β -strand of the next molecule (Fig. 5). Apart from stabilizing this complex structure, the formation of these salt bonds may also compensate for the buried charges of residues K23

and E62, in a similar manner to the model proposed for apoC-II [33]. Interestingly, two of the “aggregation-prone” peptides proposed by our study, ¹⁴LATVYVDVL²² and ⁵³VTSTFS⁵⁸ correspond to major parts of the facing β -strands formed by each monomer of apoA-I (Fig. 5, shown in red and purple, respectively). Consequently, it seems possible that the high aggregation propensity and conformational properties of these two segments may promote polymerization of the “aggregation-prone” apoA-I^{1–93} N-terminal fragment. Although this model provides some insight into how amyloid fibrils may be formed in familial apoA-I amyloidosis, it does not propose how amyloid fibrils are formed by the full length protein.

An alternative model was also recently proposed, based on FRET analysis, suggesting that the “aggregation-prone” 1–83 segment of apoA-I containing the point mutation G26R, forms amyloid protofibrils by folding in a relative β -strand-loop- β -strand arrangement [45]. The β -strands, which have an antiparallel direction in this case, are longer since they embrace 14–31 and 41–58 residues, respectively. However, similarly to our model, both the ¹⁴LATVYVDVL²² and ⁵³VTSTFS⁵⁸ peptides correspond to major parts of the facing β -strands. Additionally, as in our model, this β -hairpin is also proposed to be stabilized by the formation of a salt bridge, which is however formed by different residues, specifically between residues R26 and D48. Consequently, although the two models share both common characteristics and differences, the “aggregation-prone” ¹⁴LATVYVDVL²² and ⁵³VTSTFS⁵⁸ peptides apparently vitally contribute in the formation of apoA-I amyloid fibrils in both cases.

In conclusion, our work attempts to elucidate that the ¹⁴LATVYVDVL²², ⁵³VTSTFS⁵⁸, ⁶⁷VQEFW⁷² and ²²⁷VSFLSA²³² peptides are core segments with chameleon properties which may lead both apoA-I^{1–93} and full length apoA-I in the formation of amyloid deposits in familial amyloidosis and atherosclerosis, due to their intrinsic high propensity to self-aggregate. Furthermore, our computational studies indicate that the ¹⁴LATVYVDVL²², ⁵³VTSTFS⁵⁸ peptides may also vitally contribute to the formation of amyloid fibrils associated with familial apoA-I amyloidosis. Targeted therapies focused on inhibiting the aggregation potency of the aforementioned segments may help to efficiently prevent or decelerate deposition of apoA-I species both in hereditary or acquired forms of apoA-I amyloidoses.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We should like to thank Dr. Evangelia Chrysina for help with the X-ray experiments and the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation for allowing us to use the X-ray protein crystallography facility. The help of Dr. George Baltatzis and Prof. Efstratios Patsouris and the use of the Morgagni Microscope at the 1st Department of Pathology, Medical School, University of Athens are also gratefully acknowledged. The authors sincerely thank the Editor in Chief and the Managing Editor for properly handling this manuscript and the anonymous reviewers for their very useful and constructive criticism, which helped us to improve the manuscript. We also thank the University of Athens for support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.032>

References

- [1] M.N. Oda, R.O. Ryan, Apolipoprotein A-I structure, in: High-Density Lipoproteins, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 1–23.
- [2] D. Bashitovyy, M.K. Jones, G.M. Anantharamaiah, J.P. Segrest, J. Lipid Res. 52 (2011) 435–450.
- [3] V.I. Zannis, S.K. Karathanasis, H.T. Keutmann, G. Goldberger, J.L. Breslow, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 (1983) 2574–2578.
- [4] R.T. Nolte, D. Atkinson, Biophys. J. 63 (1992) 1221–1239.
- [5] J.P. Segrest, M.K. Jones, H. De Loof, C.G. Brouillette, Y.V. Venkatachalapathi, G.M. Anantharamaiah, J. Lipid Res. 33 (1992) 141–166.
- [6] J.P. Segrest, D.W. Garber, C.G. Brouillette, S.C. Harvey, G.M. Anantharamaiah, Adv. Protein Chem. 45 (1994) 303–369.
- [7] S. Lund-Katz, M.C. Phillips, Subcell. Biochem. 51 (2010) 183–227.
- [8] M.G. Sorci-Thomas, S. Bhat, M.J. Thomas, Clin. Lipidol. 4 (2009) 113–124.
- [9] J.F. Oram, J.W. Heinecke, Physiol. Rev. 85 (2005) 1343–1372.
- [10] O. Gursky, X. Mei, D. Atkinson, Biochemistry 51 (2012) 10–18.
- [11] S. Raimondi, F. Guglielmi, S. Giorgetti, S. Di Gaetano, A. Arciello, D.M. Monti, A. Relini, D. Nichino, S.M. Doglia, A. Natalello, P. Pucci, P. Mangione, L. Obici, G. Merlini, M. Stoppini, P. Robustelli, G.G. Tartaglia, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, R. Piccoli, V. Bellotti, J. Mol. Biol. 407 (2011) 465–476.
- [12] L. Obici, G. Franceschini, L. Calabresi, S. Giorgetti, M. Stoppini, G. Merlini, V. Bellotti, Amyloid 13 (2006) 191–205.
- [13] A. Andreola, V. Bellotti, S. Giorgetti, P. Mangione, L. Obici, M. Stoppini, J. Torres, E. Monzani, G. Merlini, M. Sunde, J. Biol. Chem. 278 (2003) 2444–2451.
- [14] P. Westermark, G. Mucchiano, T. Marthin, K.H. Johnson, K. Sletten, Am. J. Pathol. 147 (1995) 1186–1192.
- [15] Y.Q. Wong, K.J. Binger, G.J. Howlett, M.D. Griffin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2009) 1977–1982.
- [16] P.K. Teng, D. Eisenberg, Protein Eng. Des. Sel. 22 (2009) 531–536.
- [17] M. Lopez de la Paz, L. Serrano, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 87–92.
- [18] N.N. Louros, V.A. Iconomidou, P.L. Tsiolaki, E.D. Chrysina, G.E. Baltatzis, E.S. Patsouris, S.J. Hamodrakas, FEBS Lett. 588 (2013) 52–57.
- [19] V.A. Iconomidou, A. Leontis, A. Hoenger, S.J. Hamodrakas, FEBS Lett. 587 (2013) 569–574.
- [20] N.N. Louros, V.A. Iconomidou, P. Giannelou, S.J. Hamodrakas, PLOS ONE 8 (2013) e73258.
- [21] N.N. Louros, N. Petronikolou, T. Karamanos, P. Cordopatis, V.A. Iconomidou, S.J. Hamodrakas, Biopolymers 102 (2014) 427–436.
- [22] Y.Q. Wong, K.J. Binger, G.J. Howlett, M.D. Griffin, FEBS Lett. 586 (2012) 1754–1758.
- [23] E. Adachi, A. Kosaka, K. Tsuji, C. Mizuguchi, H. Kawashima, A. Shigenaga, K. Nagao, K. Akaji, A. Otaka, H. Saito, FEBS Lett. 588 (2014) 389–394.
- [24] M. Das, X. Mei, S. Jayaraman, D. Atkinson, O. Gursky, FEBS J. 281 (2014) 2525–2542.
- [25] P. Mendoza-Espinosa, D. Montalvan-Sorrosa, V. Garcia-Gonzalez, A. Moreno, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Mol. Cell. Biochem. 393 (2014) 99–109.
- [26] A. Trovato, F. Seno, S.C. Tosatto, Protein Eng. Des. Sel. 20 (2007) 521–523.
- [27] K.K. Frousios, V.A. Iconomidou, C.M. Karletidi, S.J. Hamodrakas, BMC Struct. Biol. 9 (2009) 44.
- [28] A.C. Tsois, N.C. Papandreou, V.A. Iconomidou, S.J. Hamodrakas, PLOS ONE 8 (2013) e54175.
- [29] G. Romhanyi, Virchows Arch. A: Pathol. Anat. Histopathol. 354 (1971) 209–222.
- [30] Oxford Diffraction, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England, 2009.
- [31] A.G.W. Leslie, H.R. Powell, Processing diffraction data with mosflm, in: R. Read, J.L. Sussman (Eds.), Evolving Methods for Macromolecular Crystallography, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007, pp. 41–51.
- [32] A. Savitsky, M.J.E. Golay, Anal. Chem. 36 (1964) 1627–1639.
- [33] C.L. Teoh, C.L. Pham, N. Todorova, A. Hung, C.N. Lincoln, E. Lees, Y.H. Lam, K.J. Binger, N.H. Thomson, S.E. Radford, T.A. Smith, S.A. Muller, A. Engel, M.D. Griffin, I. Yarovsky, P.R. Gooley, G.J. Howlett, J. Mol. Biol. 405 (2010) 1246–1266.
- [34] C.C. Luo, W.H. Li, M.N. Moore, L. Chan, J. Mol. Biol. 187 (1986) 325–340.
- [35] W.H. Li, M. Tanimura, C.C. Luo, S. Datta, L. Chan, J. Lipid Res. 29 (1988) 245–271.
- [36] R. Apweiler, A. Bairoch, C.H. Wu, W.C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M.J. Martin, D.A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, L.S. Yeh, Nucleic Acids Res. 32 (2004) D115–D119.
- [37] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673–4680.
- [38] N. Eswar, B. Webb, M.A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, D. Eramian, M.Y. Shen, U. Pieper, A. Sali, Curr. Protoc. Bioinform. 5 (2006), Unit 5.6.
- [39] K. Hinsen, J. Comput. Chem. 21 (2000) 79–85.
- [40] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612.
- [41] G. Vriend, J. Mol. Graph. 8 (1990) 52–56, 29.
- [42] P. Sevugan Chetty, L. Mayne, Z.Y. Kan, S. Lund-Katz, S.W. Englander, M.C. Phillips, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 11687–11692.
- [43] S.J. Hamodrakas, Comput. Appl. Biosci. 4 (1988) 473–477.

- [44] C. Kim, J. Choi, S.J. Lee, W.J. Welsh, S. Yoon, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) W469–W473.
- [45] M. Girysh, G. Gorbenco, V. Trusova, E. Adachi, C. Mizuguchi, K. Nagao, H. Kawashima, K. Akaji, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, H. Saito, *J. Struct. Biol.* 185 (2014) 116–124.
- [46] X. Mei, D. Atkinson, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38570–38582.
- [47] D.W. Borhani, D.P. Rogers, J.A. Engler, C.G. Brouillette, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 12291–12296.
- [48] J.P. Segrest, M.K. Jones, B. Shao, J.W. Heinecke, *Biochemistry* 53 (2014) 7625–7640.



The pentapeptide LQVVR plays a pivotal role in human cystatin C fibrillization



Paraskevi L. Tsiolaki, Stavros J. Hamodrakas, Vassiliki A. Iconomidou *

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2014
Revised 10 November 2014
Accepted 19 November 2014
Available online 3 December 2014

Edited by Jesus Avila

Keywords:

Human cystatin C
Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy
Alzheimer's disease
3D-domain swapping
'Aggregation-prone' pentapeptide LQVVR
Amyloid fibrils

ABSTRACT

Human cystatin C (HCC) is a low molecular weight member of the cystatin family (type2). HCC consists of 120 amino acids. Normally it is an inhibitor of cysteine proteases, but in pathological conditions it forms amyloid fibrils in brain arteries of young adults. An 'aggregation-prone' pentapeptide (⁴⁷LQVVR⁵¹) was located within the HCC sequence using AmylPred, an 'aggregation-prone' peptide prediction algorithm developed in our lab. This peptide was synthesized and self-assembled into amyloid-like fibrils in vitro, as electron microscopy, X-ray fiber diffraction, Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Spectroscopy and Congo red staining studies reveal. Thus, the ⁴⁷LQVVR⁵¹ peptide seems to have an important role in HCC fibrillization.

© 2014 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

1. Introduction

Human cystatins are proteins that have the capacity to regulate normal body processes and usually their down-regulation causes several diseases [1]. The first cystatin sequence determined was that for a protein isolated from human urine, which was first called γ -trace due to its electrophoretic mobility and it was later renamed cystatin C [2]. Cystatins form a single chain 'superfamily' of reversible inhibitors of cysteine proteases of the papain-like (C1) and legumain-related (C13) families, which consists of three major types, with proteins homologous in sequence [3]. These groups, based on molecular organization, have different distributions in an organism. It is obvious that evolutionary pressure has created different branches of cystatins by duplication events far back in time. Today, we know that cystatins are present in many kinds of eukaryotic organisms such as mammals, birds, fish, insects, plants and some protozoa [4]. The basic structural fold of monomeric representatives of the cystatin superfamily has been defined by the crystal structure of chicken cystatin [5].

Human cystatin C (HCC) is a low molecular weight protein which belongs to the cystatin family [6]. HCC, expressed in all nucleated human cells, is a secretory type 2 cystatin, and it has, predominantly, extracellular functions. It is widely used as an endogenous marker of several illnesses since its presence in all types of cells seems to be independent of age, sex and muscle mass. It is found in all tissues and body fluids [4] and it is present at particularly high concentrations in cerebrospinal fluid [2,6]. It consists of a polypeptide chain of 120 amino acid residues [3] and its canonical structural features include a long alpha helix (α 1 helix) running across a large, five-stranded antiparallel beta-sheet (Fig. 1). Recently, a monomer-stabilized HCC with an engineered disulfide bond [(L47C)–(G69C)] has been created by Koladziejczyk et al. [5]. Three regions are implicated in its interaction with the enzyme papain family: The N-terminal segment and the two hairpin loops L1 and L2, constitute a structural epitope, which shows high affinity and binds to the enzyme [7] (Fig. 1).

HCC is co-deposited in the amyloid plaques of Alzheimer's disease and Down's syndrome [8] and it is also involved in tissue-degenerative diseases such as osteoporosis and periodontitis [9]. In pathological processes, it forms amyloid deposits in brain arteries of young adults, which lead to fatal cerebral hemorrhage. In advanced age, under denaturing conditions the protein oligomerization leads to amyloid deposits in the leptomeninges, cerebral cortex and brainstem [10]. These amyloid fibrils are composed of a mutated and truncated variant of cystatin C that eventually

Abbreviations: HCC, human cystatin C; HCCAA, Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy; ATR FT-IR Spectroscopy, Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Spectroscopy

* Corresponding author. Fax: +30 210 7274254.

E-mail address: veconom@biol.uoa.gr (V.A. Iconomidou).

accumulates to cause hemorrhage and death. The corresponding amyloidosis is called Hereditary Cystatin C Cerebral Amyloid Angiopathy (Icelandic Cerebral Angiopathy) and it seems to be the first familial type of amyloidosis related to a point mutation in a gene coding for an inhibitor [11–13]. This angiopathy is an autosomal dominant disorder found in members of 8 different families originating from one specific geographical area in Iceland [14,15].

Three crucial events turn the wild type protein into a pathological form. First, a point mutation (A → T) at codon 68 of cystatin C gene (located on chromosome 20) converts a leucine to glutamine (L68Q), leading to an amino acid substitution. Leucine 68 is located at the C-terminal end of strand β 3 and its side-chain participates in the hydrophobic core that stabilizes the protein, between the α -helix and the five-stranded β -sheet [16] (Fig. 1). In the case of the mutant L68Q, the amino acid substitution affects greatly the stability of the molecule, because the long polar side chain of glutamine cannot be accommodated into the hydrophobic core of HCC (Figs. 1 and S1). Secondly, human amyloid deposits have an N-terminal truncation possibly because of the disintegration of the leucocytes, normally present in the cerebrospinal fluid. Proteolytic enzymes take action and remove the first 10 amino acids residues of the native sequence of HCC [14,17]. Finally, replacement of the hydrophobic Leu68 promotes unfolding through the L1 loop with a specific mechanism named 3D-domain swapping [18] (Supplementary Fig. S1). From the time of its definition it has been observed in different proteins; among them in the amyloidogenic proteins prion and β 2-microglobulin [19,20].

In the case of cystatin C, the L1 loop is the segment of the protein, which connects the swapped domain to the rest of the protein and actually the one segment which changes its conformation between the monomer and the oligomer. Two identical monomers exchange equivalent structural components and form a closed interface, which is identical in the monomer and dimer, with the exception that in the oligomer two separate polypeptide chains contribute to the interaction [19] (Supplementary Fig. S1). This mechanism for protein homo-oligomerization may be involved in the fibrillogenesis in the case of angiopathy [17].

Amyloids are formed under protein-denaturing conditions or as a result of mutations, as in HCC. The conversion of amyloidogenic proteins from their soluble forms into fibrillar aggregates is associated with a wide range of pathological conditions [21–24]. As research continues for the understanding of the mechanisms involved in amyloid formation, the development of prediction methods is an important complement to experimental approaches [23]. Detailed theoretical and experimental evidence has repeatedly indicated that amyloid formation is mediated by specific short sequence regions/stretches of a polypeptide chain that have a higher aggregation propensity and therefore vitally contribute to its aggregation tendency [25–27]. In this work, we determined a novel aggregation-potent segment of HCC, 47 LQVVR 51 , which was initially predicted as such, by implementing AMYLPRED, our aggregation propensity prediction algorithm [28]. This ‘aggregation-prone’ peptide segment was synthesized (see Section 2) and here we present experimental results, verifying its strong aggregation propensity to form amyloid fibrils. Also, we discuss our findings, implicating LQVVR as one of the main driving forces in HCC fibril formation, providing a novel target for HCC amyloidosis prevention/prohibition.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis and formation of amyloid-like fibrils

The LQVVR peptide-analogue, part of the 2nd beta-strand of cystatin C (Fig. 1) was synthesized by GeneCust Europe, Luxembourg

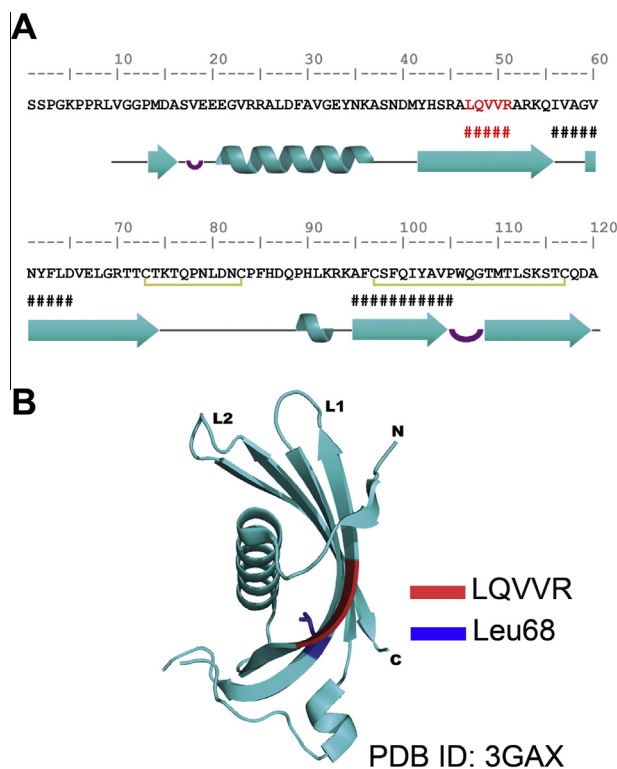


Fig. 1. Amino acid sequence and native structure of human cystatin C. (A) The polypeptide sequence normally consists of 120 amino acid residues [3]. In the case of Cerebral Amyloid Angiopathy, proteolytic enzymes, which are present in the cerebrospinal fluid, remove the first 10 amino acids, at the N-terminal of the native sequence [14,17]. Predicted ‘aggregation-prone’ segments by AMYLPRED [28], are shown in red (47 LQVVR 51) and bold (56 IVAGVNYFLD 65 and 95 AFCSQIYAVP 105), respectively, and are marked with “#” under the sequence. Dark yellow lines point out existing disulfide bonds. (B) A monomer-stabilized human cystatin C with an engineered disulfide bond (see Section 1) is shown (PDB ID: 3GAX) [5], based on the crystal structure of chicken cystatin [7]. L1 and L2 hairpin loops and the N-terminal segment, indicate the structural epitope of the protein, capable of binding to cysteine proteases. Colored regions in red and dark blue, illustrate the 47 LQVVR 51 ‘aggregation-prone’ segment and Leucine 68, respectively.

(98% pure, free N- and C-terminals). The synthesized LQVVR peptide was dissolved in distilled water (pH 5.5), at a concentration of 10 mg/ml to produce mature amyloid-like fibrils after 1–2 weeks incubation. Oriented fibers, suitable for X-ray diffraction, were obtained from suspensions of LQVVR mature amyloid-like fibrils, as described below.

2.2. X-ray diffraction

A droplet (~10 μ l) of mature fibril suspension was placed between two siliconized glass rods, spaced ~1.5 mm apart and mounted horizontally on a glass substrate, as collinearly as possible. The droplet was allowed to dry slowly at ambient temperature and humidity for 1 h to form an oriented fiber, suitable for X-ray diffraction. X-ray diffraction patterns were recorded on a Mar Research 345 mm image plate, utilizing CuK α radiation (λ = 1.5418 Å), obtained from a Rigaku MicroMax-007 HF, microfocus rotating anode generator (with Osmic Rigaku VariMaxTM HF optics), operated at 40 kV, 20 mA. The specimen-to-film distance was set at 150 mm and the exposure time was 30 min. No additional low angle reflections were observed at longer specimen-to-film distances, up to 300 mm. The X-ray patterns, initially viewed using the program MarView (MAR Research, Hamburg, Germany), were displayed and measured with the aid of the program IPDISP of the CCP4 package [29].

2.3. Negative staining

For negative staining, LQVVR peptide mature fibril suspensions were applied to glow-discharged 400-mesh carbon-coated copper grids for 60 s. The grids were (occasionally) flash-washed with $\sim 150 \mu\text{l}$ of distilled water and stained with a drop of 1% (w/v) aqueous uranyl acetate for 45 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper and the grids were air-dried. They were examined in a Philips CM120 BioTWIN transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands) operated at 100 kV. Photographs were obtained with a bottom-mounted Keen View 1K CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.4. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR FT-IR) and post-run computations of the spectra

A 10- μl drop of the HCC-analogue, LQVVR, mature fibril suspension was cast on a front-coated Au mirror and left to dry slowly at ambient conditions to form a thin film. Infrared spectra were obtained from these films at a resolution of 4 cm^{-1} , utilizing an IR microscope (IRScope II by Bruker Optics) equipped with a Ge attenuated total reflectance (ATR) objective lens ($20\times$) and attached to a Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer (Equinox 55, by Bruker Optics). Internal reflection spectroscopy has several advantages compared with the more common KBr dispersion technique [30]. The choice of ATR was dictated by the need to exclude any possible spectroscopic and chemical interactions between the sample and the dispersing medium. Having a penetration depth ca. 1–2 μm (1000 cm^{-1} , Ge), ATR is free of saturation effects, which may be present in the transmission spectra of thicker samples. Moreover, the use of a microscope facilitates the acquisition of data from small samples. Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the S/N ratio. The spectra are shown in the absorption mode after correction for the wavelength dependence of the penetration depth ($pd \sim \lambda$). Absorption band maxima were determined from the minima in the second derivative of the corresponding spectra. Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software and included smoothing by the Savitzky–Golay algorithm [31] over a $\pm 8 \text{ cm}^{-1}$ range, around each data point. Smoothing over narrower ranges resulted in a deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence.

2.5. Congo red staining and polarized light microscopy

HCC mature fibril suspensions were applied to glass slides and stained with a 10 mM Congo Red (Sigma) solution in PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) for approximately 30 min. Then, they were washed several times with 90% ethanol and left to dry approximately for 10 min. The samples were observed under bright field illumination and between cross polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope, equipped with a JVC GC-X3E camera.

2.6. Crystallization experiments and polarized light microscopy

Quantities of freshly made LQVVR peptide solutions in distilled water (concentrations 5–10 mg/ml, pH 5.5) were tested in crystallization experiments, using the “hanging-drop” method [32], for the possible formation of crystals. The precipitant was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (concentration varied from 1.0 to 2.0 M). The samples were observed, both under bright field illumination and between crossed polars, respectively, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope (please, see [Supplementary Data](#)).

2.7. Structural models

The HCC models were built from PDB files 3GAX, 1R4C and 1G96 [33]. The software PyMol [34] was used to visualize and manipulate the models.

3. Results

Electron micrographs of LQVVR peptide fibrils show protofilaments, which are straight, unbranched and coalesce laterally among each other to form ribbons (or tapes). The protofilaments have a diameter of approximately $\sim 30 \text{ \AA}$ (Fig. 2). Congo red stained LQVVR peptide fibrils showed the red–green birefringence characteristic of amyloid fibrils, when viewed under crossed polars (Fig. 3). Additionally, X-ray diffraction patterns from fibers formed from LQVVR peptide fibrils showed two strong reflections at 4.62 \AA and 11.63 \AA (Fig. 4). These reflections appear as rings due to the poor alignment of the constituent fibrils. This is probably due to random packing of the fibers in the gels which adopt all possible orientations as confirmed by electron microscopy. The strong reflection at 4.62 \AA suggests that β -sheets are present and it is attributed to inter-strand distances. The weaker reflection at 11.63 \AA most probably corresponds to the inter-sheet packing distances. These two reflections clearly indicate the existence of β -sheets and are characteristic of the cross- β conformation observed for several amyloid-like fibrils (Fig. 4), not oriented, however, in this case. The ATR FT-IR spectrum (Fig. 5) shows a prominent band at 1634 cm^{-1} in the amide I region, which is a band clearly due to β -sheet conformation and the shoulder at 1697 cm^{-1} is an indication that the β -sheets are antiparallel [35–39]. Thus, this spectrum supports the presence of antiparallel β -sheets in the structure of the LQVVR peptide fibrils, apparently in agreement with the existence of β -sheet structure suggested by X-ray diffraction and Congo red binding data (Table 1).

4. Discussion

Our experimental work clearly shows that fibrils formed from LQVVR peptide solutions fulfill all three basic criteria of amyloid fibrils: they are straight and unbranched, they bind the dye Congo Red exhibiting the characteristic for amyloids ‘red-apple/green’ birefringence, and oriented fibers made-up of them give characteristic ‘cross- β ’ – like X-ray diffraction patterns [24].

Several fibrillogenesis pathways of peptides or proteins have been proposed during the last two decades and many concepts have been described for the in vitro or in vivo formation of amyloid

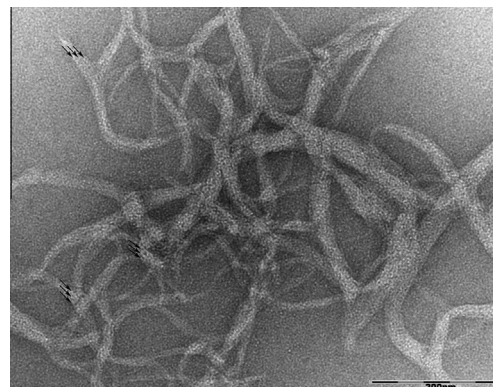


Fig. 2. Transmission electron microscopy images of negatively stained LQVVR amyloid-like fibrils, forming ribbons (see Section 3). Individual fibrils are indicated with multiple black arrows (ca. 30–40 \AA in diameter). Bar is 200 nm.

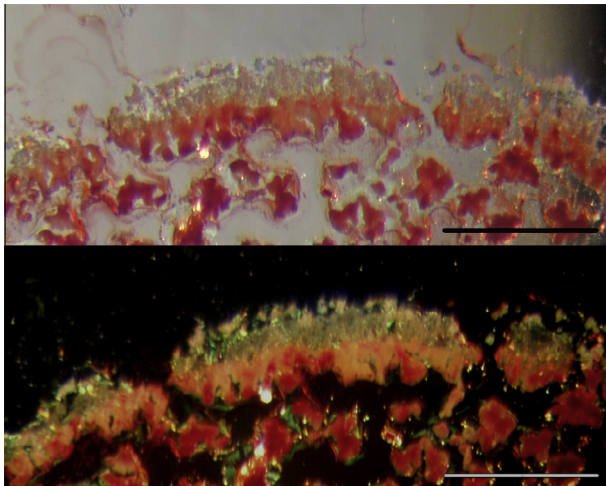


Fig. 3. A 10 mg/ml solution of the LQVVR peptide was incubated in distilled water (at ambient temperatures, pH 5.5), for approximately 10 days to produce mature amyloid-like fibrils and then it was stained with Congo Red. Mature amyloid-like fibrils appear red under bright field illumination and exhibit a strong green-apple birefringence under crossed polars. Bar is 500 μm .

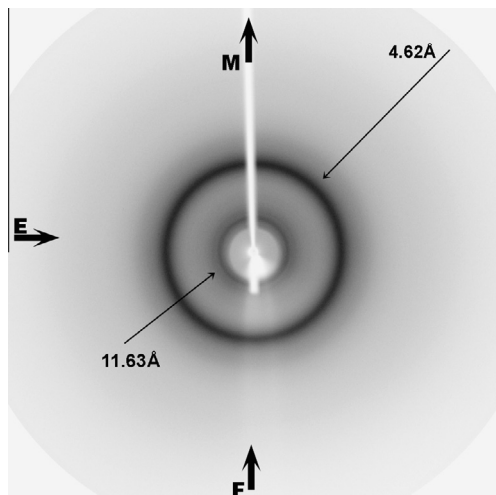


Fig. 4. X-ray diffraction pattern from aligned LQVVR peptide mature amyloid-like fibrils. Reflections with spacings of 4.62 Å and 11.63 Å, respectively, are indicated with arrows. Diffraction patterns were acquired using a Rigaku MicroMax-007 microfocus rotating anode generator (with Osmic Rigaku VariMax™ HF optics), operated at 40 kV, 20 mA.

protofilaments and fibrils [40–43]. Supramolecular spherical structures, known as spherulites were formed after 1 day incubation of LQVVR under a wide variety of conditions (Supplementary Fig. S2). As we have proposed in 2004 [44] the first main step of amyloid-like fibrillogenesis is the formation of a nuclei of liquid crystalline nature, in several cases. Spherulites were observed in a polarizing microscope under crossed polars with characteristic ‘maltese crosses’ [45,46]. In a similar fashion we might assume that these liquid crystalline intermediates of LQVVR were transformed into amyloid-like fibrils (Supplementary Fig. S2). Electron micrographs of mature fibrils, obtained from solutions of the LQVVR peptide, after 1–2 weeks incubation, show protofilaments associated laterally to form multistranded ribbons (or tapes). The protofilaments have a thickness of approximately 30 Å, almost at the resolution limit of the electron microscope (Fig. 2).

The propensity of the wild type (wt) HCC and of the mutated form L68Q to form fibrils in vitro were tested by Wahlbom et al.

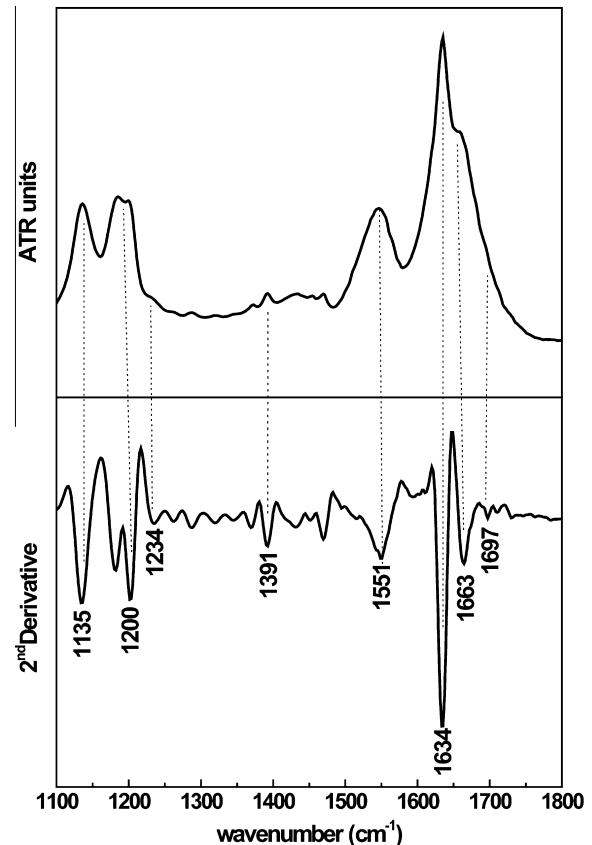


Fig. 5. ATR FT-IR (1100–1800 cm^{-1}) spectrum of LQVVR peptide mature amyloid fibrils, cast on a flat stainless-steel plate and left to air-dry slowly, at ambient conditions, to form a hydrated, thin film. A second derivative spectrum is also included.

Table 1

Bands observed in the ATR FT-IR (1500–1800 cm^{-1}) spectrum produced from a hydrated film of the ‘aggregation-prone’ pentapeptide, LQVVR, after self-assembly, and their tentative assignments (Fig. 5).

Band (cm^{-1})	Assignment
1135	TFA
1200	TFA
1234	Amide III (β -sheet)
1391	
1551	Amide II (β -sheet)
1634	Amide I (β -sheet)
1663	TFA
1697	Amide I (antiparallel β -sheet)

[47]. The wt protein forms long, twisted fibrils with a diameter of 100–120 Å, at pH 4, whereas the mutated protein forms fibrils with the same appearance to those of the wt protein, but with a higher tendency for lateral attachment.

Amyloid aggregation is actually driven by short fragments of misfolded proteins (“amyloid stretch hypothesis”) [25–27]. Short amyloidogenic stretches of five or six amino acid residues provide the potential to ‘guide’ amyloid fibril formation from a soluble globular domain. Therefore, several algorithms have been published during the last decade or so, which attempt to predict such ‘aggregation-prone’ stretches based on various properties of peptide chains. A relatively recent review of available software is given in Ref. [23]. Utilizing our consensus prediction algorithm of ‘aggregation-prone’ segments AMYLPRED [28], three (3) peptides of HCC were predicted as ‘aggregation-prone’ segments: The

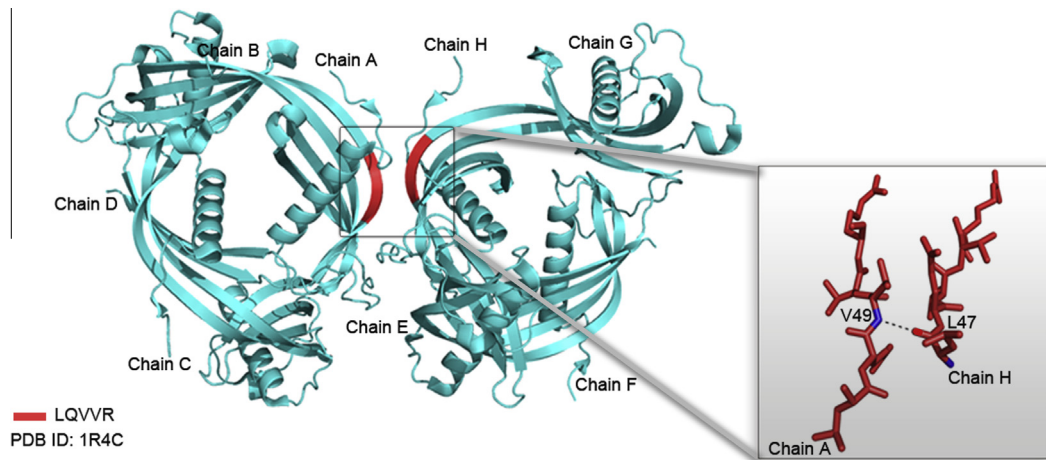


Fig. 6. Crystal structure of the domain swapped octamer of N-truncated HCC (PDB ID: 1R4C). Two tetramers interact together via two LQVVR pentapeptides (in red) to form an octamer. Red sticks represent the atomic structure of the LQVVR peptide, both backbone and side chains. A dashed line connects the main chain carbonyl O atom (bright red) of Leu 47 (chain H) and the main chain N atom (blue) of Val49 (chain A), indicating a possible hydrogen bond between the two donut shaped tetramers.

pentapeptide $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ and the peptides $^{56}\text{IVAGVNYFPLD}^{65}$ and $^{95}\text{AFCSFQIYAVP}^{105}$ (Fig. 1). All three peptides were synthesized and the LQVVR peptide was shown conclusively to have amyloidogenic properties (see Section 3), whereas for the other two peptides work is in progress to determine their amyloidogenic properties (*data in preparation*).

Amyloid deposits of patients in cerebrospinal fluid contain HCC, shortened by ten amino acid residues at the N-terminal segment because of disintegration of proteolytic leucocyte enzymes, which are normally present in this fluid [17]. Janowski et al. [17] managed to crystallize this N-truncated form of HCC and solve its crystal structure (PDB ID 1R4C). They discovered that this form of HCC forms domain swapped dimers of HCC (Supplementary Fig. S1), which in turn form tetramers and the tetramers in turn associate to form octamers (Fig. 6). It was very interesting to note that tetramers interact via the highly amyloidogenic LQVVR peptide to form octamers (Fig. 6). It is noteworthy that the ‘aggregation-prone’ peptide LQVVR lies exposed on the surface of the tetramers and promotes their interaction for the formation of octamers, as has been suggested by Frousios et al. [28]. At the same time, our results indeed support the idea that protein–protein interaction surfaces and ‘aggregation-prone’ segments overlap in the homooligomeric form of proteins [46], since LQVVR is both a peptide with high aggregation propensity and a crystal contact [48].

In analogy to the model proposed by Staniforth et al. [49], based on the amyloidogenic properties of the peptide LQVVR and on the packing observed in the crystal structure 1R4C [17], we propose the model shown in Supplementary Fig. S3 as a plausible model of the amyloid fibrils formed by HCC. These fibrils have a diameter ca. 90–100 Å.

In this respect, it is interesting to note that, recent studies created a stabilized monomer of HCC using an engineered disulfide bond (L47C)–(G69C) between the structural elements that become separated upon domain swapping. Apart from the two well-conserved disulfide bridges of HCC which support the folding of the monomer, crystallographers created a brand new monomer-stabilizing disulfide bridge. They found that it is possible to inhibit dimerization, further oligomerization and finally amyloid formation of HCC by site-directed mutagenesis of its sequence. One of the mutant amino acids was Leu47 which is part of $^{47}\text{LQVVR}^{51}$ [5].

For Icelandic Cerebral Angiopathy treatment, remedies/drugs designed to prevent aggregation of the LQVVR peptide, may prove to be of paramount importance in future work, following the example of recent impressive studies on transthyretin amyloidosis [50].

Notes

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

We thank the University of Athens for support. We should also like to thank EMBL, Heidelberg for hospitality and Mr. Peter Everitt for excellent technical assistance. We would also like to thank the editor of this manuscript for properly handling it and the anonymous reviewers for their useful and constructive criticism.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.041>.

References

- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M. and Nathanson, C.M. (2003) Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.*, 179–199.
- Grubb, A. and Lofberg, H. (1982) Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3024–3027.
- Grubb, A.O. (2000) Cystatin C-properties and use as diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem.* 35, 63–99.
- Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G. and Grubb, A. (1986) Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J. Biol. Chem.* 261, 11282–11289.
- Kolodziejczyk, R., Michalska, K., Hernandez-Santoyo, A., Wahlbom, M., Grubb, A. and Jaskolski, M. (2010) Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J.* 277, 1726–1737.
- Abrahamson, M., Grubb, A., Olafsson, I. and Lundwall, A. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett.* 216, 229–233.
- Bode, W. et al. (1988) The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* 7, 2593–2599.
- Zerovnik, E. (2009) The emerging role of cystatins in Alzheimer's disease. *BioEssays* 31, 597–599.
- Johansson, L., Grubb, A., Abrahamson, M., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Grzonka, Z. and Lerner, U.H. (2000) A peptidyl derivative structurally based on the inhibitory center of cystatin C inhibits bone resorption in vitro. *Bone* 26, 451–459.
- Revesz, T., Holton, J.L., Lashley, T., Plant, G., Frangione, B., Rostagno, A. and Ghiso, J. (2009) Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol.* 118, 115–130.
- Ghiso, J., Pons-Estel, B. and Frangione, B. (1986) Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin

- C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 548–554.
- [12] Ghiso, J., Jenson, O. and Frangione, B. (1986) Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2974–2978.
- [13] Yamada, M. (2000) Cerebral amyloid angiopathy: an overview. *Neuropathology* 20, 8–22.
- [14] Asgeirsson, B., Haebel, S., Thorsteinsson, L., Helgason, E., Gudmundsson, K.O., Gudmundsson, G. and Roepstorff, P. (1998) Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: monitoring the presence of the Leu-68 → Gln cystatin C variant in cerebrospinal fluids and monocyte cultures by MS. *Biochem. J.* 329 (Pt 3), 497–503.
- [15] Olafsson, I. and Grubb, A. (2000) Hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Amyloid* 7, 70–79.
- [16] Rostagno, A., Holton, J.L., Lashley, T., Revesz, T. and Ghiso, J. (2010) Cerebral amyloidosis: amyloid subunits, mutants and phenotypes. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 581–600.
- [17] Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A. and Jaskolski, M. (2004) Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *J. Mol. Biol.* 341, 151–160.
- [18] Liu, Y. and Eisenberg, D. (2002) 3D domain swapping: as domains continue to swap. *Protein Sci.* 11, 1285–1299.
- [19] Nelson, R. and Eisenberg, D. (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 260–265.
- [20] Nelson, R. and Eisenberg, D. (2006) Structural models of amyloid-like fibrils. *Adv. Protein Chem.* 73, 235–282.
- [21] Kelly, J.W. (1996) Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 11–17.
- [22] Zerovnik, E. (2002) Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur. J. Biochem.* 269, 3362–3371.
- [23] Hamodrakas, S.J. (2011) Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies. *FEBS J.* 278, 2428–2435.
- [24] Sunde, M. and Blake, C.C. (1998) From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Q. Rev. Biophys.* 31, 1–39.
- [25] Lopez de la Paz, M. and Serrano, L. (2004) Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 87–92.
- [26] Esteras-Chopo, A., Serrano, L. and Lopez de la Paz, M. (2005) The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16672–16677.
- [27] Teng, P.K. and Eisenberg, D. (2009) Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 531–536.
- [28] Frousios, K.K., Iconomidou, V.A., Karletidi, C.M. and Hamodrakas, S.J. (2009) Amyloidogenic determinants are usually not buried. *BMC Struct. Biol.* 9, 44.
- [29] Winn, M.D. et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242.
- [30] de Jongh, H.H., Goormaghtigh, E. and Ruyschaert, J.M. (1996) The different molar absorptivities of the secondary structure types in the amide I region: an attenuated total reflection infrared study on globular proteins. *Anal. Biochem.* 242, 95–103.
- [31] Savitsky, A. and Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.
- [32] Blundell, T.L. and Johnson, L.N. (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, London-New York-San Francisco.
- [33] Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- [34] Delano, W.L. (2005) *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific LLC.
- [35] Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. and Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389–394.
- [36] Jackson, M. and Mantsch, H.H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120.
- [37] Haris, P.I. and Chapman, D. (1995) The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 37, 251–263.
- [38] Krimm, S. and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38, 181–364.
- [39] Valenti, L.E., Paci, M.B., De Pauli, C.P. and Giacomelli, C.E. (2011) Infrared study of trifluoroacetic acid unpurified synthetic peptides in aqueous solution: trifluoroacetic acid removal and band assignment. *Anal. Biochem.* 410, 118–123.
- [40] Rochet, J.C. and Lansbury Jr., P.T. (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 60–68.
- [41] Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. and Dobson, C.M. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofibrils and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3590–3594.
- [42] Kelly, J.W. (2000) Mechanisms of amyloidogenesis. *Nat. Struct. Biol.* 7, 824–826.
- [43] Chiti, F. and Dobson, C.M. (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* 5, 15–22.
- [44] Hamodrakas, S.J., Hoenger, A. and Iconomidou, V.A. (2004) Amyloid fibrillogenesis of silkworm chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase. *J. Struct. Biol.* 145, 226–235.
- [45] Shtukenberg, A.G., Punin, Y.O., Gunn, E. and Kahr, B. (2012) Spherulites. *Chem. Rev.* 112, 1805–1838.
- [46] Castillo, V. and Ventura, S. (2009) Amyloidogenic regions and interaction surfaces overlap in globular proteins related to conformational diseases. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000476.
- [47] Wahlbom, M., Wang, X., Lindstrom, V., Carlemalm, E., Jaskolski, M. and Grubb, A. (2007) Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping. *J. Biol. Chem.* 282, 18318–18326.
- [48] Janin, J. (1997) Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nat. Struct. Biol.* 4, 973–974.
- [49] Staniforth, R.A., Giannini, S., Higgins, L.D., Conroy, M.J., Hounslow, A.M., Jerala, R., Craven, C.J. and Waltho, J.P. (2001) Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *EMBO J.* 20, 4774–4781.
- [50] Connelly, S., Choi, S., Johnson, S.M., Kelly, J.W. and Wilson, I.A. (2010) Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 54–62.



An N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) 'aggregation-prone' segment involved in isolated atrial amyloidosis



Nikolaos N. Louros^a, Vassiliki A. Iconomidou^a, Paraskevi L. Tsiolaki^a, Evangelia D. Chrysina^b, Georgios E. Baltatzis^c, Efstratios S. Patsouris^c, Stavros J. Hamodrakas^{a,*}

^a Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01, Greece

^b Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Avenue, Athens 116 35, Greece

^c 1st Department of Pathology, Medical School, University of Athens, 75 Mikras Assias, Goudi 115 27, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2013

Revised 8 October 2013

Accepted 30 October 2013

Available online 9 November 2013

Edited by Jesus Avila

Keywords:

Natriuretic peptide

N-terminal pro-atrial natriuretic peptide

(NT-proANP)

Amyloid fibril

Isolated atrial amyloidosis (IAA)

Cardiac amyloidose

ABSTRACT

Isolated atrial amyloidosis (IAA) is a common localized form of amyloid deposition within the atria of the aging heart. The main constituents of amyloid fibrils are atrial natriuretic peptide (ANP) and the N-terminal part of its precursor form (NT-proANP). An 'aggregation-prone' heptapeptide (¹¹⁴KLRALLT¹²⁰) was located within the NT-proANP sequence. This peptide self-assembles into amyloid-like fibrils in vitro, as electron microscopy, X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy and Congo red staining studies reveal. Consequently, remedies/drugs designed to inhibit the aggregation tendency of this 'aggregation-prone' segment of NT-proANP may assist in prevention/treatment of IAA, congestive heart failure (CHF) or atrial fibrillation (AF).

© 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Several soluble proteins and peptides have the ability to aggregate under certain conditions into higher-order fibrillar structures known as amyloid fibrils [1,2]. Deposition of amyloid fibrils in various tissues and organs has been associated with a variety of pathological conditions termed amyloidoses [3]. This diverse group of conformational diseases includes, amongst others, a number of neurodegenerative disorders (such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's), prion diseases, type II diabetes, several cases of carcinomas (e.g. medullary carcinoma, prolactinoma or insulinoma), heart conditions (cardiac amyloidoses), etc. [4].

Amyloid deposition in the elderly heart is an ordinary finding [5]. Cardiac amyloidosis is divided into two distinct types, a systemic and a localized form. The first type, designated as senile systemic amyloidosis (SSA), is associated with the formation of amyloid fibrils, derived from transthyretin (TTR), mainly in the

cardiac ventricles [6]. The second type, called isolated atrial amyloidosis (IAA), involves the localized deposition of amyloid fibrils in the atria of the aging heart [7]. As an age related condition, it frequently appears after the fourth decade and prevails in higher age groups (>80–85% in ages above 80 years) [8], showing a predisposition for females [9]. Experimental evidence and clinical studies have indicated an increased frequency associated with different cardiac diseases, such as congestive heart failure (CHF), atrial fibrillation (AF) and atrial thromboembolism [10,11]. Additional clinical effects of amyloid deposits in the heart atria involve, apart from cardiac failure, several rhythm disturbances [12], deriving from damaged diastolic function due to the mechanical disturbance of myocyte movement by the diffuse deposition of amyloid [13].

Atrial natriuretic peptide (ANP) has been identified as the primary component of IAA amyloid fibrils [14]. However, immunohistochemical studies have also signified the presence of the N-terminal remnant of its precursor form, ^{1–98}proANP and Brain Natriuretic Peptide (BNP) [14,15]. It is expressed and stored in cytoplasmic granules of the myocyte cells of the cardiac atria. The major stimulant for ANP release is atrial wall stretch as an after-effect of increased intravascular volume [16]. The human pre-proANP precursor, containing a hydrophobic signal peptide (residues 1–25), is cleaved to form the 126 amino acid long proANP precursor (Fig. 1). ProANP undergoes further cleavage by a specific

Abbreviations: NT-proANP, N-terminal pro-atrial natriuretic peptide; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; IAA, isolated atrial amyloidosis; SSA, senile systemic amyloidosis; TTR, transthyretin; CHF, congestive heart failure; AF, atrial fibrillation; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; ATR FT-IR spectroscopy, attenuated total reflectance Fourier-transform spectroscopy

* Corresponding author. Fax: +30 210 7274254.

E-mail address: shamodr@biol.uoa.gr (S.J. Hamodrakas).

cardiac serine protease called corin, immediately after secretion, resulting in the production of the final mature $1-28$ ANP product, a 28 amino acid long hormone and the N-terminal remnant $1-98$ pro-ANP (hereinafter called NT-proANP) [17].

The exact biological role of ANP still remains unclear. After secretion in the plasma, ANP contributes in the control of circulating blood volume [18]. Moreover, it binds to guanylyl-cyclase ANP-receptors, located in various organs, such as the brain, blood vessels, kidney and adrenal glands, activating cGMP cascade pathways [19]. ANP is rapidly cleared from the blood stream by binding to type C ANP receptors and neutral endopeptidases, both located in the kidney and blood vessels [20]. NT-proANP has a longer half-life than ANP [21] and even though its exact biological function is not determined yet, it has been suggested as a biological marker for left ventricular dysfunction [22].

Detailed theoretical and experimental evidence has repeatedly indicated that amyloid formation is mediated by specific short sequence regions/stretches of a polypeptide chain that have a higher aggregation propensity and therefore vitally contribute to its aggregation tendency [23,24]. In this work, we determine a novel aggregation-potent segment of NT-proANP, 114 KLRALLT 120 , which was initially predicted as such, by implementing AMYLPRED, our aggregation propensity algorithm [25]. This aggregation-prone peptide segment was synthesized (see Section 2) and here we present experimental results, verifying its strong aggregation propensity to form amyloid fibrils. It should be mentioned at this point that, a distantly homologous peptide, KMVLYTL, has also been determined to possess a strong aggregation propensity in the sequence of the N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) [26]. An analysis of the physico-chemical properties of both peptides is provided (see Supplementary Table 1 and Fig. S1) [27]. Also, we discuss our findings, implicating NT-proANP as one of the main the driving forces in IAA fibril formation, providing a novel target for IAA prevention/prohibition.

2. Materials and methods

2.1. Prediction of potential aggregation prone peptides in NT-proANP and peptide synthesis

Our prediction algorithm AMYLPRED, a consensus prediction tool of potential 'aggregation-prone' peptides (freely accessible to academic users at <http://biophysics.biol.uoa.gr/AMYLPRED>) [25],

was implemented on the amino acid sequence of the $1-151$ ANP pre-pro-hormone. As a result, a segment of NT-proANP, with high aggregation propensity was predicted (see Fig. 1). This heptapeptide, KLRALLT (nominal positions 114–120), is located close to the C-terminal region of NT-proANP (Fig. 1). The NT-proANP heptapeptide-analogue KLRALLT was synthesized by GeneCust Europe, Luxembourg (purity >98%, free N- and C-terminals).

2.2. Formation of amyloid-like fibrils

The synthesized NT-proANP heptapeptide-analogue, KLRALLT, was dissolved in distilled water (pH 5.75), at a concentration of 15 mg ml^{-1} . After an incubation period of 1–2 weeks, mature amyloid-like fibril containing gels were formed. However production of oriented fibers, suitable for X-ray diffraction, were obtained from solutions of higher concentration of the peptide, containing mature amyloid-like fibrils as described below.

2.3. X-ray fiber diffraction

The NT-proANP heptapeptide-analogue, KLRALLT, was dissolved in distilled water (pH 5.75) at a concentration of 20 mg ml^{-1} to produce mature amyloid-like fibrils, after 1–2 weeks incubation, forming a fibril-containing gel. A droplet ($10 \mu\text{l}$) of the fibril containing solution was placed between two aligned siliconized glass rods (spaced 2 mm apart). The droplet was allowed to dry slowly at ambient temperatures and humidities, for 1 h, to form an oriented fiber suitable for X-ray diffraction. The X-ray diffraction pattern was collected, using a SuperNova-Agilent Technologies X-ray generator equipped with a 135-mm ATLAS CCD detector and a 4-circle kappa goniometer, at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation (CuK α high intensity X-ray micro-focus source, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operated at 50 kV, 0.8 mA. The specimen-to-film distance was set at 117 mm and the exposure time was set to 180s. The X-ray pattern, initially viewed using the program CrysAlisPro [28] was displayed and measured with the aid of the program iMosFLM [29].

2.4. Congo red staining and polarized light microscopy

Fibril suspensions of the peptide solution were applied to glass slides and were air-dried at ambient temperatures and humidities. The film produced, containing amyloid-like fibrils, was stained

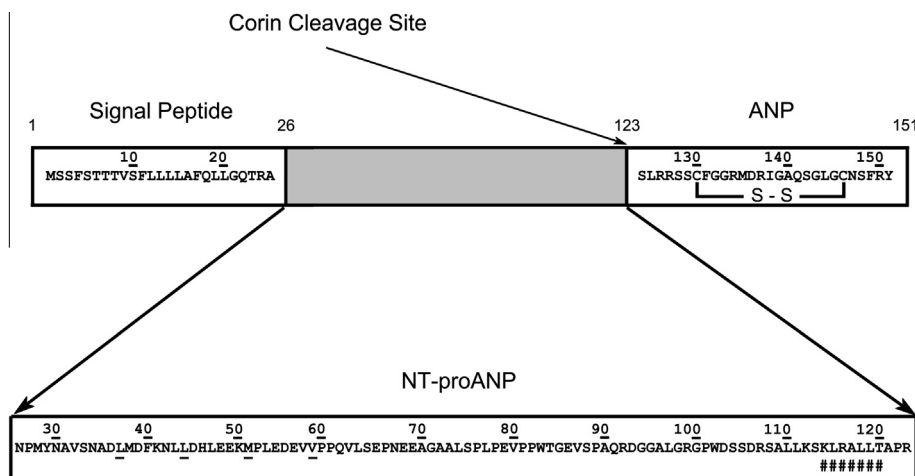


Fig. 1. The amino acid composition of full length atrial natriuretic peptide. It is expressed as a 151 amino acid long pre-pro-hormone, in the atrial myocyte cells. The prohormone form, composed of 126 amino acids, is produced after cleavage of the signal peptide and it is the predominant form stored within the atrial granules. Cleavage by a corin enzyme immediately after secretion results in the 28 amino acids in length mature ANP and the N-terminal remnant, known as NT-proANP. The predicted 'aggregation-prone' region of NT-proANP is marked with "#". The four underlined hydrophobic residues located at the N-terminal segment of NT-proANP (nominal residues 37–59), show heptad periodicities of hydrophobic residues, a coiled-coil motif (a motif capable of forming a superhelix of α -helices) [26,47].

with a 1% Congo red solution in distilled water (pH 5.75) for 20 min [30]. Excess stain was removed through tap water washes [30]. The samples were observed under bright field illumination and between crossed polars, using a Leica MZ75 polarizing stereomicroscope equipped with a JVC GC-X3E camera.

2.5. Negative staining

For negative staining, a drop ($\sim 5 \mu\text{l}$) of the fibril containing solutions of the KLRALLT peptide was applied to glow-discharged 400-mesh carbon-coated copper grids, for 60 s. The grids were flash-washed with distilled water and stained with a drop of 2% (w/v) aqueous uranyl acetate for 60 s. Excess stain was removed by blotting with a filter paper. The fibril containing grids were initially air-dried and examined with a Morgagni™ 268 transmission electron microscope, operated at 80 kV. Digital acquisitions were performed with an 11 Mpixel side-mounted Morada CCD camera (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.6. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy and post-run spectra computations

A 10- μl drop of the fibril containing solution of the NT-proANP heptapeptide-analogue was cast on a front-coated Au mirror and left to dry slowly at ambient conditions to form a thin film. IR spectra were obtained at a resolution of 4 cm^{-1} , utilizing an IR microscope (IRScope II, BrukerOPTICS, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany), equipped with a Ge ATR objective lens (20 \times) and attached to a FT-IR spectrometer (Equinox 55, BrukerOPTICS). Ten 32-scan spectra were collected from each sample and averaged to improve the S/N ratio. All spectra are shown in the absorption mode, after correction for the wavelength-dependence of the penetration depth (d_p , analogous λ). Derivatives were computed analytically using routines of the Bruker OPUS/OS2 software including smoothing over a $\pm 8 \text{ cm}^{-1}$ range around each data point, performed by the Savitsky–Golay algorithm [31]. Smoothing over narrower ranges resulted in deterioration of the S/N ratio and did not increase the number of minima that could be determined with confidence. The minima in the second derivative were used to determine the corresponding absorption band maxima.

3. Results

After incubation for 1–2 weeks, the KLRALLT peptide self-assembles into amyloid-like fibrils (Fig. 2a and b), forming gels. Electron micrographs display the amyloid-like fibrils to be straight and unbranched with an indefinite length (several microns long) and a diameter of approximately 50–60 Å (Fig. 2a). Frequently, the fibrils coalesce laterally and in register forming ribbons, varying in diameter (Fig. 2b). This apparent morphological polymorphism has previously been established as a common characteristic of amyloid-like fibrils formed by several aggregation-prone peptides or proteins [32]. Furthermore, the presence of supramolecular spherical structures (Fig. 2a, arrows) signifies the possibility that the KLRALLT peptide self-assembles, initially forming spherulites. Spherulites have been associated with early amyloid fibrillogenesis events, for several proteins involved in the formation of functional [33] or pathological amyloids, as possible pre-fibrillar amyloid intermediates and are implicated with the cytotoxicity mechanisms of amyloidoses [34,35].

The X-ray diffraction pattern produced by an oriented fiber, formed by solutions containing amyloid-like fibrils from the peptide KLRALLT, resembles a typical “cross- β ” architecture that amyloid fibrils adopt (Fig. 3) [36,37]. Specifically, a strong reflection at 4.7 Å is attributed to the interchain distance between hydrogen bonded β -strands. Furthermore, the spacing at 11.9 Å is

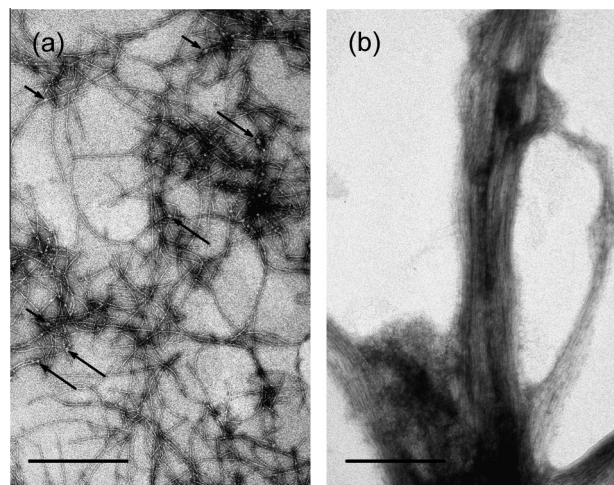


Fig. 2. Electron micrographs of amyloid-like fibrils derived by self-assembly, from a 15 mg ml^{-1} solution of KLRALLT peptide in distilled water (pH 5.75). (a) Amyloid-like fibrils appear straight, unbranched and of undetermined length with a diameter of ca. 50–60 Å. Pre-fibrillar spherical aggregates, called spherulites, are also formed (single arrows) indicating the ability of the KLRALLT peptide to nucleate (bar 500 nm). (b) Amyloid-like fibrils interact in a lateral fashion forming ribbons varying in diameter (bar 500 nm). The fibrillar polymorphism observed has previously been established as a common characteristic of amyloid-like fibrils formed by several aggregation-prone peptides or proteins [32].

ascribed to the packing distance between packed β -sheets. However, there is no preferential orientation of these two reflections along the meridian or the equator of the X-ray diffraction pattern, as in a typical cross- β pattern, implying that the amyloid-like fibrils adopt all possible orientations in the fiber (which is not really oriented!).

Complementary experimental evidence produced by the ATR FT-IR ($1500\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$) spectrum of the KLRALLT peptide, supports the presence of an antiparallel β -sheet conformation for this peptide, in agreement to the results obtained from X-ray diffraction (Fig. 4). Particularly, the spectrum displays a strong amide I band at 1624 cm^{-1} , due to the preponderance of β -sheet,

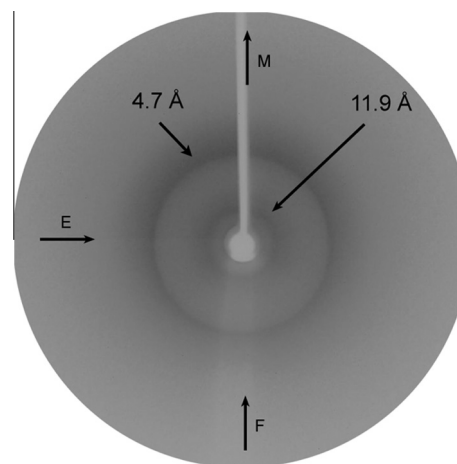


Fig. 3. X-ray diffraction pattern from an ‘oriented’ fiber of the NT-proANP KLRALLT peptide-analogue amyloid-like fibrils. The fiber axis (F) is vertical (meridian, M), whereas the equator is horizontal (E). The “cross- β ” structure is evident. A 4.7 Å reflection is due to the distance between successive hydrogen bonded β -strands and a 11.9 Å reflection results from the spacing between packed β -sheets. However, there is no preferential orientation (the reflections appear as rings) of the meridional and equatorial reflections (it is not a typical oriented “cross- β ” pattern). See, also Section 3.

supported by the amide II band at 1535 cm^{-1} [38–40]. Moreover, the additional component at 1693 cm^{-1} , in the amide I band, is probably an indication that the β -sheets are antiparallel (Table 1) [38–40]. Proteins containing antiparallel β -sheets usually exhibit a high frequency β -sheet component that arises from transition dipole coupling, typically located $50\text{--}70\text{ cm}^{-1}$ higher than the main β -sheet band [40]. The detailed spectrum, in the region $1100\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, is also provided (Supplementary Table 2 and Fig. S2).

Amyloid-like fibrils have been shown to bind the stain Congo red [41]. Films produced by the fibril containing peptide KLRALLT solutions were initially stained by the characteristic for amyloid fibrils Congo red dye (see Section 2) and then were studied under a polarizing microscope. Amyloid deposits composed of KLRALLT amyloid-like fibrils bind Congo red, as observed under bright field illumination (Fig. 5a) and exhibit the characteristic for amyloid fibrils apple/green birefringence when viewed under crossed polars (Fig. 5b).

4. Discussion

Amyloids arise from self-aggregating proteins or peptides with diverse functional properties, different amino acid sequences and

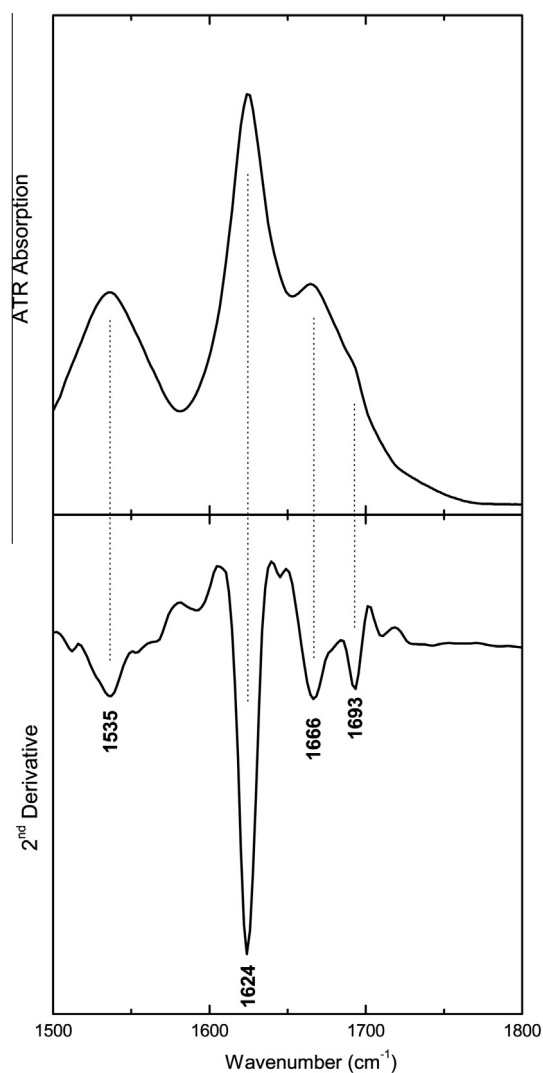


Fig. 4. ATR FT-IR ($1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) spectrum obtained from a thin hydrated-film containing mature amyloid-like fibrils derived by KLRALLT peptide self-aggregation. The second derivative spectrum was included to identify the exact band maxima and their tentative assignments. The ATR FT-IR spectrum is indicative of the preponderance of an antiparallel β -sheet secondary structure (Table 1).

Table 1

Bands observed in the ATR FT-IR ($1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) spectrum produced from a hydrated film of the 'aggregation-prone' heptapeptide, KLRALLT, after self-assembly, and their tentative assignments (Fig. 4).

Bands (cm^{-1})	Assignment
1535	β -Sheet (amide II)
1624	β -Sheet (amide I)
1666	TFA
1693	Antiparallel β -sheet

structural characteristics. A growing number of such proteins and peptides have been found to form amyloid fibrils, both *in vitro* and *in vivo*, supporting early observations, which led to the concept that, every protein may adopt both a globular and a fibrillar structure under appropriate conditions [42]. Several studies, both theoretical and experimental, have shown that self-aggregating proteins contain potent aggregation-prone segments within their native sequence [23,25,43]. Such aggregation-prone peptide regions have been proposed to act as templates for amyloid fibril formation after protein structural rearrangements [25]. An impressive genome-wide survey revealed that most proteins contain at least one peptide region with such a high aggregation tendency [43].

The KLRALLT peptide was predicted as a potential aggregation-prone peptide segment of NT-proANP by the AMYLPRED algorithm [25]. Our experimental results, presented here (see Section 3), indeed verify that this peptide-analogue self-assembles forming amyloid-like fibrils, which satisfy all the basic criteria for amyloids [41]. Apparently, NT-proANP has an inherent ability to form amyloid fibrils, mainly due to the KLRALLT peptide, in support to previous immunohistochemical data indicating its presence in amyloid deposits of heart atria [15]. Several polypeptide hormones have been identified in both mature and precursor states in amyloid fibrils [44]. Our data corroborate this concept adding ANP and NT-proANP as another hormone-prehormone amyloid fibril formation case.

Previous experimental studies have indicated that ANP polymerization into amyloid fibrils is a nucleation dependent process [45,46]. However, mature ANP has a substantially higher aggregation tendency once seeded [10,45,46]. Therefore, it is possible that pre-fibrillar aggregates are actually formed by NT-proANP, driven by the aggregation propensity of the KLRALLT peptide introducing a nucleation effect for ANP polymerization into amyloid fibrils. This may also explain why, although ANP is the predominant component in amyloid fibrils of the atria, NT-proANP is also found as a secondary supporting component [15]. Further, more refined, experimental work is needed to verify this hypothesis.

Elegant theoretical and experimental work by Richards and co-workers, more than a decade ago, indicated the presence of a coiled-coil motif region (a region capable of forming a superhelix of α -helices), close to the N-terminal of NT-proANP (as seen by the underlined hydrophobic residues in Fig. 1), suggesting that NT-proANP oligomerization may occur via these coiled-coil motifs of hydrophobic residues [47]. Therefore, an alternative approach may involve NT-proANP forming early oligomers through coiled-coils and further polymerizing into atrial amyloid fibrillar structures, as a result of the self-aggregation potential of the KLRALLT aggregation prone peptide. A similar process has recently been proposed to occur for the NT-proBNP natriuretic pro-hormone [26].

It is not clarified yet why polypeptide hormones form amyloid fibrils *in vivo*. Abnormal high concentrations of the polypeptide, close to the hormone secretion site, result in the formation of amyloid deposits in most localized amyloidoses conditions [10]. NT-proANP has a significantly longer half-life compared to ANP [21]. Consequently, it is found in correspondingly higher concentrations both in plasma and heart atria. Additionally, ANP and NT-proANP

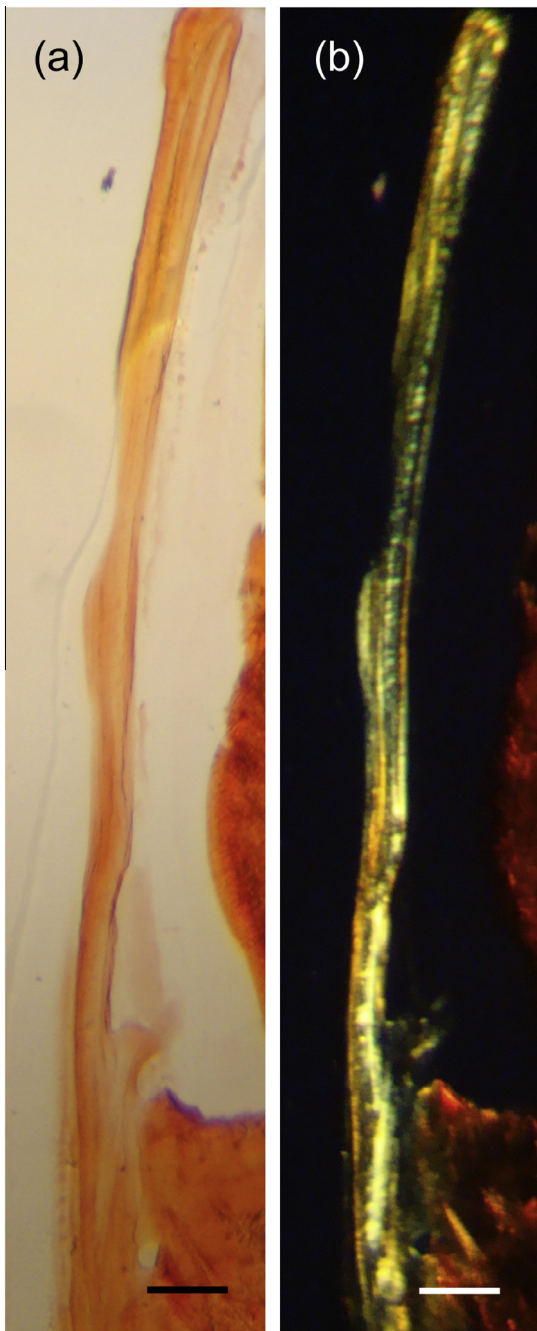


Fig. 5. Photomicrographs of an amyloid-like fibril containing gel, derived from KLRALLT peptide-analogue self-assembly, stained with Congo red. (a) The Congo red dye is bound, as seen under bright field illumination. (b) The apple-green birefringence that amyloids typically exhibit is clearly seen under crossed polars. Bar 100 μm .

secretion is reported higher in patients with heart conditions, such as congestive heart failure or atrial fibrillation [9]. As a result, high concentrations of NT-proANP within the heart atria may promote amyloid deposit formation, leading to IAA. Therefore, NT-proANP aggregation preventing techniques may be mandatory to avoid the aforementioned pathological heart conditions. If indeed ANP polymerization is dependent of NT-proANP nucleation, remedies/drugs designed to prevent aggregation of the KLRALLT peptide, following the example of recent impressive studies [48,49], could prove to be of substantial importance in future IAA treatment or prevention.

Acknowledgements

We thank the University of Athens and the National Hellenic Research Foundation for support. We thank Maria Karamolegou for expert technical assistance and our collaborators Drs. Georgios Chryssikos and Vassilis Gionis from the Theoretical and Physical Chemistry Institute of the National Hellenic Research Foundation for help with the ATR FT-IR experiments. We should also like to thank the editor of this manuscript for properly handling it and the anonymous reviewers for useful and constructive criticism.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.049>.

References

- [1] Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890.
- [2] Chiti, F. and Dobson, C.M. (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* 5, 15–22.
- [3] Pepys, M.B. (1996) *The Oxford Textbook of Medicine*, Oxford University Press, Oxford.
- [4] Buxbaum, J.N. and Linke, R.P. (2012) A molecular history of the amyloidoses. *J. Mol. Biol.* 421, 142–159.
- [5] McCarthy 3rd, R.E. and Kasper, E.K. (1998) A review of the amyloidoses that infiltrate the heart. *Clin. Cardiol.* 21, 547–552.
- [6] Sletten, K., Westermark, P. and Natvig, J.B. (1980) Senile cardiac amyloid is related to prealbumin. *Scand. J. Immunol.* 12, 503–506.
- [7] Steiner, I. (1987) The prevalence of isolated atrial amyloid. *J. Pathol.* 153, 395–398.
- [8] Kawamura, S., Takahashi, M., Ishihara, T. and Uchino, F. (1995) Incidence and distribution of isolated atrial amyloid: histologic and immunohistochemical studies of 100 aging hearts. *Pathol. Int.* 45, 335–342.
- [9] Goette, A. and Rocken, C. (2004) Atrial amyloidosis and atrial fibrillation: a gender-dependent “arrhythmogenic substrate”? *Eur. Heart J.* 25, 1185–1186.
- [10] Johansson, B. and Westermark, P. (1990) The relation of atrial natriuretic factor to isolated atrial amyloid. *Exp. Mol. Pathol.* 52, 266–278.
- [11] van den Berg, M.P., Tjeerdsma, G., Jan de Kam, P., Boomsma, F., Crijns, H.J. and van Veldhuisen, D.J. (2002) Longstanding atrial fibrillation causes depletion of atrial natriuretic peptide in patients with advanced congestive heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 4, 255–262.
- [12] Maredia, N. and Ray, S.G. (2005) Cardiac amyloidosis. *Clin. Med.* 5, 504–509.
- [13] Takemura, G. et al. (1998) Expression of atrial and brain natriuretic peptides and their genes in hearts of patients with cardiac amyloidosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 754–765.
- [14] Linke, R.P., Voigt, C., Storkel, F.S. and Eulitz, M. (1988) N-terminal amino acid sequence analysis indicates that isolated atrial amyloid is derived from atrial natriuretic peptide. *Virchows Arch. B* 55, 125–127.
- [15] Pucci, A., Wharton, J., Arbustini, E., Grasso, M., Diegoli, M., Needleman, P., Vigano, M. and Polak, J.M. (1991) Atrial amyloid deposits in the failing human heart display both atrial and brain natriuretic peptide-like immunoreactivity. *J. Pathol.* 165, 235–241.
- [16] Edwards, B.S., Zimmerman, R.S., Schwab, T.R., Heublein, D.M. and Burnett Jr., J.C. (1988) Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ. Res.* 62, 191–195.
- [17] Yan, W., Wu, F., Morser, J. and Wu, Q. (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8525–8529.
- [18] Levin, E.R., Gardner, D.G. and Samson, W.K. (1998) Natriuretic peptides. *N. Engl. J. Med.* 339, 321–328.
- [19] Waldman, S.A., Rapoport, R.M. and Murad, F. (1984) Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 259, 14332–14334.
- [20] van den Berg, M.P., van Gelder, I.C. and van Veldhuisen, D.J. (2004) Depletion of atrial natriuretic peptide during longstanding atrial fibrillation. *Europace* 6, 433–437.
- [21] Yandle, T.G., Richards, A.M., Nicholls, M.G., Cuneo, R., Espiner, E.A. and Livesey, J.H. (1986) Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. *Life Sci.* 38, 1827–1833.
- [22] Lerman, A., Gibbons, R.J., Rodeheffer, R.J., Bailey, K.R., McKinley, L.J., Heublein, D.M. and Burnett Jr., J.C. (1993) Circulating N-terminal atrial natriuretic peptide as a marker for symptomless left-ventricular dysfunction. *Lancet* 341, 1105–1109.
- [23] Lopez de la Paz, M. and Serrano, L. (2004) Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 87–92.
- [24] Teng, P.K. and Eisenberg, D. (2009) Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 531–536.

- [25] Frousios, K.K., Iconomidou, V.A., Karletidi, C.M. and Hamodrakas, S.J. (2009) Amyloidogenic determinants are usually not buried. *BMC Struct. Biol.* 9, 44.
- [26] Iconomidou, V.A., Pheida, D., Hamodraka, E.S., Antony, C., Hoenger, A. and Hamodrakas, S.J. (2012) An amyloidogenic determinant in n-terminal pro-brain natriuretic peptide (nt-probnp): implications for cardiac amyloidosis. *Biopolymers* 98, 67–75.
- [27] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (Walker, M.J., Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571–607, Humana Press, New York.
- [28] Diffraction, Oxford. (2009) Chrysalis Promotions, Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England.
- [29] Leslie, A.G.W. and Powell, H.R. (2007) Processing diffraction data with mosflm (Read, R. and Sussman, J.L., Eds.), *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, ISBN 978-1-4020-6314-5, pp. 41–51, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- [30] Romhanyi, G. (1971) Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with Congo red. *Virchows Arch. A* 354, 209–222.
- [31] Savitsky, A. and Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.
- [32] Kreplak, L. and Aebi, U. (2006) From the polymorphism of amyloid fibrils to their assembly mechanism and cytotoxicity. *Adv. Protein Chem.* 73, 217–233.
- [33] Hamodrakas, S.J., Hoenger, A. and Iconomidou, V.A. (2004) Amyloid fibrillogenesis of silkworm chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase. *J. Struct. Biol.* 145, 226–235.
- [34] Moreth, J., Kroker, K.S., Schwanzar, D., Schnack, C., von Arnim, C.A., Hengerer, B., Rosenbrock, H. and Kussmaul, L. (2013) Globular and protofibrillar abeta aggregates impair neurotransmission by different mechanisms. *Biochemistry* 52, 1466–1476.
- [35] Iconomidou, V.A., Leontis, A., Hoenger, A. and Hamodrakas, S.J. (2013) Identification of a novel 'aggregation-prone'/amyloidogenic determinant peptide in the sequence of the highly amyloidogenic human calcitonin. *FEBS Lett.* 587, 569–574.
- [36] Geddes, A.J., Parker, K.D., Atkins, E.D. and Beighton, E. (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.* 32, 343–358.
- [37] Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B. and Blake, C.C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 273, 729–739.
- [38] Krimm, S. and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38, 181–364.
- [39] Haris, P.I. and Chapman, D. (1995) The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 37, 251–263.
- [40] Jackson, M. and Mantsch, H.H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120.
- [41] Sunde, M. and Blake, C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* 50, 123–159.
- [42] Astbury, W.T., Dickinson, S. and Bailey, K. (1935) The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem. J.* 29, 2351–2360.
- [43] Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R. and Eisenberg, D. (2010) Identifying the amyloidome, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 3487–3492.
- [44] Westermark, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D.W., O'Brien, T.D. and Johnson, K.H. (1987) Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3881–3885.
- [45] Maioli, E., Torricelli, C., Santucci, A. and Pacini, A. (2000) Molecular assembly of endogenous and synthetic big atrial natriuretic peptide (ANP) and its amyloidogenic implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1500, 31–40.
- [46] Torricelli, C., Capurro, E., Santucci, A., Paffetti, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Maioli, E. and Pacini, A. (2004) Multiple plasma proteins control atrial natriuretic peptide (ANP) aggregation. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 335–341.
- [47] Seidler, T., Pemberton, C., Yandle, T., Espiner, E., Nicholls, G. and Richards, M. (1999) The amino terminal regions of proBNP and proANP oligomerise through leucine zipper-like coiled-coil motifs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 495–501.
- [48] Choi, S., Reixach, N., Connelly, S., Johnson, S.M., Wilson, I.A. and Kelly, J.W. (2010) A substructure combination strategy to create potent and selective transthyretin kinetic stabilizers that prevent amyloidogenesis and cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1359–1370.
- [49] Connelly, S., Choi, S., Johnson, S.M., Kelly, J.W. and Wilson, I.A. (2010) Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 54–62.