

Meddelčne interakcije v vodnih raztopinah globularnih proteinov

Proteini so najpogostejše biomakromolekule v celicah, kjer igrajo ključno vlogo v praktično vsakem biološkem procesu. Proteini lahko pravilno opravljajo svojo funkcijo le če ostanejo v svoji stabilni (nativni) obliki. V pričujočem delu smo proučevali vpliv meddelčnih interakcij na fazno stabilnost nekaterih globularnih proteinov, z glavnim poudarkom na jajčnem lizocimu (HEWL). V prvem delu smo raziskali fazno stabilnost HEWL v 10 različnih pufrskih raztopinah z merjenjem njihove temperature zmotnitve. Ugotovili smo, da je fazna stabilnost raztopin HEWL močno odvisna od pogojev v raztopini in tudi od izbire pufra, pri čemer rezultati pri $pH=7,0$ jasno nakazujejo na pufer specifične efekte. Z uporabo enostavnega modela v okviru Wertheimove perturbacijske teorije smo lahko napovedali koeksistenčne krivulje kapljevina-kapljevina za HEWL v pufrih pri $pH=7,0$, ki se ujemajo z našimi eksperimentalnimi rezultati. Z uporabo modela v kombinaciji z eksperimentalno določenima B_{22} in k_D smo ugotovili tudi kakšen je vpliv pufov na medproteinske interakcije pri $pH=7,0$. V drugem delu smo proučili kako različni pogoji v raztopini vplivajo na *in vitro* fibrilizacijo HEWL. Prisotnost amiloidnih fibril smo spremljali z visoko amiloidofilnima barviloma thioflavin T in Congo rdeče, kakor tudi z merjenjem spektrov cirkularnega dikroizma (CD). Opazili smo, da HEWL fibrilizira zgolj pod specifičnimi pogoji v raztopini. Dokazali smo, da senčenje elektrostatskih interakcij igra pomembno, a ne ključno, vlogo v procesu fibrilizacije. Poleg tega smo uspeli z dodatkom inertnega polimera, PEG12000, preprečiti nastanek fibril HEWL v visoko amiloidogeni raztopini. V tretjem delu smo optimizirali ekspresijo psevdo-divjega tipa lizocima T4 (WT*) in njegove točkovne mutante L99I*. Ugotovili smo, da je pri enakih pogojih v raztopini fazna stabilnost lizocima T4 višja od tiste za HEWL. Dodatno smo pokazali, da je protein T4 WT* konformacijsko stabilnejši od svoje točkovne mutante. Na koncu smo izvedli številne atomistične simulacije vodnih raztopin HEWL, T4 WT* in človeškega γ -D kristalina z uporabo molekulske dinamike. Izračunali smo fluktuacije v gostoti proteinov, ki so pokazale izrazite s proteini bogate in osiromašene regije v primeru vseh raztopin z visoko vsebnostjo proteinov. Narava samozdruževanja proteinov se je izkazala za delno reverzibilno, še posebej v raztopinah blizu eksperimentalno določenih pogojev fazne separacije. Temeljita analiza simulacij in interakcij med aminokislinami med vsemi pari proteinov nam je omogočila določitev najpomembnejših parov aminokislina-aminokislina, kakor tudi posameznih aminokislin, ki so odgovorne za tvorbo tesnih začetnih kontaktov med proteini. Za tako HEWL kot γ -D kristalin smo odkrili, da je prevladujoča aminokislina arginin, ki se povezuje predvsem s partnerji, sposobnimi tvorbe vodikovih vezi in solnih mostičkov. Medtem, ko je v primeru T4 WT* vloga iniciacije samozdruževanja proteinov pripadla lizinu. Proučili pa smo tudi difuzijske lastnosti in hidratacijo simuliranih proteinov.