

STRESZCZENIE

Amyloidozy to grupa chorób bezpośrednio związanych z nieprawidłowościami w przemianach błędnie sfałdowanych białek, często wynikającymi z wadliwości systemów degradacyjnych. Do proteolitycznych układów kontroli homeostazy białkowej zaliczyć można proteasom 20S. W stanie fizjologicznym stanowi on istotny składnik puli proteasomów, a w warunkach stresu oksydacyjnego, gdy dodatkowo uwalniany jest w wyniku dysocjacji kompleksu 26S, stanowi główną formę proteolityczną, która musi się zmierzyć z rosnącą ilością wykazujących tendencje agregacyjne uszkodzonych białek. Niestety, w tych warunkach aktywność proteasomu 20S jest zwykle hamowana. Przez wiele lat uważano, że za obserwowaną inhibicję odpowiadają fibrylarne formy białek. W obecnym podejściu zakłada się, że najbardziej toksyczne dla komórek są rozpuszczalne oligomery, które poprzedzają fibrylarne złogi na szlaku agregacji. Ich przyczynową rolę w hamowaniu proteasomu odkryto w przypadku peptydu A β związanego z chorobą Alzheimerera, α -synukleiny związanej z chorobą Parkinsona oraz zmutowanej huntingtyny, której złogi stwierdzono u osób cierpiących na chorobę Huntingtona. Zablockowany przez rozpuszczalne oligomery system proteasomalny traci swoją aktywność biologiczną, co skutkuje gromadzeniem się cytotoksycznych oligomerów, a następnie ich przekształcaniem w protofibryle, fibryle, a następnie włókna amyloidowe. Według badań grupy Smitha [1] oligomery A β 1-42 hamują aktywność proteasomu 20S w sposób allosteryczny. Badacze ci wykazali również, że krótkie peptydy obejmujące C-końcowy motyw HbYX, charakterystyczny dla naturalnych aktywatorów białkowych, mogą stymulować zahamowany działaniem oligomerów A β proteasom 20S.

Z uwagi na fakt, że u większości pacjentów cukrzycowych zaobserwowano złogi amyloidowe, cukrzycę typu 2 zaczęto rozpatrywać w kontekście amyloidozy. Cechą charakterystyczną amyloidoz jest gromadzenie się cytotoksycznych agregatów, które w przypadku cukrzycy typu 2 odkładają się głównie w trzustce, a składają z cząsteczek amyliny, zwanej także IAPP. IAPP to 37-resztowy peptyd o silniejszych właściwościach agregacyjnych niż A β . Oprócz wspólnych właściwości amyloidogennych, te dwa peptydy posiadają również wspólne cechy biochemiczne, co sugeruje wspólny mechanizm patogeny. Dla peptydu A β wiadome już jest, że w tym mechanizmie uczestniczy proteasom 20S.

Dlatego głównym celem tej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie procesu oligomeryzacji ludzkiej amyliny i zbadanie, czy akumulacji jej form oligomerycznych można zapobiec poprzez aktywację układu proteolitycznego opartego na proteasomie 20S.

Do osiągnięcia założonych celów potrzebowałam znacznych ilości ludzkiej amyliny, dlatego w pierwszym etapie zsyntetyzowałam to białko, a następnie zoptymalizowałam proces badania jego oligomeryzacji. Aby scharakteryzować utworzone formy oligomeryczne, zastosowałam zarówno warunki natywne, jak i denaturujące, dla ustabilizowania powstających oligomerów wykorzystując sieciowanie chemiczne i fotosieciowanie. W kolejnym kroku zbadałam siłę interakcji frakcji zawierających rozpuszczalne oligomery amyliny z proteasomem 20S wyizolowanym z ludzkiej krwi. Określone wartości EC50, wskazujące na silną interakcję pomiędzy tymi cząsteczkami, stanowiły punkt wyjścia do próby określenia miejsca ich wzajemnego oddziaływania. W tym celu zsyntetyzowałam również warianty amyliny z resztą fotosieciującą lub fluoroforami. Do ustalenia miejsca wiązania oligomerów do proteasomu wykorzystałam dwie niezależne techniki: spektrometrię masową i kriomikroskopię elektronową. Odwołując się do wyników badań przedstawionych przez grupę Smitha [1], postanowiłam też zweryfikować wpływ oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną proteasomu 20S. W tym celu przeprowadziłam szereg badań z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych substratów fluorogenicznych, potwierdzając hamujące działanie oligomerów na h20S, a także określając kinetykę inhibicji. W kolejnym etapie wykonałam testy mające na celu przewyciężenie tej inhibicji przy wykorzystaniu peptydomimetyków z puli naszych najlepszych aktywatorów. Powyższe badanie przeprowadziłam nie tylko na izolowanym proteasomie 20S, ale także na lizacie ludzkich komórek HEK293-T. Ponadto zweryfikowałam cytotoksyczność frakcji zawierających oligomery amyliny o małej masie cząsteczkowej w stosunku do powyższej linii komórkowej.

W odniesieniu do wyników badań uzyskanych przez grupę Smitha [1] przeprowadziłam również eksperymenty z przeciwciałem A11. Zaprezentowane wyniki w tej pozycji literaturowej wskazują, że frakcje oligomerów oddziałujących z przeciwciałem A11 odpowiadają za hamujący wpływ na aktywność proteasomu 20S. Podobne eksperymenty przeprowadzone dla amyliny dowiodły, że w jej przypadku oddziaływanie z przeciwciałem nie blokuje zdolności oligomerów do inhibicji h20S. Ponadto wykazałam, że oligomery amyliny o niskiej masie cząsteczkowej mogą być substratem dla proteasomu 20S, a posiadane przez nas związki aktywujące są w stanie stymulować ich proteolizę.

Wyniki zaprezentowanych badań rzucają nowe światło na mechanizmy, które mogą przyczynić się do rozwoju cukrzycy typu 2. Rozpatrywanie tej jednostki chorobowej w kontekście amyloidozy sprawia, że w jej terapii należałoby uwzględnić metody zapobiegania agregacji białek. Wykazana przeze mnie skuteczność peptydomimetycznych aktywatorów opartych na fragmencie białka Bln10 może stanowić dobre podłoże dla opracowywania nowych terapii w leczeniu amyloidozy związanej z cukrzycą typu 2, a tym samym zmniejszyć negatywne skutki tej choroby.

[1] T. A. Thibodeau et al., 'A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers', *Nature Communications*, 9 (2018) 1–14

