



Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Rozprawa doktorska

mgr Daria Sowik

Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2, poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu proteolitycznego

Promotor:

dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

Promotor pomocniczy:

dr Ewa Wieczerzak

Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej

Gdańsk 2024

Poniższa praca prawdopodobnie nie powstałaby bez udziału wielu osób,

którym za wszystko pragnę szczerze podziękować.

*Pragnę wyrazić moją wdzięczność **dr hab. Elżbiecie Jankowskiej, prof. UG** za bezcenne uwagi, niebywale wsparcie w trudnych momentach, zaangażowanie i zrozumienie, a także nieocenioną pomoc w przygotowaniu poniższej rozprawy. Pani Profesor - nie znam drugiej tak dobrej i opiekuńczej osoby.*

*Serdecznie dziękuję również **dr Ewie Wiczerzak** za obdarzenie mnie zaufaniem, wielki entuzjazm, a także możliwość konsultacji. Pani Ewo - dziękuję przede wszystkim za humor i uśmiech, który w trudnych momentach był nieoceniony.*

*Dziękuję serdecznie **dr Małgorzacie Giżyńskiej** za współpracę podczas realizacji projektu NCN, którego owocem jest poniższa praca. Gosia - nauczyłaś mnie dobrej praktyki laboratoryjnej, a także byłaś niezwykłym wsparciem merytorycznym w tym trudnym projekcie. Bez Ciebie nie dałabym rady.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję również do **dr inż. Pawła Wityka** za zaangażowanie oraz poświęcony czas nad analizami ze spektrometrii mas. Paweł - bardzo dziękuję za wspólnie spędzone liczne godziny oraz odwagę w analizowaniu tak wymagających próbek.*

*Chciałabym także podziękować wszystkim **Kolegom i Koleżankom z Katedry Chemii Biomedycznej** za otwartość, możliwość konsultacji i niezwykle ważną w tych czasach przyjazną atmosferę pracy. Szczególne podziękowania kieruję do moich koleżanek z pokoju A113 - **Kasi oraz Karoliny** – za wszystkie przeprowadzone dyskusje pozwalające rozwiązywać liczne problemy, zrozumienie i wsparcie w chwilach zwątpienia.*

*Dziękuję również **Narodowemu Centrum Nauki** za możliwość realizacji zaprezentowanych w poniższej pracy badań w ramach finansowania projektu OPUS 17 o nr 2019/33/B/NZ7/00112.*

*Podziękowania kieruję również do **Narodowego Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie** za możliwość przeprowadzenia pomiarów z zakresu mikroskopii krioelektronowej.*

*Najważniejsze podziękowania kieruję do **mojej Rodziny**. Tak naprawdę bez Waszego wsparcia i zrozumienia nigdy nie byłabym w tym miejscu, w którym jestem.*

*Osobne podziękowania należą się **mojemu mężowi Jakubowi**, który najlepiej znał etapy przez jakie przechodziłam w czasie realizacji pracy doktorskiej i nigdy we mnie nie zwątpił. Obdarzył mnie największym wsparciem i zrozumieniem, a także wyrozumiałością. Niejednokrotnie był też częścią realizacji mojej pracy doktorskiej poprzez liczne dyskusje naukowe, a także rozwiązywanie problemów technicznych. **Mężu** - cieszę się, że przechodziliśmy przez to razem i dziękuję Ci, że zawsze jesteś przy mnie.*

Spis treści

Wykaz skrótów	10
I Założenia i cel pracy.....	16
II Wstęp literaturowy	19
1. Systemy proteolityczne	19
1.1. Proteasom 20S i jego funkcje	21
1.1.1. Budowa proteasomu 20S	24
1.2. Naturalne regulatory proteasomu.....	27
1.2.1. 11S	27
1.2.2. PA200.....	27
1.2.3. 19S	28
1.3. System proteolityczny zależny od ubikwityny (UPS)	29
1.4. Hybrydy i typy proteasomu 20S	30
2. Amyloidozy	31
2.1. Choroba Alzheimerera.....	32
2.2. Cukrzyca	35
2.2.1. Cukrzyca typu 1	38
2.2.2. Cukrzyca typu 2	38
2.2.3. Insulina.....	39
3. Amylina	41
3.1. Kontrola proteolityczna i skutki wadliwego funkcjonowania układów degradacyjnych	46
3.2. Mechanizmy cytotoksyczności amyliny	48
3.3. Amylina w chorobie Alzheimerera	52
3.4. Strategie leczenia w T2DM	54
III Badania własne	59
1. Charakterystyka oligomerów amyliny	59

1.1.	Natywne metody charakterystyki oligomerów amyliny	59
1.1.1.	Testy fluorymetryczne	60
1.1.2.	Dichroizm kołowy	69
1.1.3.	DLS	72
1.1.4.	Elektroforeza natywna	75
1.1.5.	Chromatografia wykluczenia	76
1.1.6.	Elektroforeza kapilarna	80
1.2.	Warunki denaturujące w charakterystyce oligomerów amyliny	81
1.2.1.	Elektroforeza tricynowa	81
1.2.2.	Elucja oligomerów z żelu	89
2.	Oddziaływanie oligomerów amyliny z ludzkim proteasomem	90
2.1.	Termoforeza mikroskalowa (MST)	90
2.2.	Spektrometria mas	92
2.3.	Mikroskopia krioelektronowa	101
3.	Wpływ oligomerów na aktywność proteolityczną h20S	103
3.1.	Niwelowanie inhibicji przez aktywatory proteasomu	108
3.1.1.	Modulatory oparte o 11S	108
3.1.2.	Modulatory będące analogami aktywatora Blm-pep	112
4.	Oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem A11	115
4.1.	Western blot	116
4.2.	Test immunoneutralizacji	117
5.	Zdolność do trawienia oligomerów amyliny przez proteasom	120
5.1.	Badania na wyizolowanym proteasomie	120
5.2.	Wpływ aktywatorów na zdolności degradacyjne proteasomu wobec oligomerów amyliny	127
6.	Badania biologiczne	128
6.1.	Badania na lizatach ludzkich linii komórkowych HEK293-T	128

6.2.	Cytotoksyczność oligomerów amyliny.....	130
IV	Podsumowanie.....	132
V	Metodologia prowadzonych badań.....	136
1.	Synteza i oczyszczanie amyliny oraz jej wariantów	136
1.1.	Synteza.....	136
1.2.	Przyłączanie znaczników fluorescencyjnych.....	136
1.2.1.	Przyłączanie NBD.....	136
1.2.2.	Przyłączanie FITC	137
1.3.	Odszczepianie peptydów z nośnika stałego.....	137
1.4.	Tworzenie mostka disulfidowego	138
1.5.	Oczyszczanie	138
1.6.	Test Ellmana.....	139
2.	Charakterystyka oligomerów amyliny	140
2.1.	Proces oligomeryzacji amyliny.....	140
2.2.	Testy fluorymetryczne z Tioflawiną T	140
2.3.	Dichroizm kołowy	141
2.4.	Stabilizacja oligomerów poprzez sieciowanie.....	141
2.5.	Chromatografia wykluczenia.....	142
2.6.	Elektroforeza kapilarna.....	143
2.7.	DLS.....	143
2.8.	Elektroforeza natywna	144
2.9.	Elektroforeza Tricine SDS-PAGE.....	145
2.9.1.	Wybarwienie żeli z użyciem srebra	147
2.10.	Elucja oligomerów z żelu	147
3.	Oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem konformacyjnym A11	148
3.1.	Dot-blot.....	148
3.2.	Western blot	149

4.	Oczyszczanie ludzkiego proteasomu 20S	149
4.1.	Liza erytrocytów	149
4.2.	Wysalanie.....	150
4.3.	HiTrap	151
4.4.	HIC.....	151
4.5.	MonoQ.....	151
4.6.	Zatężanie i określanie stężenia białka.....	152
4.7.	Elektroforeza SDS-PAGE i testy aktywności proteolitycznej	152
5.	Badania oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem 20S.....	153
5.1.	Termoforeza mikroskalowa	153
5.1.1.	Znakowanie ludzkiego proteasomu 20S znacznikiem fluorescencyjnym 153	
5.1.2.	Wyznaczanie siły oddziaływania dla kompleksów proteasomu 20S z oligomerami ludzkiej amyliny.....	153
5.2.	Analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas.....	154
5.2.1.	Sieciowanie przez Bpa.....	154
5.2.2.	Sieciowanie przez DSSO i trawienie próbek w żelu	155
5.2.3.	Sieciowanie amyNBD oraz amyFITC	156
5.2.4.	Analizy programem MeroX 2.0.....	158
5.3.	Mikroskopia krioelektronowa.....	159
6.	Zdolność proteasomu 20S do trawienia oligomerów amyliny	160
6.1.	Testy fluorymetryczne z Tioflawiną T	160
6.1.1.	Testy z aktywatorami	160
6.2.	Analizy HPLC.....	161
6.3.	Elektroforeza Tricine SDS-PAGE oraz western blot	161
7.	Badania wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną h20S.....	162
7.1.	Badania inhibicji	162
7.1.1.	Latentny h20S	163

7.1.2.	Aktywowany h20S.....	163
7.1.3.	Oligomery amyliny w buforze zawierającym SDS	163
7.2.	Kinetyka inhibicji	164
7.3.	Inhibycyjny wpływ oligomerów po neutralizacji przeciwciałami A11	164
8.	Badania komórkowe	165
8.1.	Przygotowanie lizatów komórkowych (eksperyment przeprowadzony przez mgr Karolinę Trepczyk)	165
8.2.	Inhibycyjny wpływ oligomerów amyliny w lizacie komórek HEK293-T	165
8.3.	Znoszenie inhibycyjnego wpływu oligomerów amyliny w lizacie komórek HEK293-T przez aktywatory proteasomu.....	166
8.4.	Cytotoksyczność oligomerów amyliny względem komórek HEK293-T	166
9.	Peptydomimetyczne modulatory oparte na sekwencji naturalnego aktywatora 11S	167
9.1.	Synteza aktywatorów 11S za pomocą automatycznego syntezatora mikrofalowego Liberty Blue (CEM).....	167
9.2.	Manualne przyłączanie kwasu bromooctowego do <i>N</i> -końcowej grupy aminowej	167
9.3.	Zdejmowanie osłony Mtt z grup tiolowych.....	167
9.4.	Cyklizacja tioeterowa	167
9.5.	Odszczepianie peptydów z żywicy	168
9.6.	Cyklizacja CLIPS	168
9.7.	Oczyszczanie i charakterystyka związków	169
9.8.	Badania wpływu analogów 11S na aktywność proteasomu 20S	171
	Summary.....	172
	Streszczenie	175
	Wykaz dorobku naukowego.....	178
VI	Przypisy	181
1.	Spis rysunków	181

2. Spis tabel	193
3. Bibliografia.....	194

Wykaz skrótów

Stosowane w tekście skróty i symbole aminokwasów oraz grup ochronnych są zgodne z zaleceniami IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, opublikowanymi w *J. Biol. Chem.*, 260, 14, 1985. Ogólnie stosowane skróty i symbole są zgodne z listą zamieszczoną w *J. Org. Chem.*, 65, 21a, 2000 oraz *J. Peptide Sci.*, 5, 465, 1999.

Pozostałe skróty i symbole stosowane w pracy:

A11 – poliklonalne przeciwciało konformacyjne rozpoznające formy oligomeryczne

ACN – acetonitryl

amyBpa – wariant amyliny z wprowadzoną resztą Bpa w pozycji 15 zamiast naturalnie występującej tam fenyloalaniny

AMC - 7-amino-4-metylokumaryna

amyFITC – wariant amyliny z wprowadzoną na *N*-końcu dodatkową resztą β -alaniny oraz fluoroforem FITC

amyNBD – wariant amyliny z wprowadzonym na *N*-końcu fluoroforem NBD

APF - protofibryle pierścieniowe (ang. annular protofibrils)

APP - białko prekursorowe amyloidu (ang. Amyloid Precursor Protein)

Apo E - apolipoproteina E

APS - nadsiarczan amonu

ATP - adenozyno-5'-trifosforan

BACE- enzym rozszczepiający amyloid (ang. β -amyloid cleaving enzyme)

Bpa - *p*-benzoilo-L-fenyloalanina

BSA – surowicza albumina bydłęca (ang. bovine serum albumin)

c-20S – proteasom 20S swobodnie krążący w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (ang. circulating 20S)

CCA - kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy

CD - dichroizm kołowy (ang. Circular Dichroism)

CE – elektroforeza kapilarna (ang. Capillary Electrophoresis)

ChT-L – aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu

C-L – aktywność kaspazopodobna proteasomu

CPE - karboksypeptydaza E (ang. carboxypeptidase E)

cryo-EM - mikroskopia krioelektronowa (ang. cryo-Electron Microscopy)

CTR – receptor kalcytoniny (ang. calcitonin transmembrane receptor)

DHB - kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy

DIC - *N,N'*-diizopropylkarbodiimid

DIPEA - *N,N*-diizopropylamina

DLS - dynamiczne rozpraszanie światła (ang. Dynamic Light Scattering)

DMAP - 4-dimetyloaminopirydyna

DMEM – pożywka do hodowli komórek ssaczych (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMF - dimetyloformamid

DMSO - dimetylosulfotlenek

DOL - stopień wyznakowania (ang. degree of labeling)

DSSO - bis(2,5-diokspiroolidyn-1-ylo)-3,3'-sulfinylodipropionian

DTNB - kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy

DTT - ditiotretiol

EC50 – połowa maksymalnego stężenia efektywnego

EDTA - wersenian disodowy

EPR - elektronowy rezonans paramagnetyczny (ang. Electron Paramagnetic Resonance)

Et₂O - eter dietylowy

EV-20S – proteasom 20S zamknięty w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (ang. extracellular vesicles 20S)

EOF - przepływ elektroosmotyczny (ang. electroosmotic flow)

FITC - 5-izotiocyjan fluoresceiny

FTIR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier-transform infrared spectroscopy)

Fmoc – grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa

HATU - heksafluorofosforan 1-[bis(dimetyloamino)metyleno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pirydyniowy

HCOOH - kwas mrówkowy

HCTU - heksafluorofosforan O-(1H-6-chlorobenzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy

HEK293-T - linia embrionalnych komórek ludzkiej nerki zawierających antygen T SV40 (ang. human embryonic kidney 293T)

HEPES - kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

HFIP - 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-ol

HOBt - 1-hydroksybenzotriazol

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high performance liquid chromatography)

HSPG - proteoglikan siarczan heparanu

IAA - jodoacetamid

IAPP – amyлина (ang. islet amyloid polypeptide)

IDE – enzym degradujący insulinę (ang. insulin degrading enzyme)

IDP - białka wewnętrznie nieuporządkowane (ang. intrinsically disordered proteins)

IDR – region wewnętrznie nieuporządkowany (ang. intrinsically disordered regions)

IFG – nieprawidłowa glikemia na czczo (ang. impaired fasting glycaemia)

IGT – upośledzona tolerancja glukozy (ang. impaired glucose tolerance)

K_m – stała Michaelisa

LALS – niskokątowy detektor rozpraszania światła (ang. Low-Angle Light Scattering)

LIF – detektor fluorescencji indukowanej laserem (ang. Laser Induced Fluorescence)

MeOH - metanol

MST – termoforeza mikroskalowa (ang. Microscale Thermophoresis)

MTT - bromek metylotiazolilodifenylotetrazoliowy

NADPH – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

NaPi – bufor fosforanowy o pH 7,4 zawierający 140 mM NaCl

NBD - 4-chloro-7-nitrobenzofurazan

NEP - neprylizyna

NHS - ester aktywny *N*-hydroksysukcynoimidowy

NMP - *N*-metylo-2-pirolidon

Oxyrna – (hydroksylimino)cyjanooctan etylu

PBS - bufor fosforanowy z solą fizjologiczną

PC 1/3 - prohormon konwertazy 1/3

PC2 - prohormon konwertazy 2

PDA – detektor wykorzystujący matrycę fotodiodową (ang. photo diode array)

PDI - polidyspersyjność

PEG – polietylenoglikol

PICUP – rodzaj fotosieciowania niemodyfikowanych białek (ang. photo-induced cross-linking of unmodified proteins)

PVDF - fluorek poliwinylidenu

RAMP – białko modyfikujące aktywność receptora (ang. receptor activity modifying protein)

RALS - detektor rozpraszania światła pod kątem prostym (ang. Right-Angle Light Scattering)

RI – detektor refraktometryczny (ang. refractive index)

RuBpy - chlorek tris(2,2'-bipirydylo)rutenu(II)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxxygen species)

SAA – serum amyloidu A (ang. Serum Amyloid A)

SAP - serum amyloidu P (ang. Serum Amyloid P)

SDS - dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE - elektroforeza żelowa w warunkach denaturujących

SEC – chromatografia wykluczenia (ang. Size Exclusion Chromatography)

SEM – wartość błędu standardowego średniej arytmetycznej (ang. standard error of the mean)

SWATH – sekwencyjna akwizycja okienkowa widm fragmentacyjnych wszystkich jonizujących analitów (ang. Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra)

T1DM – cukrzyca typu 1 (ang. Type 1 Diabetes Mellitus)

T2DM – cukrzyca typu 2 (ang. Type 2 Diabetes Mellitus)

T-4157 – poliklonalne przeciwciało rozpoznające fragment sekwencji 25-37 ludzkiej amyliny

TAPS - kwas [tris(hydroksymetylo)metyloamino]propanosulfonowy

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. Transmission Electron Microscopy)

TEMED - tetrametyloetylenodiamina

TFA - kwas trifluorooctowy

ThT – tioflawina T

TIPS – triizopropylosilan

T-L – aktywność trypsynopodobna proteasomu

TRIC - zmiany intensywności fluorescencji związane z temperaturą (ang. Temperature-Related Intensity Change)

TRICINE - *N*-[1,3-dihydroksyy-2-(hydroksymetylo)propan-2-ylo]glicyna

TRIS - 2-amino-2-(hydroksymetylo)-propano-1,3-diol

UFLC - ultraszybka chromatografia cieczowa (ang. Ultra-Fast Liquid Chromatography)

UHPLC – ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. Ultra-High Performance Liquid Chromatography)

UPR - odpowiedź na niesfałdowane białko (ang. Unfolding Protein Response)

UPS - system ubikwityna-proteasom (ang. Ubiquitin-Proteasome System)

V_{max} – maksymalna szybkość reakcji

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organisation)

I Założenia i cel pracy

Postępujący w ostatnich latach dynamiczny rozwój tendencji do prowadzenia niehigienicznego stylu życia, obejmujący swym zasięgiem coraz większą populację ludzi, skutkuje szeregiem patologii. Alarmujące dane przedstawiane przez WHO klasyfikują obecnie pewne jednostki chorobowe, kiedyś związane z dojrzałym wiekiem, jako choroby cywilizacyjne. Przykładem jest grupa schorzeń znanych pod nazwą „amyloidozy”, które diagnozowane są u coraz młodszych osób, co stanowi wyzwanie dla medycyny. Niepokojący jest również fakt, że coraz większym zasięgiem charakteryzuje się cukrzyca typu 2, która stanowi prawdziwą plagę w obecnych czasach. Jako przyczynę rozwoju tej choroby przez długi czas uważano wyłącznie nieprawidłowość w wydzielaniu insuliny, a także jej błędne oddziaływanie z receptorami insulinowymi zlokalizowanymi na powierzchni komórek, uniemożliwiające wnikanie glukozy z krwi do ich wnętrza.

Nowe spojrzenie na cukrzycę typu 2 nastąpiło po odkryciu złogów agregacyjnych u ponad 90% pacjentów chorujących na tę chorobę, co zapoczątkowało rozpatrywanie jej w kontekście amyloidozy. Obecność agregatów wiąże się z faktem, iż w odpowiedzi na wydzielanie insuliny następuje współwydzielanie drugiego z hormonów trzustkowych – amyliny. Występujący w cukrzycy typu 2 brak prawidłowej odpowiedzi komórek na wydzielaną insulinę powoduje dalszą stymulację komórek β trzustki do jej produkcji, a tym samym również do zwiększonego wydzielania amyliny. Ze względu na swoją silnie hydrofobową budowę amyлина wykazuje wysokie tendencje agregacyjne, a więc długotrwały wzrost jej stężenia w organizmie stanowi poważne zagrożenie amyloidozą.

Obecnie wiadome już jest, że swój udział w rozwoju cukrzycy typu 2 mają oba z hormonów trzustkowych produkowanych przez komórki β . Insulina została już zbadana i obszernie opisana w literaturze, a za jej odkrycie przyznano Nagrodę Nobla. Natomiast drugi z hormonów - amyлина, jest zdecydowanie słabiej scharakteryzowany.

Poznane fakty o natywnej strukturze amyliny, złożonej z regionów nieuporządkowanych, sugerują, że w kontrolę proteolityczną poziomu tego białka jest zaangażowany proteasom 20S. Wiadomo bowiem, że rdzeń katalityczny 20S pełni funkcję kontrolną w odniesieniu do białek, które na skutek braku/utraty struktury drugorzędowej wykazują tendencje do tworzenia potencjalnie toksycznych form oligomerycznych. Niewystarczająco efektywne działanie enzymu może upośledzać proces tej kontroli i skutkować postępującą agregacją. Opublikowana w 2018 roku praca

grupy Smitha [1] przedstawia korelację między aktywnością proteasomu 20S a obecnością białek agregujących, takich jak α -synukleina, zmutowana wersja huntingtyny, czy peptyd A β . Naukowcy udowodnili, że w przypadku każdej z tych biocząsteczek hamujące działanie względem zdolności proteolitycznych enzymu wykazują tworzące się w początkowych etapach agregacji rozpuszczalne oligomery, posiadające epitop rozpoznawany przez przeciwciało konformacyjne A11. Te cechy wspólne wyraźnie wskazują na podobny mechanizm blokowania aktywności proteasomu przez oligomery, który skutkuje zwiększającym się stężeniem oligomeryzującego białka i jeszcze szybszą jego agregacją. Można przypuszczać, że podobny mechanizm występuje też w przypadku amyliny.

W związku z powyższym głównym celem mojej pracy doktorskiej była charakterystyka przebiegu oligomeryzacji amyliny, a następnie zbadanie wpływu jej oligomerów na aktywność proteolityczną proteasomu 20S. Przy wykazaniu zakładanego, hamującego działania amyliny na proteasom, w kolejnym kroku chciałam wykorzystać związki peptydomimetyczne o charakterze aktywującym zdolności proteolityczne proteasomu, aby móc przełamywać tę inhibicję.

Realizację założonych celów rozpoczęłam od syntezy ludzkiej amyliny, a następnie optymalizacji eksperymentu badającego przebieg jej oligomeryzacji. Do charakterystyki tworzących się form oligomerycznych zastosowałam techniki badawcze zarówno w warunkach natywnych, jak i denaturujących, wykorzystując do ustabilizowania oligomerów sieciowanie chemiczne oraz fotosieciowanie. W kolejnym kroku zbadalam siłę oddziaływania rozpuszczalnych oligomerów amyliny z proteasomem 20S, który samodzielnie wyizolowałam z ludzkiej krwi. Wyznaczone wartości EC50, wskazujące na silne oddziaływanie między oligomerami a enzymem, stanowiło punkt wyjścia dla próby zdefiniowania miejsca ich wzajemnej interakcji. W celu realizacji tego zadania zsyntezowałam wariant amyliny z resztą fotosieciującą i wykorzystałam dwie niezależne techniki: sieciowanie chemiczne połączone ze spektrometrią mas oraz mikroskopię krioelektronową. Określenie zdolności amyliny do oddziaływania z proteasomem 20S skłoniło mnie do weryfikacji wpływu tej interakcji na jego aktywność proteolityczną. W tym celu przeprowadziłam szereg badań z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych substratów fluorogenicznych, wyznaczając między innymi kinetykę inhibicji. Wykonałam też testy badające oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem A11. Przy wykorzystaniu peptydomimetyków z puli naszych najlepszych aktywatorów

sprawdziłam, czy możliwe jest przewyciężenie inhibicji h20S przez oligomery. Powyższe badanie przeprowadziłam nie tylko na wyizolowanym proteasomie 20S, ale także w lizacie ludzkich komórek HEK293-T. Ponadto zweryfikowałam cytotoksyczność frakcji zawierających niskocząsteczkowe oligomery amyliny względem tej linii komórkowej. W kolejnym etapie zbadalam, czy oligomery amyliny o niskiej masie cząsteczkowej mogą być substratem dla proteasomu 20S, oraz czy posiadane przez nas związki aktywujące są w stanie stymulować ich proteolizę.

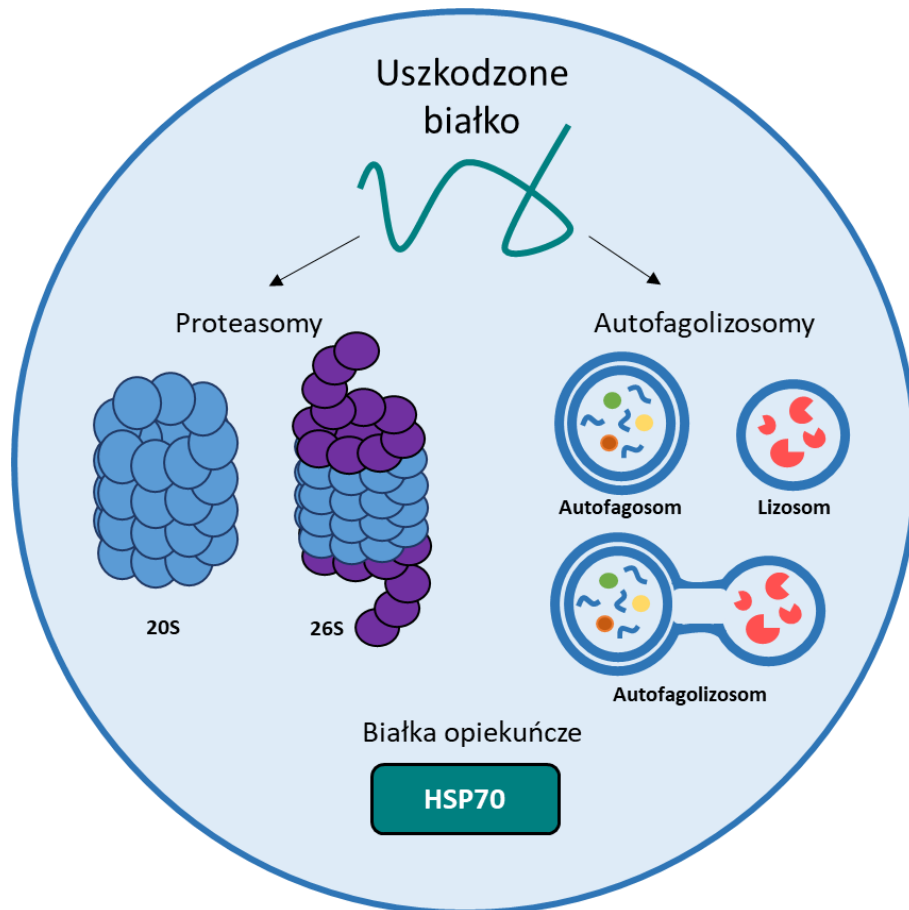
Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań mogą rzucić nowe światło na mechanizmy przyczyniające się do rozwoju cukrzycy typu 2. Rozpatrywanie tej jednostki chorobowej w kontekście amyloidozy sprawia, że w jej terapii należałoby uwzględnić metody zapobiegania agregacji białek. Skuteczność peptydomimetycznych aktywatorów w przełamywaniu inhibicji proteasomu i pobudzaniu degradacji oligomeryzujących białek może stanowić dobre podłoże dla opracowywania nowych terapii w leczeniu amyloidozy związanej z cukrzycą typu 2, a tym samym zmniejszyć negatywne skutki tej choroby.

II Wstęp literaturowy

1. Systemy proteolityczne

Ludzki organizm to niezwykle skomplikowana struktura, na którą składa się niezliczona liczba komórek ściśle połączonych ze sobą funkcjami. W obrębie każdej z nich jednocześnie przebiega wiele procesów, a równowaga w ich zachodzeniu jest kluczowa dla prawidłowego działania całego organizmu. Równowaga ta nazywana jest homeostazą. Składa się na nią między innymi metabolizm białek, czyli procesy ich syntezy i degradacji proteolitycznej. Proteiny, ze względu na swoje zdolności do tworzenia form wyżej ustrukturyzowanych, można podzielić na te o stabilnej strukturze trójwymiarowej, a także na takie, w których występują fragmenty nieuporządkowane (ang. *IDR- intrinsically disordered regions*) [2].

Tego rodzaju naturalnie nieustrukturyzowane białka, zwane IDP (ang. *intrinsically disordered proteins*), stanowią nawet 40% białek kodowanych [3]. Oprócz IDP występują też białka, które tracą natywną strukturę na skutek różnych, niepożądanych procesów, takich jak nieprawidłowe fałdowanie lub obróbka potranslacyjna, co wpływa na utratę ich funkcjonalności [4]. Upośledzona w swojej strukturze proteina nie może oddziaływać z celem molekularnym, co powoduje że nie zostaje ona wykorzystana w przemianach i tym samym może ulegać odkładaniu. Organizm ludzki, aby zapobiegać zaleganiu takich białek, wykształcił w toku ewolucji dwa podstawowe systemy degradacji proteolitycznej: autofagolizosomalny i proteasomalny, co prezentuje Rysunek 1. W kontrolę jakości białek zaangażowane są również białka opiekuńcze zwane „chaperonami”, które wspomagają pracę systemów proteolitycznych poprzez nadzór nad poprawnością fałdowania protein [5], [6]. Prawidłowa praca wszystkich układów związanych z syntezą, fałdowaniem i degradacją jest warunkiem utrzymania homeostazy białek.



Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie systemu kontroli proteolitycznej w organizmie ludzkim.

Jedną ze ścieżek degradacji jest autofagia. Proces ten jest indukowany w znaczącym stopniu przez stres siateczki śródplazmatycznej. Schemat rozpoczyna się od etapu otoczenia podwójną membraną nieprawidłowo sfałdowanej proteiny, co prowadzi do utworzenia autofagosomu. Połączenie takiej struktury z lizosomem prowadzi do powstania autofagolizosomu i degradacji uwięzionego w jego strukturze białka [7]. Jedną z odmian autofagii jest agregofagia, występująca przy pojawiających się w cytozolu niepożądanych strukturach fibrylarnych [8].

Odpowiedzią komórek na zwiększającą się obecność nieprawidłowo sfałdowanych białek jest wzrost stresu komórkowego i tym samym aktywacja systemu UPR (ang. *unfolding protein response*). Rolą tego systemu jest stymulacja pracy białek opiekuńczych do lepszej kontroli fałdowania protein podatnych na tworzenie dysfunkcyjnych struktur, ograniczenie syntezy wszystkich białek, za wyjątkiem tych wspomagających pracę UPR, a także kierowanie już upośledzonych strukturalnie białek na szlak degradacji proteasomalnej [9]. Szlak ten odpowiada za proteolizę nawet 80-90% wszystkich protein, w zależności od stanu fizjologicznego organizmu [10]. Jednym

z powodów, dla których białko nie może być substratem proteasomu jest jego wielkość. Jeśli ma ono postać wielopodjednostkową lub zagregowaną, ze względu na rozmiar kanału katalitycznego proteasomu nie może zostać zdegradowane tym szlakiem i jest substratem dla systemu lizosomalnego [5].

1.1. Proteasom 20S i jego funkcje

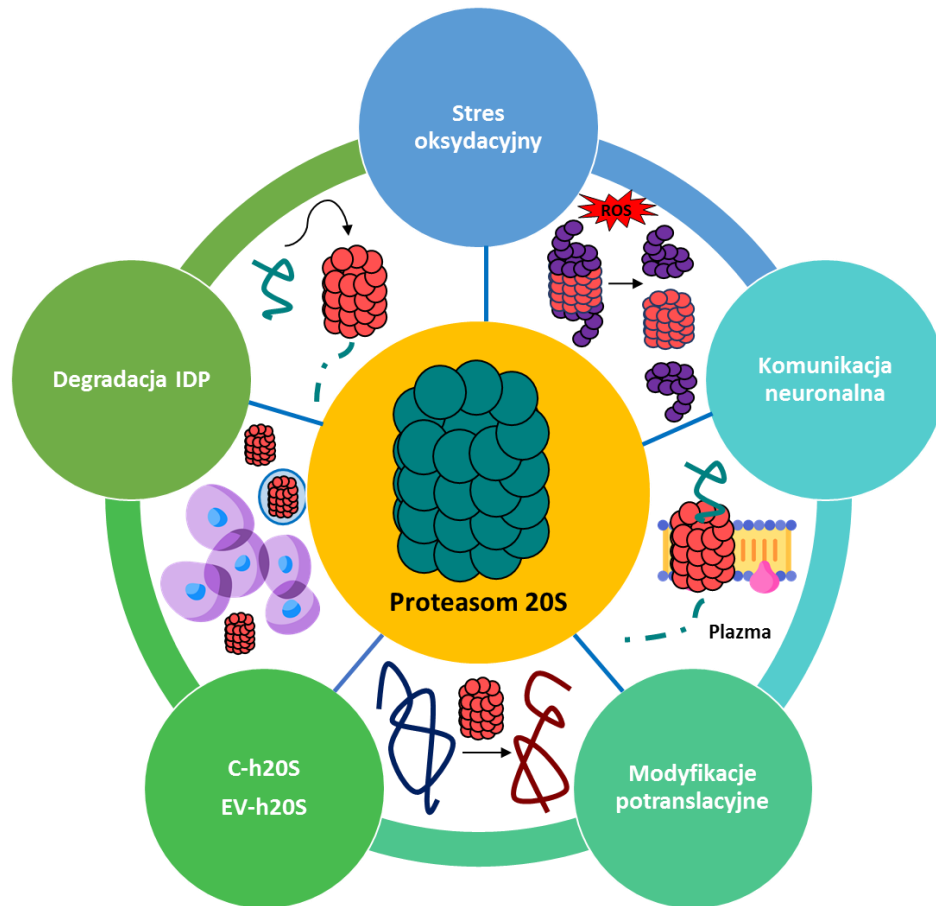
Proteasom zlokalizowany jest głównie w cytozolu oraz w jądrze komórkowym [11]. Może on występować w formie wolnej cząstki rdzeniowej (20S) lub w postaci kompleksów z aktywatorami 11S, PA200 lub 19S. Proteasom 20S połączony z aktywatorem 19S tworzy strukturę zależnego od ubikwityny i ATP proteasomu 26S. Według niektórych źródeł co najmniej połowę wszystkich układów proteasomalnych stanowi sama cząstka rdzeniowa [12]. Zaobserwowano również, że proteasom 20S jest formą dominującą w przypadku obecnego w wielu patologiach stresu komórkowego [13]. W takich stanach obserwuje się gwałtowne obniżenie poziomu endogennego ATP [14], co ma bezpośredni wpływ na wzrost NADPH jako głównego elementu biorącego udział w dezaktywacji reaktywnych form tlenu - ROS (ang. *reactive oxygen species*) [15]. Ograniczenie ilości ATP prowadzi do faworyzowania procesów od niego niezależnych, jakim jest proteoliza realizowana przez proteasom 20S [16]. W związku z powyższym, szczególnie w początkowych etapach stresu oksydacyjnego, obserwuje się dezintegrację kompleksu proteasomu 26S do samego rdzenia 20S [13]. W proces tej dysocjacji zaangażowane jest również białko opiekuńcze Hsp70, które odpowiada za stabilizację odłączanego regulatora 19S, a także za ponowne utworzenie kompleksu 26S po minięciu stresu oksydacyjnego [17]. Z przeprowadzonych badań wynika, że co najmniej 20% wszystkich białek podlega proteolizie przez proteasom 20S [18]. Głównym kryterium dla skierowania białka na ten szlak jest brak lub częściowy brak struktury, co umożliwia wnikanie do komory katalitycznej bez konieczności uprzedniego rozfałdowania. Wynika to w głównej mierze z rozmiarów bramy proteasomu, utworzonej z *N*-końców podjednostek α (ang. *α -annulus*). Ze względu na różnice w budowie między proteasomami organizmów eukariotycznych i archeonów obserwuje się inny zakres ich możliwości proteolitycznych. Występująca u archeonów swobodniejsza struktura α -bramy umożliwia trawienie większej grupy białek, ze względu na ich stosunkowo swobodne przemieszczanie się do kanału katalitycznego. Natomiast obecna w organizmach eukariotycznych wysoce zorganizowana struktura α -bramy, której średnica może być nawet 2 razy mniejsza niż średnica komory enzymatycznej, ogranicza

wnikanie protein do centrum enzymatycznego [19]. Ściśle kontrolowany proces sprawia, że w obrębie substratów ludzkiego proteasomu 20S znajdują się dwie grupy białek. Pierwszą z nich są białka natywnie nieuporządkowane (IDP) lub posiadające fragmenty o nieuporządkowanej strukturze [20]. Do drugiego rodzaju można zaliczyć proteiny, które pod wpływem stresu oksydacyjnego, mutacji lub procesów starzenia, utraciły swoją pierwotną strukturę. Ze względu na dużą skłonność takich białek do ulegania procesom agregacji, są one wysoce niebezpieczne, a zaburzenia w ich degradacji mogą w łatwy sposób prowadzić do wielu patologii [21].

Proteasom 20S angażuje się nie tylko w degradację nieuporządkowanych strukturalnie białek, ale także w procesy potranslacyjne, dzięki którym białko zyskuje nową strukturę i, co za tym idzie, funkcjonalność [22]. W głównej mierze proces ten opiera się na endoproteolizie fragmentów nieuporządkowanych, IDR. Przykład stanowi białko p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym. Jedną z jego wielu poznanych izoform stanowi wariant pozbawiony w wyniku obróbki proteasomalnej *N*-końcowych 39 reszt aminokwasowych. Tak utworzone białko ma zdolność do tworzenia

oligomerycznych form z pełną izoformą p53, co w konsekwencji wpływa na obniżenie aktywności transkrypcyjnej [23].

Opisane powyżej funkcje proteasomu nie są jedynymi, co schematycznie podsumowuje Rysunek 2.



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie procesów komórkowych, w które zaangażowany jest proteasom 20S. Opracowanie własne na podstawie [22].

Interesującym odkryciem było zaobserwowanie proteasomów transmembranowych, zlokalizowanych w obrębie błon komórkowych neuronów [24]. Jego nietypowe umiejscowienie ma na celu degradację biosyntezy wewnątrzkomórkowo białek i uwalnianie ich na zewnątrz komórki w postaci aktywnych neuroprzekazników [25]. Nietypowe jest również występowanie proteasomów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [26]. Dotychczas nie zostało poznane ich dokładne pochodzenie, a tylko dwa rodzaje zostały scharakteryzowane. Pierwszym jest proteasom swobodnie krążący w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, tzw. c-20S (ang. *circulating 20S*). Jego poziom wzrasta w przypadku schorzeń związanych z układem odpornościowym, takich jak choroby autoimmunologiczne, sepsa czy nowotwory [27], [28], [29]. Dokładna fizjologia c-20S

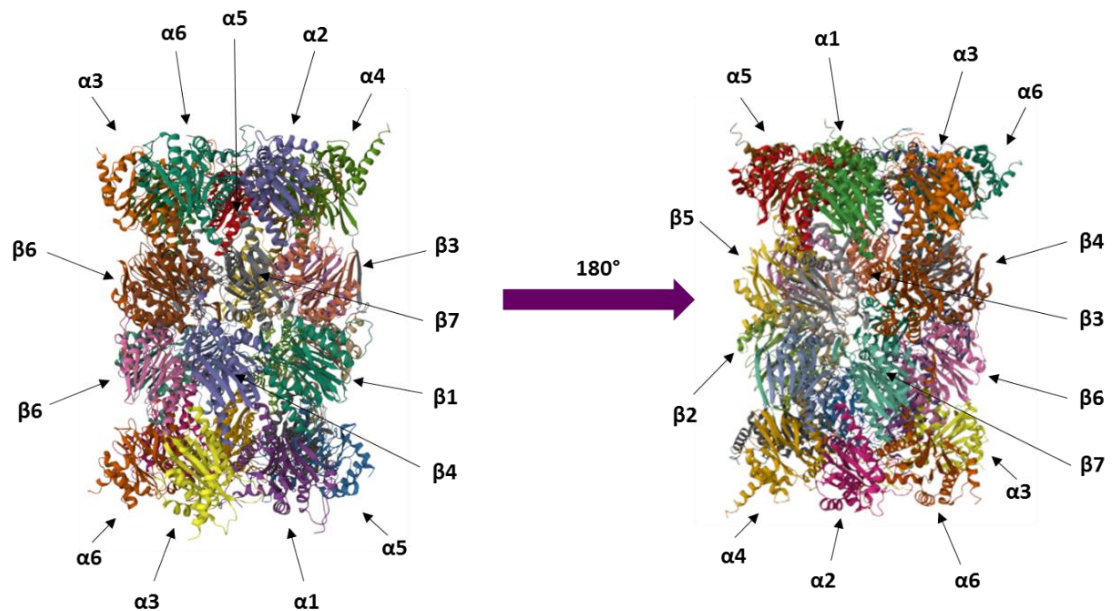
nie jest poznana, natomiast zmiany jego stężenia w zależności od stanów chorobowych stanowią podstawę do stosowania c-20S jako biomarkera tych patologii [26]. Drugim typem zewnątrzkomórkowych proteasomów są takie, których struktura zamknięta jest w pęcherzykach lipidowych, tzw. EV-20S (ang. *extracellular vesicles 20S*). Przypuszcza się, że forma proteazy osłoniętej membraną służy do jej transportu między komórkami [30], ale także zaobserwowano zaangażowanie EV-20S w produkcję przeciwciał decydujących o przyjęciu narządu po przeszczepie [31]. Ze względu na dotychczasowe większe zainteresowanie naukowców badaniami proteasomów wewnątrzkomórkowych, dane dotyczące form zewnątrzkomórkowych są wciąż niewystarczające, aby poznać w pełni specyfikę ich działania.

1.1.1. Budowa proteasomu 20S

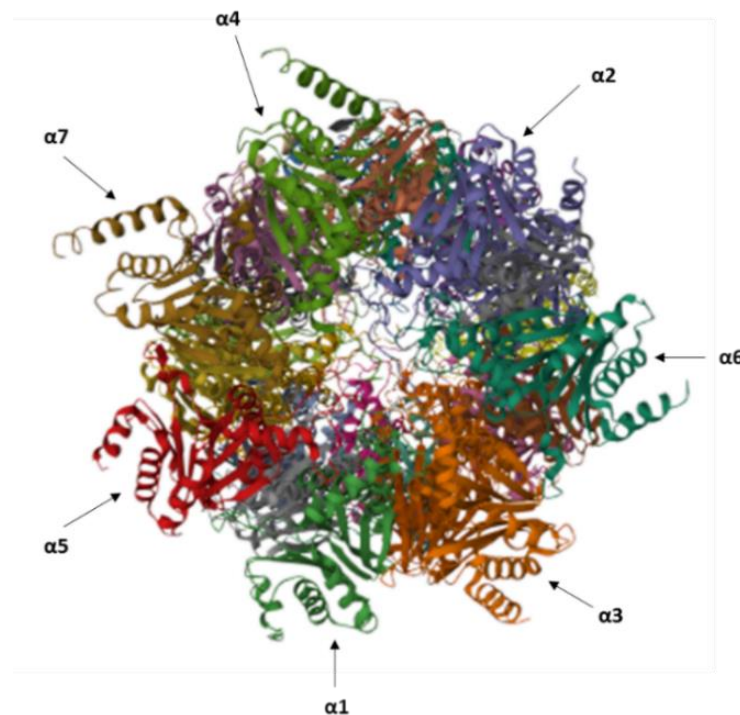
Proteasom 20S o masie bliskiej 700 kDa i wymiarach 160 x 100 Å przypomina kształtem beczułkę, na którą u eukariotów składają się dwie pary heptamerycznych pierścieni ułożonych w sekwencji $\alpha\beta\alpha$ (Rysunek 3A). Masa cząsteczkowa pojedynczej podjednostki mieści się w granicach 20-30 kDa. Wewnętrzny segment, utworzony z podjednostek β , buduje komorę katalityczną, osłoniętą po obu stronach pierścieniami α [32]. Spośród siedmiu podjednostek β trzy wykazują zdolności proteolityczne i są to: $\beta 1$ o aktywności kaspazopodobnej, $\beta 2$ - trypsynopodobnej oraz $\beta 5$ - chymotrypsynopodobnej [33]. Kryterium decydującym o właściwościach enzymatycznych danej podjednostki jest rodzaj reszty aminokwasowej występującej w pozycji 45 w kieszeni substratowej S1. Preferencje $\beta 1$ względem reszt o charakterze kwasowym wynikają z obecności w tej pozycji argininy. W przypadku podjednostki $\beta 2$ występująca w pozycji 45 glicyna pozwala na swobodne układanie się stosunkowo długich łańcuchów bocznych zasadowych reszt aminokwasowych. Metionina w podjednostce $\beta 5$ ze względu na swoją ruchliwość ułatwia dostosowywanie wielkości apolarnej kieszeni substratowej do obszernych reszt hydrofobowych [34]. Triada katalityczna proteasomu 20S składa się odpowiednio z reszt Thr1, Lys33, Asp/Glu17 [35]. Nukleofilowa Thr1 jest miejscem, które inicjuje hydrolizę wiązania peptydowego w proteinie poddawanej degradacji enzymatycznej [36]. Podjednostki α , choć nie posiadają miejsc aktywnych, również są niezbędne w procesie proteolizy, między innymi do kontroli migrujących do wnętrza struktury proteasomu substratów [37]. Odbywa się to przez zmianę pozycji labilnych *N*-końców podjednostek α . Mogą one tworzyć zamkniętą strukturę, uniemożliwiając proteolizę białek (Rysunek 3B), bądź pod

wpływem oddziaływania z naturalnymi regulatorami proteasomu ulegać rozsunięciu, tworząc strukturę otwartej lub częściowo otwartej α bramy [36].

A

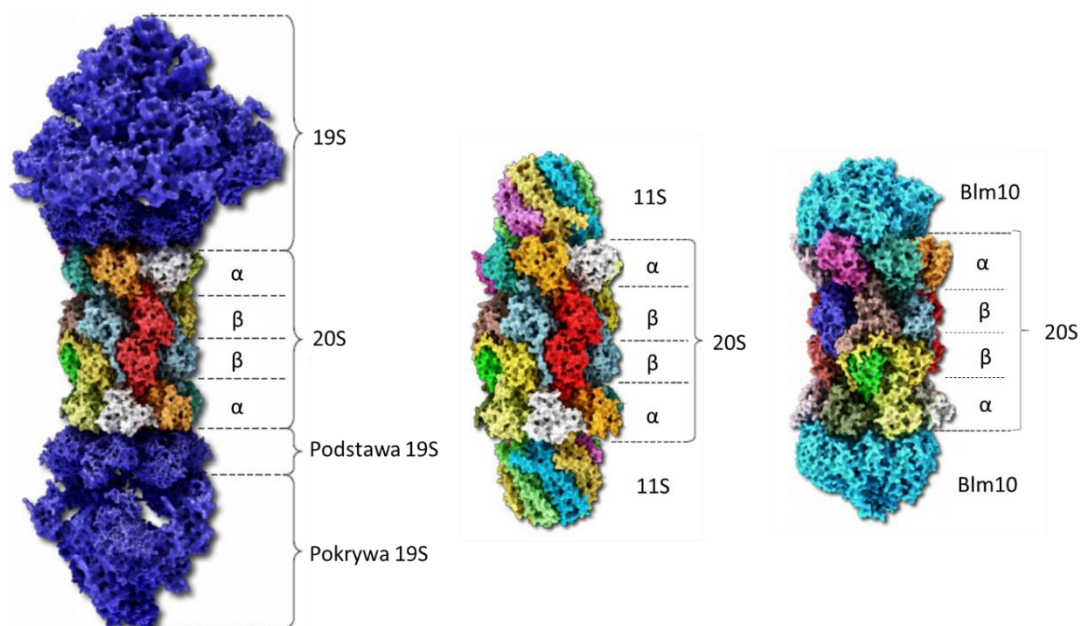


B



Rysunek 3. Struktura krystaliczna konstytucyjnego ludzkiego proteasomu 20S (PDB: 4R3O), A. widok z boku, B. rzut z góry. Na obrazie B wyraźnie widoczna jest α brama h20S zamknięta przez przeplatające się N -końce podjednostek α .

Elementem łączącym wszystkie typy naturalnych aktywatorów proteasomu jest ich mechanizm działania. Opiera się on na przesunięciu Pro17, co wpływa na ułożenie *N*-końców podjednostek α w taki sposób, że możliwe jest dotarcie substratów do komory proteolitycznej [38]. Pośród naturalnie występujących modulatorów aktywności proteasomu 20S można wyróżnić trzy typy aktywatorów (PA) oraz dwa inhibitory. Do związków o stymulującym wpływie należą PA700 (19S), PA200 (i jego drożdżowy ortolog Blm10) oraz PA28 (11S) (Rysunek 4), natomiast hamującym wpływem charakteryzują się PI31 oraz PR39 [39], [40]. Jako pierwsze opisane w literaturze zostały aktywatory [41], natomiast większą uwagę w początkowych badaniach skupiono nad związkami o charakterze hamującym aktywność proteolityczną h20S. W 1992 roku DeMartino i współpracownicy jako pierwsi opisali PI31 [42]. Mechanizm działania tego białka polega na konkurowaniu z regulatorem PA28 o miejsce wiązania z proteasomem [43]. Drugi z poznanych inhibitorów charakteryzuje się z kolei niekompetycyjnym mechanizmem działania. PR39 to stosunkowo krótki, bo 39-resztowy peptyd, zdolny do wiązania się w obrębie podjednostki $\alpha 7$ ludzkiego proteasomu (h20S), co wpływa na strukturę enzymu, uniemożliwiając mu oddziaływanie z aktywatorem 19S [40].



Rysunek 4. Struktury kompleksów proteasomu 20S z naturalnymi aktywatorami jego zdolności proteolitycznych [44].

1.2. Naturalne regulatory proteasomu

1.2.1. 11S

W większości organizmów regulator ten jest znany pod nazwą PA28/ REG lub PA26 w przypadku pierwotniaka *Trypanosoma brucei*. PA28 może być zbudowany z trzech typów podjednostek: α , β i γ [45], sekwencyjnie homologicznych w 50% [46]. Charakterystyczne dla tego aktywatora jest tworzenie się heteroheptamerycznych kompleksów zbudowanych z podjednostek α i β , oraz kompleksów homoheptamerycznych składających się wyłącznie z podjednostek γ . Ma to związek z odmienną lokalizacją poszczególnych podjednostek: podczas gdy zarówno PA28 α , jak i PA28 β zlokalizowane są głównie w cytozolu, PA28 γ najliczniej występuje w jądrze komórkowym [47]. Badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazały, iż PA28 tworzy na proteasomie 20S symetryczne struktury, przypominające kształtem ścięty stożek [48]. Wyróżniający dla tego regulatora jest mechanizm aktywacji proteasomu. 11S wykorzystuje C-końce swoich siedmiu podjednostek jedynie aby zakotwiczyć się w obrębie każdej z kieszeni między podjednostkami α enzymu. Znajdujące się strukturalnie w pobliżu, swobodnie wystające, 6-resztowe fragmenty 11S, zwane pętlami aktywującymi, przesuwają Pro17 we wszystkich podjednostkach α o 0,5-3,5 Å, tym samym inicjując otwarcie α -bramy proteasomu [49].

1.2.2. PA200

Mianem PA200 określany jest ssaczy odpowiednik drożdżowego regulatora Blm10, z którym dzieli 20% sekwencji. Cechą wyróżniającą ten modulator jest jego monomeryczna postać. W wyniku oddziaływania z proteasomem tworzy on podłużną, zakrzywioną formę, dopasowując się do cylindrycznego kształtu 20S [50], [51]. Jest odpowiedzialny w głównej mierze za hydrolizę peptydów, szczególnie po resztach aminokwasowych o charakterze kwasowym [52]. Wyjątkowa lokalizacja PA200, tylko w obrębie jąder komórkowych, może wskazywać na jego zaangażowanie w procesy kontroli jakości materiału genetycznego. Potwierdzeniem jest obecność tego modulatora szczególnie w nasieniu i jądrach [53], a także obserwacja, że pojawienie się warunków szkodliwych dla komórek indukuje powstawanie PA200 i jego kondensację w obrębie chromatyny [54], [55]. Proces aktywacji proteasomu przez PA200, jak i Blm10 odbywa się z udziałem charakterystycznego motywu HbYX znajdującego się na ich C-końcu. HbYX jest to układ, w którym dowolna reszta zwińczająca peptyd poprzedzona jest

resztą tyrozyny i kolejno resztą aminokwasową o charakterze hydrofobowym. Podobny poziom aktywacji obserwuje się, gdy w pozycji przedostatniej zamiast tyrozyny występuje reszta fenyloalaniny [56]. Modulator PA200 do aktywacji proteasomu wykorzystuje dwa punkty zakotwiczenia w obrębie kieszeni wiążących. Jednym z nich jest oddziaływanie jego C-końcowego motywu HbYX z podjednostkami $\alpha 5$ i $\alpha 6$, a drugim wiązanie się fragmentu aminokwasowego tworzącego pętlę pomiędzy podjednostkami $\alpha 1$ i $\alpha 2$. Podwójne związanie w dwóch odrębnych rejonach ma wpływ na szereg przesunięć, a to z kolei skutkuje szerokim otwarciem bramy proteasomu. Nieosiowe ułożenie modulatora sprawia jednak, że częściowo zasłania on dostęp do bramy proteasomu, przez co degradacji mogą ulegać jedynie peptydy, a nie białka [55]. W przypadku drożdżowego regulatora Blm10 obecność motywu HbYX umożliwia jego wiązanie między podjednostkami $\alpha 5$ i $\alpha 6$ proteasomu oraz jego oddziaływanie przez tworzenie mostka solnego z Lys66 z podjednostki $\alpha 6$. Powoduje to przesunięcie Pro17 w podjednostce $\alpha 5$, bez wpływu na położenie tej reszty w pozostałych podjednostkach, czego wynikiem jest częściowe otwarcie α -bramy proteasomu [49]. Poza działaniem aktywacyjnym modulator Blm10 bierze także udział w dojrzewaniu proteasomów poprzez stabilizację ich tworzącej się struktury [57]. Zaobserwowano również stymulujący wpływ na aktywność proteasomu przy jednostronnym dołączeniu Blm10 do rdzenia katalicznego, a przeciwny przy obustronnym [58]. Interesujące jest również odkrycie, że aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu, związana z podjednostką $\beta 5$, zmienia się pod wpływem połączenia z regulatorem PA200 w aktywność trypsynopodobną, ze względu na zmianę charakteru kieszeni wiążącej S1 i umożliwienie wiązania się w jej obrębie również reszt o charakterze zasadowym [59].

1.2.3. 19S

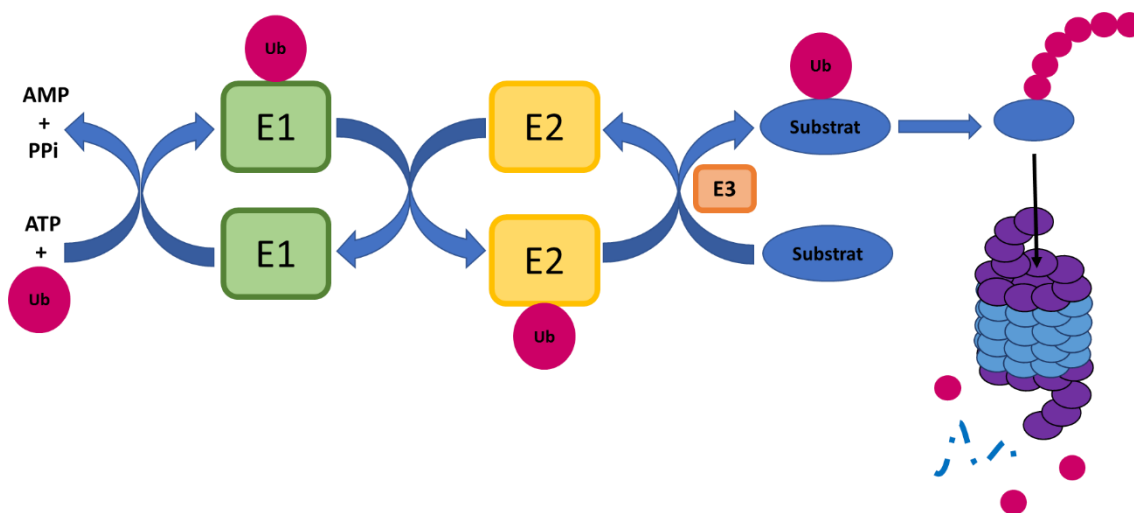
Nazewnictwo regulatora 19S również nie ogranicza się tylko do jednej opcji; zamiennie używa się określenia PA700, a w przypadku organizmów prokariotycznych popularna jest nazwa PAN [45]. W przeciwieństwie do dwóch powyżej opisanych modulatorów działanie aktywatora 19S zależne jest od energii w postaci ATP. Wynika to z funkcji tego regulatora, powiązanej z jego strukturą, na którą składają się dwa elementy: podstawa oraz pokrywa (Rysunek 4). Główną funkcją pokrywy jest deubikwitynacja substratu przeznaczonego do trawienia. W jej składzie tylko jedna z dziewięciu podjednostek (Rpn3, 5-9, 11, 12, 15) wykazuje aktywność proteolityczną. Podjednostka Rpn11 o charakterze metaloizopeptydazy jest zaangażowana w proces usuwania

ubikwityny. Odszczepia ona cały łańcuch poliubikwityny, a w dalszych etapach, pod wpływem innych enzymów, ulega on monomeryzacji i tym samym recyklingowi [60]. Bezpośredni kontakt z pierścieniem α proteasomu ma podstawa. Tworzą ją podjednostki Rpn1, Rpn2, dwie podjednostki będące receptorami ubikwityny - Rpn10 i Rpn13 oraz pierścień sześciu podjednostek Rpt zależnych od ATP [61]. Ułożenie ich względem siebie nie jest przypadkowe i występuje w kolejności: Rpt1-Rpt2-Rpt6-Rpt3-Rpt4-Rpt5 [62]. Sam proces aktywacji opiera się na wiązaniu się C-końca regulatora 19S między podjednostkami α proteasomu, co powoduje ich obrót o 4° i zamknięcie kieszeni wiążącej. Wynikiem tej rotacji jest otwarcie bramy proteasomu. Niezbędnym elementem w działaniu powyższego modulatora jest przyłączenie się ATP do podjednostek od niego zależnych. Powoduje to zmiany strukturalne w obrębie regulatora, w wyniku których dochodzi do zwiększenia ekspozycji wolnych C-końców i tym samym szansy na aktywację proteasomu [19]. Istotna rola C-końców w procesie stymulowania aktywności proteasomu wynika ze znajdującego się w ich obrębie konserwatywnego motywu HbYX, podobnie jak w przypadku regulatora Blm10 [56]. Motyw ten występuje w połowie podjednostek z pierścienia ATP-az (Rpt2, Rpt3, Rpt5). W przypadku działania regulatora PA700 jedną z zagadek pozostaje sposób, w jaki stabilizuje on konformację otwartej bramy proteasomu. Wynika to z dysproporcji w oddziaływaniu układu sześciu ATP-az regulatora 19S z siedmioma podjednostkami α -pierścienia h20S [63]. Podejrzewa się, że przyłączenie pierścienia ATP-az zmienia położenie N-końców podjednostek α , w wyniku czego następuje ich przesunięcie w stronę aktywatora. Taki układ angażuje cztery kluczowe reszty aminokwasowe (Tyr8, Asp9, Pro17, Tyr26), zlokalizowane na obrzeżach kolejnych podjednostek α , do tworzenia struktur przypominających klaster, który zwiększa stabilność otwartej bramy [64], [65].

1.3. System proteolityczny zależny od ubikwityny (UPS)

Cechą charakterystyczną dla systemu UPS (ang. *ubiquitin-proteasome system*) jest, jak sama nazwa wskazuje, obecność niewielkiego peptydu - ubikwityny. Jest to proteina zbudowana z 76 reszt aminokwasowych, która w toku ewolucji zachowała niezwykle wysoką konserwatywność sekwencyjną - nawet do 95% między gatunkami roślin, zwierząt czy drożdży [66]. Zdolność ubikwityny do oznaczania nieprawidłowo sfałdowanych protein kontrolowana jest przez kaskadę przemian enzymatycznych, przedstawionych schematycznie na Rysunku 5. Pierwszym etapem jest wiązanie ubikwityny przez enzym aktywujący E1. Pozwala to w drugim etapie na jej transfer na

enzym przenoszący E2, który prezentuje ją enzymowi E3. W trzecim kroku jednoczesne oddziaływanie między E3 a celem degradacyjnym i E2 prowadzi do przeniesienia ubikwityny z E2 na docelową proteinę. Wielokrotne powtórzenie całego cyklu prowadzi do powstania białka naznaczonego łańcuchem poliubikwitynowym i skierowania go na ścieżkę degradacji proteasomalnej. Pierwszy z etapów wymaga zużycia ATP, stąd proces degradacji przez szlak proteasomu 26S jest zależny od dostarczenia energii [67], [68].



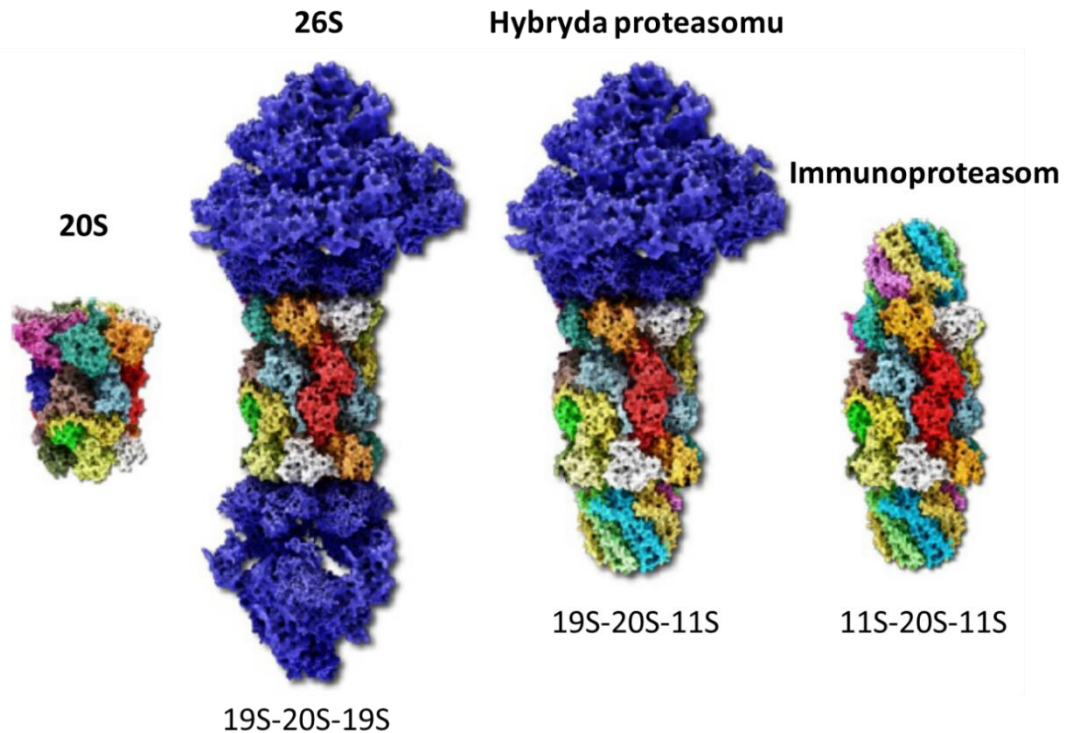
Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie kaskady przemian, towarzyszących degradacji proteasomalnej na szlaku ubikwitynozależnym. Opracowanie własne na podstawie [69].

Wybór substratów do proteolizy determinowany jest przez obecność degronów, określanych także mianem sygnałów destrukcyjnych [70]. Mogą być nimi fragmenty aminokwasowe, naturalnie zlokalizowane wewnątrz struktury białka, które na skutek szeregu zmian ulegają wyeksponowaniu do środowiska. Do warunków przyczyniających się do powstania degronów należą: potranslacyjna obróbka białka, w tym fosforylacja, a także utlenianie podatnych reszt aminokwasowych, mutacje lub zmiany środowiskowe.

1.4. Hybrydy i typy proteasomu 20S

Symetryczna budowa proteasomu 20S w płaszczyźnie poziomej warunkuje możliwość przyłączania się cząstek regulatorowych na obu jego końcach. Wydawać by się mogło, że tylko jeden typ modulatora może się wiązać jednocześnie, natomiast zaobserwowano również tworzenie tak zwanych hybryd. Przykłady takich modyfikacji prezentuje Rysunek 6. Stosunkowo dobrze poznanym przykładem jest proteasom 20S, który z jednej strony oddziałuje z regulatorem 19S, natomiast z drugiej z modulatorem 11S [71]. Obecność takiego układu zwiększa efektywność deubikwitynacji przez 19S substratów przeznaczonych do degradacji, a co za tym idzie, wpływa stymulująco na

aktywność proteolityczną 20S [72]. Postuluje się również, że powyższa struktura hybrydowa zaangażowana jest w metabolizm antygenów. Na podstawie otrzymanych produktów degradacji możliwe jest określenie, czy dana proteina została strawiona przez sam kompleks 26S czy hybrydę 19S-20S-11S [73].



Rysunek 6. Struktury możliwych kompleksów proteasomu 20S z jego modulatorami [44].

2. Amyloidozy

Amyloidy to określenie grupy protein o wysokim stopniu samoorganizacji opartej na strukturach oligomerycznych. Za ich stabilizację odpowiedzialne są głównie wiązania wodorowe, ale nie tylko [74]. Pierwsze użycie sformułowania ‘amyloid’ nastąpiło w 1838 roku, przez botanika niemieckiego Matthiasa Schleidena, w odniesieniu do normalnie występującego, ziarnistego w swojej strukturze składnika roślin. Dopiero ponad 20 lat później (w 1859 roku) stwierdzono, że amyloid to białkowa struktura, a nie, jak wcześniej podejrzewano, struktura zbudowana z węglowodanów [75], [76]. Dalsze badania, głównie z wykorzystaniem metod mikroskopowych, doprowadziły do obecnego stanu wiedzy odnośnie amyloidów. Postulowana początkowo postać amorficzna została zastąpiona wysoce zorganizowaną strukturą złożoną z polimerycznych, nierozgałęzionych struktur β -karkowych [77]. Tworzenie amyloidów nie dotyczy jednej jednostki chorobowej, a jest schematem ogólnym, wiążącym wiele chorób. Obecnie

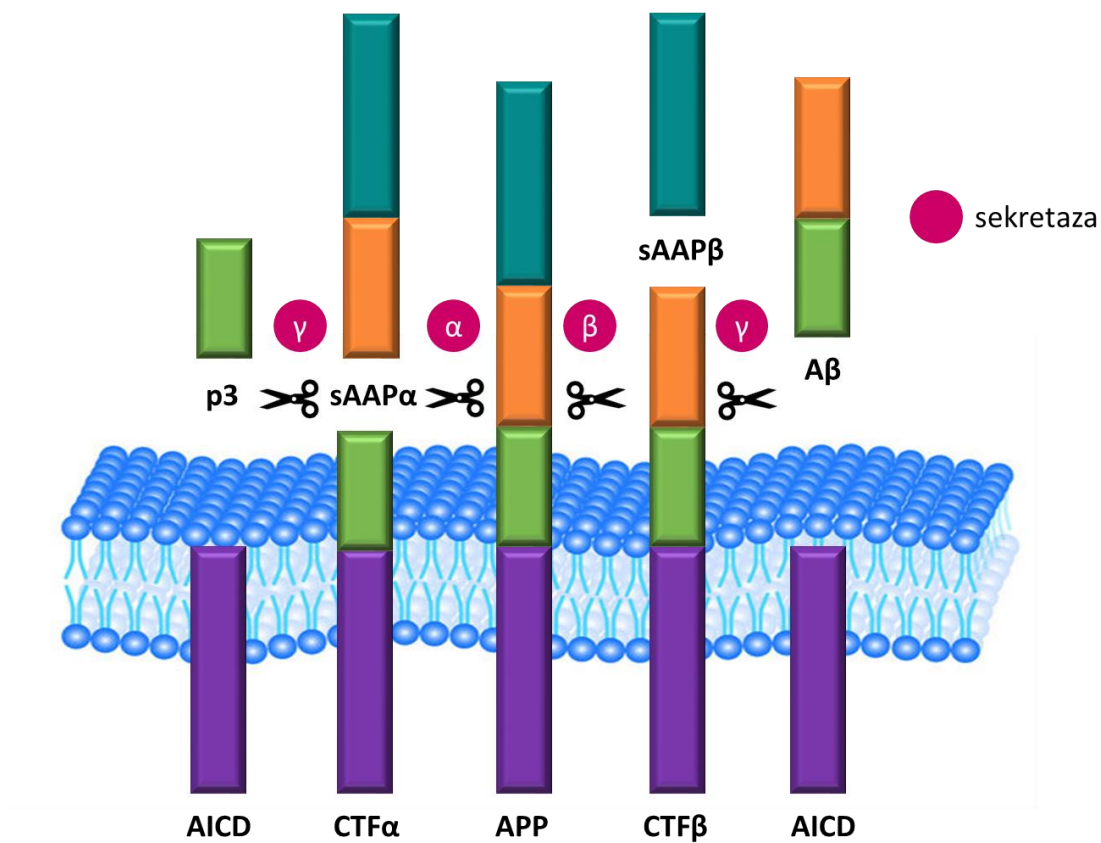
w populacji ludzkiej potwierdzono występowanie więcej niż 25 białek agregujących, związanych z patogenezą różnych jednostek chorobowych [78]. Proces oligomeryzacji rozpoczyna się od tak zwanej fazy opóźnienia (ang. *lag phase*), w której następuje tworzenie niskorzędowych oligomerów, typu dimer czy trimer. W drugim etapie następuje elongacja. Odpowiada ona przyrastającej ilości struktur β -karkowych. Zwieńczeniem oligomeryzacji jest faza wysycenia, podczas której następuje ustalenie się równowagi i utrzymywanie się stałej zawartości fibryli. Przebieg zarówno pierwszego, jak i drugiego etapu oligomeryzacji jest silnie zależny od wielu warunków, między innymi: temperatury, stężenia peptydu/białka amyloidogennego, stężenia soli czy obecności inhibitorów danej fazy [79]. Ze względów strukturalnych amyloidy można podzielić na dwie grupy, z których jedną stanowią te, których białka prekursorowe cechują się nieuporządkowaną strukturą. Drugą odmianą są takie, których białka prekursorowe przed procesem agregacji mają formę globularną [80], [81].

W wyniku obserwacji procesów agregacji wnioskuje się, że są to procesy konkurencyjne do fałdowania białek. W warunkach fizjologicznych organizm lokalizuje amyloidogenne domeny białek, ograniczając ich zdolności agregacyjne, co pozwala na prawidłowe przeprowadzenie procesów fałdowania białka. W przypadku działania niepożądanych proteaz, bądź zmian mutacyjnych, amyloidogeny fragment białkowy może zostać odsłonięty, co skutkuje inicjacją oligomeryzacji. Natomiast w toku ewolucji wykształciło się wiele metod promowania fałdowania białek w opozycji do ich agregacji, co pozwala na utrzymanie prawidłowej fizjologii komórek. Należy do nich między innymi obecność licznych białek opiekuńczych, zdolnych do rozwijania agregatów białkowych [82]. Jeśli następują nieprawidłowości w pracy mechanizmów ochronnych przed niepożądaną agregacją, to dochodzi do wielu patologii w funkcjonowaniu organizmu, znanych pod nazwą amyloidoz.

2.1. Choroba Alzheimera

Jedną z najbardziej kojarzonych chorób związanych z amyloidami jest choroba Alzheimera. Składowymi tej jednostki chorobowej jest zarówno zewnątrzkomórkowe, jak i wewnątrzkomórkowe odkładanie się agregatów. Główną formą zewnątrzkomórkowej agregacji jest odkładanie się blaszek starczych. Utworzone są one w większości przez grupę peptydów oligomeryzujących A β , ale także zwyrodnieniowe aksony i komórki gleju [83], [84]. Peptydy A β powstają jako produkty proteolizy białka prekursorowego amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*, APP). Ta 120 kDa proteina

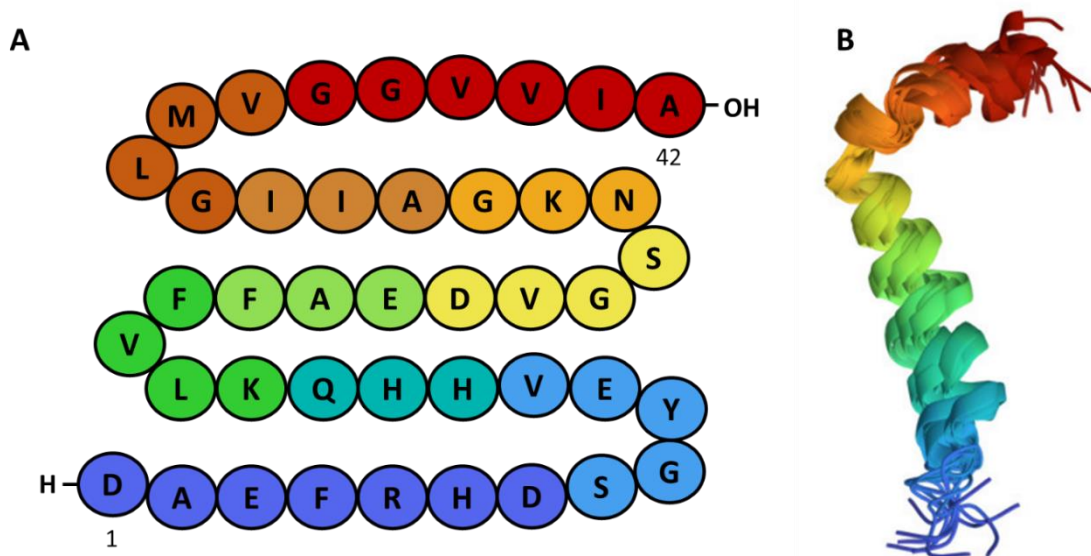
jest przykładem białka transmembranowego o zdolnościach do wiązania jonów miedzi, a także aktywności ferooksydacyjnej. Natomiast zakres jej działania w organizmie nie został jeszcze w pełni poznany [84]. Obróbka enzymatyczna białka APP prowadzi do utworzenia 38-43-resztowych fragmentów peptydowych. O amyloidogenności powstałych produktów decyduje rodzaj enzymów, jakich działaniu zostało poddane APP. W szlak przemian APP zaangażowane są głównie sekretazy: α , β , γ . Pod wpływem działania jako pierwszej α -sekretazy, a następnie γ -sekretazy, powstają krótsze peptydy pozbawione amyloidogennego charakteru. Natomiast jeśli jako pierwsza zadziała β -sekretaza, a po niej γ -sekretaza, to proteoliza następuje w taki sposób, że uwalniany jest zakotwiczony w błonie fragment APP o właściwościach agregacyjnych, co prezentuje Rysunek 7.



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie dwóch szlaków przemian białka APP, prowadzących do powstania produktów nieamyloidogennych (szlak po lewej stronie schematu) oraz amyloidogennych z uwolnieniem peptydów A β (szlak po prawej stronie schematu).

Pośród produktów szlaku amyloidogennego, utworzonych w wyniku działania enzymu BACE (ang. *β -amyloid cleaving enzyme*), wyróżnia się dwa główne peptydy: A β 40 i A β 42, które ściśle związane są z chorobą Alzheimera [84]. Amyloid β 42 posiada najwyższą hydrofobowość, związaną z niepolarną sekwencją jego C-końca. Taka

struktura powoduje, że wykazuje on wysoką zdolność do samoasocjacji, która jest impulsem do dalszej oligomeryzacji [84], [85]. Skład aminokwasowy oraz strukturę przestrzenną A β 42 prezentuje Rysunek 8. Przekształcanie się pierwotnej struktury α -helikalnej w postać β -kartkową prowadzi do łączenia się pojedynczych merów peptydu w wyższe formy oligomeryczne, a następnie do tworzenia form fibrylarnych. W chorobie Alzheimera zaobserwowano, że powstałe fibryle złożone są w 75% z peptydów A β , a pozostałą część stanowią białkowe i lipidowe pochodne cukrów, które wzmacniają trwałość fibryli względem procesów proteolitycznych [86]. Zaobserwowano, że kluczowe znaczenie dla cytotoksyczności ma etap przedfibrylarny. Różnorodność przedfibrylarnych form oligomerycznych jest bardzo duża, od najmniejszych oligomerów, czyli dimerów i trimerów, aż po 12-mery wysoce stabilne w temperaturze fizjologicznej [87], a także formy pierścieniowe o masie przekraczającej 90 kDa, tzw. APF (ang. *annular protofibrils*) [85]. U osób chorych na chorobę Alzheimera obserwuje się także odkładającą się postać amorficzną, która wykazuje zdolność do pozytywnej reakcji w testach fluorymetrycznych, co sugeruje, że może być ona zaczątkiem dla tworzących się fibryli [88].



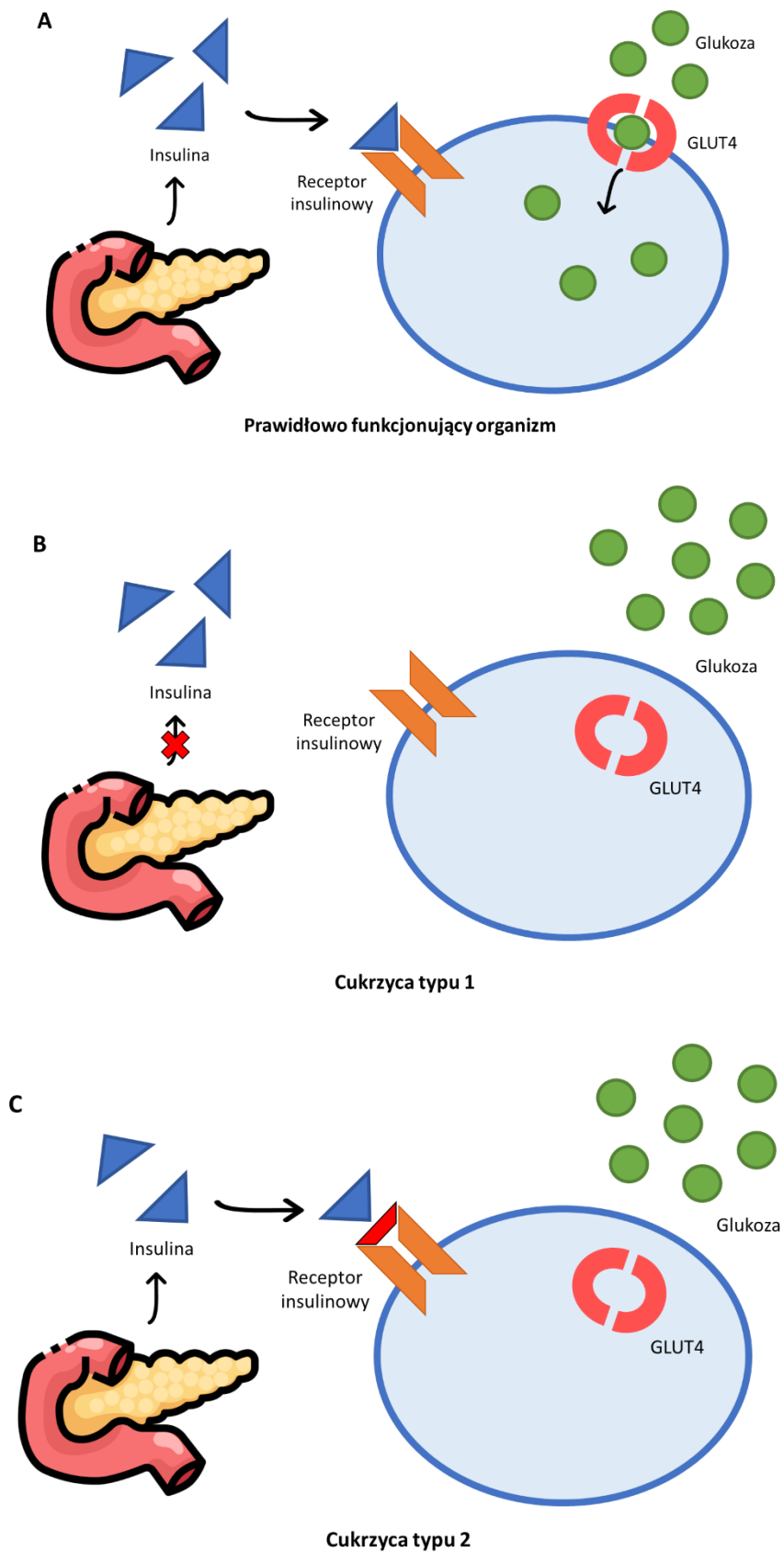
Rysunek 8. Sekwencja peptydu A β 42 (A) oraz jego struktura przestrzenna (B) wyznaczona techniką NMR (PDB: 1IYT).

Drugą składową agregacji w chorobie Alzheimera jest wewnątrzkomórkowe odkładanie się hiperfosforylowanego białka tau. Obecność takich agregatów zaobserwowano również w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku dezintegracji uszkodzonych neuronów. Rolą białka tau w organizmie jest kontrola nad procesem tworzenia się mikrotubul, które są odpowiedzialne za dostarczanie substancji

odżywczych do neuronów. Reszty seryny oraz treoniny (Ser202, Ser404, Thr205, Thr231) białka tau ulegają naturalnej fosforylacji pod wpływem kinaz, co zapewnia im możliwość stabilizacji tworzących się mikrotubul. W przypadku zaburzeń homeostazy, w tym nadekspresji kinaz, dochodzi do nadmiernej fosforylacji białka tau, co skutkuje brakiem możliwości jego oddziaływania z mikrotubulami. W kolejnym etapie destabilizacja całego układu prowadzi do nieprawidłowego odżywienia neuronów i w konsekwencji ich obumierania. Gromadzące się znaczne ilości tau skutkują jego agregacją i odkładaniem się w postaci spletków neurofibrylarnych. Jedną z hipotez badawczych mówi o zaangażowaniu peptydów A β w upośledzenie procesu fosforylacji białka tau [89], [90]. Zaskakujący jest fakt, że obecność agregatów A β , jak i spletków neurofibrylarnych stwierdzono w obrębie innych organów niż mózg, między innymi w trzustce [91].

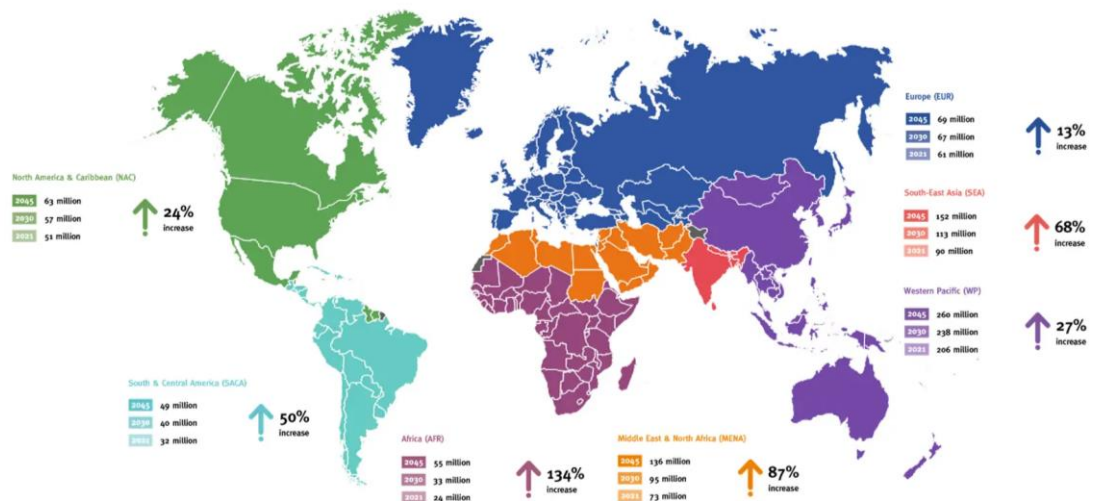
2.2. Cukrzyca

W świetle danych Światowej Organizacji Zdrowia cukrzyca jest wielonarządową chorobą przewlekłą, której towarzyszy stale utrzymujący się, podwyższony poziom glukozy w krwioobiegu, zwany hiperglikemią, a także zaburzenia w produkcji, bądź działaniu insuliny. Insulina jest jednym z hormonów trzustkowych bezpośrednio zaangażowanych w procesy regulacji poziomu cukru w organizmie. Antagonistą działania insuliny jest drugi z hormonów trzustkowych, zwany amyliną, którą alternatywnie określa się skrótem IAPP (*ang. islet amyloid polypeptide*) Ze względu na zaburzenia na szlaku wydzielania czy prawidłowego oddziaływania insuliny z komórkami, cukrzycę dzieli się na cztery typy, z czego najbardziej znane są typ I oraz II, których mechanizmy przebiegu przedstawione zostały na Rysunku 9. Ponadto wyróżnia się również cukrzycę ciążową, która pojawia się w wyniku zmian hormonalnych związanych z rozwojem płodu i zanika wraz z porodem [92]. Prawie 20 lat temu w literaturze został opisany nowy typ cukrzycy określony typem 3. Model ten powstał, ponieważ jest połączeniem cech charakterystycznych dla obu pozostałych typów. Wśród nich wyróżnić można występującą insulinooporność, która wynika z niewystarczającej liczby receptorów insulinowych, a także zaburzeń w ich szlaku sygnałowym. Towarzyszy jej niższy poziom glukozy, a także niższe stężenie białka tau, które jest zależne od insuliny [93]. Cukrzyca typu 3 zwana jest również cukrzycą wtórną, ponieważ jej rozwój wynika z postępu innych chorób, takich jak choroba Cushinga, akromegalia czy przewlekłe zapalenia trzustki [94].



Rysunek 9. Schematy przedstawiające zaburzenia występujące w cukrzycy typu 1 (B) oraz cukrzycy typu 2 (C) względem prawidłowo funkcjonującego organizmu (A). Opracowanie własne na podstawie [95].

Dane dotyczące skali problemu jakim jest cukrzyca są zatrważające. Według WHO choroba ta była bezpośrednią przyczyną zgonu aż 1,5 mln ludzi na świecie w 2019 roku [96]. W przedstawionym w 2015 roku raporcie Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej zaprezentowano dane wskazujące, iż pacjenci cukrzycomi stanowili 1 na 11 osób. Prognozy kształtowały się w taki sposób, że do 2040 roku miała to być już co 10 osoba. Zgodnie z przedstawionymi w 2021 roku danymi tej organizacji realne dane wyprzedziły w znaczący sposób prognozy, ponieważ to co miało wydarzyć się w 2040 roku stało się faktem już w 2021 roku. Cukrzyca dotknęła w 2021 roku 540 mln ludzi na całym świecie. Obecne prognozy mówią, że do 2045 roku chorować będzie już co ósma osoba [97]. Światowe statystyki odnośnie rozpowszechnienia cukrzycy przedstawia Rysunek 10. Ponadto istotne znaczenie w rozwoju cukrzycy mają jej stany pośrednie. Należą do nich wadliwość przyswajania glukozy (ang. IGT - *impaired glucose tolerance*) lub nieprawidłowe jej poziomy na czczo (ang. IFG - *impaired fasting glycemia*). Pozbawiony symptomów charakter obu tych stanów rzutuje na liczną grupę osób nieświadomych swojej choroby. W związku z brakiem diagnozy osoby takie nie są uwzględnione w statystykach, a utajona progresja w prosty sposób prowadzi do rozwoju cukrzycy i wielu innych powikłań [98].



Rysunek 10. Światowe statystyki dotyczące cukrzycy oraz prognozy rozwoju tej jednostki chorobowej na przestrzeni najbliższych lat, przedstawione przez Międzynarodową Federację Diabetologiczną.

Diagnostyka cukrzycy opiera się na weryfikacji poziomu glukozy we krwi na czczo (norma do 99 mg/dl) oraz 2 godziny po spożyciu 75 g glukozy rozpuszczonej w 250 ml wody (norma do 140 mg/dl). Wartość powyżej 140 mg/dl, ale nie przekraczająca

200 mg/dl świadczy o nietolerancji glukozy, co może być już stanem przedcukrzycowym. Wynik przekraczający 200 mg/dl jest jednoznacznym stwierdzeniem cukrzycy. Przedstawione dane dotyczą norm ogłoszonych w 2022 roku przez Polskie Towarzystwo Medycyny Rodzinnej [99]. Symptomami, które mogą świadczyć o utrzymującym się stanie hiperglikemii i rozwoju cukrzycy są: częstomocz, zwiększone uczucie pragnienia, utrata masy ciała mimo stałego, bądź zwiększonego apetytu, ogólne osłabienie, senność oraz podatność na infekcje, w szczególności układu moczowego [94]. Regularne badania zalecane są szczególnie osobom ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy, czyli z obciążeniem genetycznym, otyłością czy nadciśnieniem tętniczym [100].

2.2.1. Cukrzyca typu 1

Cukrzyca typu 1 (ang. T1DM - *Type 1 Diabetes Mellitus*) zwana jest też insulinozależną, ponieważ charakteryzuje się niedoborem zarówno insuliny, jak i amyliny, co wynika z prawie całkowitego braku u chorych komórek β trzustki [98]. Cukrzyca typu 1 jest też określana cukrzycą wieku młodzieńczego, ponieważ najczęściej diagnozuje się ją u dzieci i młodzieży do 17 roku życia. Dotyczy ona od 1 do 2 przypadków na 1000 osób [101]. Szacuje się, że może ona stanowić zaledwie od 5 do 10% wszystkich typów cukrzycy [98]. Etiologia choroby nie została jeszcze poznana, chociaż obserwuje się silną zależność między zachorowalnością a obecnością specyficznego allelu HLA, co sugeruje, że najważniejszym czynnikiem są predyspozycje genetyczne [102]. Za podłoże choroby uznaje się autoimmunologiczne mechanizmy destrukcyjne o nie do końca poznany przebiegu. Charakterystycznym elementem dla cukrzycy typu 1 jest obecność w organizmie przeciwciał skierowanych przeciw komórkom wysp trzustki lub bezpośrednio przeciwko samej insulinie [103]. Leczenie pacjentów wymaga wielokrotnego podawania w ciągu dnia insuliny w postaci zastrzyków lub przy pomocy pomp insulinowych, a także dodatkowo utrzymywania prawidłowej diety [104].

2.2.2. Cukrzyca typu 2

Cukrzyca typu 2 (ang. T2DM - *Type 2 Diabetes Mellitus*) to rodzaj choroby metabolicznej złożonej z szeregu dysfunkcji, w skład których wchodzi: zaburzenia wydzielania insuliny, insulinooporność, czyli brak prawidłowego oddziaływania insuliny z jej receptorem, a także utrata komórek β trzustki w następstwie amyloidogenego działania amyliny [105], [106]. Nazywana jest cukrzycą wieku późnego, ponieważ

szacuje się, że nawet 30% osób po 65 roku życia zmaga się z tą chorobą. W ciągu ostatnich dziesięcioleci obserwuje się niepokojący trend związany z rozwojem tej jednostki chorobowej wśród coraz młodszych ludzi. Przyczyn takiego zjawiska upatruje się w postępie cywilizacyjnym, który w tym przypadku głównie wiąże się ze zmianą trybu życia na siedzący i oparty o dietę wysokokaloryczną [107]. Skala wszystkich powyższych zmian doprowadziła do ogłoszenia przez WHO cukrzycy typu 2 jako pandemii XXI wieku. T2DM odpowiada za większość spośród typów cukrzycy, bo stanowi nawet 95% wszystkich przypadków i jest przyczyną śmierci co 20-tej osoby po 70 roku życia [108].

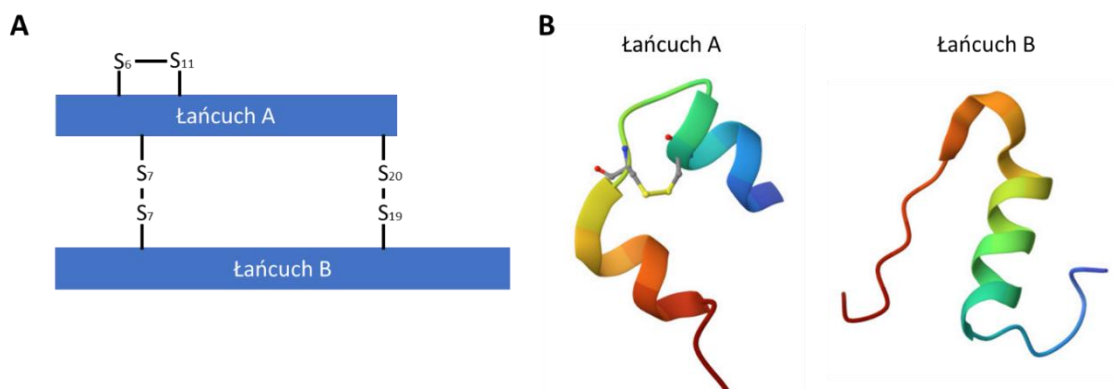
Ogólny mechanizm cukrzycy typu 2 wiąże się z dwoma procesami: utrzymującą się insulinoopornością oraz uszkodzeniami komórek β trzustki [109]. W wyniku zaburzeń na szlaku oddziaływania insulina-receptor insulinowy w pierwszych etapach choroby prawidłowo funkcjonujące komórki β trzustki próbują kompensować insulinooporność poprzez zwiększone wydzielanie insuliny. Wiąże się to z jednoczesną nadprodukcją amyliny, w wyniku czego jej stężenie utrzymuje się na podwyższonym poziomie. Zdolna do agregacji oraz występująca w nadmiarze amyлина rozpoczyna proces oligomeryzacji, czego na początku nie można uchwycić żadną z technik medycznych. W niedługim czasie prowadzi to do odkładania się złogów amyloidowych i uszkodzania komórek β trzustki. Apoptoza kolejnych komórek β trzustki, odpowiedzialnych za wydzielanie hormonów trzustkowych, powoduje spadek ich stężenia do około 4 pM/l. Utrzymujący się niedobór amyliny i insuliny prowadzi do zaburzeń w syntezie glukagonu, co wymusza zwiększenie dostarczania glukozy z jego rozpadu. To z kolei wzmacnia sygnał do wydzielania amyliny [110], [111]. Wydzielanie amyliny dotyczy głównie komórek β trzustki. Zaobserwowano wprowadzić taką zdolność również w przypadku komórek α , ale jedynie w niewielkim stopniu [112].

2.2.3. Insulina

Insulina to hormon peptydowy, który został odkryty w 1922 roku przez dwóch kanadyjskich lekarzy. Rok później zostali oni uhonorowani za to odkrycie Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny [113]. Kolejnym przełomem w badaniach dotyczących insuliny było jej zsekwencjonowanie przez Sangera w 1955 roku, co również zostało docenione w środowisku naukowym przez przyznanie mu trzy lata później Nagrody Nobla. Niezwykle ważny wkład w rozwój wiedzy o insulinie miała również noblistka, Dorothy Crowfoot Hodgkin, która w 1969 roku z wykorzystaniem technik krystalograficznych określiła jej strukturę przestrzenną [114]. Wszystkie

z powyższych odkryć były kluczowe dla poznania mechanizmu leżącego u podstaw rozwoju cukrzycy, a także prowadzenia badań poszukujących odpowiedniego terapeutyku.

Gen odpowiadający za produkcję insuliny zlokalizowany jest w obrębie 11 chromosomu [115]. Zawarta w nim informacja o strukturze insuliny prowadzi do produkcji dipeptydu, zbudowanego z dwóch łańcuchów polipeptydowych - A i B. Utworzone są one łącznie z 51 reszt aminokwasowych (21 reszt łańcucha A oraz 30 reszt łańcucha B), co składa się na masę 5802 Da. Połączenie obu łańcuchów insuliny, a także ich przestrzenne ułożenie przedstawia Rysunek 11. Charakter reszt budujących insulinę odpowiada za jej punkt izoelektryczny (pI) przy wartości pH 5,5. Na strukturę przestrzenną tego białka składa się układ helis, gdzie *N*-końcowa helisa i antyrównoległa *C*-końcowa helisa łańcucha A złączone są z centralną, helikalną domeną łańcucha B przez dwa mostki disulfidowe [116].



Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie połączenia łańcucha A i B insuliny (A), a także ich struktury krystaliczne (PBD: 3I40) (B).

Insulina produkowana jest w rybosomach retikulum endoplazmatycznego w postaci proformy. Pozbycie się sekwencji sygnałowej prowadzi do utworzenia trójwymiarowej struktury, która za pomocą pęcherzyków wydzielniczych migruje z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego. Bogate w cynk środowisko w pobliżu tego organelum skutkuje tworzeniem się stabilnych form heksamerycznych proinsuliny [116]. Pod wpływem działania enzymów następuje ich rozpad z uwolnieniem cząsteczek insuliny oraz *C*-peptydu [117]. Impulsem do wydzielania insuliny przez komórki β trzustki jest podwyższony poziom glukozy. W początkowym etapie, bezpośrednio po spożyciu posiłku, ma ono charakter gwałtowny, który wraz z biegiem czasu ulega stabilizacji do formy mniej intensywnej, ale trwałej. Skokowy charakter wydzielania

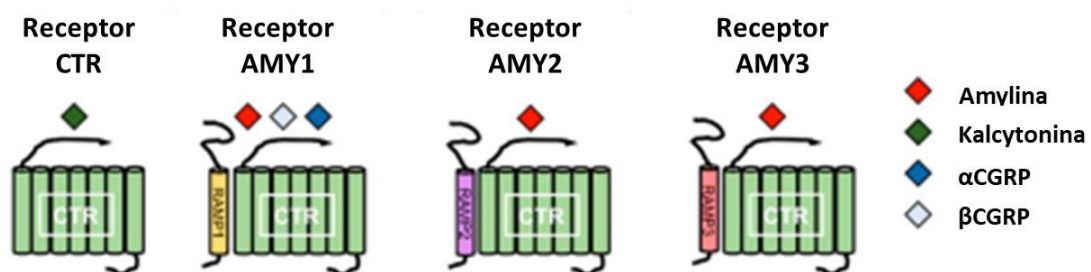
insuliny wynika z pojawiających się pulsacyjnie zmian stężenia glukozy, związanych głównie ze spożywaniem pokarmów [118]. Ze stymulującego działania na produkcję insuliny znana jest również arginina. Oprócz czynników regulatorowych pochodzących z odżywiania, występują również naturalne modulatory wydzielania insuliny, takie jak endogenne hormony o wpływie pobudzającym, jak glukagon czy gastryna lub hamującym - adrenalina czy somatostatyna [119].

Główną rolą insuliny w organizmie jest kontrola poziomu glukozy we krwi, tak aby nie doprowadzić do niekorzystnego stanu hiperglikemii. Jej wydzielanie wpływa stymulująco na syntezę glikogenu poprzez transport glukozy do komórek mięśniowych. Umożliwia to wykorzystanie węglowodanów, zamiast magazynowanych kwasów tłuszczowych, jako źródła energii dla pracujących mięśni [120]. Każdy z funkcjonujących regulatorów wymaga kontroli przez inną molekułę, co zapobiega jego nadmiernej aktywności. Bardziej intensywne niż wymagane przez organizm wydzielanie insuliny może prowadzić do stanów hipoglikemii, czyli zbyt niskiego poziomu cukru we krwi. Aby temu zapobiegać równolegle wydzielany jest hormon o przeciwnych funkcjach, zwany amyliną [79].

3. Amylina

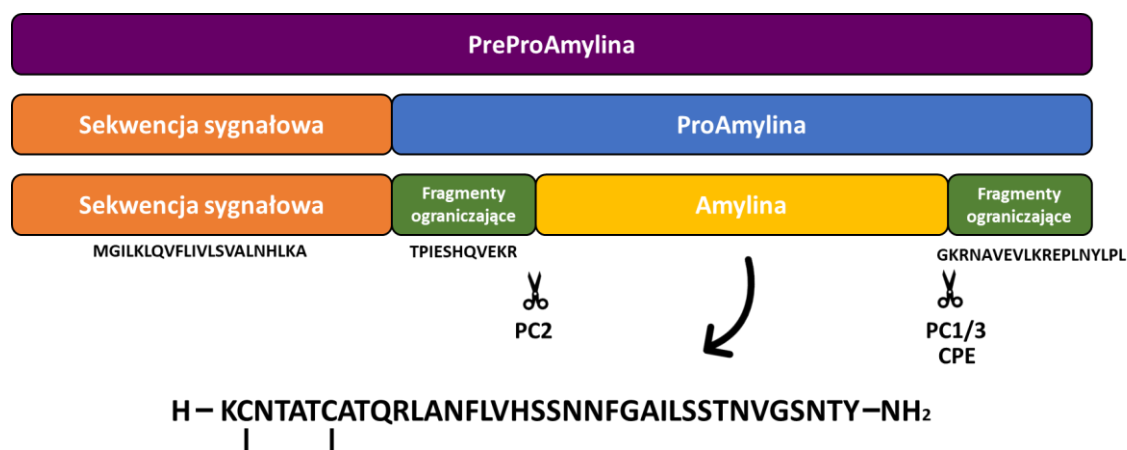
Amylina została po raz pierwszy opisana przez dwóch niezależnych badaczy [79], [121], a mimo to przez wiele kolejnych lat jej sekwencja i właściwości stanowiły zagadkę. Przełomem w badaniach nad amyliną był rok 1986, w którym ustalona została jej częściowa sekwencja oraz wprowadzona nazwa IAPP [122], która wciąż obowiązuje, zamiennie z nazwą amyliną [123]. Poznanie sekwencji przyczyniło się do powstania w 1997 roku pierwszego analogu IAPP - pramlintydu [124], [125] dopuszczonego jako lek w terapii cukrzycy zarówno typu I, jak i II [126]. Jako miejsce wydzielania amyliny w początkowym okresie typowane były jedynie komórki trzustki [127], natomiast w kolejnych badaniach udowodniono jej ekspresję również w obrębie przewodu pokarmowego, głównie na odcinku od żołądka do jelita, a także w komórkach płuc. Największym zaskoczeniem było odkrycie amyliny również w komórkach nerwowych, co udowodniło, że wydzielanie amyliny ma charakter neuroendokryny [88]. Gen odpowiadający za produkcję amyliny zlokalizowany jest w obrębie 12 chromosomu [115].

IAPP należy do grupy kalcytonin, czyli rodziny białek odpowiadających za utrzymanie homeostazy jonów wapnia [79]. Cechami wspólnymi dla kalcytonin jest obecność mostka disulfidowego między 2 a 7 resztą aminokwasową, a także amidowany C-koniec [128]. Powiązanie między tą rodziną białek a amyliną obserwuje się również na poziomie sygnałowym. Receptory białek rodziny kalcytoniny (CTR) należą do wielodomenowych białek transmembranowych zdolnych do tworzenia kompleksu z białkiem RAMP (ang. *receptor activity modifying protein*). Zadaniem tej proteiny jest wpływanie na aktywność receptora względem docierających sygnałów, a także pośredniczenie w migracji receptora w pobliże membrany komórkowej [129]. Schemat budowy białek RAMP jest bardzo podobny, mimo występującej między nimi zaledwie 30% homologii aminokwasowej. Cechują się one trzyczłonową strukturą, która utworzona jest przez: *N*-końcówką, zewnątrzkomórkową domenę z cysteinami, pojedynczy fragment transmembranowy oraz wewnątrzkomórkową część *C*-końcówką. Białko CTR może występować jako autonomiczny receptor kalcytoniny, bądź oddziałując z każdym z białek RAMP tworzyć trzy receptory amyliny - AMY1, AMY2 i AMY3 (Rysunek 12). Dimer CTR z RAMP3 wykazuje największe powinowactwo względem IAPP [130], [131]. Obecność receptorów amyliny w mózgu wyróżnia się pewną specyficznością, ponieważ mogą one występować w obrębie bariery krew-mózg, jak receptor AMY1 lub być zlokalizowane poza nią, jak AMY3. Krążąca we krwi IAPP, w wyniku wiązania się ze swoimi białkami sygnałowymi, indukuje kaskadę kolejnych sygnałów do innych obszarów mózgu, a to prowadzi do sterowania ośrodkiem uczucia sytości i tym samym dalszym wydzielaniem, bądź niewydzielaniem amyliny. Dla zachowania homeostazy istotne jest, że aż 90% komórek zaopatrzonych jest zarówno w receptory amylinowe, jak i receptory glukozy [132].



Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie budowy receptora kalcytoniny, a także receptorów amylinowych utworzonych przez zwiążanie się z nim poszczególnych białek RAMP [133].

Amylina w organizmie jest wydzielana w formie 89-resztowej pre-proteiny. W jej składzie wyróżnić można 22-resztową sekwencję sygnałową, dwa niewielkie fragmenty ograniczające - po 15 reszt aminokwasowych na C- i N-końcu - oraz 37-resztowy fragment stanowiący aktywny rdzeń IAPP [134], [135]. Modyfikacja do aktywnej formy rozpoczyna się od usunięcia w retikulum endoplazmatycznym sekwencji sygnałowej. Następnie proamyлина ulega dalszym przemianom polegającym na odszczepieniu peptydów ograniczających przez działanie trzech proteaz: prohormonu konwertazy 2 (PC2), prohormonu konwertazy 1/3 (PC 1/3) oraz karboksypeptydazy E (CPE), co obrazuje Rysunek 13. Proces ten przebiega w aparatach Golgiego oraz w granulocytach [136], [137]. Do powstania natywnej formy amyliny niezbędne jest jeszcze utworzenie amidu na jej wolnym C-końcu. Ponadto w pełni aktywna IAPP wymaga obecności mostka disulfidowego między drugą a siódmą resztą cysteiny [79]. Drugorzędowa struktura amyliny interpretowana jest w literaturze jako nieuporządkowana [138] z fragmentami helikalnymi w obrębie N-końca [139]. Podejrzewa się, że właśnie ten odcinek jest zaangażowany w oddziaływanie z receptorami, a także ma wpływ na upośledzenie funkcji amyliny przez promowanie jej agregacji [79]. Najnowsze eksperymenty wskazują, że wysoki poziom α -helikalnych form prowadzi do dimeryzacji IAPP, która jest stanem pośrednim w przebiegu dalszej oligomeryzacji [140].



Rysunek 13. Schemat szlaku przemian preproamyliny, prowadzący do utworzenia amyliny. Opracowanie własne na podstawie [141].

Pośród gatunków ssaczych sekwencja aminokwasowa amyliny jest wysoce konserwatywna. Za amyloidogenny charakter ludzkiej amyliny odpowiada głównie fragment 20-29, zwany też amyloidogennym rdzeniem, który w porównaniu z wariantem szczurzym pozbawiony jest reszt proliny, znanej z właściwości antyagregacyjnych.

Występujące sześć różnic w obrębie tego fragmentu między wariantem ludzkim a szczurzym powoduje, że syntetyczny fragment 20-29 ludzkiej amyliny wykazuje ekstremalnie silne właściwości agregacyjne [142]. Zaobserwowano jednak, że nie tylko fragment 20-29 ma charakter amyloidogenny. Wprowadzenie reszty proliny w pozycję 14., zamiast naturalnie występującej tam asparaginy, ogranicza zdolności agregacyjne hIAPP [143], [144]. Ponadto w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii TEM z barwieniem czerwienią Kongo oraz spektroskopii FTIR potwierdzono amyloidogenność C-końcowego fragmentu amyliny, utworzonego z reszt aminokwasowych w pozycjach 30-37 [145]. Środkowa domena zlokalizowana między 14. a 20. resztą aminokwasową charakteryzuje się helikalnością, a także właściwościami amfipatycznymi, co ma również pośredni wpływ na właściwości oligomeryzacyjne tego peptydu [146]. Na podstawie przeprowadzonych badań elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) na mutancie amyliny ze zmodyfikowanymi resztami cysteiny, pozbawionej mostka disulfidowego, ustalono, że odpowiedzialny za agregację elastyczny C-koniec wraz z fragmentem 20-29 nie są bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z błoną komórkową. Wzajemne równoległe ułożenie kolejnych cząsteczek amyliny, wynikające z oddziaływania z błoną ich N-końców, prowadzi do lokalnej koncentracji amyloidogennych fragmentów, co ma wpływ na dalsze etapy agregacji. Fragment 1-19 ludzkiej amyliny, przyjmujący w obecności membran strukturę α -helikalną, ma zdolność do głębokiej penetracji niepolarnego rdzenia błony, co w przypadku wariantu szczurzego nie występuje, a oddziaływanie dotyczy jedynie powierzchni dwuwarstwy. Podobne zachowanie ludzka amylina wykazuje w obniżonym pH [145], [147]. Ciekawy efekt zaobserwowano również wprowadzając modyfikacje w sekwencji szczurzej amyliny. Zamiana reszty Arg18, Asn23 i Val26 na aminokwasy występujące w ludzkiej sekwencji spowodowała pojawienie się słabych zdolności agregacyjnych [148]. Co również ciekawe, w konserwatywności reszt aminokwasowych ludzkiej amyliny zanotowano jedno odstępstwo. Była nim mutacja zaobserwowana wśród populacji azjatyckiej, obejmująca zamianę seryny w pozycji 20. na glicynę. Wnioskuje się, że może ona stanowić czynnik ryzyka w rozwoju cukrzycy typu 2 [149], [150]. Dla tworzenia stabilnych struktur oligomerycznych kluczowe są oddziaływania między resztami aromatycznymi, a także aromatycznymi oraz hydrofobowymi [151]. Wykazano to w eksperymentach, w których zamieniono wszystkie występujące w sekwencji IAPP reszty aromatyczne na reszty leucyny i spowodowało to pięciokrotne zmniejszenie właściwości agregacyjnych [152]. Właściwości reszt aminokwasowych składających się

na sekwencję amyliny powodują, że jej punkt izoelektryczny wynosi 8,90. Zatem w pH fizjologicznym, ze względu na możliwość protonacji Lys1, Arg11 oraz His18, amyлина posiada ładunek dodatni [111].

W prawidłowo funkcjonującym organizmie stężenie IAPP w osoczu wynosi zaledwie od 1 do 2% stężenia insuliny i mieści się w przedziale od 4 do 25 pmol/l [153]. Ze względu na współdzielanie obu tych hormonów, wraz ze wzrastającym stężeniem glukozy we krwi stymulowana jest produkcja ich obu [154]. Powyższy mechanizm wskazuje na rolę amyliny w regulacji metabolizmu glukozy, która polega na antagonistycznym działaniu w stosunku do insuliny. W niedługim czasie po odkryciu IAPP, w badaniach z wykorzystaniem mięśni szkieletowych szczurów zauważono, że pod wpływem działania insuliny amyлина jest zdolna do wychwytywania glukozy i poddawania jej syntezie do glikogenu [123]. Podwójne działanie amyliny względem wydzielanej insuliny zaobserwował również Akesson, wykrywając, iż w przypadku nadmiernej produkcji insuliny IAPP ogranicza jej wydzielanie, natomiast w przypadku homeostazy ma wpływ stymulujący [155]. We wzajemnej relacji między tymi peptydami interesujący jest też inhibicyjny wpływ insuliny na agregację IAPP [156]. Podejrzewa się, że wynika on z oddziaływania helikalnego fragmentu amyliny z łańcuchem B insuliny [157]. Silną inhibicję obserwowano przy proporcji obu białek zawierającej się w zakresie między 5:1 a 100:1 [158]. IAPP ma również za zadanie redukować stężenie glukozy we krwi przez wpływanie na ośrodkowy układ nerwowy w celu ograniczenia uwalniania glukagonu z komórek [79]. Inną z zaobserwowanych funkcji amyliny jest spowolnienie opróżniania żołądka przez stymulację nerwu błędnego, co powoduje dłużej trwające poczucie sytości [159]. Ze względu na tę cechę amyлина nazywana jest również hormonem anorektycznym. Ta jej funkcja ma szczególnie istotne znaczenie w przypadku cukrzycy typu 1, gdzie występuje całkowity brak tego hormonu, co ma patologiczny wpływ na regulację pracy żołądka [160]. Interesujące jest również zaangażowanie IAPP w procesy kościotwórcze. Wysokie podobieństwo strukturalne amyliny do kalcytonin od początku sugerowało możliwość jej udziału w tych samych szlakach. Zostało potwierdzone eksperymentalnie, że jest ona zdolna do hamowania aktywności osteoklastów [161]. Ponadto wykazuje słabsze, ale charakterystyczne dla rodziny kalcytonin, właściwości naczyniowo-rozkurczowe, wpływając na opór obwodowych naczyń krwionośnych [79]. Amyлина również ochrania komórki β trzustki przed uszkodzeniami poprzez poprawę mikrokrążenia trzustkowego oraz ograniczanie

hiperpolaryzacji tych komórek [162]. Wszystkie opisane wyżej funkcje pokazują jak ważna jest obecność IAPP w organizmie, mimo że nie obejmuje to prawdopodobnie wszystkich procesów w jakie może być zaangażowana, ponieważ wciąż nie została poznana jej pełna rola.

3.1. Kontrola proteolityczna i skutki wadliwego funkcjonowania układów degradacyjnych

Zachowanie pożądaných funkcji przez amylinę jest regulowane przez dwa procesy: produkcję oraz degradację [163]. Amylina w odróżnieniu od insuliny, której usuwanie zachodzi w wątrobie, jest metabolizowana przez nerki [153]. IAPP ulega przemianom w organizmie głównie przez działanie dwóch metaloproteinaz, zawierających cynk w swoim rdzeniu. Pierwszą jest białko IDE (ang. *insulin degrading enzyme*), zwane również insulizyną, produkowane przez różne komórki organizmu. Drugim jest neprylizyna (NEP), uwalniana głównie z komórek β trzustki. Ilość powstającego NEP stopniowo zmniejsza się wraz z wiekiem. Cechą wspólną obu enzymów jest zapobieganie cytotoksyczności oligomerów, nie tylko amyliny, ale także peptydu A β , przez ich degradację [164], [165]. Poznanie korelacji między IAPP a IDE pozwoliło na poszukiwanie inhibitorów aktywności tej metaloproteinazy. Inhibicja IDE skutkuje zwiększeniem tolerancji na glukozę u myszy poprzez zwiększone wydzielanie amyliny, co przyczynia się do wolniejszego opróżniania żołądka [166]. Niestety, długotrwałe stosowanie takich inhibitorów wiąże się z poważnymi konsekwencjami związanymi z rozregulowaniem pracy podstawowych systemów proteolitycznych [167], [168].

Kontrolę nad agregacją amyliny pełnią również chaperony, które są zdolne do wychwytywania jej cząsteczek [169]. U pacjentów z cukrzycą typu II zaobserwowano wzrost chaperonowego białka szoku termicznego Hsp70 w osoczu [170]. Ma to ściśle powiązanie z dysfunkcją autofagowych systemów degradacyjnych, co wiąże się z odkładaniem fibryli amyloidowych [169]. Ladjimi zauważył, że wzrost stężenia Hsp70 może być mechanizmem obronnym odpowiadającym na stres oksydacyjny, gdyż białko to ma zdolność do hamowania agregacji IAPP [171].

Interesujące w kontekście kontroli proteolitycznej jest zaangażowanie głównych struktur degradacyjnych jakimi są proteasomy. Ich udział w ograniczaniu agregacji został opisany w przypadku białka tau, czy α -synukleiny [172], [173]. W 2018 roku Smith

i współpracownicy skorelowali trzy różne amyloidozy - chorobę Alzheimera, Huntingtona i Parkinsona, przedstawiając wpływ oligomerycznych białek, ściśle związanych z tymi patologiami, na aktywność proteolityczną proteasomów. Udowodnili oni inhibujący wpływ oligomerów na zdolności degradacyjne proteasomu 20S. Zaproponowany przez nich mechanizm opiera się na allosterycznej inhibicji h20S przez oddziaływanie z jego zewnętrznym pierścieniem α trójwymiarowych struktur oligomerycznych o określonej i zbliżonej do siebie konformacji, co wpływa na modulację α -bramy i tym samym ogranicza dostęp substratów do komory katalitycznej [1]. Pierwsze dane literaturowe dotyczące korelacji amyliny z proteasomem sięgają 2007 roku, kiedy Casas i współpracownicy udowodnili spadek aktywności proteasomalnej w trzustkowych liniach komórkowych myszy pod wpływem traktowania ich ludzką amyliną. Podobnego efektu nie zaobserwowano w badaniach z wariantem szczurzym IAPP [174]. W 2016 roku Singh i współpracownicy potwierdzili zaangażowanie systemów proteasomalnych w ścieżkę degradacji amyliny. W swoich badaniach z wykorzystaniem metod immunoprecypitacyjnych wykazali także oddziaływanie amyliny z podjednostką $\alpha 4$ h20S. Ponadto, przy zastosowaniu inhibitora aktywności proteasomu, laktacystyny, potwierdzili zwiększoną cytotoksyczność i wewnątrzkomórkową akumulację amyliny [175]. Przedstawione eksperymenty jednoznacznie wskazują na zaangażowanie proteasomu 20S w degradację amyliny.

Długotrwale utrzymujący się stan hiperglikemii pobudza komórki β trzustki do produkcji amyliny, co powoduje wzrost jej stężenia i przyspiesza agregację [79], [176]. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że dodatek świeżo przygotowanej amyliny powoduje wprawdzie wzrost ekspresji Hsp70, ale i tak już po godzinie od dodania amyliny upośledza w znaczącym stopniu aktywność proteolityczną proteasomu, prowadząc komórkę na szlak apoptozy [174]. Ponadto niedobór białka IDE prowadzi do rozwoju hiperamylinemii, co skutkuje pogłębianiem problemu insulinooporności [177]. Zostało to potwierdzone w badaniach *in vitro*, w których wykazano zwiększoną cytotoksyczność amyliny w sytuacji niedoboru metaloproteiny IDE [167].

Jednym z parametrów świadczących o zaburzeniu procesów degradacyjnych w komórce jest pojawienie się w jej wnętrzu agresomów, zwanych inaczej ciałami inkluzyjnymi. Są to struktury naturalnie występujące zewnątrzkomórkowo, stanowiące magazyn białek takich jak tubulina, czy wimentyna, niezbędnych do tworzenia elementów cytoszkieletu, stąd ich inna nazwa - centrum organizacji mikrotubuli. W skład

agresomu wchodzą również podjednostki 20S, cząsteczki ubikwityny i białka opiekuńczego Hsp70. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy uważa się, że rola agresomów ma charakter cytoprotekcyjny, mają one bowiem na celu gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek i ich agregatów w formie inkluzji w jednym miejscu w komórce, co ogranicza ich nieprawidłowe interakcję z innymi białkami [178], [179]. Z ich działaniem powiązano proteinę zwaną p62, będącą selektywnym receptorem autofagii. Z przeprowadzonych badań wynika, że agresomy powiązane z powyższym białkiem mogą być degradowane przez systemy proteolityczne. Ponadto zaobserwowano ich obecność w komórkach β trzustki, a tworzenie się p62 pozytywnych agresomów, utworzonych ze złogów amylinowych, skutkowało zwiększoną przeżywalnością komórek β , co wskazuje na ich zaangażowanie w przemiany amyliny [180].

3.2. Mechanizmy cytotoksyczności amyliny

Utrzymujący się stan hiperglikemii wraz z nietolerancją glukozy stanowi istotny czynnik promujący proces oligomeryzacji amyliny [181]. Czynnikiem wpływającym na ten proces jest także proteoglikan siarczan heparanu, zwany Perclanem (HSPG), który poprzez wiązanie cząsteczek amyliny przyspiesza jej oligomeryzację oraz odkładanie się agregatów. Obecność HSPG oraz białek, takich jak na przykład patologiczne chaperony, została zaobserwowana w złogach amyloidowych w trzustce [182]. Zlokalizowano w nich ponadto surowicze białko amyloidu A (ang. SAA - *serum amyloid A*), białko P (ang. SAP - *serum amyloid component P*) i apolipoproteinę E (Apo E). SAP może mieć znaczący wpływ na proces agregacji, ponieważ wnioskuje się, że pełni on funkcje stabilizujące amyloid i chroniące go przed strawieniem [111].

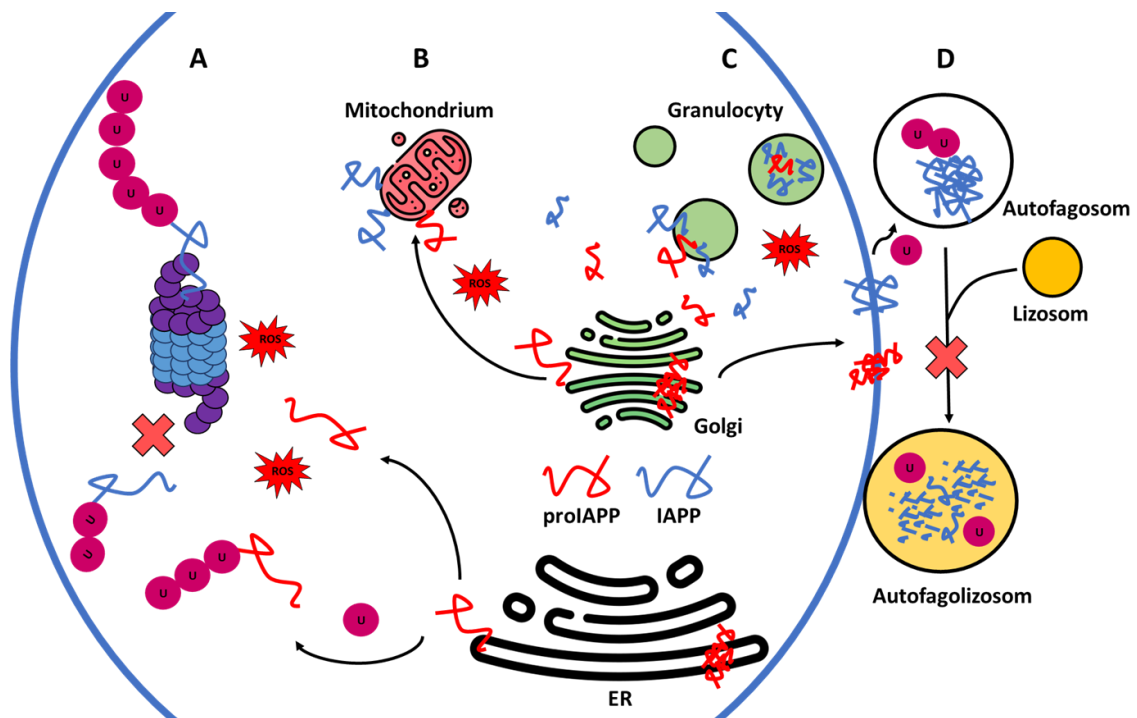
Agregacja amyliny rozpoczyna się od jej wewnątrzkomórkowej oligomeryzacji [79]. Pogłębiająca się hiperglikemia, a także stres oksydacyjny, stymulują oligomeryzację IAPP [174], [183]. Krokiem milowym w pracach nad procesami agregacyjnymi i ich cytotoksycznością była obserwacja uszkodzeń komórek trzustki i dalszy postęp choroby, które wystąpiły jeszcze przed pojawieniem się form fibrylarnych IAPP [184]. Następnie w kolejnych badaniach wykazano, że największą cytotoksyczność cechują się małe oligomery amyliny [185]. Zaobserwowano też, że w przeciwieństwie do innych peptydów agregujących amyliną już w postaci monomerycznej może oddziaływać z błoną komórkową [186]. Asocjacja helikalnych, *N*-końcowych fragmentów amyliny, zachodząca na skutek kontaktu z membraną, prowadzi do koncentracji amyloidogennych fragmentów jej sekwencji. Lokalne zagęszczenie tych fragmentów może być impulsem

do rozpoczęcia oligomeryzacji. Oddziałujące ze sobą hydrofobowe motywy amyliny zmieniają powierzchnię dwuwarstwy lipidowej i prowadzą do przzerwania jej ciągłości [183], [187]. Z tego powodu dochodzi do szeregu niekorzystnych zdarzeń, m.in. do zaburzenia pracy kanałów wapniowych, co jest jednym z powodów cytotoksyczności tworzących się form oligomerycznych [188].

Ponadto, jako ogólny mechanizm toksyczności wszystkich peptydów agregacyjnych, została potwierdzona zdolność form oligomerycznych do tworzenia toroidalnych struktur, złożonych z odpowiedniej liczby merów. Struktura taka tworzy się na skutek oddziaływania oligomerów z błoną, prowadzącego do powstania tak zwanych amyloidogennych porów [189]. Nieszczelność w strukturze błony komórkowej skutkuje uwalnianiem jonów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [79]. Dodatkowo oddziaływanie z błoną aktywuje produkcję kalpain, tzw. cytoplazmatycznych proteaz [188]. Ponadto powstające nierozpuszczalne fibryle oddziałują z lipidami tworzącymi błonę komórkową, zmieniając ich ujemny ładunek, co skutkuje przerwami w ciągłości błony i możliwością uwalniania fibryli do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [190]. Interakcja amyliny z ujemnie naładowanymi resztami fosfolipidowymi tworzącymi błonę komórkową może wpływać na wymuszanie jej helikalnej struktury we fragmencie 1-19, co, jak to zostało wspomniane wcześniej, przyczynia się do głębokiej penetracji niepolarnego rdzenia błony. Podobna zależność występuje w sztucznych układach, w których środek powierzchniowo czynny tworzy micelle, imitując naturalne membrany. Dodatkowo zaobserwowano, że zdolność amyliny do głębokiego penetrowania błony komórkowej ma związek z obecnością histydyny w pozycji 18. W przeprowadzonych eksperymentach potwierdzono, że obniżenie pH do kwasowego powoduje protonację His18, co skutkuje jedynie powierzchniowym oddziaływaniem amyliny z błoną, podobnie jak ma to miejsce w przypadku wariantu szczurzego. Opisany mechanizm penetracji błony może tłumaczyć destrukcyjny wpływ IAPP na ciągłość membran [191], [192].

W otoczeniu uszkodzonej komórki kontrolę proteolityczną, umożliwiającą usuwanie między innymi fibryli amyloidowych, pełni autofagolizosomy. W przypadku cukrzycy typu 2 zaobserwowano upośledzenie ich tworzenia, szczególnie w pierwszych stadiach choroby. Skutkuje to odkładaniem się agregatów w wakuolach autofagalnych, co stanowi jeden z elementów kaskady cytotoksyczności [79]. Wszystkie opisane powyżej procesy stymulują aktywność inflamasomu, białkowego kompleksu

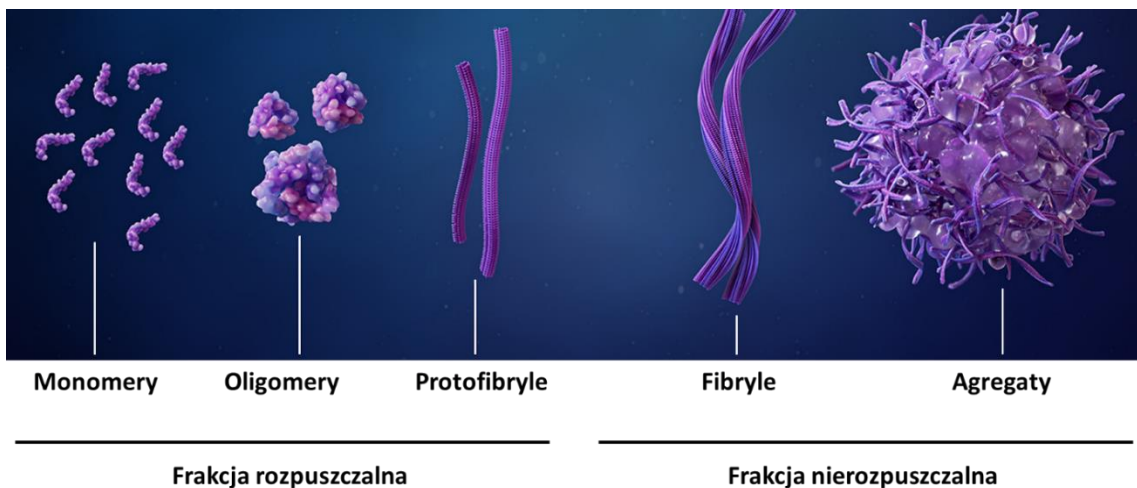
prozapalnego, zwiększając produkcję interleukiny-1 β i tym samym kierując komórkę na drogę apoptozy [193]. Schematyczne zestawienie cytotoksycznego wpływu amyliny przedstawia Rysunek 14. Istnieją przesłanki wskazujące, że stymulacja agregacji do form fibrylarnych może być mechanizmem obronnym organizmu przed szkodliwym działaniem form oligomerycznych. Wiąże się to z możliwością pozbycia się niebezpiecznego białka przez związanie go w postaci nierozpuszczalnych złogów [194].



Rysunek 14. Schematyczne przedstawienie cytotoksycznego wpływu amyliny. Wieloorganelowe uszkodzenia błon komórkowych struktur takich jak aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne czy mitochondrium (B) prowadzi do wzrostu stresu oksydacyjnego poprzez indukcję tworzenia się reaktywnych form tlenu (ROS). To z kolei wpływa na aktywność degradacyjną proteasomów (A), prowadząc do dysocjacji kompleksów 26S, co uniemożliwia proteolizę białek ubikwitynowanych. Ponadto ROS przyczyniają się do hamowania aktywności proteasomu 20S. Formy oligomeryczne uszkodzają także granuloocytów (C) i zewnętrzną błonę komórkową, co wpływa na zaburzenie równowagi jonowej. W obrębie uszkodzonej komórki za usuwanie agregatów amyloidowych odpowiedzialne są struktury utworzone przez połączenie autofagosomu z lizosomem (D). Ze względu na upośledzenie w ich tworzeniu w przebiegu cukrzycy obserwuje się zaburzenia w tym szlaku. Opracowanie własne na podstawie [79].

Innym mechanizmem ochronnym jest wykorzystywanie przeciwciał do ograniczania uszkodzenia komórek β trzustki wywołanych cytotoksycznością amyliny. W wyniku przeprowadzonych badań odkryto, że w osoczu osób cierpiących na cukrzycę typu 2 znajduje się specyficzne przeciwciało oddziałujące tylko z oligomerami amyliny. Powyższe oddziaływanie zaobserwowano również dla grupy kontrolnej, którą stanowiło osocze osób zdrowych, jednak stężenie tego przeciwciała utrzymywało się u nich na stosunkowo niskim i zbliżonym poziomie. Wśród pacjentów cukrzycowych poziom

przeciwciała był różny, ale minimum dwa razy wyższy względem grupy kontrolnej. Różnice te mogłyby wskazywać na różne stadia rozwoju cukrzycy, które również różnią się zawartością form oligomerycznych. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na liniach komórek β -trzustki wykryto, że dodatek wspomnianego, wyizolowanego przeciwciała zwiększa przeżywalność komórek β pacjentów cukrzycowych, czego nie zaobserwowano u osób zdrowych. Ponadto badania wykazały, że im wyższy dodatek przeciwciała, tym większa przeżywalność komórek β trzustki pacjentów cukrzycowych. Przedstawione działanie przeciwciał skierowanych na oligomery amyliny może stanowić mechanizm obronny organizmu przed całkowitą destrukcją komórek. Stanowi to interesujący obiekt do dalszych badań, szczególnie w kontekście leczenia cukrzycy już w rozwiniętym stadium [195]. Inny mechanizm ochronny wykorzystuje antyagregacyjne działanie cynku, który poprzez wydłużanie pierwszego etapu oligomeryzacji, tzw. „lag phase”, zaburza powstawanie cytotoksycznych oligomerów [196]. Na Rysunku 15 przedstawiłam poszczególne etapy tworzenia się agregatów z monomerycznej postaci białka, z ich podziałem na frakcje rozpuszczalną i nierozpuszczalną. W fazie opóźnienia (lag phase) występują głównie monomery białka, z dodatkiem niskocząsteczkowych oligomerów, zawartych we frakcji rozpuszczalnej. Dalszy postęp oligomeryzacji prowadzi do fazy elongacji, w wyniku której powstają w pierwszym etapie protofibryle, a z nich tworzą się nierozpuszczalne fibryle i agregaty.



Rysunek 15. Przedstawienie poszczególnych form oligomerycznych z ich podziałem na frakcje rozpuszczalną i nierozpuszczalną [197].

3.3. Amylina w chorobie Alzheimerera

Choroba Alzheimerera (AD) dotyka na świecie około 50 milionów ludzi i aż jedna trzecia przypadków jest powiązana z otyłością oraz cukrzycą typu II [198]. Na podłożu powstawania AD składają się dwa amyloidogenne procesy: wewnątrzkomórkowe odkładanie się białka tau w postaci spletków neurofibrylarnych i zewnątrzkomórkowa agregacja A β [199]. Zaobserwowano, że przy trwającej dłużej niż 9 lat T2DM ryzyko zachorowania na AD zwiększa się o 65% [200].

Ze względu na wiele właściwości fizykochemicznych wspólnych dla amyliny i amyloidu β podejrzewa się, że wykazują one wspólny mechanizm cytotoksyczności [201], [202]. Oba peptydy łączy aż 25% podobieństwa w ich sekwencji, a najwyższą homologię obserwuje się dla fragmentów biorących udział w formowaniu amyloidu [201], co przedstawia Rysunek 16. Powoduje to, że amyлина z amyloidem β może wchodzić w interakcję i tworzyć oligomery krzyżowe [203]. Powstałe w ten sposób formy oligomeryczne wykazują trzy razy wyższą cytotoksyczność niż występując samodzielnie [204] i bezpośrednio wpływają na zwiększenie produkcji hiperfosforylowanego białka tau. To z kolei potęguje stres oksydacyjny i powstałe już stany zapalne, co skutkuje uszkodzeniami neuronów [205], [206].

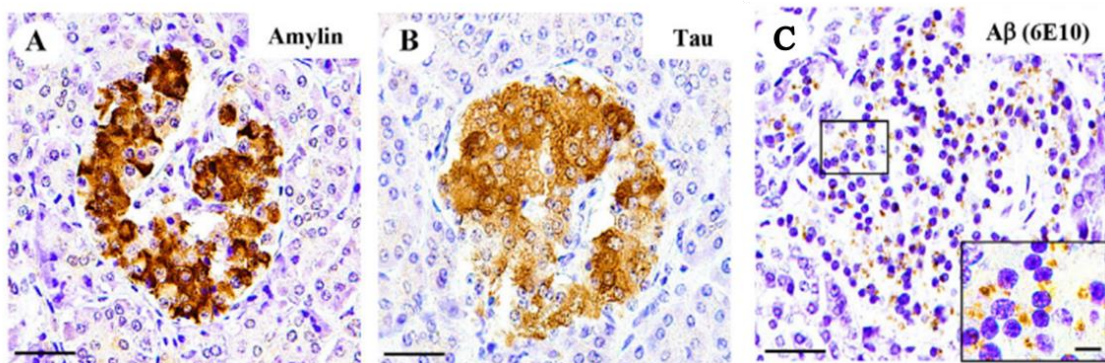


Rysunek 16. Podobieństwa między sekwencjami aminokwasowymi amyliny oraz peptydu A β 1-42. Na pomarańczowo zaznaczyłam najkrótsze sekwencje o najwyższej homologii, na granatowo reszty aminokwasowe biorące udział w samoasocjacji peptydów, a na zielono powtarzające się w tych samych regionach aminokwasowy [207].

Dodatkowym elementem spajającym obie choroby jest potwierdzona obecność agregatów A β i białka tau w wysepkach trzustkowych [208]. Zaobserwowano również powiązanie obu chorób przez apolipoproteinę E epsilon-4 (ApoE ϵ 4). Osoby będące nosicielami allelu tej proteiny mają większe ryzyko zachorowania na obie choroby [209]. Pierwsze badania wskazywały, że ApoE związana jest wyłącznie z chorobą Alzheimerera, natomiast w przeprowadzonych później eksperymentach ze znakowaną formą tej lipoproteiny, potwierdzono jej obecność we wszystkich typach komórek trzustki.

Wyniki te sugerują, że ApoE jest syntezowana w obrębie wysp Langerhansa, bądź pojawia się tam w wyniku transportu lipidów. Mając na uwadze fakt, że apolipoproteina E działa jako patologiczne białko opiekuńcze, jej obecność w rejonie nadprodukcji amyliny stanowi duże zagrożenie niepożądaną agregacją [210].

Zależności między AD i T2DM mogą wynikać również ze zdolności amyliny do migracji w organizmie, w tym także przekraczania bariery krew-mózg. Udowodniono to obserwując złogi amylinowe powstające nie tylko w trzustce, ale także w mózgu [182]. Przykładem powiązania między obiema chorobami może być również przypadek zaprezentowany na Rysunku 17. Przedstawione preparaty immunohistochemiczne jednoznacznie pokazują obecność złogów amylinowych, białka Tau oraz peptydu A β 1-42 w komórkach β trzustki pacjenta z diagnozą choroby Alzheimera, bez potwierdzonej cukrzycy typu 2.



Rysunek 17. Preparaty immunohistochemiczne pacjenta chorującego na chorobę Alzheimera, bez diagnozy cukrzycy, przedstawiające złogi amylinowe (A), białka Tau (B) i peptydu A β 42 w obrębie komórek β trzustki (pasek skali dla preparatu A i B - 50 μ m, C - 20 μ m) [211].

Dane literaturowe jednoznacznie wskazują wspólne podłoże dla rozwoju cukrzycy typu 2 i choroby Alzheimera. W obu jednostkach chorobowych obserwuje się nieprawidłowości w gospodarce jonów Ca²⁺ i występowanie stresu oksydacyjnego, wynikającego między innymi z powstawania reaktywnych form tlenu [212]. Metabolizm białek w komórkach pod wpływem przekształceń oksydacyjnych ulega modyfikacji, co prowadzi do powstania reaktywnych produktów końcowych, zdolnych do inicjowania procesów destrukcyjnych komórki. Podobieństwo obserwuje się również w szlakach sygnałowych neuronów i komórek trzustki [213]. Łącznikiem między dwiema chorobami jest receptor mózgowy AMY3 [214]. Uważa się, że jeden z elementów tego receptora, białko RAMP3, jest zaangażowany w przedwczesną programową śmierć komórek związaną z agregacją zarówno amyliny, jak i peptydu A β 42 [215].

3.4. Strategie leczenia w T2DM

Cukrzyca jest jednostką chorobową, która towarzyszy ludzkości od wieków. Do początku ubiegłego wieku była chorobą nieuleczalną, a dla pacjentów reprezentujących typ I śmiertelną. Rewolucją był rok 1922, w którym dr Frederick Banting wraz ze swoją grupą badawczą wyizolował insulinę z ekstraktu trzustkowego psa i podał ją umierającemu 14-letniemu chłopcu z cukrzycą typu I, co uratowało mu życie. Sukces ten przełożył się na uruchomienie zaledwie rok później produkcji insuliny w krajach wysokorozwiniętych. W Polsce produkcja rozpoczęła się w 1924 roku. Początkowo wiązała się ona z izolacją insuliny z trzustki zwierzęcej (krowy lub świni), co przekładało się również na liczne reakcje alergiczne u pacjentów. Wynikało to z niskiej czystości preparatów, a także różnic w sekwencjach aminokwasowych w zestawieniu z ludzkim wariantem. Kolejnym krokiem milowym było otrzymanie w 1980 roku metodami inżynierii genetycznej z wykorzystaniem bakterii *E. Coli* ludzkiej insuliny, co równocześnie stanowiło pierwszy lek wytworzony tą techniką [94].

Obecnie terapia diabetyków, czyli osób cierpiących na cukrzycę, jest zależna od jej typu, a także od stopnia zaawansowania choroby. W pierwszych etapach wdrażane są zmiany w codziennych nawykach. Jeśli zalecenia o zwiększeniu ruchu, czy modyfikacji diety nie są efektywne, następuje przejście do leczenia medykamentami doustnymi. Ze względu na to, że cukrzyca jest chorobą postępującą, jej terapia wymaga indywidualnego podejścia. Kluczowym aspektem jest występująca w tej jednostce chorobowej insulinooporność. Bardzo często w pierwszych stadiach choroby komórki β trzustki prawidłowo wydzielają insulinę w odpowiedzi na podwyższone stężenie glukozy we krwi, natomiast komórki docelowe nie reagują na nią prawidłowo. Prowadzi to do zwiększonego stężenia insuliny we krwi, dlatego początkowo zastosowanie znajdują leki, które mają uwrażliwiać receptory insulinowe na działanie tego hormonu. Wraz z postępem choroby upośledzenie dotyczy również wydzielania, dlatego na tym etapie niezbędna jest stymulacja komórek β trzustki do produkcji endogennej insuliny. Ponadto wszystkie leki mają, z różnym natężeniem, obniżać poziom glukozy we krwi [94].

Ze względu na mechanizm działania, leki na cukrzycę można podzielić na dwie grupy: flozyny oraz terapeutyki inkretynowe. Pierwsze z nich ograniczają wchłanianie glukozy w obrębie nerek, tym samym zwiększając jej wydalanie wraz z moczem. Mechanizm ten chroni nerki przed uszkodzeniami, co jest jednym z głównych powikłań cukrzycy. Działanie leków inkretynowych jest bardziej zaawansowane i przejawia się na

wielu płaszczyznach. Jedną z nich jest zwiększenie wydzielania endogennej insuliny przez pobudzanie komórek β trzustki, a także hamowanie wydzielania glukagonu. Co ciekawe, jest to proces selektywny, który zachodzi tylko w momencie podwyższonego stężenia glukozy we krwi, co ogranicza możliwość wystąpienia hipoglikemii [94]. Przykładami doustnych preparatów na cukrzycę są: metformina, pochodne sulfonilomocznika, antagoniści receptora GLP-1, czy inhibitory SGLT-2 [94]. Różnorodność mechanizmów działania powyższych terapeutyków pozwala na utrzymywanie nawet przez kilka lat prawidłowych poziomów glikemii.

W przypadku stopniowego spadku skuteczności leków doustnych i znaczącego niedoboru endogennej insuliny, wynikającego z wyniszczenia komórek β trzustki, wdraża się do leczenia podawanie analogów insuliny. Ważnym aspektem w leczeniu cukrzycy i stosowaniu leków doustnych jest ich zdolność do utrzymywania prawidłowej masy ciała, co w przypadku podawania insuliny nie jest takie proste. Ponadto insulina jako lek peptydowy musi być podawana w postaci iniekcji podskórnych, co zmniejsza komfort pacjentów. Natomiast dużym plusem ze względu na rozwój metod bioinżynieryjnych jest powstawanie form insuliny dopasowanej do pacjenta. Z uwagi na czas i sposób działania można wyróżnić analogi ludzkiej insuliny o krótkim (1-3 godziny) i średnim (3-10 godzin) czasie działania. Rozwój prac badawczych nad insuliną doprowadził do powstania również jej mutantów, które charakteryzują się niemal natychmiastowym działaniem (0,5-1,5 godziny), bądź działaniem długotrwałym (8 godzin), bez wyraźnego szczytu jej stężenia [94]. Formą terapii, która jest najbliższa fizjologicznej gospodarce insuliną, jest pompa insulinowa. Z zastosowaniem wlewów podskórnych podawany jest analog szybko działający. Dozowanie polega na stałej podaży insuliny w dawkach podstawowych, a także umożliwia podanie dodatkowej porcji w formie tak zwanych bolusów. Stosowanie pompy insulinowej jest szczególnie rekomendowane osobom aktywnym, ze zmiennym harmonogramem dnia. Niestety, jest to kosztowna forma terapii. Koszty insuliny dla pacjentów cukrzycowych pokrywane są przez Narodowy Fundusz Zdrowia, natomiast samodzielny zakup pompy insulinowej wiąże się z wydatkiem od 3 500 złotych do nawet 18 000 złotych [216].

Alternatywą dla leczenia insuliną jest wykorzystanie drugiego z hormonów trzustkowych, który naturalnie jest współwydzielany z insuliną - amyliny. Pierwszym lekiem powstałym w wyniku poznania jej sekwencji był pramlintyd. Charakterystyka szczurzego wariantu amyliny w zestawieniu z ludzkim doprowadziła do powstania

analogu, w którym trzy reszty z fragmentu amyloidogennego, w pozycji 25, 28 i 29, zostały zastąpione resztami proliny. W ten sposób powstał jedyny do dziś, komercyjnie dostępny lek w leczeniu cukrzycy typu 2 oparty o działanie IAPP. Pramlintyd ze względu na niewielkie różnice sekwencyjne posiada masę cząsteczkową podobną do amyliny, wynoszącą ok. 4 kDa. Podawany jest on w postaci soli octanowej w formie zastrzyków podskórnych. Jego okres półtrwania wynosi 48 minut, stąd wymaga podawania do czterech razy dziennie, przed głównymi posiłkami. Mechanizm działania pramlintydu jest niezwykle zbliżony do funkcjonowania amyliny. Regulacja stężenia glukozy we krwi opiera się na kontroli tempa opróżniania żołądka, co ogranicza ilość przyjmowanego pokarmu [217], [218]. Lek ten powinien być przechowywany w lodówce i podawany jedynie w postaci klarownego roztworu. Wystąpienie jakiegokolwiek zmętnienia świadczy o agregacji i wyklucza go z możliwości podania pacjentom [219].

Istotnym odkryciem było zrozumienie fizjologii innego z naturalnie występujących hormonów - leptyny. Jest ona nazywana także hormonem sytości, gdyż jej działanie obejmuje kontrolę apetytu. Wydzielana przez komórki tłuszczowe leptyna wiąże się ze swoimi receptorami w obrębie podwzgórza, co aktywuje sygnał o sytości [220]. Jej regulujący mechanizm wpływa również hamująco na wydzielanie insuliny [221]. Niedobór leptyny prowadzi do wielu chorób związanych z zaburzeniami odżywiania, w tym przede wszystkim do otyłości. Leczenie pacjentów polega na podawaniu zamienników leptyny. Jej syntetyczny analog, zwany metreleptyną, stosowany jest jako medykament w leczeniu zaburzeń związanych z genetycznym upośledzeniem produkcji leptyny lub w schorzeniach tkanki tłuszczowej, takich jak lipodystrofia [222]. Zdolność metreleptyny do obniżania poziomu glukozy we krwi przekłada się na zmniejszanie stanu hiperglikemii u pacjentów cukrzycowych. Niestety, Europejska Agencja Leków podaje też działania niepożądane wywoływane przez metreleptynę. Należą do nich między innymi: lęk, pogorszenie widzenia, bóle ciała, dezorientacja, zawroty głowy czy przyspieszone bicie serca [223]. Choć mechanizmy działania obu powyżej opisanych leków, pramlintydu i metreleptyny, są odrębne, to skutkują zbliżonymi efektami. Terapia łącząca oba leki może wykazywać lepsze efekty, przez synergiczne działanie tych związków. Stosowane jest już połączenie pramlintydu z leptyną w leczeniu otyłości [224].

Wykazana w poprzednich rozdziałach korelacja między oligomeryzacją protein a upośledzonym działaniem układów proteolitycznych, skłania do poszukiwania metod

terapeutycznych w stymulacji systemów degradacyjnych, w tym stymulacji proteasomu. Przez wiele lat wiodącym tematem w kontekście regulacji aktywności proteasomalnej były inhibitory. Możliwość ich zastosowania w chorobach związanych z nadmierną aktywnością proteolityczną h20S poskutkowała dopuszczeniem przez FDA użycia kilku z inhibitorów w terapiach przeciwnowotworowych. Choroby związane z upośledzonymi zdolnościami degradacyjnymi proteasomu prowadzą do odkładania się niepożądanych białek, co w dalszym etapie prowadzi do dysfunkcji komórki. Sposobem terapii może być stymulacja proteasomu. Temat ten nie jest jeszcze tak eksplorowany jak inhibicja, ale w literaturze zostały już opisane niskocząsteczkowe aktywatory h20S. Jednymi z nich są pozyskane ze źródeł naturalnych kwas betulinowy czy oleuropeina [225]. Wadą tego typu związków jest ich mała selektywność, a także możliwość przekształcenia pod wpływem różnych modyfikacji do form inhibitorowych [226].

W nowoczesnej medycynie coraz szersze zastosowanie jako leki znajdują peptydy. Wynika to z szeregu ich zalet. Należą do nich przede wszystkim wysoka biodostępność, niska toksyczność, a także stosunkowo tania produkcja. Leki peptydowe wykazują z reguły wyższą specyficzność i selektywność w porównaniu z małowcząsteczkowymi związkami, a także wywołują mniejszą stymulację układu odpornościowego niż białkowe medykamenty [227], [228]. Peptydy jako leki nie są jednak pozbawione wad. Do ograniczeń w ich stosowaniu zalicza się przede wszystkim ich podatność na działanie enzymów proteolitycznych. Szlak trawienny układu pokarmowego, odpowiadający za proteolizę białek z pokarmów i dostarczenie egzogennych aminokwasów, w ten sam sposób przyczynia się do rozkładu leku peptydowego. W oczywisty sposób wyklucza to formę doustną podawania takich środków. Ponadto leki peptydowe wykazują słabą wchłanianiałość przez błonę śluzową jelita. Wszystko to składa się na konieczność stosowania zdecydowanie mniej komfortowych dla pacjentów wlewów dożylnych, bądź iniekcji podskórnych w celu podania peptydowych preparatów. Nie jest to jednak pełnym rozwiązaniem problemu braku stabilności takich związków, ponieważ w osoczu również występują liczne proteazy, co sprawia że czas półtrwania leków peptydowych jest stosunkowo krótki, a ich zdolność do penetracji błon komórkowych nie jest wysoka [229]. W związku z powyższym jako środki terapeutyczne proponowane są często peptydomimetyki, które pozwalają zachować wysoką aktywność biologiczną i niską cytotoksyczność charakterystyczną dla peptydów, przy jednoczesnym wyeliminowaniu podatności na proteolizę.

Zaangażowanie naszej grupy badawczej w poszukiwanie skutecznych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S trwa od lat. Poznanie sekwencji oraz podstaw mechanizmów działania naturalnych, białkowych modulatorów proteasomu umożliwiło zaprojektowanie ich krótszych, peptydowych analogów, a następnie modyfikowanie ich do postaci peptydomimetyków. Szeroki zakres prowadzonych przez nas prac przyczynił się do powstania puli stabilnych proteolitycznie aktywatorów proteasomu, które potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie m.in. w przeciwdziałaniu hamowania aktywności h20S przez oligomery amyliny.

III Badania własne

1. Charakterystyka oligomerów amyliny

Trudnością w porównywaniu wyników eksperymentów z amyliną jest zmienność jej właściwości, a w szczególności tendencji oligomeryzacyjnych w zależności od warunków. Różnice obserwuje się również dla amylin pochodzących z różnych źródeł [230]. Problematyczna jest optymalizacja stężenia IAPP, w którym przeprowadzane są eksperymenty. Wiadome jest, że naturalnie w komórkach amyлина występuje w stężeniu 0,8-4 mM, natomiast w przypadku doświadczeń z jej izolowaną formą wysoką cytotoksyczność obserwuje się w stężeniach niższych niż 1 μM [231]. Proces oligomeryzacji amyliny zależy nie tylko od stężenia samej próbki, ale także rodzaju i stężenia soli w roztworze buforowym. Znaczenie ma również pH układu, ze względu na możliwość protonowania przy niskim pH pierścienia imidazolowego histydyny oraz grupy α -aminowej. Istotnym czynnikiem jest dodatek komponentów ułatwiających rozpuszczanie amyliny i jej wstępną deagregację [232]. Częstą praktyką w przygotowywaniu amyloidogennych peptydów jest ich rozpuszczanie w fluoroalkoholach, na przykład w 1,1,1,3,3,3-heksafluoropropan-2-olu (HFIP), czy rozpuszczalnikach organicznych, jak DMSO. Nawet niewielka ilość takiego dodatku może wpływać na przebieg oligomeryzacji, zwłaszcza że obecność HFIP wymusza powstawanie struktur α -helikalnych [187].

Dogłębne poznanie procesu agregacji jest niezwykle skomplikowane. Uchwycenie pierwszych etapów oligomeryzacji, szczególnie w warunkach natywnych, stanowi duże wyzwanie, ze względu na wysoką dynamikę tego układu. Do uzyskania jak najlepszej charakterystyki oligomerycznych form białek niezbędne jest zastosowanie wielu technik badawczych. W celu uniknięcia braku powtarzalności między danymi partiami białka w zależności od producenta, amylinę oraz jej warianty zsyntezowałam i oczyściłam samodzielnie.

1.1. Natywne metody charakterystyki oligomerów amyliny

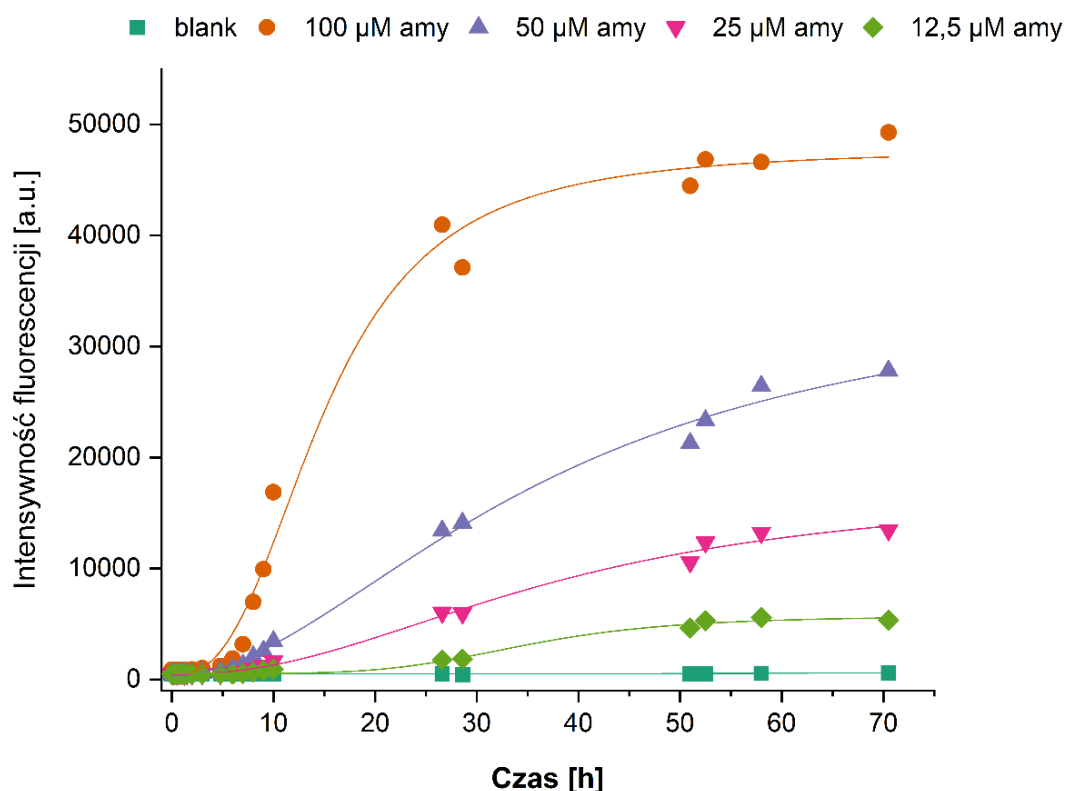
Rzeczywisty stan białka i jego zachowanie w organizmie najlepiej oddają techniki badawcze, które umożliwiają prowadzenie eksperymentów w warunkach natywnych. Metody te pozwalają na zachowanie konformacji przestrzennych białek, które mogą

mieć kluczowe znaczenie w ich funkcjonalności, a także sposobie oddziaływania ze środowiskiem.

1.1.1. Testy fluorymetryczne

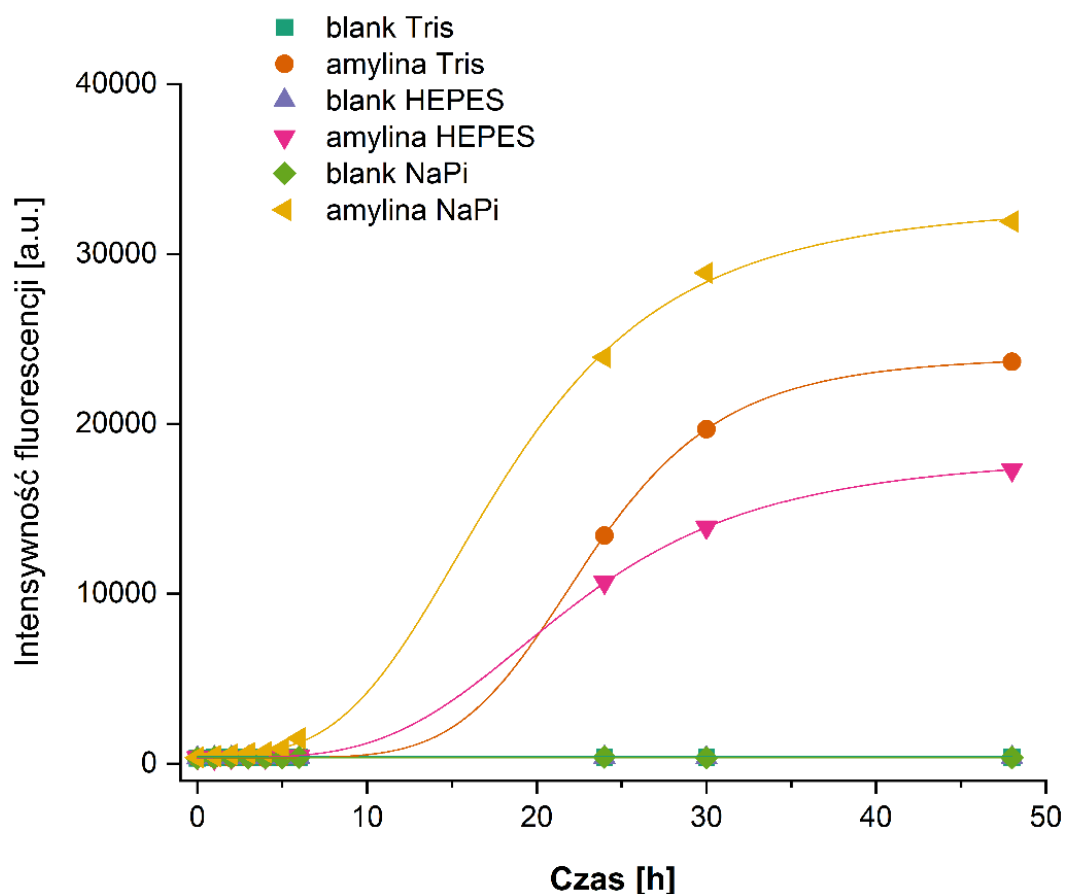
Charakterystykę oligomeryzacji amyliny rozpoczęłam od dobrania warunków jej agregacji. W pierwszym kroku wykonałam serie testów fluorymetrycznych z zastosowaniem Tioflawiny T. Jest to barwnik fluorescencyjny, będący solą benzotiazolową, charakteryzowany przez dwa pasma: wzbudzenia przy długości fali λ 349 nm oraz emisji λ 454 nm. Tioflawina T ma zdolność do oddziaływania z tworzącymi się arkuszami β -karkowymi, interkalując wewnątrz nich, co objawia się batochromowym przesunięciem pasm. Wykorzystanie tego zjawiska w badaniu agregacji białek pozwala na śledzenie postępu oligomeryzacji. Zaczynając od początkowej fazy opóźnienia (ang. *lag phase*), poprzez przyrost form β -karkowych zwany elongacją, po stabilizację form fibrylarnych, nazywaną fazą wysycenia, otrzymuje się charakterystyczny wykres przyrostu fluorescencji w czasie, który definiuje postęp oligomeryzacji. Dobór warunków agregacji przeprowadziłam na podstawie analizy wielu zmiennych parametrów, mających wpływ na oligomeryzację.

Pomiary rozpoczęłam od wyboru stężenia badanej próbki oraz buforu do inkubacji. Na podstawie danych literaturowych do testów wybrałam trzy najbardziej popularne bufony, do których należały: Tris, HEPES oraz bufor fosforanowy. Wyniki przeprowadzonych analiz zamieściłam odpowiednio na Rysunku 18 i 19.



Rysunek 18. Wpływ stężenia amyliny na postęp oligomeryzacji, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl (20 mM NaPi). Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują, że postęp oligomeryzacji amyliny jest wysoce zależny od jej stężenia. Najlepiej widoczny postęp agregacji, a także najbardziej spójną z klasyczną i charakterystyczną dla pomiarów z Tioflawiną T krzywą, reprezentuje stężenie 100 μM amyliny. Dla tej krzywej można zaobserwować fazę utajenia, trwającą do 6-7 godzin od rozpuszczenia białka, następnie stopniowy przyrost ilości agregatów (najprawdopodobniej o charakterze β-kartki, ze względu na specyficzność detekcyjną Tioflawiny T), który po około 35 godzinach przechodzi w fazę wysycenia. Z tego względu do dalszych badań wykorzystywałam właśnie to stężenie amyliny.

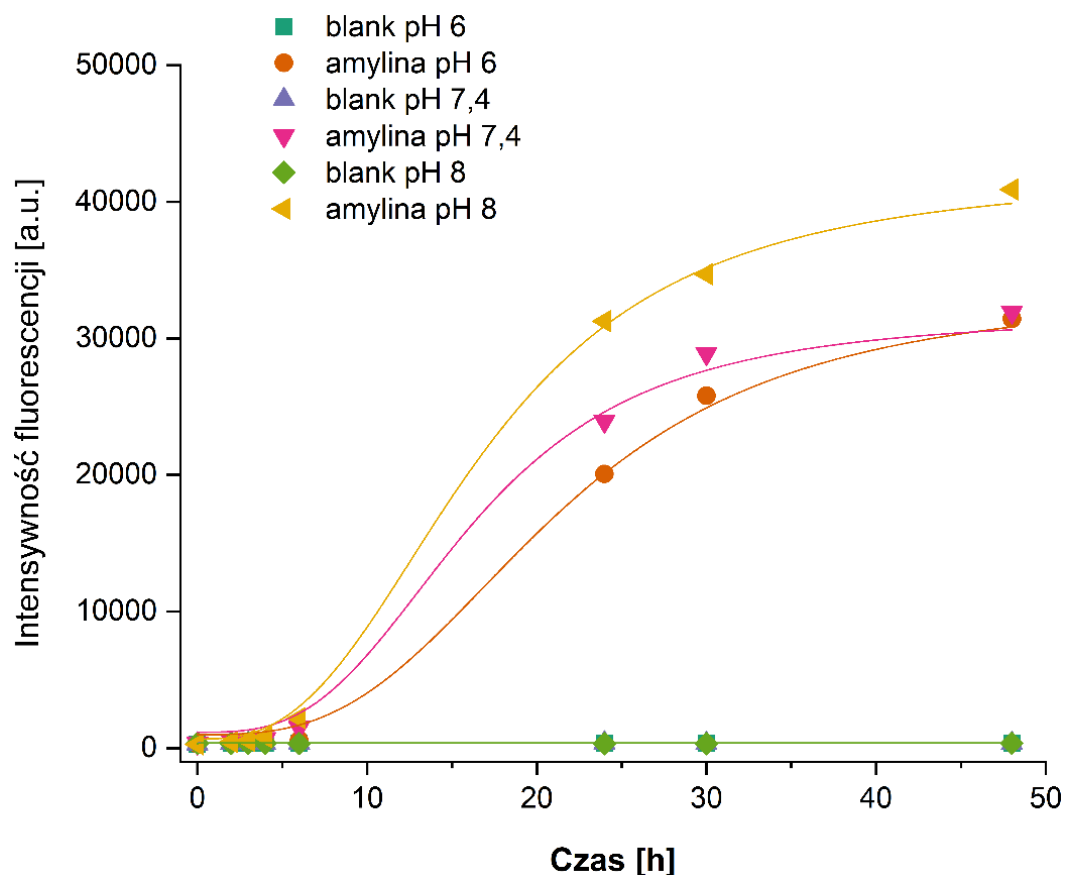


Rysunek 19. Wpływ rodzaju bufora do inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona odpowiednim 20 mM buforem o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowałam, że najwyższe przyrosty fluorescencji pojawiają się w przypadku bufora fosforanowego. Spośród badanych trzech układów buforowych jest on też najbardziej zbliżony do warunków fizjologicznych. Ponadto charakteryzuje się optymalną długością fazy opóźnienia, w której występują przede wszystkim niskocząsteczkowe formy oligomeryczne, w głównej mierze stanowiące obiekt moich badań. W przypadku buforu Tris faza ta jest zdecydowanie wydłużona, nawet do około 12 godzin, co utrudnia przeprowadzanie eksperymentów obejmujących jej końcowe etapy, bądź dotyczące fazy elongacji. W buforze HEPES brak jest wyraźnego rozgraniczenia faz, a także występują najniższe przyrosty fluorescencji. Ze względu na wyniki przedstawionych powyżej eksperymentów do dalszych etapów wybrałam 20 mM bufor fosforanowy o pH 7,4 zawierający 140 mM NaCl (20 mM NaPi).

Z uwagi na zasadowy charakter IAPP oraz jej pI zgodnie z danymi literaturowymi dla monomeru przypadający przy pH 8,9, znaczenie ma również pH bufora

inkubacyjnego, co również zweryfikowałam. Wyniki tego eksperymentu zaprezentowałam na Rysunku 20.

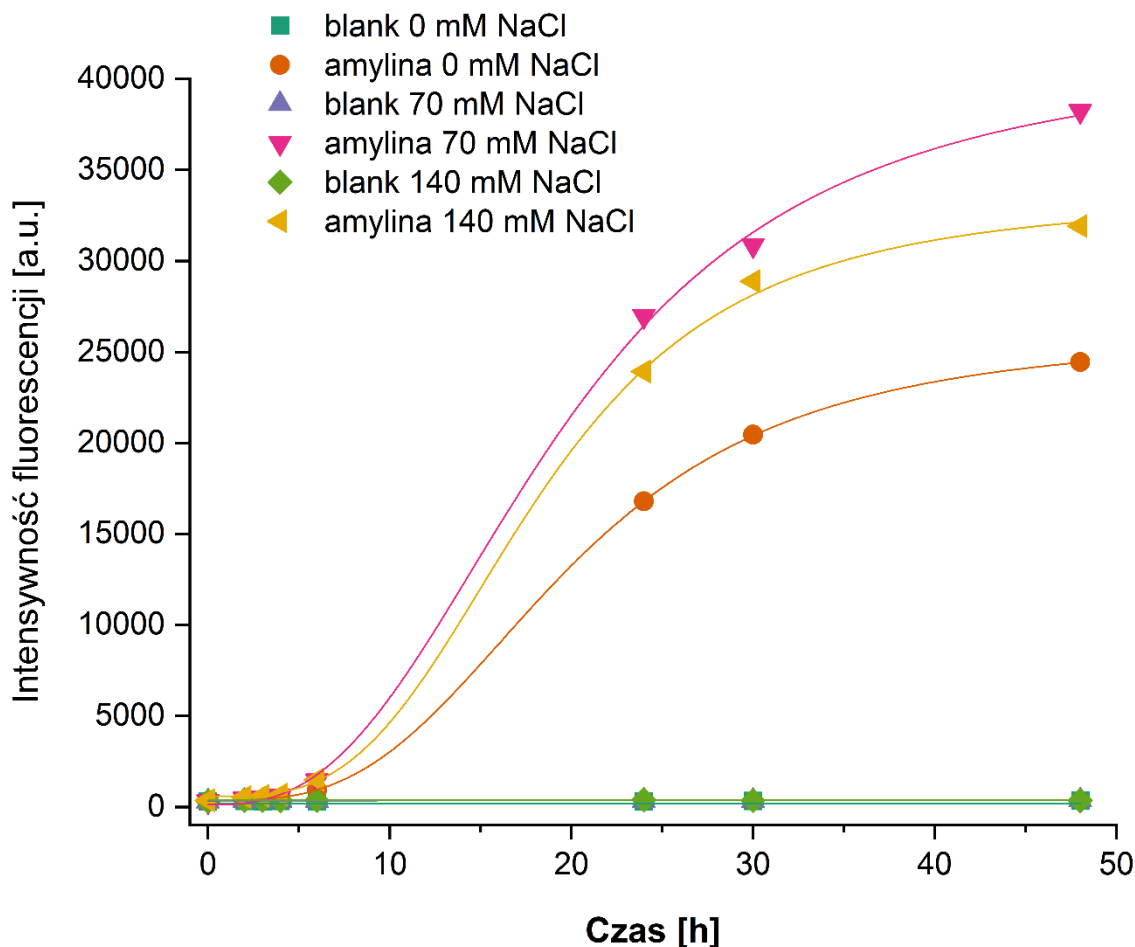


Rysunek 20. Wpływ pH bufora do inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Na przedstawionym wykresie widać, iż kształt każdej z krzywych jest zbliżony, co wskazuje na podobny rozkład w czasie fazy opóźnienia, elongacji i wysycenia. Obserwuje się natomiast wzrost intensywności fluorescencji wraz z pH bufora zbliżającym się do pI amyliny. Najwyższe intensywności fluorescencji występują dla pH 8, a najniższe dla pH 6. Z tego powodu do dalszych badań wybrałam pH najbardziej zbliżone do środowiska naturalnego organizmu, wynoszące 7,4.

Ważnym parametrem jest również siła jonowa bufora, na którą składa się stężenie zarówno soli tworzących układ buforowy, jak i dodatkowych jego komponentów. Częstą praktyką w śledzeniu procesów agregacyjnych jest dodawanie soli NaCl do układu buforowego, która zwiększa stabilność tworzących się form oligomerycznych.

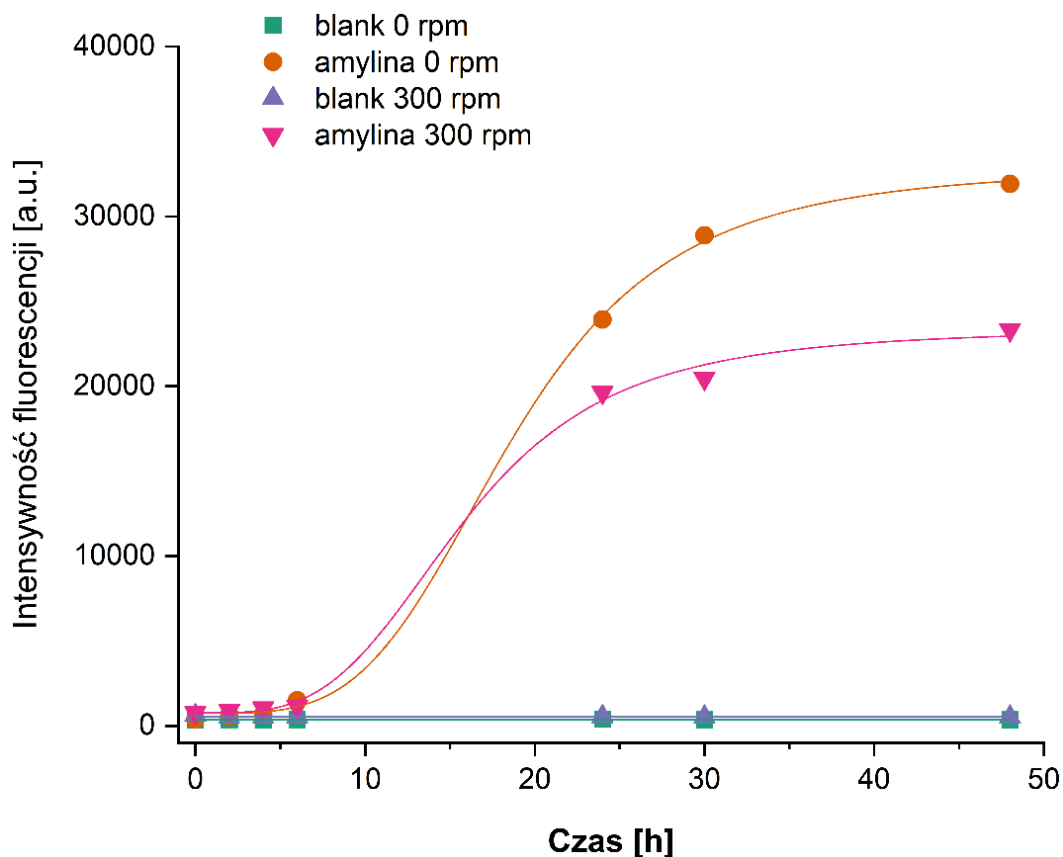
Sprawdziłam zatem wpływ jej stężenia na postęp agregacji amyliny, co przedstawia Rysunek 21.



Rysunek 21. Wpływ stężenia soli NaCl w buforze inkubacyjnym na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

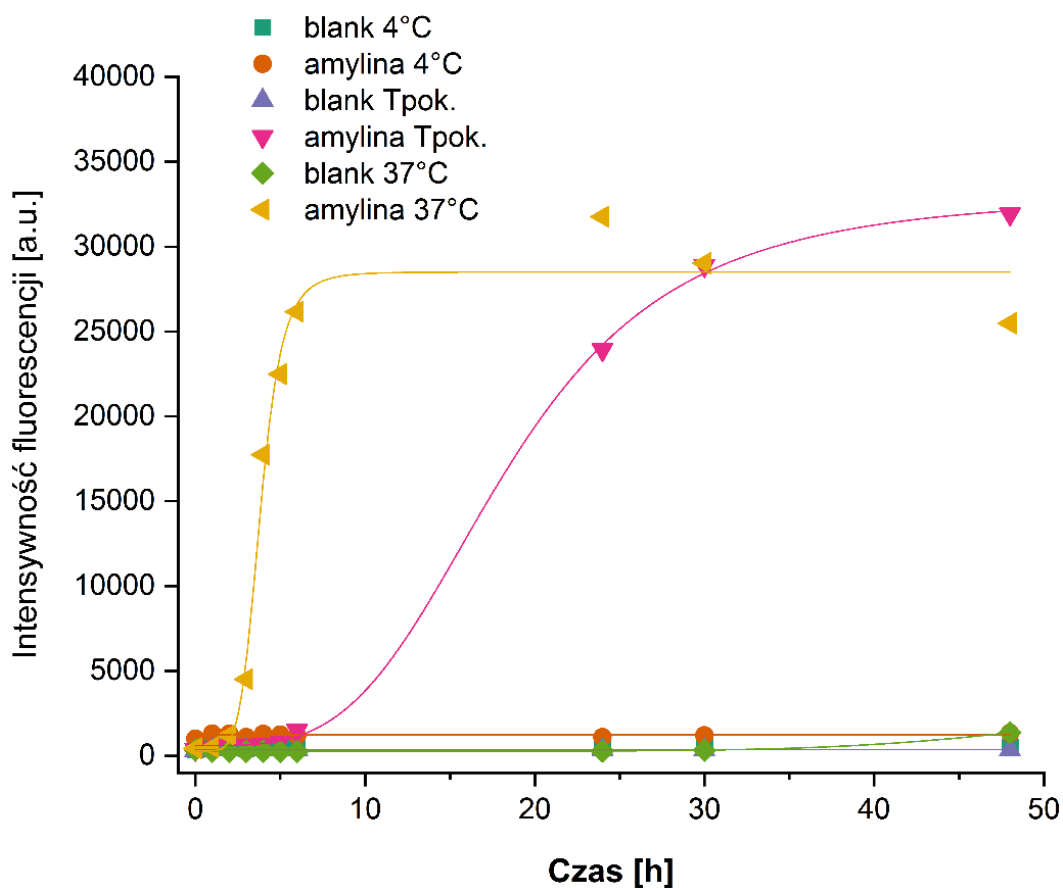
Przedstawione wyniki pokazują, że obecność soli NaCl, a tym samym zwiększenie siły jonowej buforu do inkubacji ma stabilizujący wpływ na formy oligomeryczne amyliny, co objawia się większymi intensywnościami fluorescencji. Ilość dodanego NaCl nie ma znaczącego wpływu na fazę elongacji, dlatego w dalszych badaniach stosowałam stężenie 140 mM, które odpowiada naturalnie występującemu stężeniu tej soli w ludzkim osoczu.

Istnieją również inne parametry, które mają wpływ na oligomeryzację. Kluczowe w procesie agregacji jest również wytrząsanie próbek, czy temperatura inkubacji. Wpływ tych dwóch czynników przedstawiłam odpowiednio na Rysunku 22 i 23.



Rysunek 22. Wpływ wytrząsania próbki na postęp oligomeryzacji, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

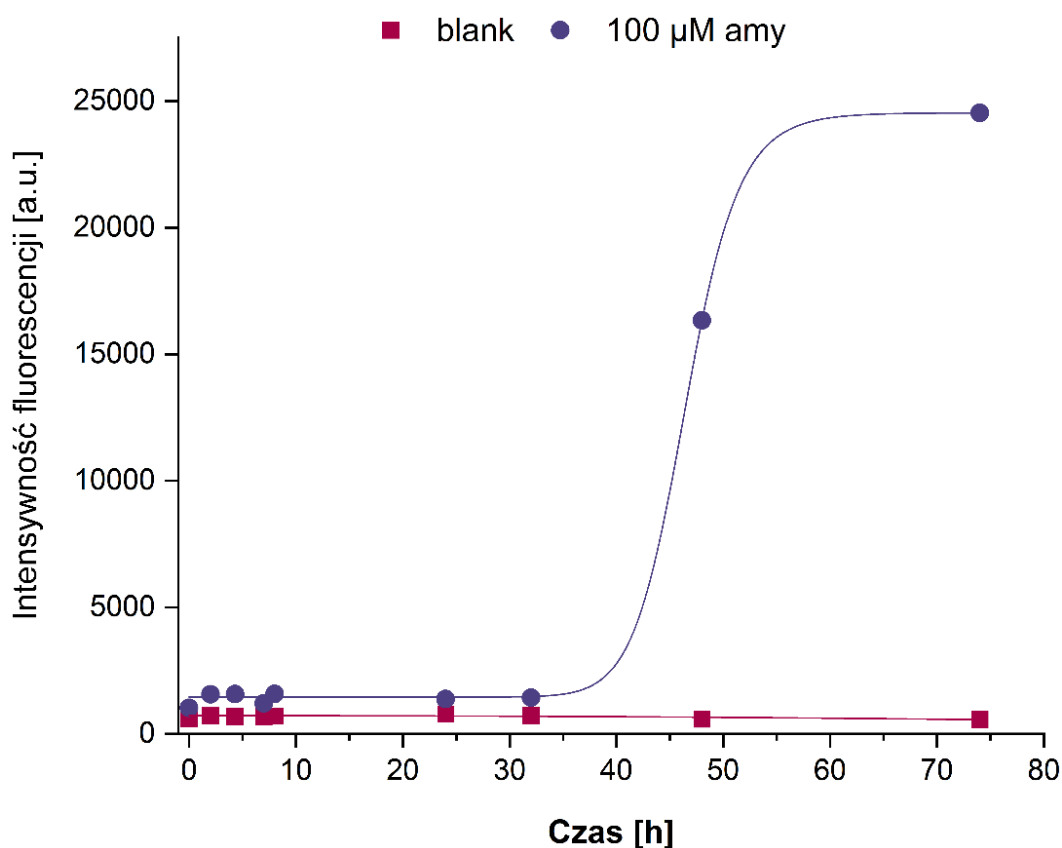
Zaobserwowałam, że wprowadzenie dodatkowego wytrząsania nie ma znaczącego wpływu w pierwszych etapach oligomeryzacji, natomiast prowadzi do szybszego wysycenia, a także do niższych wartości fluorescencji. Z uwagi na to do dalszych etapów próbki inkubowałam bez wytrząsania.



Rysunek 23. Wpływ temperatury inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Jednym z parametrów, który ma największy wpływ na oligomeryzację amyliny okazała się temperatura inkubacji. Na zaprezentowanym wykresie wyraźnie widoczne są trzy znacząco różne krzywe. Podniesienie temperatury z pokojowej do odpowiadającej organizmowi ludzkiemu prowadzi do skrócenia fazy utajenia o ponad połowę. Kolejno następuje gwałtowny przyrost fluorescencji, który po około 8 godzinach od rozpuszczenia próbki przechodzi już w fazę wysycenia. W przypadku temperatury 4°C nie obserwuje się krzywej charakterystycznej dla oligomeryzacji, gdyż fluorescencja przez cały czas pomiarowy utrzymuje się na tym samym poziomie, zbliżonym do wartości tła. Otrzymane wyniki wskazują, że do prowadzonych przeze mnie eksperymentów najbardziej optymalna jest temperatura pokojowa, w której wyraźna jest każda z faz oligomeryzacji i trwa ona odpowiednio długo.

Ponadto, aby dodatkowo sprawdzić próbkę amyliny inkubowaną w 4°C, postanowiłam przenieść ją po upływie 32 godzin do temperatury pokojowej i zweryfikować postęp oligomeryzacji, co zaprezentowałam na Rysunku 24.

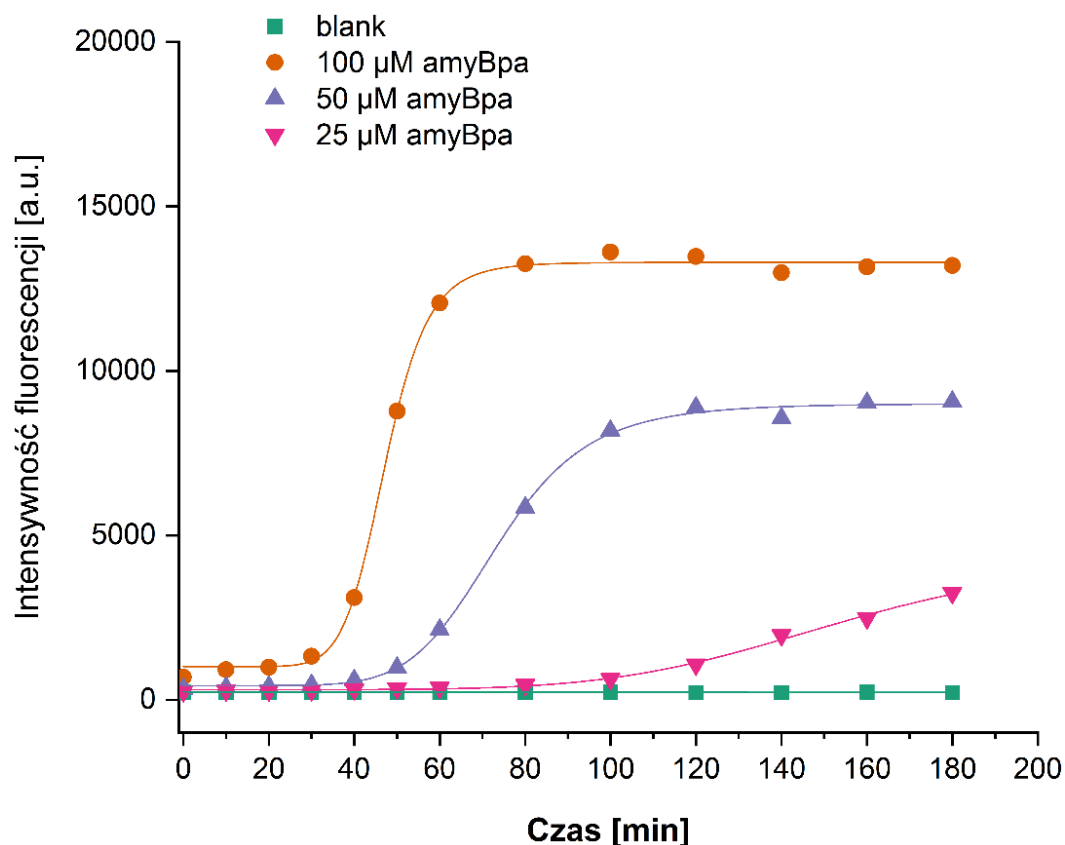


Rysunek 24. Wpływ zmiany temperatury inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Próbkę została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, rozcieńczona w 20 mM NaPi tak, aby końcowe stężenie DMSO wynosiło 2%, a następnie inkubowana, początkowo w temperaturze 4°C, a po upływie 32 godzin od jej rozpuszczenia inkubację przeniesiono do temperatury pokojowej.

Okazało się, że podniesienie temperatury inkubacji pozwala osiągnąć standardową dla temperatury pokojowej krzywą oligomeryzacji, składającą się z każdej z faz. Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że obniżenie temperatury pozwala na zahamowanie oligomeryzacji amyliny, co stanowi ważne narzędzie w przeprowadzaniu wielu eksperymentów.

Na podstawie wszystkich wykonanych analiz fluorymetrycznych jako najbardziej optymalne warunki oligomeryzacyjne do dalszych badań wybrałam następujące parametry: 100 μM stężenie amyliny w 20 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl i 2% DMSO, inkubacja w temperaturze pokojowej bez wytrząsania.

W celu porównania z natywnym białkiem wariantu amyliny z wprowadzoną resztą fotosieciującą Bpa jego tendencje oligomeryzacyjne zbadalam w powyzej opisanych, zoptymalizowanych warunkach. Wyniki tego eksperymentu przedstawia Rysunek 25.



Rysunek 25. Wpływ stężenia amyBpa na postęp oligomeryzacji, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

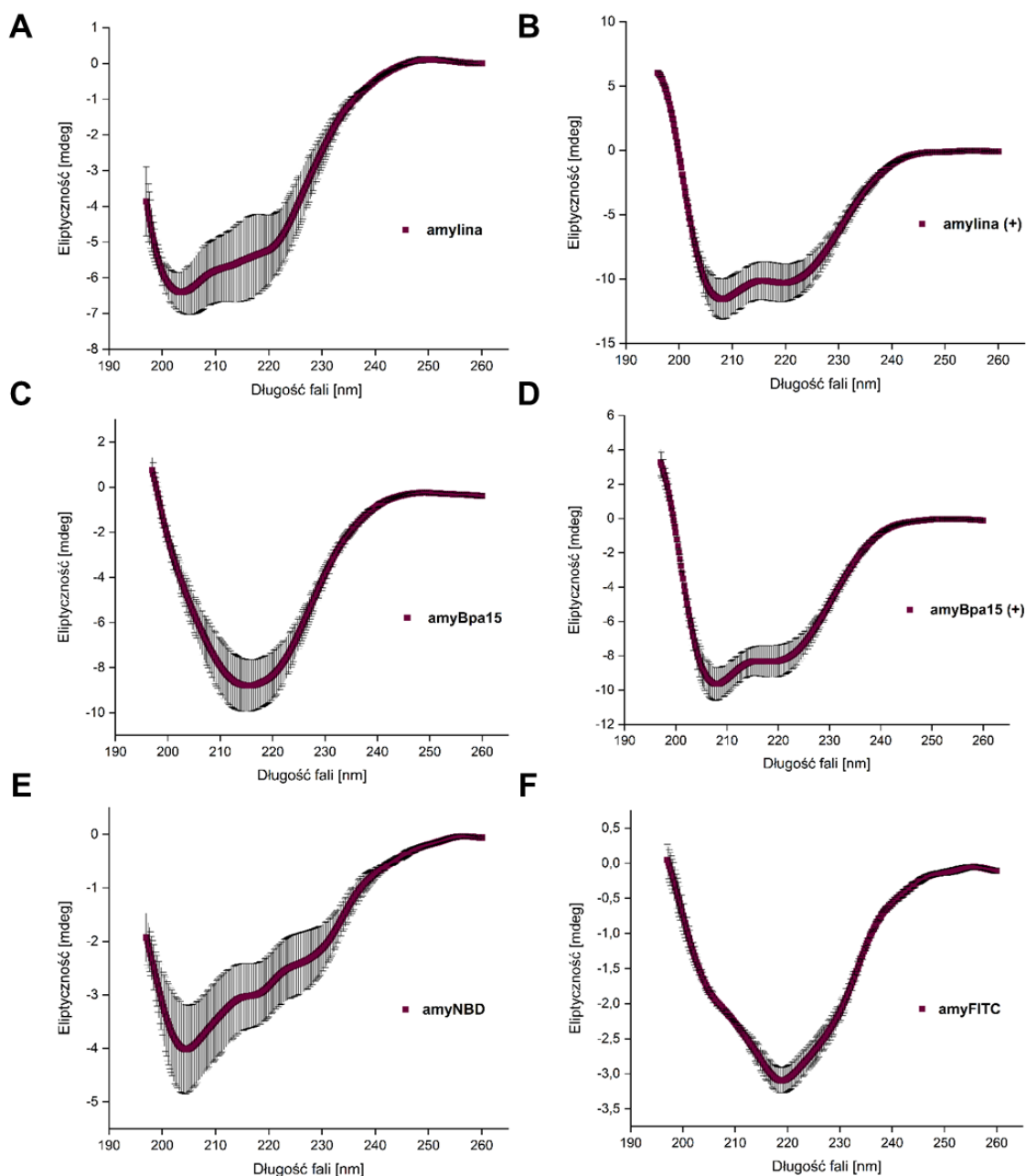
Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że amyBpa ma większe tendencje agregacyjne, ponieważ proces jej oligomeryzacji przebiega znacznie szybciej w stosunku do natywnej amyliny. Faza elongacji rozpoczyna się po około 35 minutach od rozpuszczenia, a zaledwie po 80 minutach od rozpuszczenia obserwuje się już fazę wysycenia.

W przypadku wariantów amyliny posiadających znaczniki fluorescencyjne (amyNBD i amyFITC), niemożliwa była ich charakterystyka z użyciem Tioflawiny T, z uwagi na nakładające się z nią pasma absorpcji i emisji fluoroforów.

1.1.2. Dichroizm kołowy

Kolejnym krokiem w charakterystyce natywnego stanu amyliny i jej wariantów było zbadanie ich struktury drugorzędowej za pomocą dichroizmu kołowego. Metoda ta opiera się na różnicy w absorpcji lewo- i prawoskrętnego światła spolaryzowanego kołowo przez próbkę optycznie czynną. Wskutek niejednorodnego pochłaniania przez nią światła wektor pola elektrycznego zmienia kształt wykreślanego konturu z kołowego na eliptyczny. Wynikiem takiego eksperymentu jest wykres zależności eliptyczności od długości fali. Zakresem charakterystycznym dla protein jest przedział długości fali λ 160-240 nm. Przez porównanie pasm widocznych w tym zakresie z pasmami obecnymi w próbkach wzorców można określić strukturę drugorzędową białka. Dla monomerycznych związków możliwe jest dodatkowo wyznaczenie eliptyczności molowej, czyli zależności eliptyczności od masy cząsteczkowej badanej proteiny i liczby reszt aminokwasowych z jakich jest utworzona. W badaniach oligomerycznych próbek, jeśli jest to mieszanina oligomerów, nie jest to możliwe z uwagi na fakt, że nieznana jest dokładna masa cząsteczkowa, ani liczba reszt aminokwasowych.

Porównania struktur drugorzędowych amyliny oraz jej wariantów dokonałam dla rozpuszczalnych frakcji uzyskanych po zwirowaniu próbek poddanych uprzednio 1-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej. Wyniki przeprowadzonych analiz prezentuje Rysunek 26.

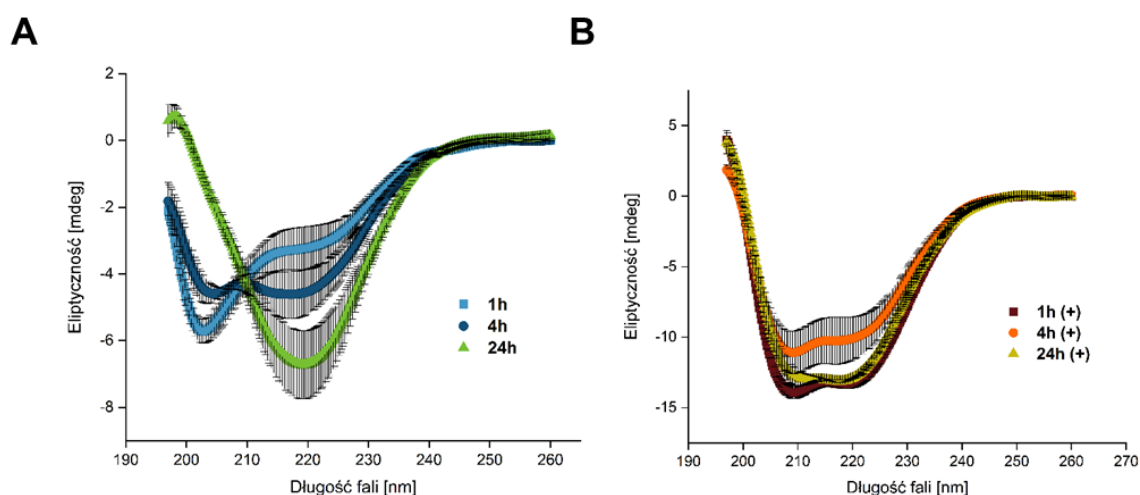


Rysunek 26. Widma CD amyliny (A-B) oraz jej wariantów (C-F), zarejestrowane dla próbek inkubowanych w 20 mM NaPi, a także w tym buforze ale wzbogaconym o 0,05% SDS (próbki oznaczone symbolem „+”). Dla każdej z danych zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).

W buforze standardowym próbce amyliny odpowiada krzywa CD wskazująca kształtem na strukturę α -helisy, z nieco przesuniętymi hipsochromowo wartościami dwóch minimów, które wzorcowo występują przy λ 208 nm oraz λ 222 nm. Taki kształt krzywej może wskazywać na obecność w sekwencji amyliny struktur helikalnych, ale także nieuporządkowanych, co opisywane jest w literaturze [138], [139]. Zaobserwowałam znaczące różnice w przebiegu krzywej CD wariantu amyBpa. W tym

przypadku krzywa ta charakteryzuje się wyraźnym minimum przy λ 218 nm, wskazującym na strukturę β -kardki. Wariant amyliny z wprowadzonym fluoroforem FITC również wykazuje podobne minimum, ale jest ono nieco przesunięte w kierunku fal o większej długości, a poza tym na widmie zaznacza się dodatkowe przegięcie poniżej 210 nm, co łącznie może wskazywać na pewien udział α -helisy. W przypadku wariantu z NBD trudno jednoznacznie określić strukturę. Widmo nie ma typowego przebiegu ani dla α -helisy ani β -kardki. Z kolei na charakterystyczną krzywą struktury nieuporządkowanej składa się bardzo niska eliptyczność powyżej 210 nm oraz minimum przy 195 nm, a dla amyNBD nie obserwuje się również tych ekstremów. Jest to jednak zgodne z literaturą, w której amylna nie jest klasyfikowana jako struktura typowo nieuporządkowana, a raczej jako IDP [138]. Interesujące wyniki pokazały analizy w buforze z dodatkiem SDS, w których nie tylko amylna, ale także amyBpa wykazuje wyraźną strukturę α -helikalną (dwa minima, przy λ 208 nm oraz λ 222 nm). Sugeruje to, że niewielki dodatek surfaktantu w sposób istotny wpływa na strukturę drugorzędową amyliny i stabilizuje jej formę helikalną nawet jeśli białko pierwotnie przyjmowało postać β -kardki.

Do scharakteryzowania za pomocą CD zmian strukturalnych zachodzących podczas oligomeryzacji amyliny wykorzystałam trzy czasy jej inkubacji - 1-, 4- i 24-godzinny - wybrane na podstawie testów fluorymetrycznych z Tioflawiną T. Wyniki tych eksperymentów przedstawiłam na Rysunku 27.



Rysunek 27. Widma CD amyliny zarejestrowane po 1, 4 i 24 godzinach inkubacji **A.** w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, **B.** w takim samym buforze ale wzbogaconym o 0,05% SDS (próbki oznaczone symbolem „+”). Dla każdej z danych zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).

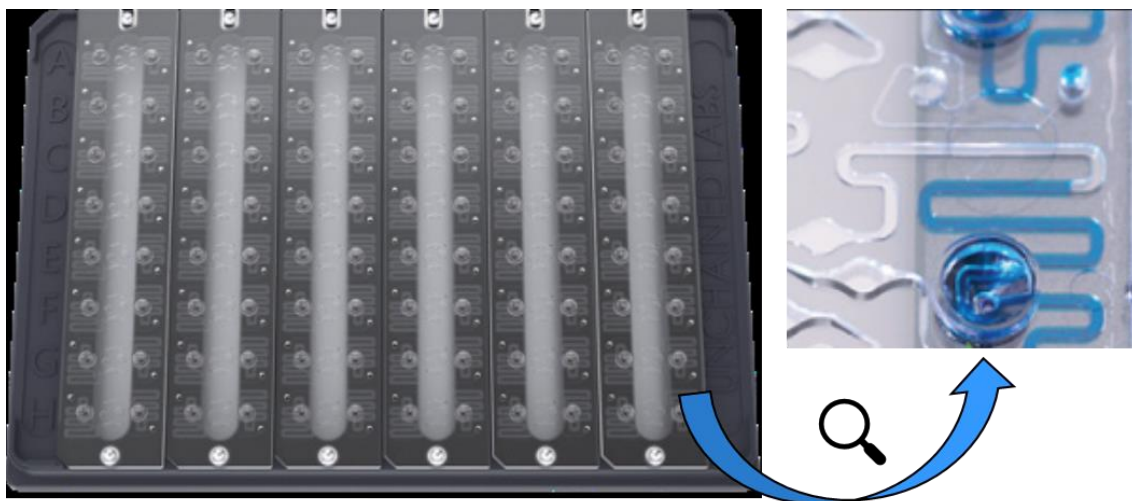
W buforze bez dodatku surfaktantu (wykres A) zaobserwowałam zmiany struktur drugorzędowych białka, rozpoczynając od struktury będącej połączeniem α -helisy ze strukturą nieuporządkowaną, z której stopniowo wyłania się wyraźna postać β -kartki, na co wskazuje pogłębiające się minimum przy ok. 220 nm. Taki sam eksperyment wykonałam dla próbek inkubowanych w buforze z dodatkiem SDS (wykres B) i wynikiem była utrzymująca się w każdym z analizowanych czasów struktura α -helisy, co potwierdza właściwości stabilizujące surfaktantu.

1.1.3. DLS

Pomiar dynamicznego rozpraszania światła jest metodą analizy wielkości cząstek rozpuszczonych w roztworze. Padające na próbkę, ustawione pod odpowiednim kątem światło lasera jest w odmienny sposób rozpraszane przez różnej wielkości cząsteczki, które nieustannie drgają ruchami Browna, co rejestrowane jest przez detektor. Bazujący na powyższym zjawisku pomiar odnotowuje różnice w prędkościach drgania cząstek, co przeliczone w oparciu o równanie Stocksa-Einsteina prowadzi do otrzymania rozkładu wielkości cząstek w badanym roztworze. Klasyczne aparaty do pomiaru dynamicznego rozpraszania światła charakteryzują się stosunkowo dużym zużyciem próbki. Ma na to wpływ zasada, że im mniejsza masa cząsteczkowa badanej molekuly, tym wyższe powinno być jej stężenie. Sugerowane stężenie dla wzorca, jakim jest lizozym o masie cząsteczkowej 14,4 kDa, wynosi 0,1 mg/ml. W przypadku standardowych kuwet pomiarowych wymagana objętość roztworu wynosi około 1 ml. Do analizy mniejszych objętości stosuje się specjalnie przystosowane kuwety kwarcowe. Jednak wadą takich rozwiązań w badaniu próbek białkowych, w szczególności próbek oligomerycznych, jest wielokrotne używanie takiej kuwety ze względu na jej duży koszt. Z powodu wysokich zdolności adsorpcyjnych protein, nawet dokładna seria myć kuwety może nie zagwarantować całkowitego pozbycia się poprzedniego analitu, co może znacząco wpływać na kolejne pomiary.

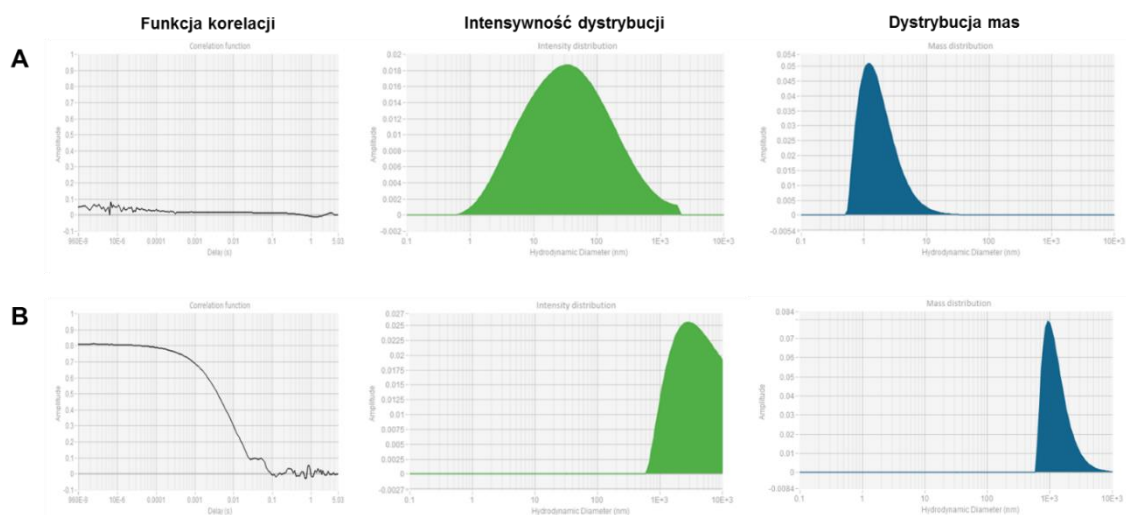
W badaniach stanu oligomerycznego amyliny wszystkie z powyżej opisanych parametrów stanowiły wyzwanie. Ze względu na stosunkowo małą masę cząsteczkową IAPP (3,9 kDa), wymagane było jej większe stężenie. Wybrane na podstawie poprzednich eksperymentów stężenie 100 μ M przekłada się na 0,39 mg/ml. W teorii jest to wartość wystarczająca do eksperymentu, natomiast niezbędna objętość 1 ml oznacza zużycie niemal 400 μ g białka na jeden eksperyment. W związku z powyższym poszukiwałam aparatu DLS, który pozwoli znacząco ograniczyć objętość analitu, przy jednoczesnym

wykorzystaniu jednorazowych kuwet pomiarowych. Największą ilość eksperymentów wykonałam na aparacie Stunner (Unchained Labs), który wykorzystuje 96-dołkowe płytki pomiarowe o objętości dołków 2 μ l. Rodzaj wykorzystywanej płytki przedstawiłam na Rysunku 28.



Rysunek 28. Zdjęcie stosowanej płytki pomiarowej kompatybilnej z aparatem Stunner (Unchained Labs) z przybliżeniem na wygląd komory pomiarowej.

Aparat Stunner prezentuje otrzymane wyniki w postaci trzech modułów, na które składa się: wykres funkcji korelacji, intensywność dystrybucji oraz dystrybucja masy. Każdy z powyższych parametrów jest istotny dla określenia wiarygodności wyników. Najistotniejszy jest kształt wykresu korelacji funkcji. Powinien on jak najbardziej przypominać idealną krzywą sigmoidalną, co ma wpływ na dalszą interpretację wyników. Ponadto dwa pozostałe moduły, dotyczące dystrybucji, mogą wykazać obecność nawet niewielkiej ilości agregatów (intensywność dystrybucji) z określeniem ich udziału w badanej próbce (dystrybucja mas). Przykładowe analizy o najniższym współczynniku polidispersyjności (PDI) dla oligomerycznej próbki amyliny przedstawiłam na Rysunku 29.



Rysunek 29. Przykładowe wyniki z przeprowadzonych dla amyliny eksperymentów na aparacie Stunner (Unchained Labs). Próbkę amyliny przygotowana została przez 2-godziną inkubację w stężeniu 0,39 mg/ml w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO. Po tym czasie roztwór został przeniesiony w dwóch powtórzeniach do komór pomiarowych poprzez odwrotne pipetowanie. W przypadku powtórzenia A uzyskałam PDI na poziomie 0,05 przy jednoczesnym oznaczeniu stężenia 0,22 mg/ml. W powtórzeniu B wartość PDI wyniosła 0,4, a stężenie również 0,22 mg/ml. Wyniki te nie są wiarygodne ze względu na brak prawidłowego wykresu dla funkcji korelacji, co oznacza że zarówno wykres intensywności dystrybucji, a także dystrybucji mas nie jest prawidłowy.

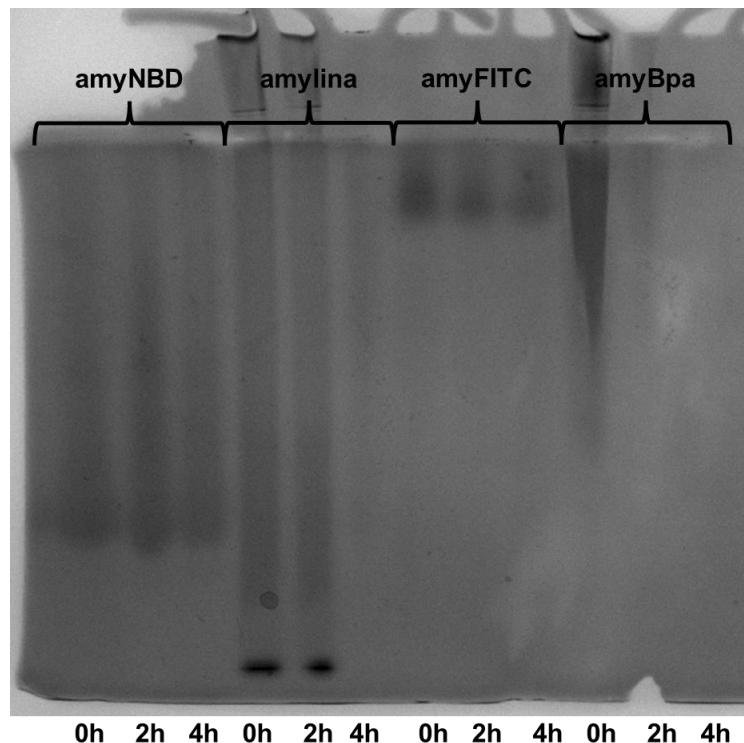
Najbardziej powtarzalne wyniki otrzymałam dla próbek amyliny przygotowanej przez 2-godziną inkubację w stężeniu 0,39 mg/ml w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie zamieszanie roztworu za pomocą pipety i naniesienie go do dwóch komór pomiarowych przez odwrotne pipetowanie. W powtórzeniu I uzyskałam wartość PDI na poziomie 0,33 przy jednoczesnym oznaczeniu stężenia 0,30 mg/ml. Natomiast w drugim powtórzeniu wartość PDI wyniosła 0,30, a stężenie 0,31 mg/ml, co wskazuje na dość dobrą powtarzalność eksperymentu. Natomiast otrzymane wykresy pozbawione były całkowicie rozkładu mas cząstek i prawidłowego wykresu dla korelacji funkcji, co oznacza że wynik nie jest w pełni wiarygodny. Dla niskich stężeń roztworu, bądź małych molekuł zalecane jest wydłużenie czasu gromadzenia danych, co jednak w moim przypadku również nie pomogło. Najwyższa z otrzymanych wartości PDI wyniosła aż 0,8. Przeprowadzone eksperymenty z różnymi warunkami pipetowania, wirowania czy mieszania, jak i samej inkubacji amyliny, jednoznacznie wskazały na zbyt wysoką polidispersyjność próbek, aby móc określić rozkład wielkości zawartych w nich cząstek.

Tożsame wyniki otrzymałam w przypadku pomiarów na aparacie Uncle (Unchained Labs), a także w pomiarach wykonanych z wykorzystaniem aparatu Prometheus Panta (NanoTemper), gdzie polidispersyjność badanych próbek wyniosła powyżej 1,15. Według wskazówek producenta wszystkie wartości polidispersyjności próbek

przekraczające 0,7 świadczą o wysokiej heterogeniczności próbki, uniemożliwiającej określenie rozkładu wielkości zawartych w niej cząstek.

1.1.4. Elektroforeza natywna

Jedną z najpowszechniej stosowanych technik do analizy natywnych białek jest elektroforeza natywna, w której rozdział przebiega na podstawie mas oraz kształtu i rozmiarów danej molekuly. Nie bez znaczenia jest również punkt izoelektryczny białka, który przekłada się na kierunek wędrówki jonów w stronę konkretnej elektrody przy odpowiednim pH żelu oraz buforu elektrodowego. Standardowa wersja natywnej elektroforezy dedykowana jest głównie dla protein o charakterze od kwasowego do lekko zasadowego, których pI mieści się w zakresie pH 3-8. Punkt izoelektryczny opisany literaturowo dla amyliny występuje przy pH 8,9. W związku z powyższym niemożliwe jest przeprowadzenie separacji oligomerów amyliny według standardowego protokołu. Opisana przez firmę BioRad procedura rozdziału białek o charakterze zasadowym opiera się na wykorzystaniu histydyny, jonów potasu, a także buforu TAPS. Nazwana katodową elektroforezą natywną metoda umożliwiła mi porównanie tworzących się w czasie inkubacji oligomerów natywnej amyliny oraz jej wariantów, co obrazuje Rysunek 30.



Rysunek 30. Wynik przeprowadzonej w warunkach natywnych elektroforezy próbek amyliny oraz jej wariantów po ich inkubacji (0, 2, 4 godziny) w 20 mM buforze NaPi zawierającym 2% DMSO. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

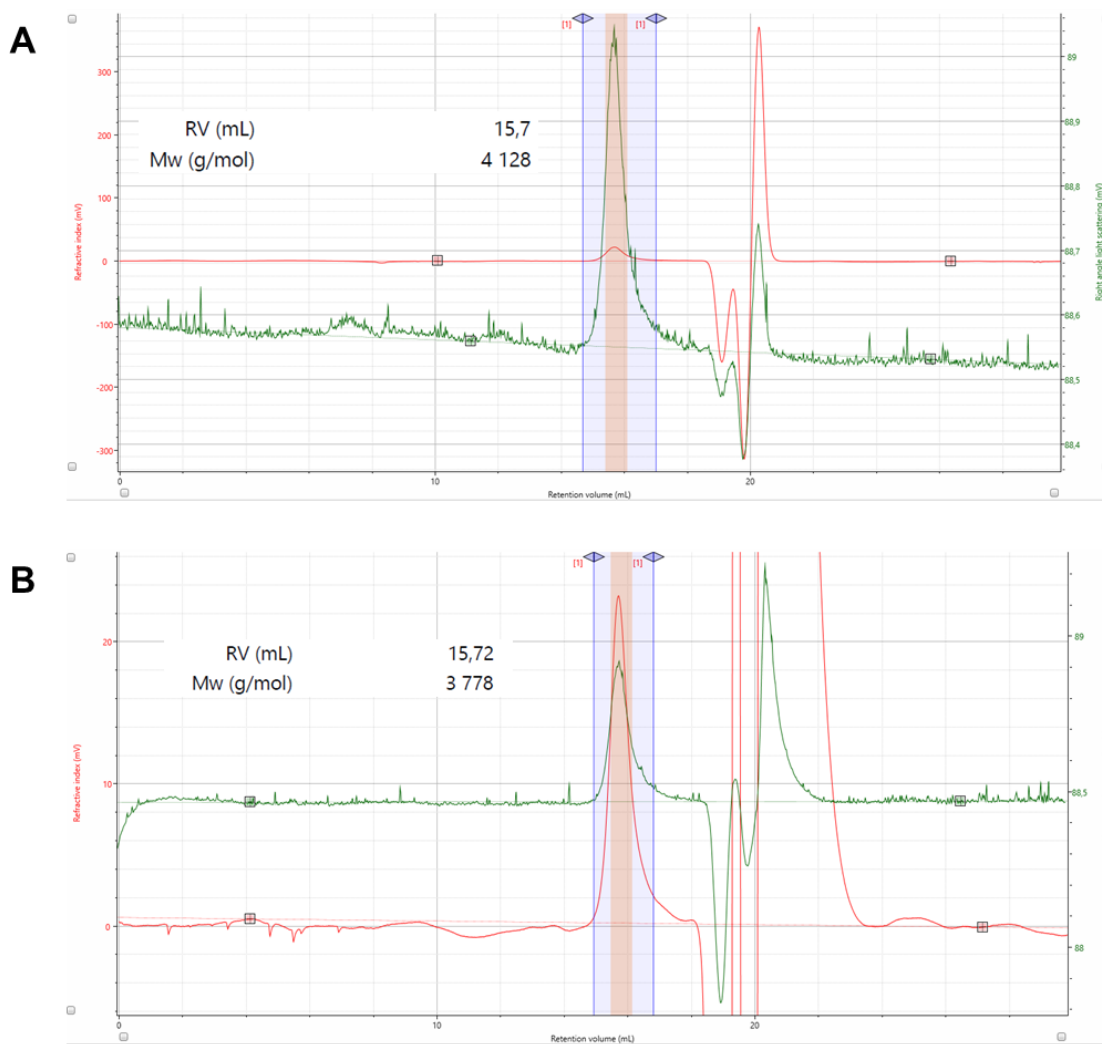
Na przedstawionym elektroforegramie widoczny jest inny dla każdego z wariantów przebieg rozdziału form oligomerycznych. Warto przy tym zaznaczyć, że białka te nie różnią się znacząco masą cząsteczkową, która mieści się w przedziale od 3,9 kDa dla najmniejszej, natywnej amyliny do 4,4 kDa dla największego wariantu amyFITC. Na elektroforegramie trudno jest zaobserwować wyraźne prążki, pochodzące od konkretnych oligomerów. Stan oligomeryczny objawia się jako smuga, co może potwierdzać wysoką dynamikę i polidispersyjność tych układów. Zaprezentowany na żelu postęp oligomeryzacji natywnej amyliny pokrywa się z wynikami testów fluorymetrycznych z Tioflawiną T. W dwóch początkowych czasach inkubacji amyliny widoczna jest jej monomeryczna postać, która zanika po 4 godzinach inkubacji, co odpowiada przyrostowi form zagregowanych na krzywej tioflawinowej. Dla wariantu amyBpa wyraźne, większe formy oligomeryczne widoczne są bezpośrednio po rozpuszczeniu próbki, zanikając po 2 godzinach inkubacji. Elementem wspólnym dla wszystkich wariantów amyliny jest ich wyższy stopień zagregowania w stosunku do natywnego białka, nawet bezpośrednio po ich rozpuszczeniu (0h). Ponadto warianty z wprowadzonymi znacznikami fluorescencyjnymi (amyNBD i amyFITC), których charakterystyka Tioflawiną T jest niemożliwa, wykazują niezależny od czasu inkubacji rozkład oligomerów. Dla amyNBD smuga na elektroforegramie jest dłuższa, co odpowiada większemu zróżnicowaniu oligomerów, od niższych do wyższych form. Natomiast dla amyFITC obserwuje się jedynie duże formy oligomeryczne, co również nakłada się z wynikami dichroizmu kołowego, gdzie wariant ten wykazywał strukturę β -kardki.

1.1.5. Chromatografia wykluczenia

Inną z natywnych technik separacyjnych stosowanych w analizie oligomerycznych próbek jest SEC. Zastosowanie kolumn opartych o wypełnienia krzemionkowe lub agarozowe, które posiadają odpowiednią porowatość, umożliwia rozdział związków ze względu na ich wielkość. Duże cząsteczki nie są w stanie penetrować porów, co wiąże się z ich wykluczeniem i szybszą elucją z kolumny. Tym samym najmniejsze cząsteczki eluują jako ostatnie. Dobór kolumny wynika z zakresu mas rozdzielanych związków. Wynik analizy zależy od zastosowanego w układzie detektora. W przypadku analiz protein poprzez SEC najczęściej stosowanym jest detektor UV. Wymaga on przygotowania krzywej kalibracyjnej złożonej z białek wzorcowych o znanych masach cząsteczkowych, z której na podstawie otrzymanych czasów retencji, określone są

wielkości cząstek zawartych w analizie. Na takiej samej zasadzie działa inny detektor stężeniowy zwany refraktometrycznym (RI). Detekcja w obu przypadkach jest obciążona znaczącym błędem, który wynika z braku uwzględnienia konformacji przestrzennej białek wzorcowych. Do bezpośredniego określenia mas cząsteczkowych rozdzielanych białek zastosowanie znajduje detektor statycznego rozpraszania światła. Ze względu na zalety i wady każdego z typów detekcji, najlepsze wyniki analiz obserwuje się przy detekcjach łączonych.

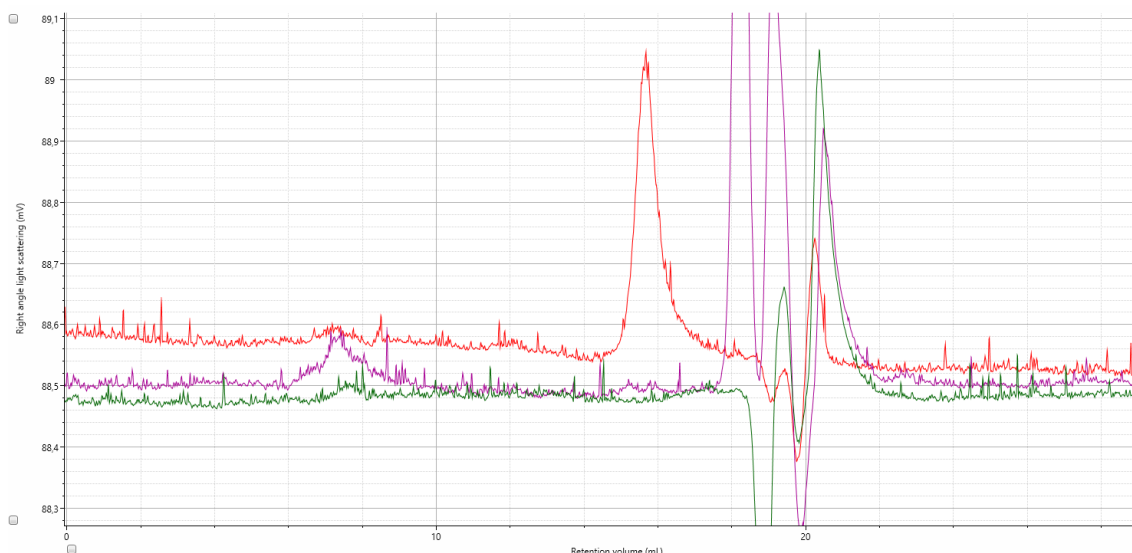
Zastosowanie chromatografii wykluczenia w przypadku mojej pracy z oligomerami amyliny miało być narzędziem do analizy stanu oligomerycznego, ale także miało posłużyć do rozdzielania oligomerów na poszczególne frakcje. Przebadane różne warunki buforowe, kolumny, a także aparaty wyposażone w odmienne detektory nie pozwoliły mi na określenie stanu oligomerycznego zarówno próbek natywnych, jak i stabilizowanych przez sieciowanie. W większości analiz występował problem znikania próbki podczas jej rozdziału chromatograficznego. Dodatki opisanych w literaturze związków zmniejszających oddziaływanie niespecyficzne, jak również wstępne opłaszczanie kolumn także nie pomogło. Najlepszym efektem finalnym, jaki udało mi się osiągnąć, było uwidocznienie się na chromatogramie sygnału pochodzącego od monomerycznej amyliny, co prezentuje Rysunek 31.



Rysunek 31. Chromatogramy z analizy SEC przeprowadzonej na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 (Cytiva) w 40 mM buforze cytrynianowym o pH 4,6. Analizowana próbka amyliny została przygotowana przez jej rozpuszczenie w 2,5% kwasie octowym do stężenia 5 mM, następnie inkubowana w łaźni ultradźwiękowej przez 20 s i rozcieńczona do stężenia 100 μ M przy użyciu buforu do analizy (A) lub 20 mM NaPi (B). Wyznaczona masa cząsteczkowa została obliczona na podstawie nakładających się sygnałów pochodzących od detektora RI (kolor czerwony), a także od detektora RALS (kolor zielony).

Na przedstawionych na Rysunku 31 chromatogramach pojawiający się sygnał, który odpowiada monomerycznej amylinie, uwidocznił się na dwóch detektorach – RI oraz RALS. Podwójna detekcja pozwala na wyznaczenie masy cząsteczkowej eluującej frakcji. Elucja monomeru IAPP przy objętości 15,7 ml w przypadku obu analiz następuje tuż przed wymyciem rozpuszczalnika organicznego oraz soli, pochodzących z buforu. Zastosowanie różnych buforów do rozcieńczania amyliny nie ma znaczącego wpływu na obserwowane wyniki, a pojawiające się różnice w otrzymanych masach mogą wynikać z dokładności aparatu, który ma za zadanie szacować jedynie masy eluujących związków. Przy stosunkowo małych masach cząsteczkowych badanych związków odchylenia te są większe, co nie wpływa znacząco na interpretację wyników.

Przedstawione powyżej wyniki dotyczyły natywnego stanu próbki, stąd obserwacja jedynie monomerycznej postaci amyliny. Stabilizacja oligomerów IAPP, zarówno przez fotosieciowanie, jak i sieciowanie chemiczne, pozwala na rejestrowanie większej różnorodności układu (Rysunek 32).



Rysunek 32. Nalożone chromatogramy z analiz SEC przeprowadzonych na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 (Cytiva) w 40 mM buforze cytrynianowym o pH 4,6. Analizowane próbki amyliny zostały przygotowane przez jej rozpuszczenie w 2,5% kwasie octowym do stężenia 5 mM, inkubację w łaźni ultradźwiękowej przez 20 s i rozcieńczenie do stężenia 100 μ M przy użyciu buforu do analizy. Rozdzielowi zostały poddane: próbka bezpośrednio po rozpuszczeniu (chromatogram czerwony), po 2-godzinnej inkubacji w Tpok. i sieciowaniu bądź PICUP (chromatogram fioletowy), bądź glutaraldehydem (chromatogram zielony). Przedstawione sygnały pochodzą od detektora RALS.

Na Rysunku 32 przedstawiłam porównanie wyników analiz dla próbki amyliny niesieciowanej oraz sieciowanej z wykorzystaniem metody PICUP oraz glutaraldehydu. Sygnały widoczne na tych chromatogramach uchwycone zostały tylko na jednym z detektorów, co nie pozwala na obliczenie mas cząsteczkowych eluujących frakcji. W przypadku detektora RI, ze względu na jego niższą czułość w stosunku do RALS, nie zaobserwowałam różnic między analitami. Dla sieciowanych próbek widoczne są zdecydowane różnice w stosunku do chromatogramu natywnej amyliny. Przy zastosowaniu sieciowania typu PICUP obserwuje się pojawienie się sygnału przy niższej objętości elucji, co odpowiada większym strukturom, a także dwóch sygnałów przy wyższej objętości niż dla monomeru. W przypadku obu typów sieciowania następuje zanik sygnału od monomeru, co wskazuje na prawidłowe działanie odczynników sieciujących, stabilizujących formy oligomeryczne.

1.1.6. Elektroforeza kapilarna

Kolejną z technik zastosowanych przeze mnie do scharakteryzowania oligomerów amyliny była elektroforeza kapilarna (CE). Metoda ta wykorzystuje podobne zjawisko jak standardowa elektroforeza, czyli ruch cząstek naładowanych w polu elektrycznym, natomiast rozdział przebiega nie w żelu, a w kapilarach o mikrometrowej średnicy. Ogranicza to konwekcję i dyfuzję, występującą w przypadku standardowych żeli, a także pozwala na utrzymywanie stałej temperatury bez względu na przyłożone napięcie. Drugim zjawiskiem, charakterystycznym tylko dla CE, jest przepływ elektroosmotyczny (ang. *EOF – electroosmotic flow*). Jest on rezultatem istnienia przy ścianach kapilary podwójnej warstwy elektrycznej, która powstaje w wyniku zetknięcia się z roztworem buforowym ścianek kapilary zbudowanych zwykle z krzemionki. Na skutek tego dochodzi do jonizacji grup silanolanowych, co prowadzi do tworzenia przylegającej warstwy kationów, silnie przyciąganych do ujemnych grup silanolanowych, a także szerszej części dyfuzyjnej zawierającej kationy, które są mniej ściśle związane i mogą się swobodnie poruszać w roztworze. Po przyłożeniu napięcia hydratowane kationy warstwy dyfuzyjnej wędrują w stronę katody, indukując przepływ roztworu w kapilarze. Obecność EOF ma wpływ na wysoką sprawność rozdzielczą CE, a także na charakterystyczny płaski profil przepływu, co objawia się znacznie ostrzejszymi sygnałami w porównaniu do przepływu hydrodynamicznego w HPLC. Przepływ elektroosmotyczny ma również wpływ na kolejność jonów wędrujących w stronę katody. Najszybciej migrują małe kationy wielokrotnie naładowane, następnie pojedynczo naładowane, kolejno duże cząstki kationowe, później cząstki pozbawione ładunku, a na końcu ujemnie naładowane w kolejności od dużych pojedynczych, przez małe wielokrotnie, a następnie pojedynczo naładowane.

Postać jonowa proteiny zależy od jej punktu izoelektrycznego i tym samym od pH buforu, w jakim jest analizowana. Z uwagi na najszybszą elucję związków dodatnio naładowanych w prowadzonych przeze mnie analizach, pH buforu ustalałam poniżej pI monomerycznej amyliny, tak aby występowała ona w formie protonowanej. Wykazana w poprzednich eksperymentach korelacja temperatury z postępowaniem oligomeryzacji udowadnia jak ważnym parametrem jest utrzymywanie stałej temperatury w czasie analizy. W przeprowadzonych przeze mnie rozdziałach stosowałam więc stałą temperaturę 25°C. Analizie poddałam próbki po różnych czasach inkubacji, zarówno bez sieciowania, jak również ustabilizowane przez sieciowanie chemiczne, czy PICUP.

Powtórzyłam także przeprowadzone analizy z użyciem kapilary neutralnej, która eliminuje wpływ EOF. Żadna z analiz nie pozwoliła na uzyskanie powtarzalnych wyników. Biorąc pod uwagę rezultaty eksperymentu DLS, jak również natywnej elektroforezy żelowej, można wnioskować, że być może zbyt duża niejednorodność oligomerycznych próbek nie pozwala na wykonanie powtarzalnych nastrzyków nawet z użyciem autosamplera. Rozwiązaniem mogłoby być uprzednie rozdzielanie usieciowanych oligomerów na frakcje z wykorzystaniem chromatografii wykluczenia. Jak jednak opisałam powyżej, mimo wielokrotnych prób i zastosowania różnorodnych modyfikacji protokołów analizy, okazało się to niemożliwe.

1.2. Warunki denaturujące w charakterystyce oligomerów amyliny

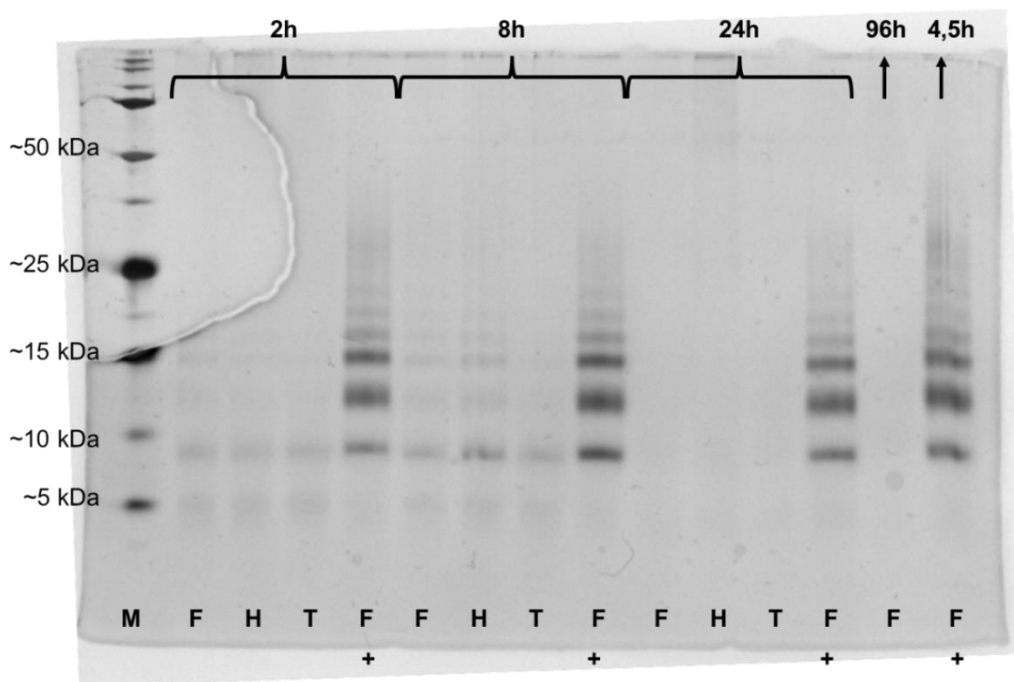
Analizy białek w warunkach denaturujących są technikami zdecydowanie prostszymi w użyciu. W przypadku białek agregujących, po ustabilizowaniu utworzonych form oligomerycznych przez sieciowanie, próbki są zdecydowanie mniej wrażliwe na zmienne warunki, w tym na zmiany temperatury czy wytrząsanie. Niemniej jednak należy mieć na uwadze, że sieciowane białka nie są idealnym odzwierciedleniem natywnych warunków, a stanem w pewnym sensie wymuszonym. Dodany po danym czasie inkubacji odczynnik sieciujący łączy ze sobą najbliższe znajdujące się cząsteczki, a więc stabilizuje naturalnie tworzące się oligomery. Jednak poprzez specyfikę jego reakcji z określonymi grupami chemicznymi może też wpływać na konformację przestrzenną oligomerów. Szczególnie może mieć to miejsce podczas sieciowania chemicznego, gdzie dodatkowo następuje wbudowanie fragmentu odczynnika sieciującego, jak ma to miejsce w przypadku glutaraldehydu. Łączy on grupy aminowe poprzez tworzenie z nimi wiązania iminowego. Stąd też czasem preferowaną metodą jest sieciowanie typu PICUP, które opiera się na rodnikowym mechanizmie łączenia się wzbudzonych reszt aminokwasowych. Ograniczeniem tej metody może być brak odpowiednich reszt w natywnej sekwencji białka lub zbyt dalekie ich położenie względem siebie, co uniemożliwia sieciowanie.

1.2.1. Elektroforeza tricynowa

Elektroforeza denaturująca usieciowanych oligomerów amyliny wymaga dobrania warunków pod kątem separowanych białek. Do rozdziału protein o niewielkiej masie cząsteczkowej dedykowana jest jej odmiana zawierająca trycynę, zamiast glicyny standardowo stosowanej w buforze elektrodowym. Ze względu na masę cząsteczkową

amyliny bliską 4 kDa, do analizy jej oligomerycznych form wybrałam taką właśnie formę elektroforezy.

W pierwszym etapie sprawdziłam wpływ warunków buforowych na stan oligomeryczny próbki, co przedstawiłam na Rysunku 33.

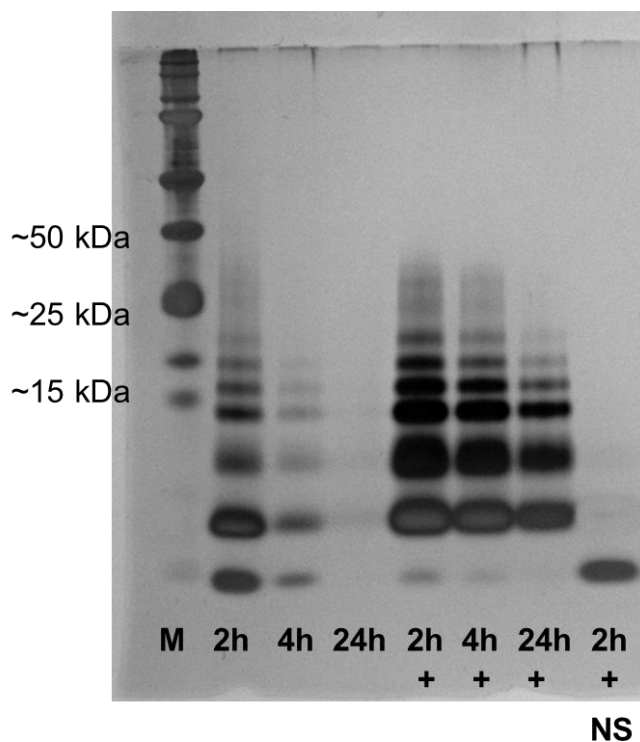


Rysunek 33. Elektroforegram z rozdzielu oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (2, 4,5, 8, 24, 96 godzin) w 20 mM buforach o pH 7,4 (F –bufor fosforanowy; H - HEPES; T - Tris) zawierających 140 mM NaCl oraz 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconych o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem.

Dla amyliny inkubowanej w różnych buforach pozbawionych surfaktantu obserwuje się podobieństwo wielkości tworzących się oligomerów. Niewielkie różnice występują w czasie inkubacji 8 godzin w przypadku buforu Tris, w którym głównie obserwowanym oligomerem jest dimeryczna amyлина, podczas gdy w buforze fosforanowym oraz w HEPES występuje większe zróżnicowanie frakcji. W przypadku każdego z buforów widoczny jest również postęp oligomeryzacji odpowiadający krzywym tioflawinowym. Po 24 godzinach inkubacji, co odpowiada w każdym z przypadków fazie wysycenia, nie obserwuje się już oligomerów amyliny na żelu elektroforetycznym. Może to oznaczać, że utworzone po tym czasie formy są zbyt duże, aby wejść w żel. Bardzo dużą różnicę wywołuje dodatek surfaktantu do buforu inkubacyjnego. W każdym z badanych czasów inkubacji amyliny stabilizuje on formy oligomeryczne, co uwidacznia się w większej intensywności prążków, barwionych srebrem. Warto zauważyć,

iż w obecności surfaktantu po 24 godzinach inkubacji nadal tworzą się mniejsze oligomery, które zanikają dopiero po 96-godzinnej inkubacji.

Z wykorzystaniem różnych typów sieciowania zweryfikowałam wpływ czasu inkubacji w buforze pozbawionym oraz zawierającym surfaktant na tworzące się oligomery amyliny. Na Rysunku 34 zaprezentowałam wynik tego eksperymentu przy zastosowaniu sieciowania chemicznego glutaraldehydem.

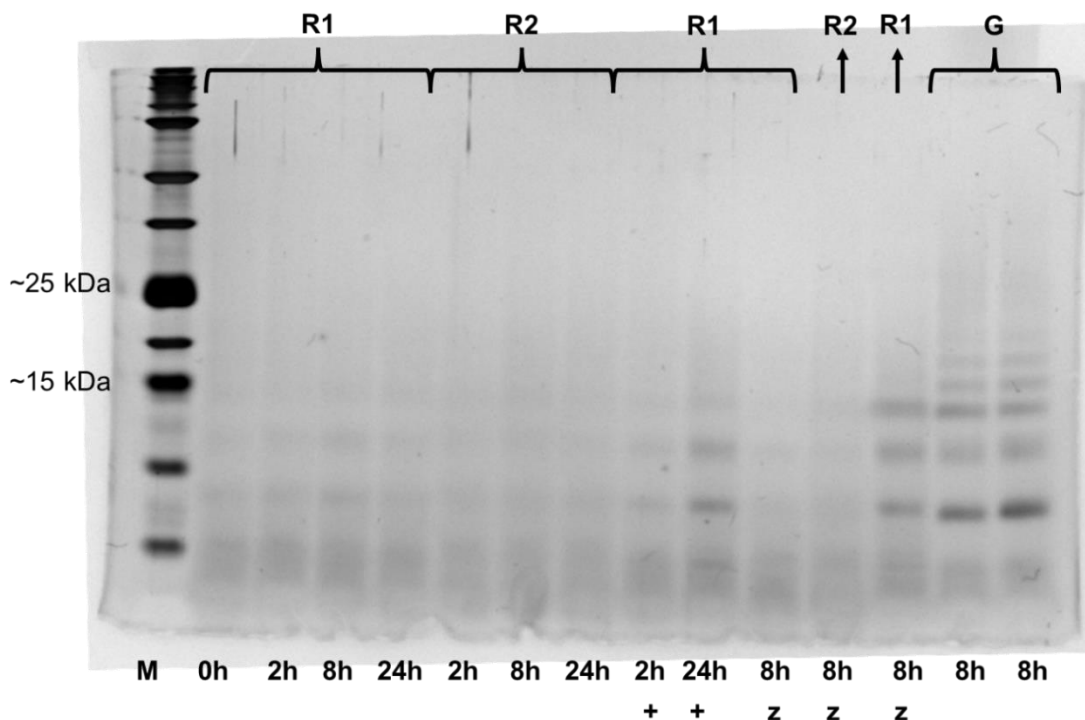


Rysunek 34. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (2, 4, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Próbką oznaczona symbolem „NS” pozbawiona jest sieciowania. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Zaprezentowany elektroforegram potwierdza, iż przy wydłużaniu czasu inkubacji następuje stopniowy zanik oligomerów. Jest to szczególnie dobrze widoczne dla próbek pozbawionych dodatku surfaktantu w buforze inkubacyjnym. Dodatek SDS prowadzi do stabilizacji niskocząsteczkowych oligomerów amyliny, rozpoczynając od dimeru do heptameru. Jednakże byłoby to trudne do zaobserwowania bez zastosowania sieciowania. Przedstawiona na żelu próbka amyliny po 2 godzinach inkubacji w buforze z dodatkiem SDS, ale pozbawiona sieciowania, reprezentuje jedynie monomeryczną i ledwo widoczną

dimeryczną postać amyliny. Najprawdopodobniej wpływ na to mają denaturujące warunki rozdziału elektroforetycznego.

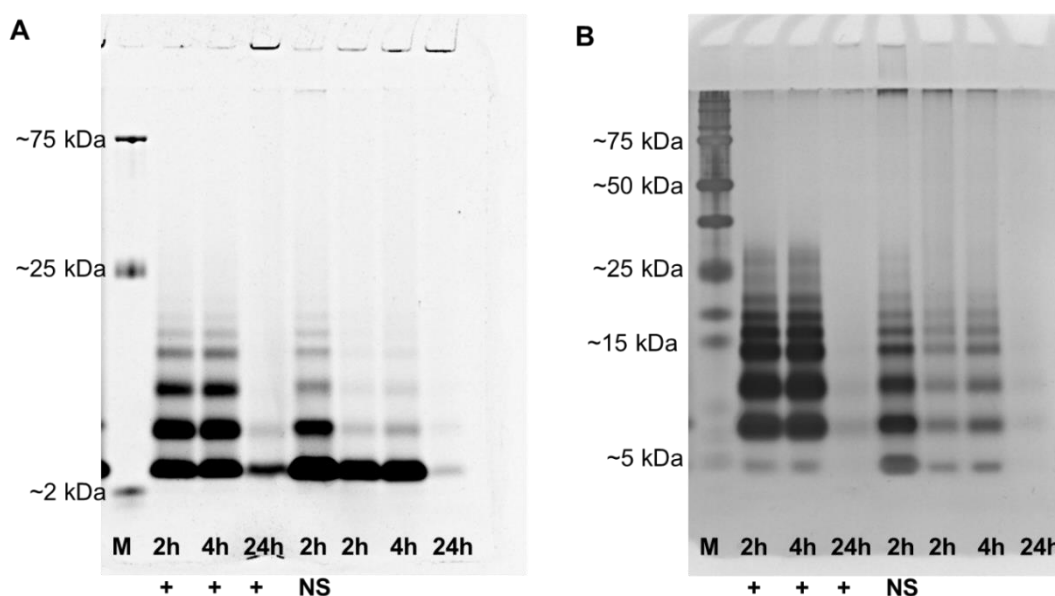
Jako alternatywną metodę dla sieciowania chemicznego wykorzystałam fotosieciowanie typu PICUP z reagentem RuBpy. Sieciowanie to nie wprowadza dodatkowych elementów do sekwencji próbki. Wynik eksperymentu przedstawiłam na Rysunku 35.



Rysunek 35. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (0, 2, 8, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie PICUP (R) lub glutaraldehydem (G). Sieciowanie fotochemiczne prowadziłam z wykorzystaniem RuBpy. Zastosowałam dwa warianty tego sieciowania, różniące się stosunkiem APS względem RuBpy (R1 - 200 μ M RuBpy i 200 μ M APS; R2 - 200 μ M RuBpy i 4 mM APS). Próbkę oznaczone symbolem „z” bezpośrednio przed wykonywaniem elektroforezy zostały zdenaturowane przez 10 minut w temperaturze 75°C.

Jak wykazał eksperyment, zastosowane różne proporcje RuBpy i APS nie mają większego znaczenia w stabilizacji utworzonych oligomerów amyliny. Obserwuje się te same typy merów (od monomeru do tetrameru), zarówno dla próbek sieciowanych RuBpy, jak i glutaraldehydem. Natomiast oligomery amyliny sieciowane chemicznie są lepiej wybarwione na żelu, a także widoczne są ich jeszcze wyższe niż tetramer formy.

Dla wariantów amyliny zawierających znaczniki fluoroscencyjne wykonałam analizy elektroforetyczne po różnych czasach inkubacji próbek ustabilizowanych przez sieciowanie glutaraldehydem. Z uwagi na obecność wewnętrznego fluoroforu w sekwencji amyNBD do wizualizacji prążków wykorzystałam obserwację żelu przez filtr o odpowiedniej długości (Rysunek 36A), a także barwienie srebrem (Rysunek 36B).

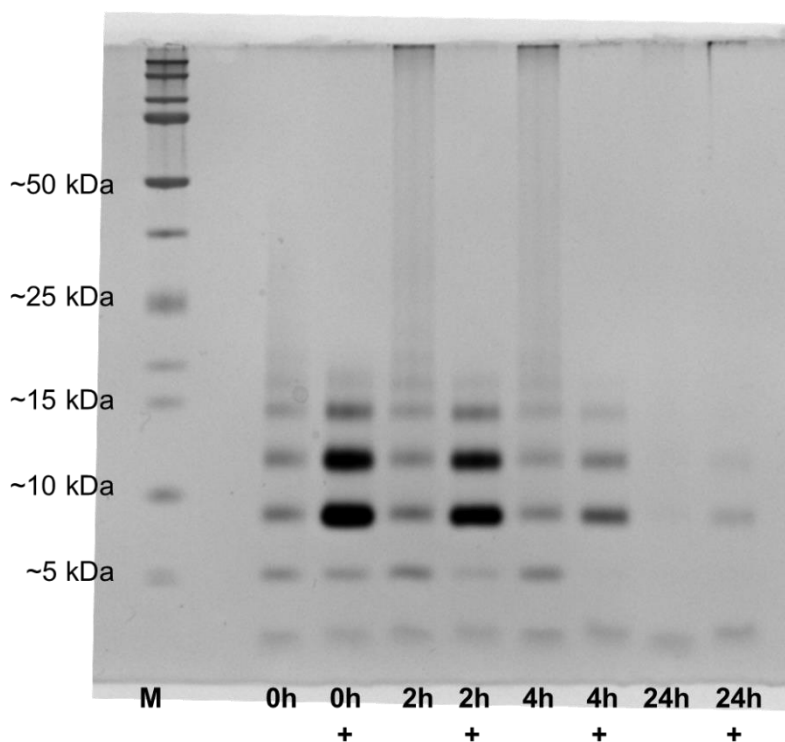


Rysunek 36. Elektroforegramy z rozdziału oligomerów amyNBD otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (2, 4, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Próbką oznaczona symbolem „NS” pozbawiona jest sieciowania. Wizualizacji prążków dokonałam dwoma metodami: poprzez wzbudzenie fluoroforu na żelu falą o długości 488 nm i obserwację emisji przy 590 nm (A), a także poprzez barwienie srebrem (B).

Brak możliwości obserwacji postępu oligomeryzacji amyNBD z zastosowaniem Tioflawiny T spowodował, że badane czasy inkubacji tego wariantu wybrałam w oparciu o wyniki uzyskane dla natywnej amyliny. Jak wynika z zaprezentowanych na Rysunkach 34 i 36 elektroforegramów, utworzone w danych czasach inkubacji oligomery amyNBD odpowiadają wielkością tym obserwowanym dla amyliny. Jedną z istotnych różnic dotyczy nieusieciowanej próbki amyNBD, uzyskanej po 2 godzinach inkubacji: inaczej niż w przypadku natywnej formy, była ona stosunkowo stabilna i demonstrowała te same formy oligomeryczne co próbka poddana sieciowaniu, jedynie ze zwiększoną intensywnością prążka pochodzącego od monomeru. Ponadto okazało się, iż w przeciwieństwie do natywnej amyliny, w amyNBD inkubowanej przez 24h w obecności surfaktantu także zaczyna dochodzić do zaniku niskocząsteczkowych oligomerów. Zastosowanie dwóch technik detekcji było pomocne w ocenie stanu próbki.

Widoczne na żelu A prążki w studzienkach dla 24 godzin inkubacji świadczą o ich dużej wielkości, uniemożliwiającej wejście w żel zagęszczający.

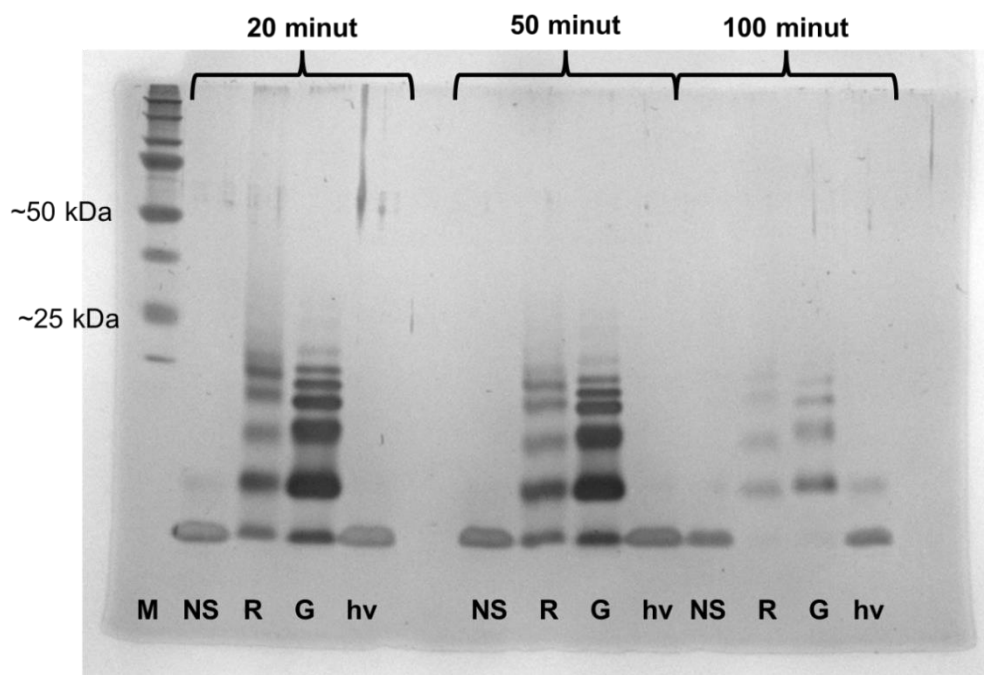
Drugi z fluorescencyjnych wariantów amyliny - amyFITC również poddałam rozdzielni elektroforetycznemu (Rysunek 37). Podobnie jak w przypadku amyNBD czasy inkubacji dobrałam na podstawie wyników testu tioflawinowego przeprowadzonego dla amyliny.



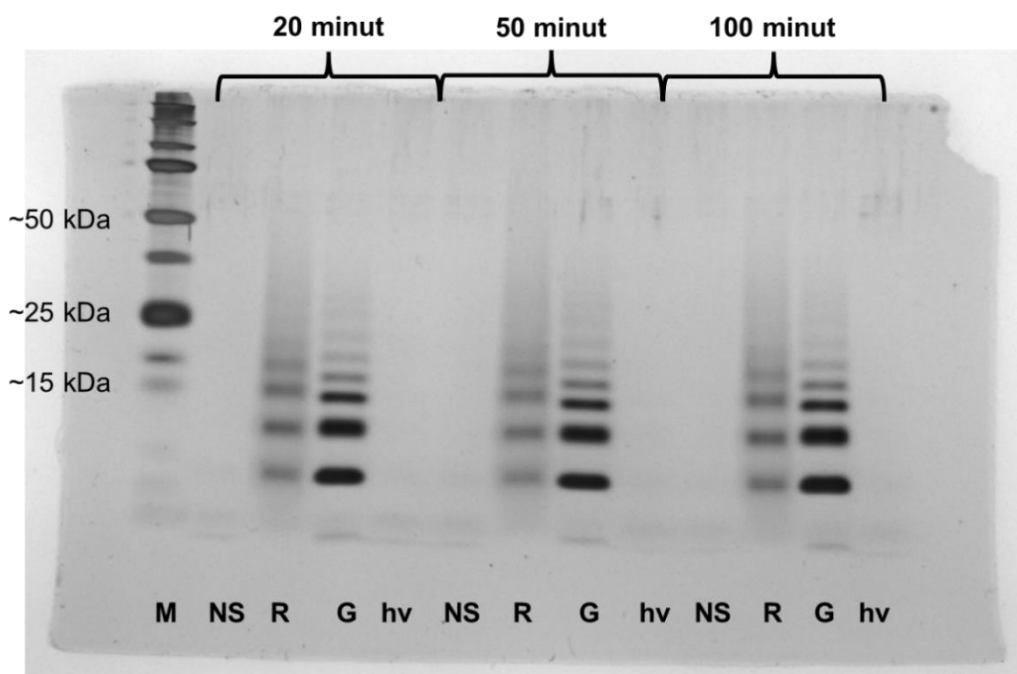
Rysunek 37. Elektroforegram z rozdzielu oligomerów amyFITC otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (0, 2, 4, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Wizualizacji prążków dokonałam przez barwienie srebrem.

Wariant amyFITC wykazuje podobne formy oligomeryczne jak amyNBD, na które składają się głównie niskocząsteczkowe oligomery, zanikające po 24 godzinach inkubacji. Ponadto również obserwuje się stabilizujące właściwości SDS.

Wariant amyliny z resztą fotosieciującą Bpa przeanalizowałam pod kątem stabilizacji jego oligomerów nie tylko z wykorzystaniem zewnętrznych czynników sieciujących, jak w przypadku poprzednich próbek, ale również wykorzystując do sieciowania samą Bpa. Oba typy sieciowania przedstawiłam na Rysunku 38 oraz 39.



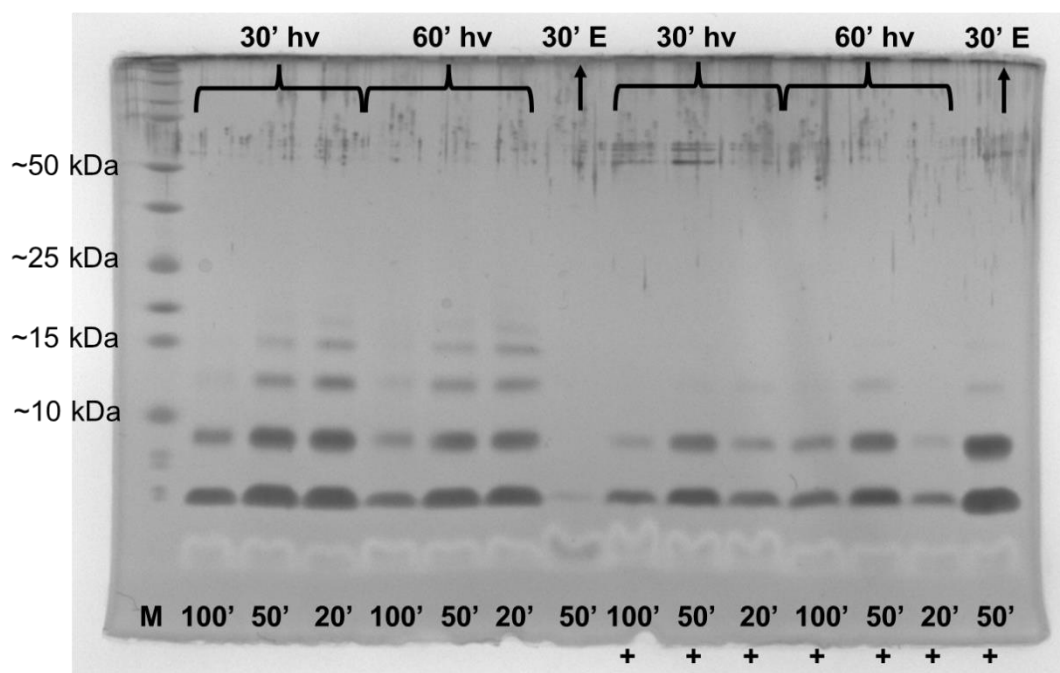
Rysunek 38. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyBpa otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (20, 50, 100 minut) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO. Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie za pomocą RuBpy (R), glutaraldehydu (G) lub naświetlania reszty Bpa (hv). Próbki oznaczone symbolem „NS” pozbawione są sieciowania. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.



Rysunek 39. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyBpa otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (20, 50, 100 minut) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i 0,05% SDS. Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie za pomocą RuBpy (R), glutaraldehydu (G) lub naświetlania reszty Bpa (hv). Próbki oznaczone symbolem „NS” pozbawione są sieciowania. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Sieciowanie wariantu amyBpa z użyciem RuBpy oraz glutaraldehydu prowadzi do stabilizacji tych samych oligomerów w przypadku dwóch początkowych czasów inkubacji, prowadzonej zarówno bez, jak i z dodatkiem surfaktantu. Trwająca 100 minut inkubacja, która odpowiada fazie wysycenia na krzywej tioflawinowej, prowadzi do stopniowego zaniku oligomerów w próbkach pozbawionych SDS. Dla sieciowania przez naświetlanie reszty Bpa widoczna jest delikatna poświata jedynie od monomeru w każdym z czasów inkubacji, podobnie jak dla próbek niesieciowanych.

Ze względu na uzyskany w pierwszym podejściu słabo widoczny wynik sieciowania przez resztę Bpa, postanowiłam sprawdzić różne czasy naświetlania, a także jego sposoby. Zastosowane w poprzednim eksperymencie naświetlanie w otwartej eppendorfcie zamieniłam na naświetlanie w szklanym insercie położonym na lodzie. Dodatkowo w przeprowadzonych eksperymentach zauważyłam, że próbki słabiej stabilizowane wymagają dłuższego barwienia srebrem, co zaburza jednak detekcję pozostałych prążków. Dlatego takie próbki postanowiłam analizować na odrębnych żelach (Rysunek 40).

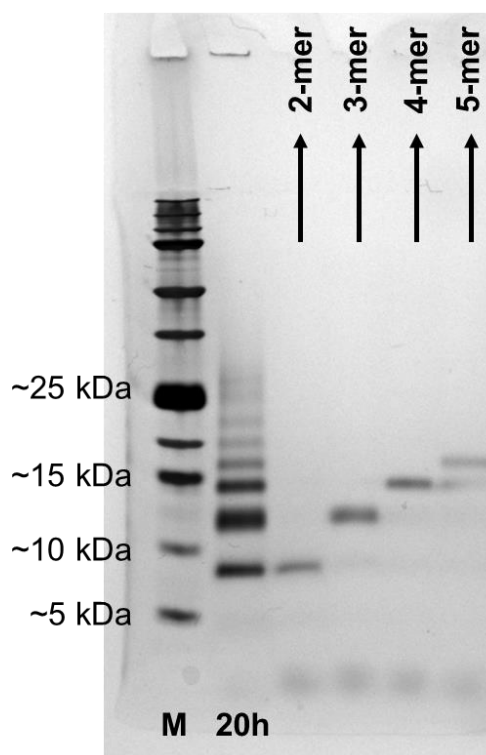


Rysunek 40. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyBpa otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (20, 50, 100 minut) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym sieciowaniu próbek przez naświetlanie w insertach (hv) przez 30 lub 60 minut. Próbki oznaczone symbolem „E” naświetlane były od góry w otwartej eppendorfcie.

Zastosowane modyfikacje pozwoliły zaobserwować prążki pochodzące ze stabilizacji oligomerów amyBpa przez naświetlanie reszty fotosieciującej. W próbkach bez SDS wyraźnie widoczna jest różnica w metodzie sieciowania, gdzie zastosowanie insertu przynosi lepsze rezultaty. Ponadto w każdej z próbek czas naświetlania nie ma większego znaczenia na tworzące się formy oligomeryczne. W próbkach z SDS stabilny jest głównie monomer oraz dimer amyBpa niezależnie od metody naświetlania.

1.2.2. Elucja oligomerów z żelu

Jedną z alternatywnych dla chromatografii wykluczenia technik oczyszczania frakcji oligomerycznych jest elucja z żelu. Metoda ta opiera się na rozdzieleniu na żelu elektroforetycznym ustabilizowanych przez sieciowanie oligomerów, a następnie wycięciu prążków odpowiadających poszczególnym merom. W kolejnym kroku białka te z zastosowaniem odpowiednich buforów i warunków wytrząsania mogą zostać wyeluowane z żelu do roztworu, a po wielokrotnej dializie otrzymane w postaci oczyszczonych frakcji. Opisaną powyżej metodę wykorzystałam do izolacji poszczególnych form oligomerycznych amyliny, a wyniki tego eksperymentu przedstawiłam na Rysunku 41.



Rysunek 41. Elektroforegram z rozdzielenia wyeluowanych z żelu oligomerów amyliny otrzymanych po 20 godzinach jej inkubacji w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i 0,05% SDS. Rozdział został przeprowadzony w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Efektom przeprowadzonego eksperymentu było uzyskanie poszczególnych frakcji oligomerów amyliny, stabilnych w danym buforze w temperaturze 4°C nawet do tygodnia. Wykorzystanie tak uzyskanych rozdzielonych oligomerów w dalszych eksperymentach okazało się jednak niemożliwe ze względu na to, że zawierają one w sobie zanieczyszczenia niewykrywalne standardowymi metodami analiz, a interferujące z badanymi białkami, co wpływało na otrzymywane wyniki. Najprawdopodobniej mogły być to pozostałości żelu, bądź SDS. W związku z brakiem skutecznej metody oczyszczania i separacji oligomerów postanowiłam wykorzystywać ich mieszaninę, każdorazowo przygotowaną według tego samego protokołu, uwzględniającego wirowanie w celu oddzielania frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej.

2. Oddziaływanie oligomerów amyliny z ludzkim proteasomem

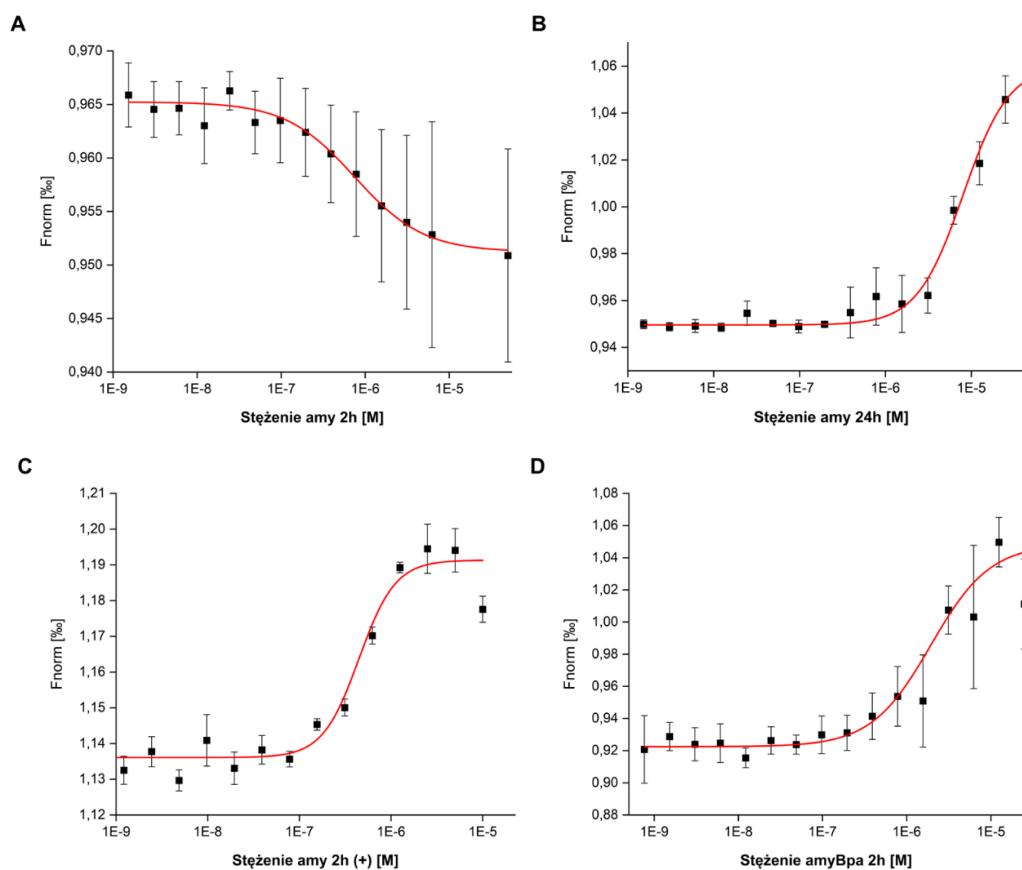
Pojawiające się w literaturze doniesienia o wpływie białek agregacyjnych na aktywność proteasomu, skłoniły nas do zbadania tego wpływu w odniesieniu do oligomerów amyliny. Impulsem do działania była opublikowana w 2018 roku w czasopiśmie Nature Communications praca grupy Smitha [1], udowadniająca wpływ na aktywność proteolityczną h20S oligomerów peptydu A β , wykazującego przecież liczne powiązania z amyliną. Po przeprowadzonej dogłębnej charakterystyce procesu oligomeryzacji IAPP, postanowiłam określić siłę jej oddziaływania z proteasomem, a także ustalić miejsce interakcji.

2.1. Termoforeza mikroskalowa (MST)

Do określania siły oddziaływania oligomerów amyliny z ludzkim proteasomem wykorzystywałam termoforezę mikroskalową. MST jest stosunkowo nową, coraz prężniej rozwijającą się techniką. Funkcjonalność tej metody polega na możliwości badania wielu różnych układów, a jedynym warunkiem koniecznym jest obecność wewnętrznego fluoroforu, bądź znacznika dołączonego kowalencyjnie do cząsteczki będącej celem, tzw. targetem. Oddziaływanie niekowalencyjne typu target-ligand prowadzi do różnic we fluorescencji w stosunku do niezwiązanych molekuł, co umożliwia określenie siły, z jaką ze sobą one oddziałują. Różnice we fluorescencji wynikają z dwóch efektów: TRIC - zmiany intensywności fluorescencji zależnej od temperatury oraz termoforezy, czyli ruchu molekuł wzdłuż mikroskopowego gradientu temperatury, indukowanego za pomocą lasera podczerwonego. Natomiast sam ruch molekuł zależny jest od takich

właściwości jak: rozmiar, ładunek, kształt i/lub struktura otoczki hydratacyjnej. Cząsteczka zawierająca fluorofor wykazuje różną ruchliwość gdy oddziałuje z inną molekułą i gdy występuje w formie niezwiązanej, co obserwuje się właśnie pod postacią odmiennych wartości fluorescencji po jej wzbudzeniu.

Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystałam możliwość wyznakowania cząsteczek proteasomu znacznikiem fluorescencyjnym opartym na estrze NHS, oddziałującym z grupami aminowymi reszt lizyny. Amylinę poddałam odpowiednio 2- i 24-godzinnej inkubacji w celu utworzenia zarówno małych, rozpuszczalnych oligomerów, jak i β -karkowych form prefibrylarnych. Sprawdziłam również wpływ dodatku SDS na oddziaływanie między obiema molekułami. Ponadto pomiary wykonałam również dla wariantu amyBpa. Wszystkie otrzymane wyniki przedstawiłam w postaci wykresów na Rysunku 42.



Rysunek 42. Wykresy zmian fluorescencji proteasomu (targetu) w zależności od stężeń liganda. Pomiary wykonałam dla amyliny (po 2 lub 24 godzinach inkubacji) oraz jej wariantu amyBpa (po 2 godzinach inkubacji) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w próbce po 2h inkubacji IAPP dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczony symbolem „+”). Dla każdej z uzyskanych wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Wykresy powstały w oparciu o pomiar modułem spectral shift na aparacie Monolith X (NanoTemper), a następnie dopasowaniu krzywych według modelu Hill1 (Origin).

Z przeprowadzonych badań wstępnych wynikało, że 1-godzinny czas inkubacji amyliny, w dowolnym buforze, jest czasem niewystarczającym do ustabilizowania się układu oligomerycznego, co uniemożliwiało wyznaczenie stałej oddziaływania z h20S. Minimalnym czasem inkubacji okazały się 2 godziny. Ponadto istotny był czas inkubacji targetu z ligandem i w tym przypadku optymalne okazało się 30 minut. Taki czas inkubacji pozwolił na powstanie oddziaływania bez nadmiernej adsorpcji białek do kapilary. Stosunkowo duże wartości błędów na niektórych wykresach wynikają z dynamiki układu, jakim jest mieszanina oligomerów. Wyniki wyznaczonych sił oddziaływania poszczególnych próbek amyliny z ludzkim proteasomem 20S zestawiam w Tabeli 1.

Tabela 1. Wyznaczone za pomocą MST wartości EC50 dla oddziaływania proteasomu 20S z oligomerami amyliny otrzymanymi po 2- lub 24-godzinnej inkubacji w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i wzbogaconym (+) lub nie o 0,05% SDS.

NAZWA PRÓBK	EC50 [μM]
AMY 2H	0,748 \pm 0,455
AMY 24H	8,005 \pm 0,815
AMY 2H (+)	0,446 \pm 0,077
AMYBPA 2H	1,929 \pm 0,699

Każda z wyznaczonych stałych mieści się w zakresie stężeń mikromolowych, co wskazuje na stosunkowo silne oddziaływanie. Najniższa wartość EC50 występuje dla oddziaływania proteasomu z oligomerami amyliny otrzymanymi po 2 godzinach inkubacji w buforze zawierającym SDS. Niewiele większą wartością charakteryzuje się ten sam układ, ale w warunkach pozbawionych dodatku surfaktantu. Otrzymane wyniki wskazują, że najsilniej oddziałują z ludzkim proteasomem 20S niskocząsteczkowe oligomery amyliny, które występują w początkowych fazach oligomeryzacji. Potwierdza to również silniejsze oddziaływanie dla wariantu amyBpa po 2 godzinach inkubacji w stosunku do 24-godzinnej inkubacji amyliny.

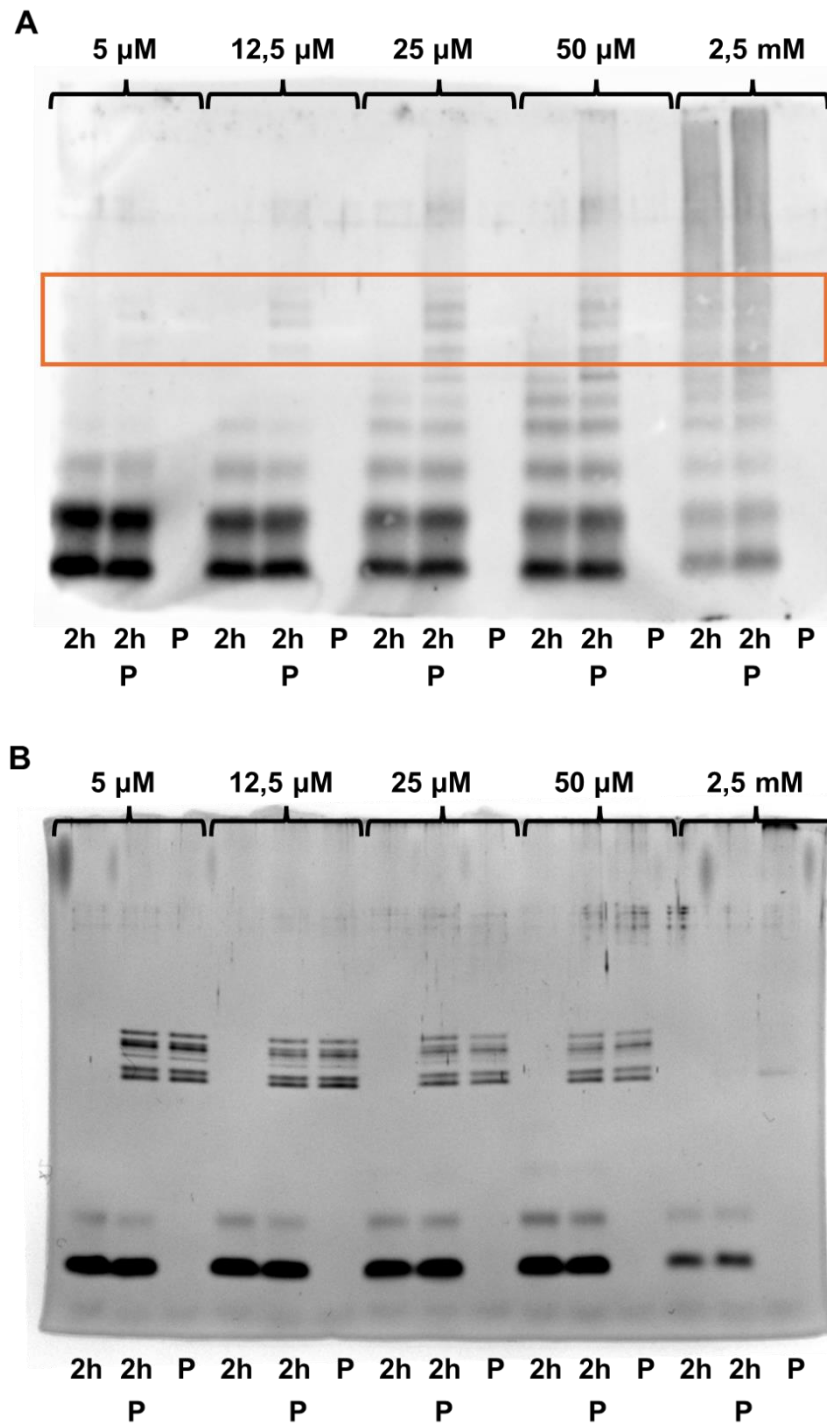
2.2. Spektrometria mas

W celu lokalizacji miejsca oddziaływania proteasomu z oligomerami amyliny postanowiłam wykorzystać metodę bottom up z proteomiki. Polega ona na trawieniu enzymatycznym próbki, a następnie analizie mas cząsteczkowych powstałych fragmentów, które są możliwe do przewidzenia ze względu na znane sekwencje badanych

białek, a także specyficzność proteolizy enzymatycznej. Połączenie powyższej metody z sieciowaniem z wykorzystaniem selektywnych odczynników sieciujących pozwala na ustalenie miejsca oddziaływania. Wynika to ze zdolności odczynnika sieciującego do łączenia dwóch, oddziałujących ze sobą molekuł, cząsteczką o charakterystycznym widmie masowym, co pozwala na identyfikację łączonych przez nią reszt aminokwasowych. Aby zwiększyć szansę na powodzenie eksperymentu, warto jest zastosować różne podejścia. Badania z wykorzystaniem proteomiki, mimo prostoty w swoim założeniu, również wymagają żmudnej optymalizacji.

Istotnym parametrem jest rodzaj odczynnika sieciującego. Najłatwiej interpretowalne są wyniki dla związków kompatybilnych ze spektrometrią mas, których fragmentacja przebiega w sposób znany i zawsze taki sam. Wśród komercyjnie dostępnych odczynników występuje cała gama związków, różniących się zarówno długością, jak i selektywnością wobec reszt aminokwasowych. Długość linkera jest bardzo istotnym parametrem. Zarówno zbyt krótki, jak i zbyt długi łącznik może uniemożliwić sieciowanie między molekułami.

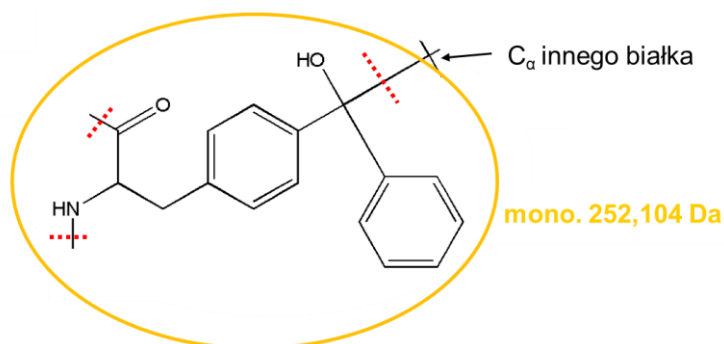
Do sieciowania oligomerów amyliny zdecydowałam się na wybór DSSO. Jest to 10 Å odczynnik sieciujący selektywny względem grup aminowych lizyn. Stanowi to dobre rozwiązanie z uwagi na fakt, że amyлина w swojej sekwencji posiada zaledwie jedną lizynę, co znacząco ogranicza liczbę możliwych kombinacji po sieciowaniu. Sam proces sieciowania często dotyczy tylko niewielkiej części cząsteczek obecnych w roztworze, co jest jednak wystarczające w niezwykle czulej spektrometrii mas. Przed wykonaniem kosztownych analiz niezbędne jest potwierdzenie obecności usieciowanego kompleksu. Wynik takiego eksperymentu przedstawiłam na Rysunku 43.



Rysunek 43. Membrana western blot (A) oraz elektroforegram wybarwiony srebrem (B) z sieciowania oligomeryzowanej amyliny do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem odczynnika DSSO. Stężenia odczynnika sieciującego podane są u góry membrany/żelu. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „2h” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez 2h w warunkach oligomeryzacyjnych. W ramce zaznaczonej na membranie (A) widoczne są pojawiające się prążki od kompleksu proteasomu z oligomerami amyliny. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Po przeprowadzeniu rozdzielania sieciowanych próbek za pomocą standardowej elektroforezy w warunkach denaturujących nie udało mi się jednoznacznie potwierdzić zachodzącej stabilizacji kompleksu. Obserwowałam jedynie stopniowe, delikatne zanikanie prążków od proteasomu wraz ze zwiększającym się stężeniem DSSO. Opisaną zależność zarejestrowałam nie tylko dla próbek z kompleksem, ale również dla samego proteasomu, dlatego zdecydowałam się na wykorzystanie immunodetekcji. W tym celu wykonałam western blot z zastosowaniem I-rzędowych przeciwciał skierowanych na fragment sekwencji amyliny. W ten sposób jednoznacznie potwierdziłam obecność amyliny na wysokości prążków od proteasomu. Przeciwciało wykryło amylinę na tej wysokości jedynie w próbach z kompleksem, co świadczy o jego tworzeniu. Najlepszą próbką okazało się być 25 μ M stężenie DSSO, ponieważ w tych warunkach wyraźnie widoczny jest kompleks, który nie nakłada się z utworzonymi oligomerami amyliny.

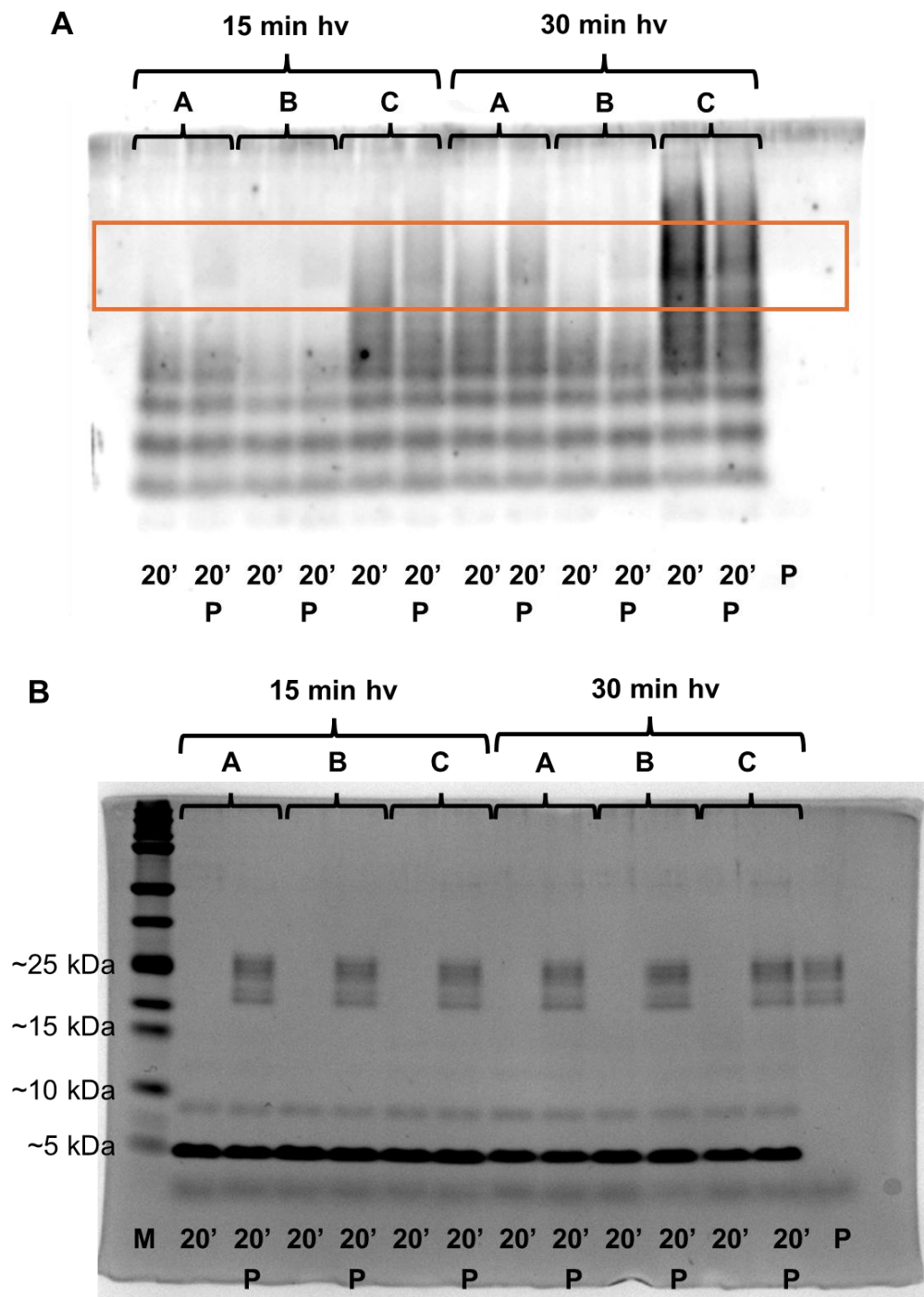
Innym zastosowanym przeze mnie podejściem do sieciowania amyliny z proteasomem było wykorzystanie wariantu z wprowadzoną resztą fotosieciującą Bpa, która wiąże się z C α znajdującym się najbliżej jej łańcucha bocznego. Wzór strukturalny reszty Bpa po zajściu reakcji sieciowania z inną cząsteczką białkową przedstawiłam na Rysunku 44.



Rysunek 44. Wzór strukturalny reszty fotosieciującej Bpa i jej monoizotopowa masa cząsteczkowa po zajściu reakcji sieciowania z inną cząsteczką białkową.

Zdecydowałam się na wykorzystanie amyBpa w analizach proteomicznych, ponieważ wyniki MST potwierdziły oddziaływanie tego wariantu z h20S. Zaletą podejścia z wykorzystaniem wewnętrznej reszty sieciującej miało być ułatwienie analiz ze względu na brak sieciowania między resztami aminokwasowymi samego proteasomu. Opierając się na wynikach otrzymanych przy charakteryzowaniu oligomerów amyBpa wybrałam 20-minutowy czas jej inkubacji, odpowiadający fazie utajenia. Przed

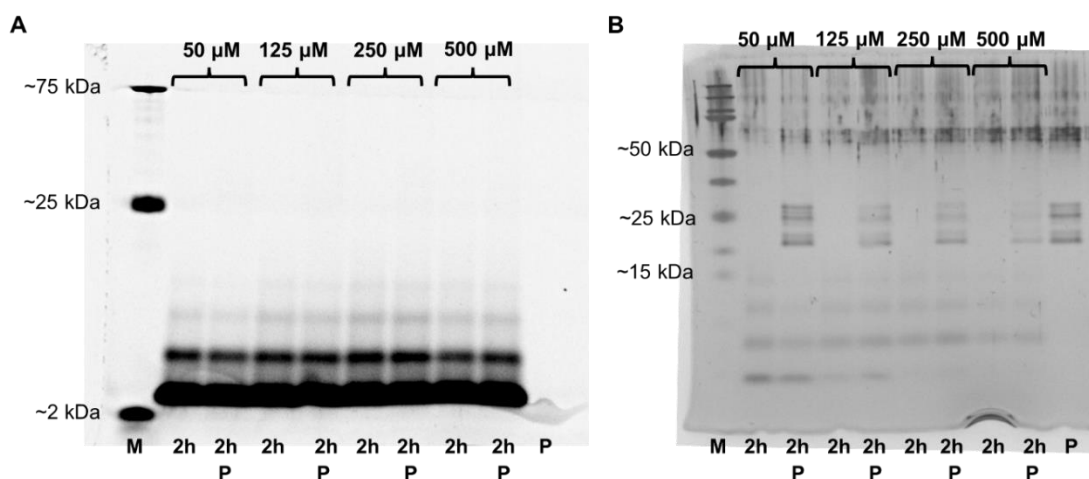
przeprowadzeniem rejestracji widm MS musiałam też ustalić warunki, w których możliwa byłaby obserwacja kompleksu amyBpa z proteasomem (Rysunek 45).



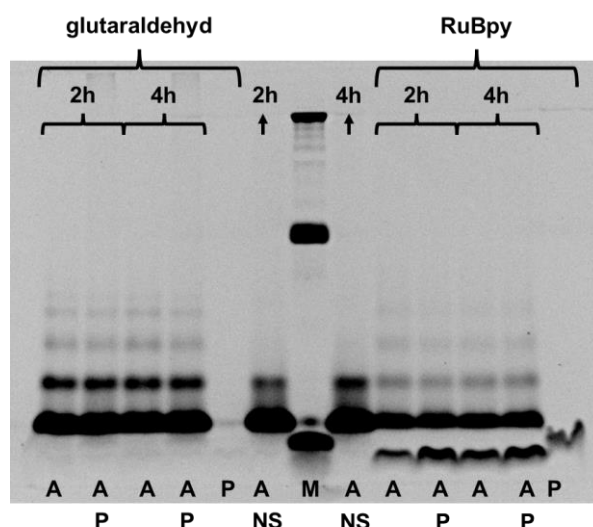
Rysunek 45. Membrana western blot (A) oraz elektroforegram wybarwiony srebrem (B) z sieciowania oligomeryzowanej amyBpa do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem naświetlania reszty Bpa długością fali 365 nm. Czas naświetlania przedstawiony jest u góry membrany/żelu. Sprawdziłam różne aparaty do naświetlania, stąd A oznacza lampę UV, B latarkę, a C diodę. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „20” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez 20 minut w warunkach oligomeryzacyjnych. Ramka zaznaczona na membranie (A) odpowiada położeniu kompleksu proteasomu z oligomerami amyliny. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Podobnie jak w przypadku sieciowania DSSO, na elektroforegramie trudne było zlokalizowanie tworzącego się kompleksu amyBpa z h20S, dlatego ponownie wykorzystałam immunodetekcję. Ze względu na większą moc promieniowania diody obserwuje się dla niej najintensywniejsze sieciowanie, ale w dalszej analizie mogłoby to nie być pożądane. Dlatego do eksperymentów proteomicznych wykorzystałam 30-minutowe naświetlanie lampą UV.

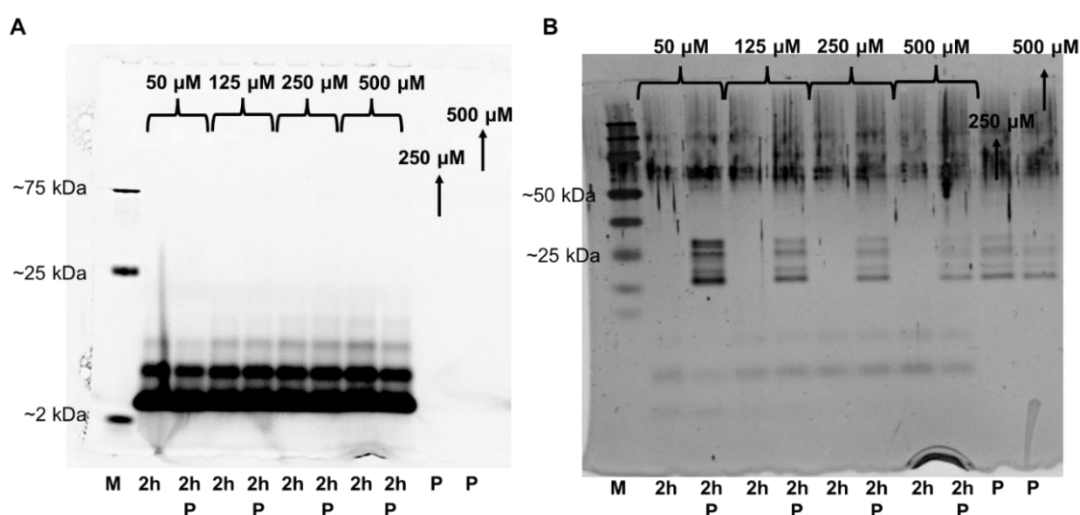
Trzecim podejściem badawczym było wykorzystanie amylin z fluoroforami. Założeniem eksperymentu było ustabilizowanie kompleksu amyNBD lub amyFITC przez sieciowanie, a następnie obserwacja przez filtr o określonej długości fali, czy pojawia się kompleks. W przypadku jego tworzenia należałoby wykonać elektroforezę 2D, za pomocą której można wyizolować pojedyncze podjednostki proteasomu i po poddaniu ich trawieniu enzymatycznemu, przeanalizować mieszaninę fragmentów za pomocą spektrometrii mas. W celu wykonania założonego planu rozpoczęłam od kroku pierwszego, czyli potwierdzenia obecności fluoroforu w rejonie tworzącego się kompleksu za pomocą elektroforezy w warunkach denaturujących. Dla amyNBD wykorzystałam sieciowanie chemiczne przez DSSO (Rysunek 46) oraz glutaraldehydem (Rysunek 47), a także sieciowanie typu PICUP (Rysunek 47). Dla amyFITC sprawdziłam sieciowanie z DSSO (Rysunek 48).



Rysunek 46. Elektroforegramy (A - wizualizacja przez filtr; B - barwienie srebrem) z sieciowania oligomeryzowanej amyNBD do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem odczynnika DSSO. Stężenia odczynnika sieciującego opisane są u góry żeli. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „2h” oznacza obecność amyNBD inkubowanej przez 2 godziny w warunkach oligomeryzacyjnych.



Rysunek 47. Elektroforegram wybarwiony srebrem z sieciowania amyNBD do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem glutaraldehydu lub RuBpy. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „A” oznacza obecność amyNBD inkubowanej odpowiednio przez 2 lub 4 godziny w warunkach oligomeryzacyjnych, a „NS” wskazuje na brak sieciowania.



Rysunek 48. Elektroforegramy (A - wizualizacja przez filtr; B - barwienie srebrem) z sieciowania amyFITC do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem odczynnika DSSO. Stężenia odczynnika sieciującego opisane są u góry żeli. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „2h” oznacza obecność amyFITC inkubowanej przez 2h w warunkach oligomeryzacyjnych..

W każdym z zaprezentowanych typów sieciowania dla dwóch różnych wariantów amyliny z fluoroforem nie udało się zaobserwować jego obecności na wysokości prążków odpowiadających proteasomowi, co mogłoby świadczyć o tworzeniu się kompleksu. Może to wynikać przede wszystkim z niskiego stopnia sieciowania, co uniemożliwia detekcję fluoroforu. Z uwagi na otrzymane w powyższych eksperymentach wyniki, niemożliwe było przeprowadzenie z powodzeniem elektroforezy 2D, a zatem ścieżka ta została odrzucona jeszcze przed analizami z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Podsumowując, do analiz proteomicznych wykorzystałam sieciowanie do proteasomu oligomerów dwóch wariantów amyliny: jej natywnej wersji, którą sieciowałam za pomocą DSSO oraz wariantu amyBpa ustabilizowanego w kompleksie z proteasomem poprzez naświetlanie. Przygotowane sieciowane próbki poddawałam trawieniu enzymatycznemu z wykorzystaniem trypsyny oraz chymotrypsyny w stosunku 1:20 do sumy ilości białek w roztworze. Ponadto bezpośrednio przed trawieniem dodawałam komercyjny surfaktant RapiGest (Waters), który ma za zadanie rozluźnić strukturę białek i umożliwić lepsze trawienie przez enzymy. Tak przygotowane próby zostały poddane analizie na aparacie ZenoTOF 7600 (Sciex) przez dr inż. Pawła Wityka.

Otrzymane wyniki z sieciowania DSSO są trudno interpretowalne ze względu na liczbę pojawiających się sygnałów. Zdecydowanie lepsze efekty dało sieciowanie wariantu amyBpa, w przypadku którego przy porównywaniu chromatogramów TIC dla samego amyBpa, samego h20S i ich kompleksu widoczne były różnice. Niestety, dla wykonanych pięciu odrębnych powtórzeń eksperymentu, chromatogramy kompleksu różniły się między sobą, co wskazuje na słabą powtarzalność. Może to wynikać zarówno ze zmienności badanego układu, jak również z niskiego stopnia sieciowania próbek, dlatego ważna jest analiza specyficznych sygnałów o stosunkowo niskich intensywnościach. Aby lepiej obserwować sygnały o wyjątkowo niskiej intensywności, można wykonać kilka zabiegów, które je zwiększą, co ułatwiłoby interpretację. W związku z tym do analizy kompleksu amyBpa z h20S wykorzystaliśmy metodę SWATH, która dzieli cały zakres widma MS na zadaną liczbę okien i w każdym z nich wykonuje analizę MS/MS. Ponadto obecność dodatkowego kwadrupola oraz zastosowanie modułu Nano pozwala na zwiększenie intensywności otrzymywanych sygnałów nawet 10-krotnie. Na otrzymanych widmach widoczny jest tworzący się kompleks, natomiast są one trudne do analizy i ich interpretacja wciąż jest w toku.

Podjęłam również próby interpretacji wyników z wykorzystaniem bezpłatnych programów do analiz proteomicznych. Jednym z nich jest MeroX 2.0. Program ten pozwala na wybór stosowanego odczynnika sieciującego z dostępnego katalogu lub dodanie własnego. Następnie poprzez dołączenie plików FASTA analizowanych białek, a także zaznaczenie używanych enzymów w krótkim czasie przeprowadza analizę, której wynikiem jest zestawienie możliwych kombinacji utworzonych kompleksów wraz z podanym prawdopodobieństwem. Wyniki otrzymane z programu MeroX dla kompleksu amyBpa i h20S zamieściłam w Tabeli 2.

Tabela 2. Analiza wyników MS z sieciowania amyBpa do h20S za pomocą programu MeroX 2.0. Kolorem żółtym zazaczyłam reszty aminokwasowe, przez które z tym samym prawdopodobieństwem może zachodzić sieciowanie.

ANA LIZA	FRAGMENT AMYLINY	FRAGMENT h20S	PODJED NOSTKA h20S	PRAWDOPOD OBIENSTWO
1	¹² LAN Bpa LVHSSN NF ²³	¹⁷² EKNYTDEAIET DDLTI K ¹⁸⁸	α 7	28%
	¹² LAN Bpa LVHSSN NF ²³	¹³³ DSFKA GGASASA MLQPL ¹⁴⁸	β 1	14%
	² CNTATCATQRLN Bpa LVHSSNNF ²³	¹⁶⁸ AIG SASEGA QS SL ¹⁸⁰	α 5	12%
2	¹³ AN Bpa LVHSSNN FGAILSSTNVGSN TY ³⁷	¹⁹⁰ GDQIPKFAVA TL ²⁰¹	β 6	8%
	3	¹³ AN Bpa LVHSSN NF ²³	⁷² ITENIGCV MTG MTADSR SQVQR ⁹³	α 6
¹³ AN Bpa LVHSSN NF ²³		⁸⁶ SLADIAREEASN FR ⁹⁹	α 3	9%
¹³ AN Bpa LVHSSN NF ²³		⁷¹ ITENIGCV MTG MTADSR SQVQR ⁹²	α 6	6%
4	¹ KCNTATCATQRL AN Bpa L ¹⁶	¹ S SIGTGYDLSHS TF ¹⁴	α 3	29%
	¹ KCNTATCATQRL AN Bpa L ¹⁶	¹⁸¹ SMTL KEAIKS SL ¹⁹³	α 5	18%
	¹² LAN Bpa LVHSSN NFGAIL ²⁷	¹⁸² SYNR FQIATVT EK ¹⁹⁴	β 4	13%
5	¹² LAN Bpa LVHSSN NF ²³	¹⁶ S PEGRLY ²²	α 6	50%
	¹² LAN Bpa LVHSSN NFGAIL ²⁷	⁸² RVL VHR AR ⁸⁹	α 2	26%

Przeanalizowane wyniki z użyciem MeroX dla sieciowania h20S z amyBpa wskazują na 8 z 14 różnych podjednostek proteasomu, dodatkowo ze zbliżonym

prawdopodobieństwem. Najwyższe wykazane prawdopodobieństwo wynosi 50% i dotyczy podjednostki $\alpha 6$, która również w wynikach pojawia się najczęściej. Analizy próbek sieciowanych DSSO wskazały jedynie na sieciowanie między podjednostkami proteasomu.

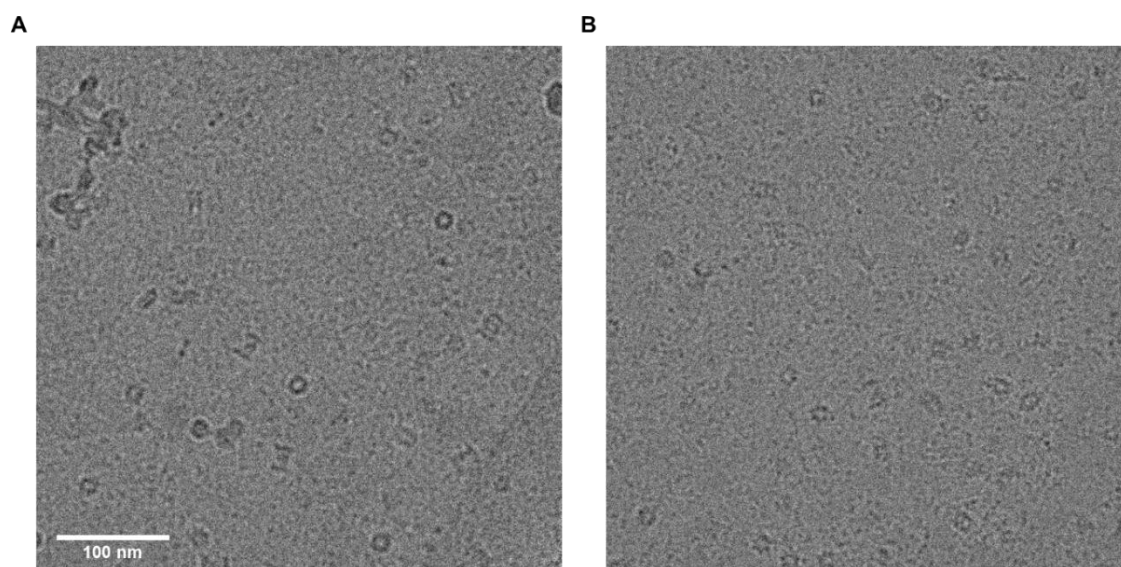
Zarówno manualne analizy widm MS, a także wyniki otrzymane przez program MeroX skłaniają do wniosków, że amyлина może nie mieć jednego, specyficznego miejsca oddziaływania z proteasomem. Wszystkie uzyskane rezultaty wskazują, że miejsc tych może być wiele.

2.3. Mikroskopia krioelektronowa

Alternatywną względem spektrometrii mas techniką, pozwalającą na określenie miejsca oddziaływania między molekułami, może być mikroskopia krioelektronowa. W tych badaniach wykorzystałam wariant amyBpa, ponieważ podczas analiz proteomicznych dobrałam już warunki tworzenia i stabilizacji kompleksu tego wariantu z h20S. Różnicę w przygotowaniu próbki do mikroskopii stanowił fakt, że stosowane w spektrometrii mas stężenia są zbyt niskie dla tej techniki. Wymagało to więc odpowiedniego zwiększenia stężenia proteasomu i tym samym oligomerów amyliny, w celu zachowania wyznaczonej proporcji między molekułami, która umożliwia obserwację ich oddziaływania. Z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność oligomerów amyliny niemożliwe było przeprowadzenie eksperymentów w tak wysokim jej stężeniu, dlatego użyłam najwyższe z jej możliwych przebadanych przez mnie stężeń, a w celu ochrony przed ewentualną proteolizą przez h20S, w jednej z próbek poddałam go działaniu inhibitora - bortezomibu. Kolejnym etapem, który wymagał optymalizacji było przygotowanie siatek, na których osadzana jest próbka. Standardowo siatki poddawane są wyładowaniom jarzeniowym (ang. *glow discharge*), które stosuje się w celu modyfikacji powierzchni siatek dla zwiększenia adhezji próbek. W badaniach proteasomu na tym etapie przeprowadza się wysycanie siatek *n*-pentyloaminą, która powoduje układanie się cylindrycznych cząsteczek enzymu zarówno wertykalnie, jak i horyzontalnie. Duża różnorodność pozycji białka umożliwia późniejszą rekonstrukcję jego struktury z lepszą rozdzielczością. Kiedy stężenie białka jest niewystarczające lub gdy ligandy wpływają na białko niekorzystnie, to zalecane jest pokrywanie siatek monowarstwowym tlenkiem grafenu. Wadą stosowania grafenu może być jednak wysokie tło oraz brak możliwości wykorzystania *n*-pentyloaminy podczas wyładowań jarzeniowych. Dobrania optymalnych parametrów wymaga nie tylko etap przygotowania

siatek, ale też witrifikacja próbki. Proces ten polega na szybkim zamrażaniu próbki w taki sposób, aby uniknąć tworzenia się kryształków lodu i uzyskać szklistą, amorficzną formę wody, co pozwala na lepsze zachowanie struktury biologicznej białka. Z optymalizacją tego etapu wiąże się dobór warunków osuszania siatek z nadmiaru roztworu (ang. *blotting*) i jego zamrażania. W związku z koniecznością optymalizacji wielu etapów, przed przeprowadzeniem właściwych pomiarów na mikroskopie o wysokiej rozdzielczości przeprowadza się serię badań wstępnych, mających na celu wybór najlepszych siatek z osadzoną próbką. Kryterium wyboru stanowi ilość cząsteczek przypadających na mikrograf, a także ich ułożenie w przestrzeni oraz ciągłość i grubość warstwy lodu.

W celu ustalenia miejsca oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem zrealizowałam dwie sesje wyjazdowe do Narodowego Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie, gdzie przeprowadziłam wstępną weryfikację próbek. Przykładowe mikrografy przedstawiłam na Rysunku 49.



Rysunek 49. Zarejestrowane mikrografy z badań wstępnych dla amyBpa usieciowanej do proteasomu 20S przez naświetlanie reszty Bpa. A - próbka zawierająca bortezomib; B - próbka bez bortezomibu. Zdjęcia wykonano na mikroskopie Glacios Crio-TEM w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie.

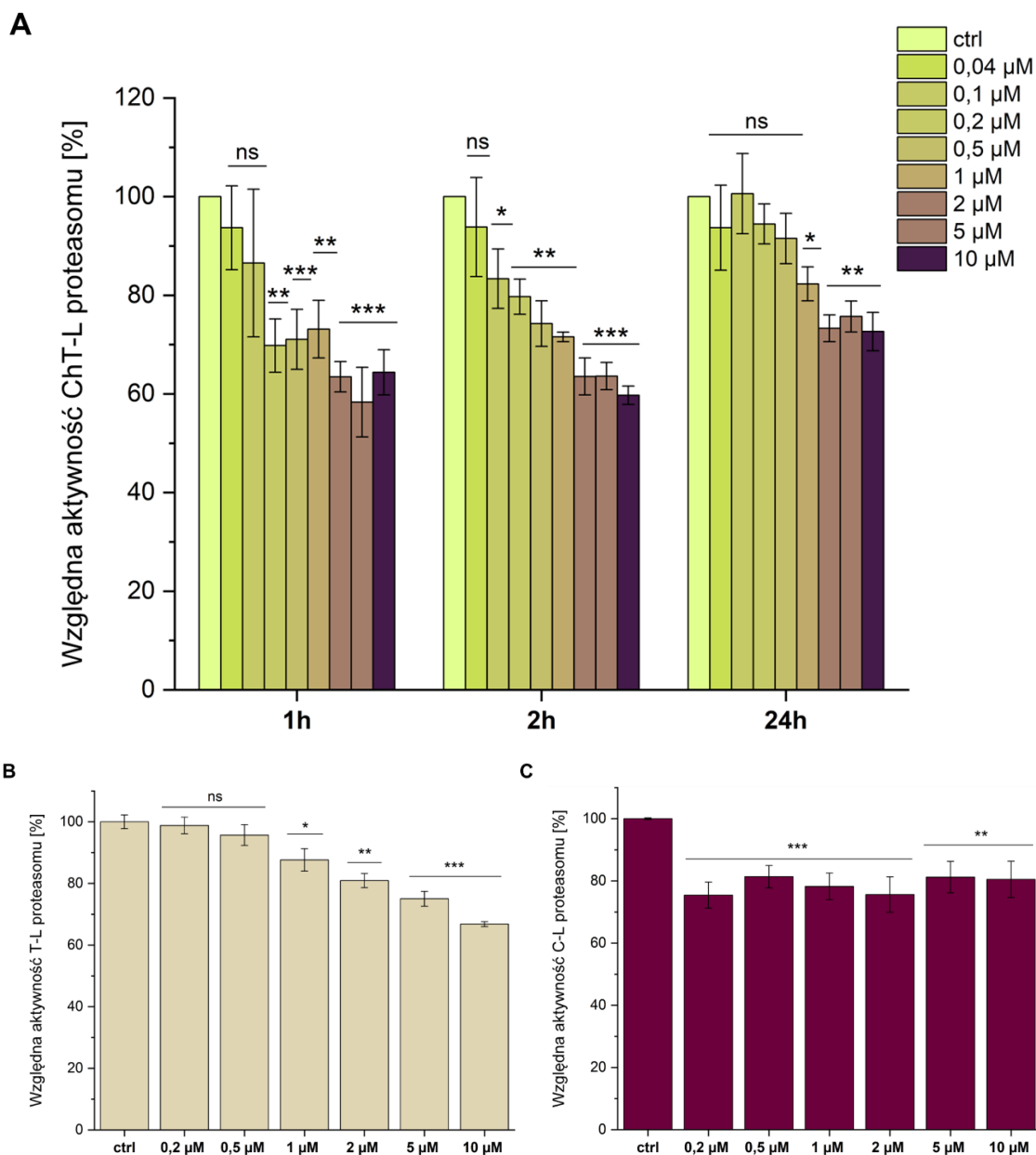
W standardowo stosowanych siatkach pod wpływem obecności amyBpa zanikały cząsteczki proteasomu, dlatego zdecydowałam się na wykorzystanie tlenku grafenu. Na przedstawionych mikrografach wyraźnie widoczna jest wystarczająca ilość cząsteczek (około 20), dodatkowo ustawionych w różnych pozycjach, pomimo braku stosowania *n*-pentyloaminy. Obie siatki przedstawiają niemalże tak samo przygotowane próbki,

a jedyną różnicą jest obecność w jednej z nich znanego, silnego inhibitora aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 20S. Ma to zapobiec ewentualnej degradacji amyBpa przez proteasom podczas inkubacji. Ze względu na nieznaną wpływ bortezomibu na oddziaływanie amyBpa z proteasomem, obie przedstawione siatki zostały zakwalifikowane do badań na wysokorozdzielczym mikroskopie TEM Krios G3I, które będą realizowane w październiku 2024 roku.

3. Wpływ oligomerów na aktywność proteolityczną h20S

Po wykazaniu wzajemnego oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem w kolejnym kroku zweryfikowałam, jaki wpływ na aktywność proteolityczną h20S ma powyższa interakcja.

W pierwszym etapie wykonałam badania aktywności wyizolowanego z ludzkiej krwi proteasomu z użyciem substratów fluorogenicznych. Standardowo stosowane substraty skierowane są na wszystkie trzy rodzaje aktywności h20S - chymotrypsynopodobną, trypsynopodobną oraz kaspazopodobną. Wykresy wpływu oligomerów amyliny na każdą z nich przedstawiłam na Rysunku 50.

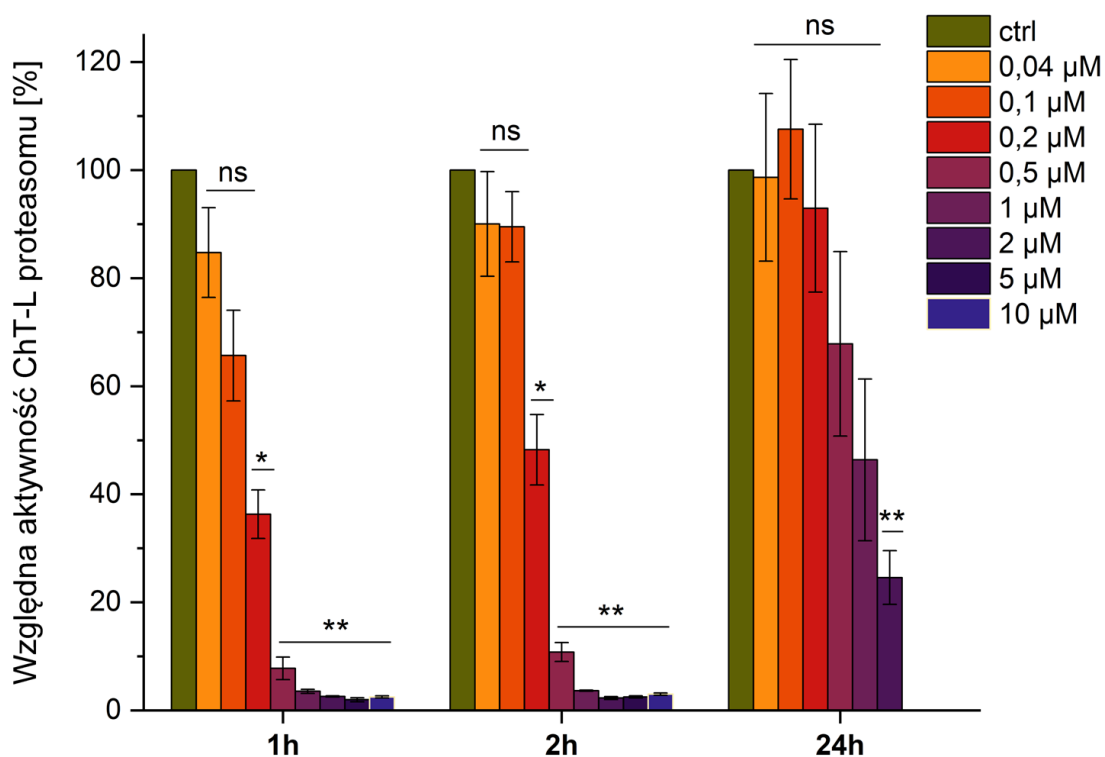


Rysunek 50. Wykresy przedstawiające wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 2 godzinach inkubacji na wszystkie trzy aktywności latentnego proteasomu 20S (A - aktywność chymotrypsynopodobna; B - trypsynopodobna; C - kaspazopodobna). Dodatkowo wyznaczyłam hamujący wpływ oligomerów amyliny utworzonych po 1 oraz 24 godzinach inkubacji na aktywność ChT-L proteasomu (A). Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Dla otrzymanych wyników przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z następującym po niej porównaniem wielokrotnym wykonanym metodą Tukey'a (Tukey test) i potwierdziłam istotność statystyczną zaobserwowanych różnic między kontrolą a wynikami otrzymanymi dla każdej z próbek (ns- nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

W przypadku aktywności chymotrypsynopodobnej oraz trypsynopodobnej obserwuje się wyraźną zależność stężeniową inhibicyjnego wpływu oligomerów. W obu przypadkach w najwyższym badanym stężeniu aktywność proteasomu spada do ok. 60% względem próby kontrolnej, którą stanowił sam proteasom. Nieco słabszy, ale wciąż

hamujący wpływ oligomerycznych form amyliny widoczny jest również dla aktywności kaspazopodobnej h20S.

W badaniach inhibitorów powszechnie stosowany jest dodatek surfaktantu, jakim jest SDS. Związek ten w określonym zakresie stężeń znany jest ze swoich zdolności do rozluźniania α -bramy proteasomu, utworzonej z wystających do wnętrza kanału *N*-końców podjednostek α . Prowadzi to do ułatwionego wnikania substratów fluorogenicznych do wnętrza kanału katalitycznego, efektem czego są stosunkowo wysokie wartości prób referencyjnych. Wstępne aktywowanie proteasomu za pomocą SDS ułatwia obserwację inhibicyjnego wpływu związków na jego zdolności proteolityczne, co prezentuje Rysunek 51.

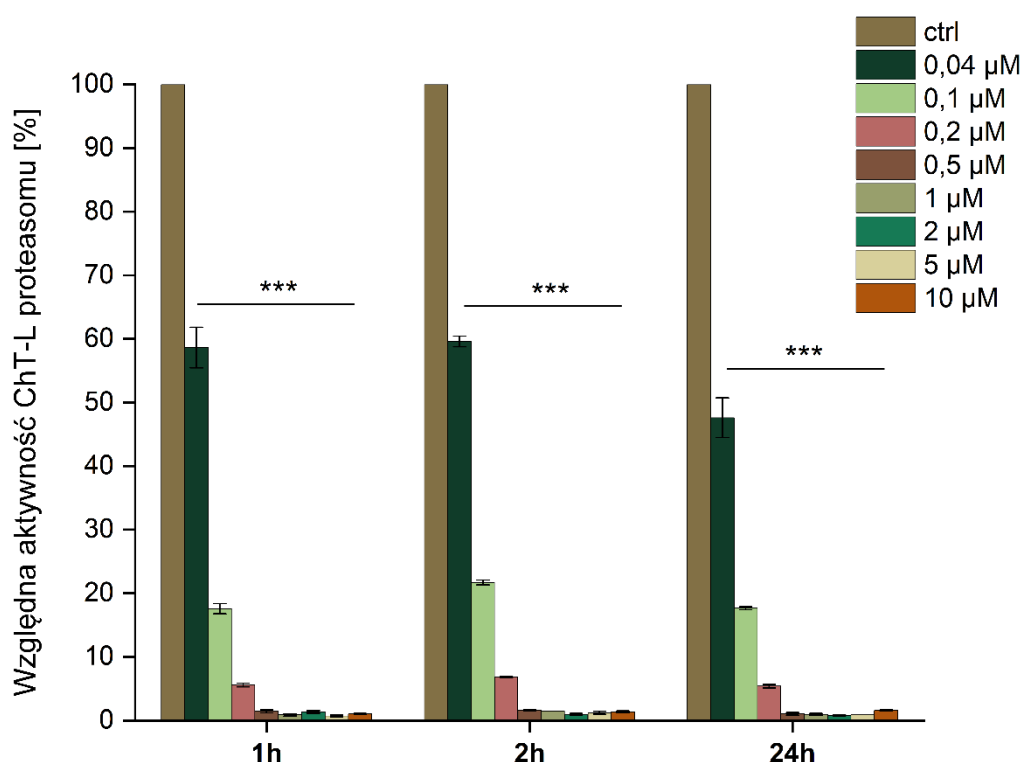


Rysunek 51. Wykres przedstawiający wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach inkubacji (1, 2, 24h) na aktywność chymotrypsynopodobną aktywowanego roztworem SDS proteasomu 20S. Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Dla otrzymanych wyników przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z następującym po niej porównaniem wielokrotnym wykonanym metodą Tukey'a (Tukey test) i potwierdziłam istotność statystyczną zaobserwowanych różnic między kontrolą a wynikami otrzymanymi dla każdej z próbek (ns- nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

W przedstawionych wynikach jeszcze lepiej widoczny jest inhibicyjny wpływ oligomerów na aktywność h20S, również zależny od stężenia amyliny. W przeprowadzonym eksperymencie można również zaobserwować silniejsze właściwości inhibicyjne dla krótszych czasów oligomeryzacji amyliny, gdzie we frakcji

rozpuszczalnej znajdują się głównie małe formy oligomeryczne. Dla takich próbek już przy ich 0,5 μM stężeniu aktywność proteasomu spada do ok. 10% wartości bazowej, a wraz z dalszym wzrostem stężenia efekt ten jeszcze się pogłębia.

Ze względu na odmienny przebieg oligomeryzacji amyliny inkubowanej w buforze z dodatkiem SDS, postanowiłam również sprawdzić wpływ tak utworzonych oligomerów na aktywność proteasomu. Istotnym czynnikiem było zachowanie ostatecznego stężenia SDS 0,01%, tak aby nie wpłynąć na aktywność h20S w niespecyficzny sposób. Rezultaty tego eksperymentu zawarłam na Rysunku 52.

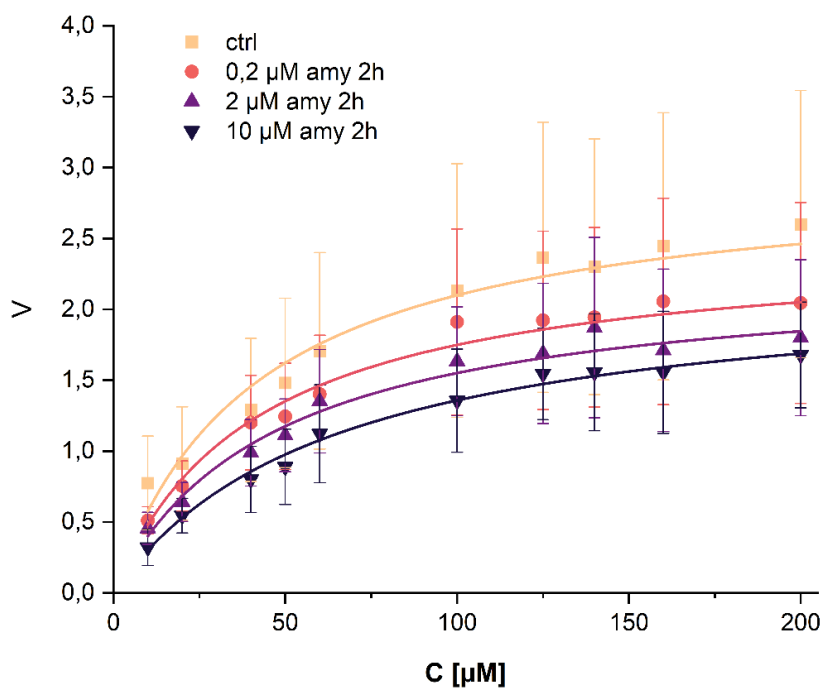


Rysunek 52. Wykres przedstawiający wpływ na aktywność ChT-L latentnego proteasomu 20S oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach inkubacji (1, 2, 24h) w buforze z dodatkiem SDS. Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Dla otrzymanych wyników przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z następującym po niej porównaniem wielokrotnym wykonanym metodą Tukey'a (Tukey test) i potwierdziłam istotność statystyczną zaobserwowanych różnic między kontrolą a wynikami uzyskanymi dla każdej z próbek (***) $p < 0,001$.

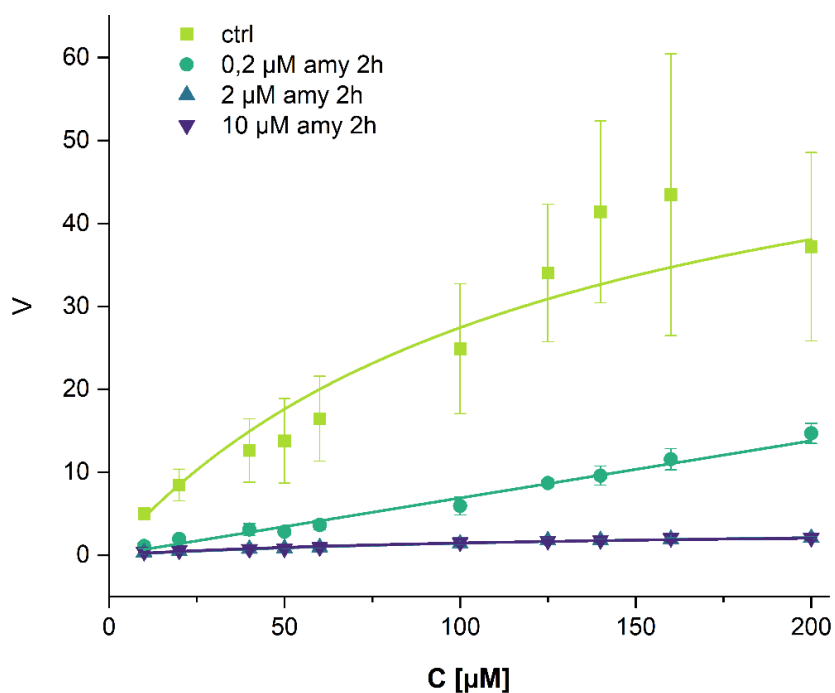
Przedstawione wyniki pokrywają się z rezultatami otrzymanymi w przypadku proteasomu aktywowanego SDS. Obserwuje się wyraźną inhibicję, sięgającą 95%, zależną od stężenia amyliny.

W celu dokładnego poznania inhibicyjnego wpływu danego związku na aktywność enzymu wyznacza się kinetykę inhibicji, stosując minimum 9 rosnących stężeń substratu fluorogenicznego. Z uwagi na fakt, że dominujący wkład w zdolności degradacyjne

ludzkiego proteasomu ma aktywność chymotrypsynopodobna, właśnie dla tego rodzaju aktywności wykonałam badania kinetyczne, zarówno dla latentnego (Rysunek 53), jak i aktywowanego za pomocą SDS proteasomu (Rysunek 54).



Rysunek 53. Wyznaczona kinetyka inhibicji oligomerów amyliny wobec aktywności chymotrypsynopodobnej latentnego proteasomu 20S. Dla każdego z wyników zazaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).



Rysunek 54. Wyznaczona kinetyka inhibicji oligomerów amyliny wobec aktywności chymotrypsynopodobnej aktywowanego roztworem SDS proteasomu 20S. Dla każdego z wyników zazaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).

Z badań przeprowadzonych dla trzech stężeń amyliny po jej 2-godzinnej inkubacji wynika, że zachowana jest stężeniowa zależność inhibicyjna. W przypadku latentnego proteasomu ponownie obserwuje się mniejszą inhibicję w porównaniu z wynikami dla aktywowanego h20S. Ponadto wyniki w układzie natywnym obarczone są większymi błędami. Obecność SDS w buforze pomiarowym nie tylko aktywuje proteasom, ale także prowadzi do stabilizacji utworzonych już oligomerów. Na podstawie wyników dla aktywowanego proteasomu, gdzie zdecydowanie lepiej widoczna jest inhibicja, można wnioskować, że oligomery amyliny należą do grupy inhibitorów niekompetycyjnych. Determinuje to ich zmieniająca się wraz ze stężeniem i różna względem kontroli wartość V_{max} wyznaczonego z dopasowania według krzywej Michaelisa-Menten, a także stała wartość K_m dla każdej z analiz. Oznacza to, że amyлина nie wiąże się bezpośrednio w miejscu aktywnym, a raczej po zewnętrznej stronie proteasomu i w sposób allosteryczny wpływa na jego aktywność proteolityczną.

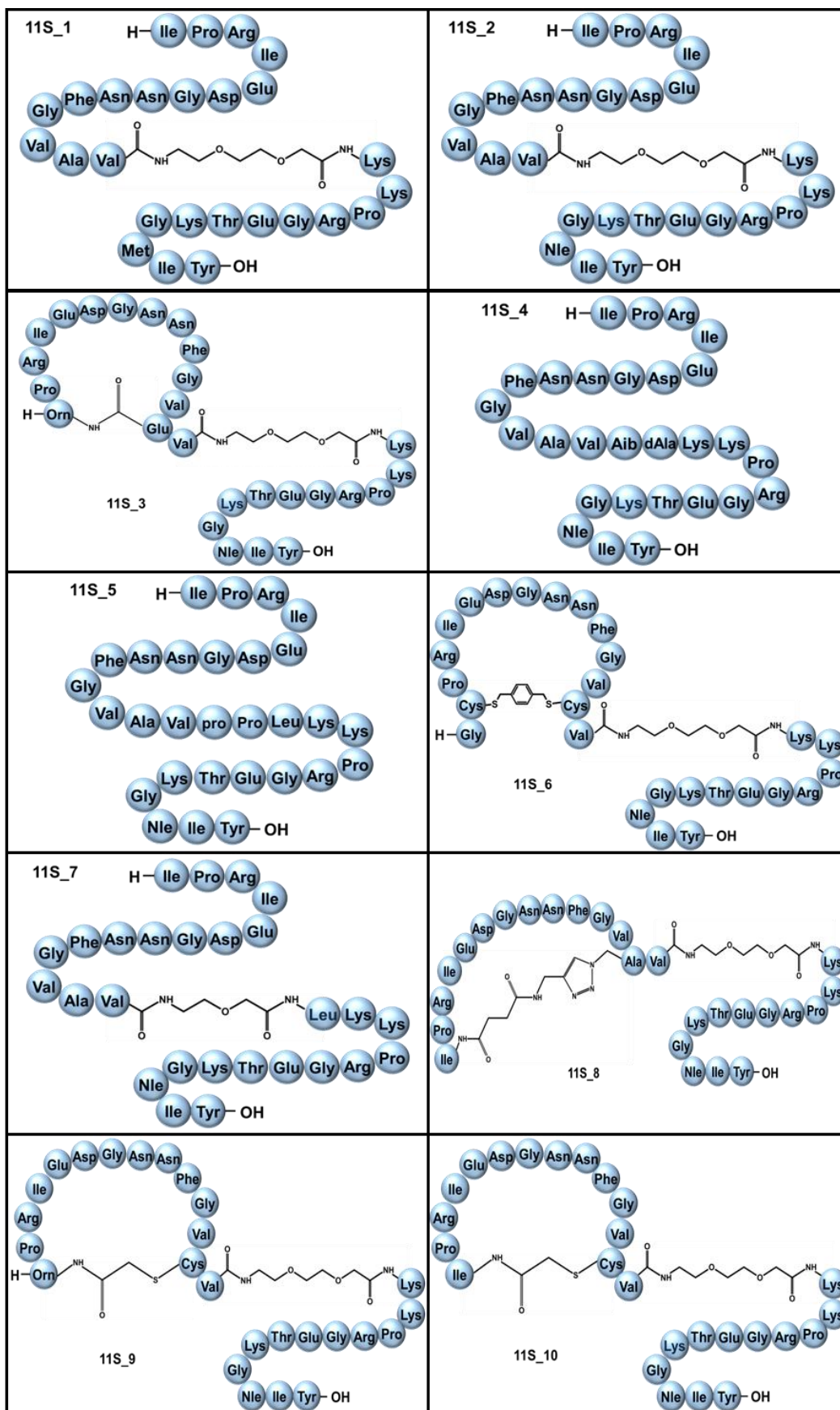
3.1. Niwelowanie inhibicji przez aktywatory proteasomu

3.1.1. Modulatory oparte o 11S

Jednym z głównych wniosków z eksperymentów przeprowadzonych przez grupę Smitha na proteasomie 20S [1] była możliwość przełamania inhibicyjnego wpływu oligomerów peptydu $A\beta$ przez modulatory oparte o sekwencje podjednostek Rpt naturalnego aktywatora 19S. Nasza grupa badawcza od lat zajmuje się projektowaniem i syntezą peptydowych, allosterycznych aktywatorów proteasomu, opartych na sekwencjach naturalnie występujących modulatorów. Posiadamy m.in. pulę skutecznych aktywatorów utworzonych na podstawie C-końcowego fragmentu drożdżowego białka Blm10. Działają one w oparciu o ten sam mechanizm aktywacji co aktywatory zaprojektowane przez grupę Smitha. Istnieją jednak obawy, że wiązanie się z proteasomem oligomerów może utrudniać dostęp takich modulatorów do miejsca ich oddziaływania, czyli do kieszeni między podjednostkami α proteasomu. W efekcie modulatory te nie mogłyby przełamywać inhibicyjnego wpływu oligomerów.

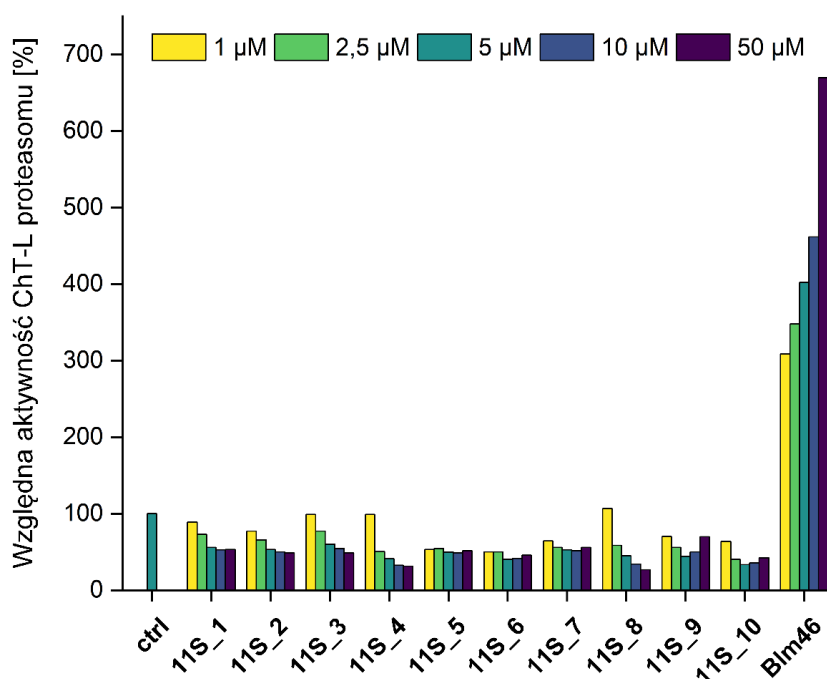
Z uwagi na to, że rozpoznany został również nieco inny mechanizm regulujący aktywność proteasomu, wykorzystujący oddziaływanie tzw. pętli aktywacyjnej, w ramach swojej pracy zsyntezowałam pulę nowych związków opartych na tych właśnie fragmentach naturalnego modulatora 11S. W przeciwieństwie do białek Blm10 i 19S, a także ich niskocząsteczkowych analogów Blm i Rpt, modulator ten wykorzystuje

oddziaływanie C-końca w kieszeniach między podjednostkami proteasomu jedynie do wiązania się z enzymem. W mechanizmie aktywacji bierze natomiast udział właśnie pętla aktywacyjna, zlokalizowana w pewnej odległości od C-końca. Działanie tej pętli stabilizuje konformację otwartej α -bramy h20S. Aby uwzględnić dwa niezbędne w regulacyjnym procesie elementy, wykorzystywałam projektowanie racjonalne oparte o analizę wyników uzyskanych dla przetestowanych już modulatorów. Dodatkowo dr Julia Witkowska wraz dr Małgorzatą Giżyńską, na podstawie analizy struktur krystalicznych kompleksu h20S z regulatorem 11S, określiły niezbędną długość linkera łączącego pętlę aktywacyjną z C-końcem. W rezultacie zaprojektowałyśmy 10 związków, których schematyczne struktury przedstawiłam na Rysunku 55.

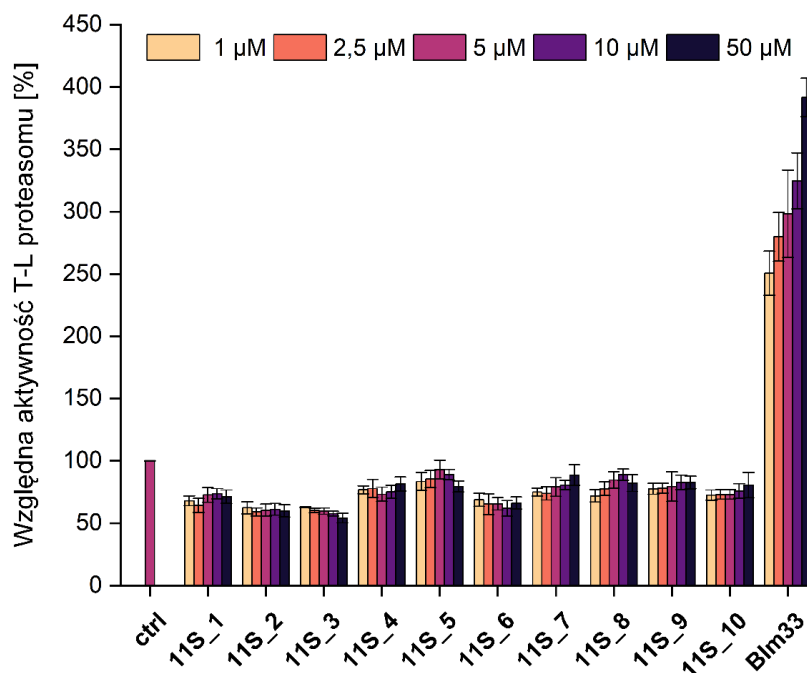


Rysunek 55. Schematyczne przedstawienie struktur zsyntezowanych peptydomimetyków. Reszta aminokwasowa oznaczona Aib symbolizuje kwas 2-aminoizomasłowy, a Nle norleucynę.

We wszystkich zaprojektowanych sekwencjach peptydomimetyków pojawił się C-koniec bezpośrednio zaczerpnięty z oryginalnego białka 11S, z jedną drobną różnicą, która polegała na wymianie naturalnie występującej metioniny (tak jak w związku 11S_1) na norleucynę, aby zniwelować możliwość utlenienia. Niezbędna do aktywacji pętla utworzona została przez wprowadzenie obok siebie reszt aminokwasowych, które wymuszają zagięcie łańcucha, jak D-Pro i L-Pro (11S_5), a także przez różnego typu reakcje takie jak: CLIPS (11S_6) czy CLICK (11S_8). Ponadto rolę linkera łączącego C-koniec z pętlą aktywną pełniły dwa typy polietylenoglikoli - PEG1 oraz PEG2. Otrzymane związki przebadaliśmy pod kątem ich aktywności względem chymotrypsynopodobnej oraz trypsynopodobnej peptydazy proteasomu 20S. Wyniki tych eksperymentów przedstawia Rysunek 56 oraz 57.



Rysunek 56. Wpływ modulatorów z puli 11S na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S. Peptyd Blm46 jest kontrolą pozytywną w przeprowadzonych eksperymentach.



Rysunek 57. Wpływ modulatorów z puli 11S na aktywność trypsynopodobną proteasomu 20S. Peptyd Blm33 jest kontrolą pozytywną w przeprowadzonych eksperymentach. Dla każdej z wartości zazaczyłam błąd standardowy średniej (SEM).

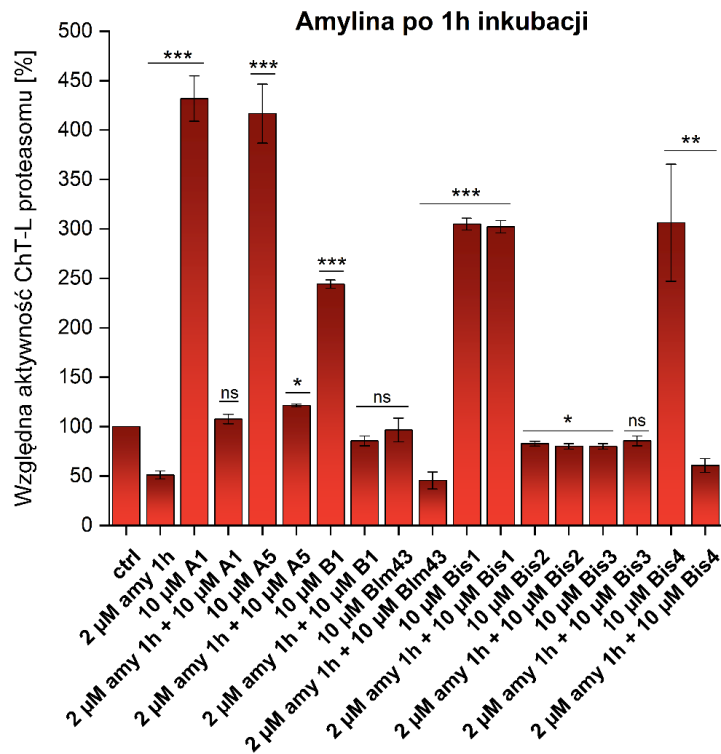
Oba przeprowadzone eksperymenty jednoznacznie wskazują, iż otrzymane związki nie wykazują zdolności aktywujących względem proteasomu. W przypadku aktywności chymotrypsynopodobnej, dla związków 11S_1, 11S_2, 11S_3, 11S_4 i 11A_8, obserwuje się wręcz stężeniową zależność inhibicyjną.

3.1.2. Modulatory będące analogami aktywatora Blm-pep

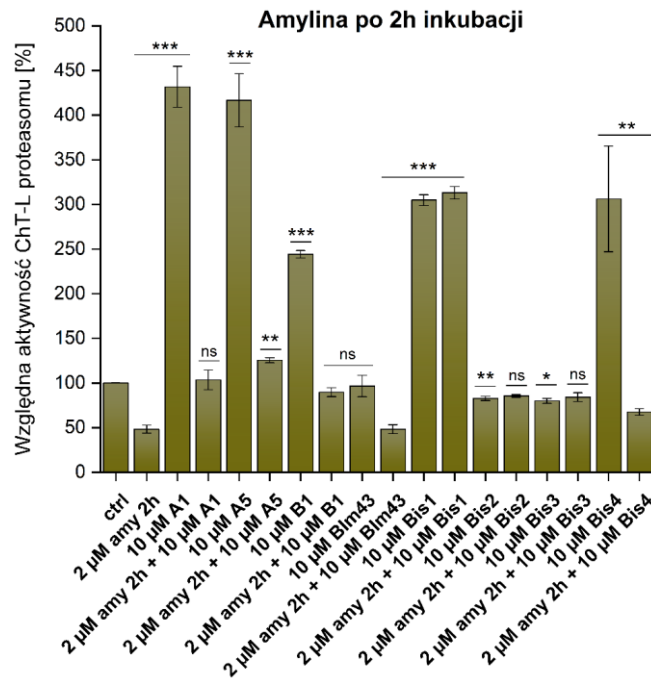
Równolegle do prowadzonych przeze mnie badań, w ramach realizacji pracy doktorskiej mgr Karoliny Trepczyk, powstała grupa najlepszych z otrzymanych dotychczas w naszej grupie badawczej aktywatorów ludzkiego proteasomu. Zaprojektowane związki wykorzystują częściowo mechanizm regulatora 11S, ale nie jest to jego dokładne odwzorowanie. Ich budowa opiera się na obecności dwóch C-końców, połączonych i tym samym stabilizowanych labilnym linkerem, co umożliwia ich jednoczesne wiązanie w dwóch kieszeniach wiążących podjednostek α . Tak utworzony układ w większym stopniu stabilizuje otwartą konformację α -bramy i tym samym zwiększa aktywność proteolityczną proteasomu.

W celu weryfikacji przełamującego działania aktywatorów na inhibicyjny wpływ oligomerów amyliny na proteasom, wybrałam 3 związki z puli Blm (wykorzystujących pojedynczy C-koniec do aktywacji) - A1, A5, B1 oraz 4 związki z puli BisBlm

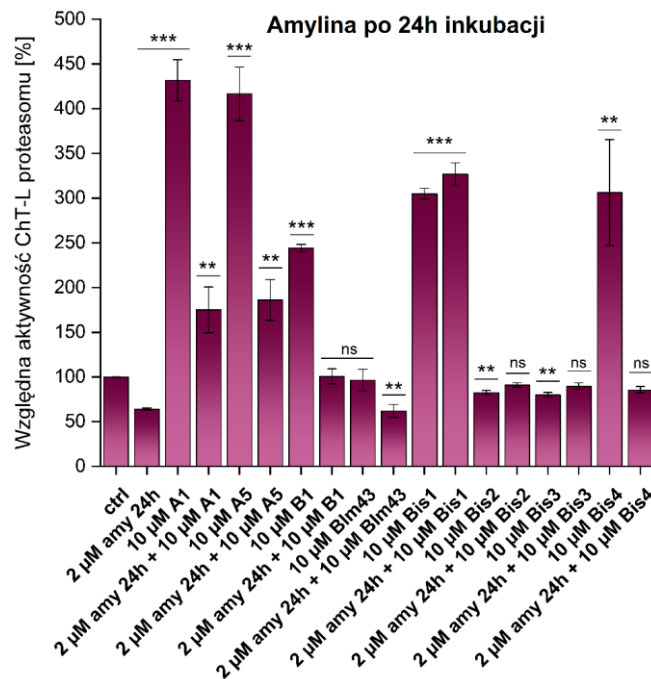
(z 2 C-końcami) - Bis1, Bis2, Bis3, Bis4. Jako negatywną próbę kontrolną zawarłam jeden z modulatorów nie mający wpływu na aktywność degradacyjną h20S (Blm43). Wyniki wpływu oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji na aktywność proteasomu w obecności peptydowych aktywatorów przedstawiłam na Rysunku 58, 59 i 60.



Rysunek 58. Wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po godzinie inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w obecności modulatorów z puli Blm oraz BisBlm. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Rysunek 59. Wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 2 godzinach inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w obecności modulatorów z puli BIm oraz BisBIm. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Rysunek 60. Wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 24 godzinach inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w obecności modulatorów z puli BIm oraz BisBIm. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Otrzymane wyniki pokazują, że niemal wszystkie związki z puli Blm, poza peptydem kontrolnym Blm43, a także związki z puli BisBlm są w stanie przywracać naturalny poziom aktywności proteolitycznej proteasomowi 20S poddanemu inhibującemu działaniu oligomerów amyliny. Podobne tendencje obserwuje się dla każdego z testowanych czasów inkubacji amyliny. Wśród puli aktywatorów Blm dwa związki wykazują podobne działanie, które polega na delikatnej aktywacji proteasomu względem próby kontrolnej. Są nimi modulator A1 oraz A5. Najbardziej interesujące wyniki zaobserwowałam jednak dla aktywatora Bis1 z puli BisBlm, który w obecności oligomerów amyliny wykazuje taki sam wpływ na aktywność h20S, jak i w próbie pozbawionej IAPP. Wskazywać by to mogło, że obie molekuly muszą oddziaływać w innych miejscach proteasomu, skoro możliwe jest związanie się modulatora Bis1, pomimo oddziałującej już z h20S amyliny. Dla tego aktywatora obserwuje się nawet 3-krotną aktywację. Co ciekawe, modulator Bis4 samodzielnie również wykazuje około 3-krotną aktywację, natomiast po dodaniu do układu proteasom-amylina nie jest w stanie znacząco zwiększać aktywności proteolitycznej h20S, a jedynie może przywrócić ją do poziomu kontroli.

W odniesieniu do wyników grupy Smitha [1] przedstawione przeze mnie wyniki są niezwykle interesujące. W przeprowadzonych przez jego grupę badaniach stosowany zakres stężeń aktywatorów mieścił się w przedziale od 10 μM do 1 mM, gdzie przywrócenie standardowej aktywności h20S po działaniu oligomerów A β obserwowali przy najniższym badanym stężeniu Rpt5. Natomiast 2-krotny wzrost aktywności proteasomu zarejestrowali dopiero od stężenia 400 μM aktywatora. Warto podkreślić, że stosowane przez nich stężenie oligomerów, które wynosiło zaledwie 0,5 μM , co przekłada się na stosunek masy A β do aktywatora 1:800. W otrzymanych przeze mnie wynikach modulator Bis1 wykazuje 3-krotną aktywację proteasomu w stężeniu 10 μM przy obecności oligomerów amyliny w stężeniu 2 μM , co przekłada się na stosunek IAPP do aktywatora 1:5. Oznacza to, że nasze związki wykazują silniejsze działanie, przy stosowanej ich znacząco mniejszej ilości.

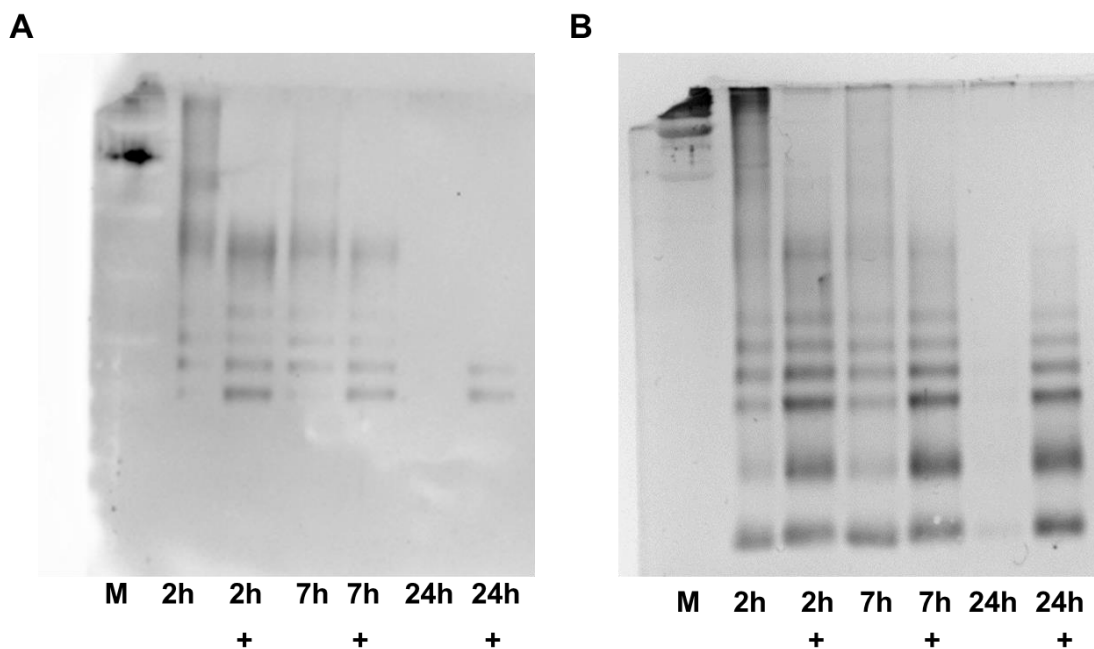
4. Oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem A11

Na podstawie otrzymanych wyników grupa Smitha postawiła tezę, że inhibicyjny wpływ na aktywność proteolityczną proteasomu wywołują oligomery wielu białek związanych z chorobami agregacyjnymi [1]. Cechą łączącą działające w ten sposób

oligomery jest ich powinowactwo do przeciwciała A11. Jest to rodzaj przeciwciała konformacyjnego, które wykazuje tendencje do oddziaływania z oligomerami α -helikalnymi. Rozpatrując cukrzycę typu 2 w kontekście choroby agregacyjnej, postanowiłam odnieść się do postawionej tezy i zweryfikować zdolność otrzymywanych przeze mnie oligomerów do oddziaływania z przeciwciałem A11.

4.1. Western blot

Do realizacji założonego celu wykorzystałam dwie podstawowe techniki immunodetekcji: dot blot, a także western blot. Obie z metod wykorzystują taki sam mechanizm działania. Związane z membraną białko poddaje się czterem standardowym etapom, oddzielonym od siebie seriami przemywań. Pierwszym z nich jest blokowanie miejsc niezwiązanych na membranie, co w kolejnym kroku, jakim jest przyłączenie przeciwciała I-rzędowego, zapobiega oddziaływaniom niespecyficznym przeciwciała z membraną. W trzecim etapie następuje inkubacja z przeciwciałem II-rzędowym skierowanym na antygen przeciwciała I-rzędowego. Ostatnim krokiem jest detekcja, która może być kolorymetryczna, chemiluminescencyjna lub fluorescencyjna. Jediną różnicą między dot blotem a western blotem jest sposób przyłączania białka do membrany. W dot blotcie następuje to przez naniesienie kropli roztworu na membranę, natomiast w western blotcie niezbędna jest wcześniejsza separacja próbki na żelu elektroforetycznym, a następnie transfer rozdzielonych prążków na membranę. Tak uzyskane wyniki prezentuje Rysunek 61.



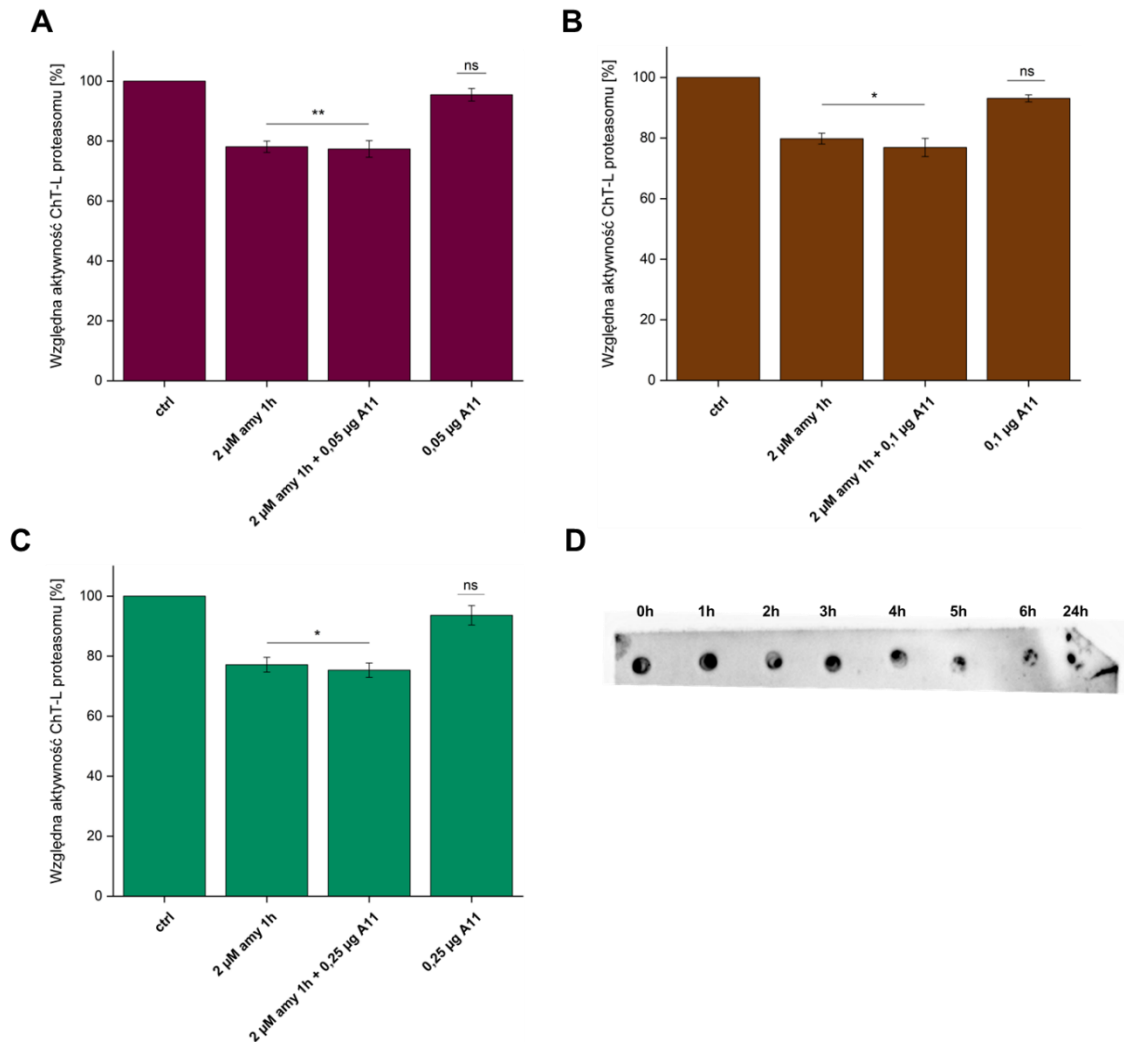
Rysunek 61. Membrana western blot z przeciwciałem A11 (A) oraz elektroforegram (B) amyliny po różnych czasach inkubacji (2, 7, 24h) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Uzyskane wyniki potwierdzają zdolność oligomerów amyliny do oddziaływania z przeciwciałem A11. Szczególnie widoczne jest to dla oligomerów inkubowanych z dodatkiem SDS w buforze (ścieżki oznaczone symbolem „+”), gdzie następuje stabilizacja struktury α -helikalnej. W próbkach pozbawionych SDS następuje szybsza oligomeryzacja do wyższych form, które nie tylko nie są już rozpoznawane przez przeciwciało A11, ale nawet tracą zdolność do migracji w żelu Z przeciwciałem A11 skutecznie oddziałują natomiast niskocząsteczkowe oligomery amyliny, począwszy od trimeru.

4.2. Test immunoneutralizacji

Po wykazaniu oddziaływania otrzymywanych przeze mnie oligomerów amyliny z przeciwciałem A11 oraz przeprowadzonych testach inhibicji proteasomu przez te oligomery, chciałam sprawdzić drugą część postawionej przez Smitha tezy i zweryfikować, czy występuje korelacja między oddziaływaniem z A11 a inhibicją proteasomu. W tym celu przeprowadziłam test immunoneutralizacji. Polega on na wstępnym inkubowaniu otrzymanych oligomerów z przeciwciałem A11, tak aby mogło wytworzyć się oddziaływanie, a następnie sprawdzeniu wpływu takiej frakcji na aktywność proteasomu. Przy założeniu, że to właśnie oligomery oddziałujące

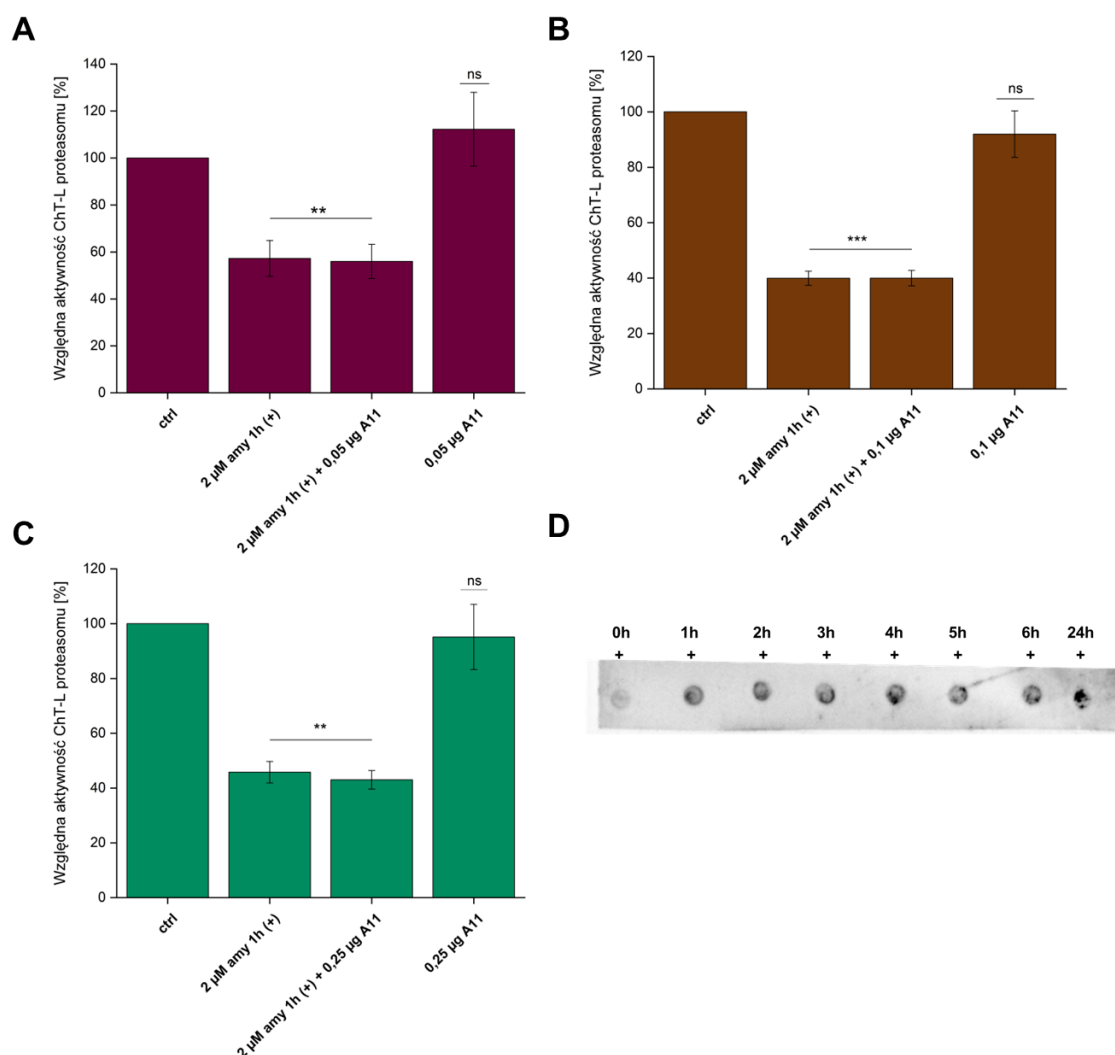
z przeciwciałem A11 są odpowiedzialne za inhibicję, nie powinno się obserwować żadnego wpływu badanej frakcji na zdolności proteolityczne h20S. Rezultaty tego eksperymentu zawarłam na Rysunku 62.



Rysunek 62. Wpływ oligomerów amyliny na aktywność chymotrypsynopodobną ludzkiego proteasomu 20S. Amylina inkubowana była przez godzinę w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, następnie poddana inkubacji z przeciwciałem A11 w różnych jego ilościach (A - 0,05 μ g; B - 0,1 μ g; C - 0,25 μ g), a na koniec do tak przygotowanej próbki dodano proteasom 20S. Na rysunku D zawarłam membranę po przeprowadzonym eksperymencie dot blot, w którym stężenie przeciwciała wynosiło 1 μ g/ml. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędów standardowych średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

W przeprowadzonym powyżej eksperymencie zaobserwowałam, że oddziaływanie z przeciwciałem A11 nie wpływa na zdolności inhibujące oligomerów amyliny. Dodatkowo jako próbę kontrolną wykonałam równoległe dot blot, aby potwierdzić oddziaływanie A11 z otrzymanymi po inkubacji frakcjami oligomerycznymi. Z uwagi na

silniejsze oddziaływanie A11 z oligomerami inkubowanymi w SDS, powyższe badania powtórzyłam dla takich próbek i wyniki zawarłam na Rysunku 63.



Rysunek 63. Wpływ oligomerów amyliny na aktywność chymotrypsynopodobną ludzkiego proteasomu 20S. Amylina inkubowana była przez godzinę w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i 0,05% SDS, następnie poddana inkubacji z przeciwciałem A11 w różnych jego ilościach (A - 0,05 μg; B - 0,1 μg; C - 0,25 μg), a na koniec do tak przygotowanej próbki dodano proteasom 20S. Na rysunku D zawarłam membranę po przeprowadzonym eksperymencie dot blot, w którym stężenie przeciwciała wynosiło 1 μg/ml. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędów standardowych średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Ponownie nie zaobserwowałam znaczących zmian względem próbek pozbawionych przeciwciała. Przeprowadzone eksperymenty prowadzą do dwóch możliwych hipotez. Pierwsza wskazuje, że przeciwciało A11 nie może być uniwersalnym wskaźnikiem w detekcji oligomerów o hamującym wpływie na aktywność proteasomu 20S. Natomiast druga hipoteza sugeruje, że miejsce oddziaływania oligomerów amyliny z przeciwciałem A11 nie jest tożsame z miejscem ich oddziaływania z proteasomem, przez co

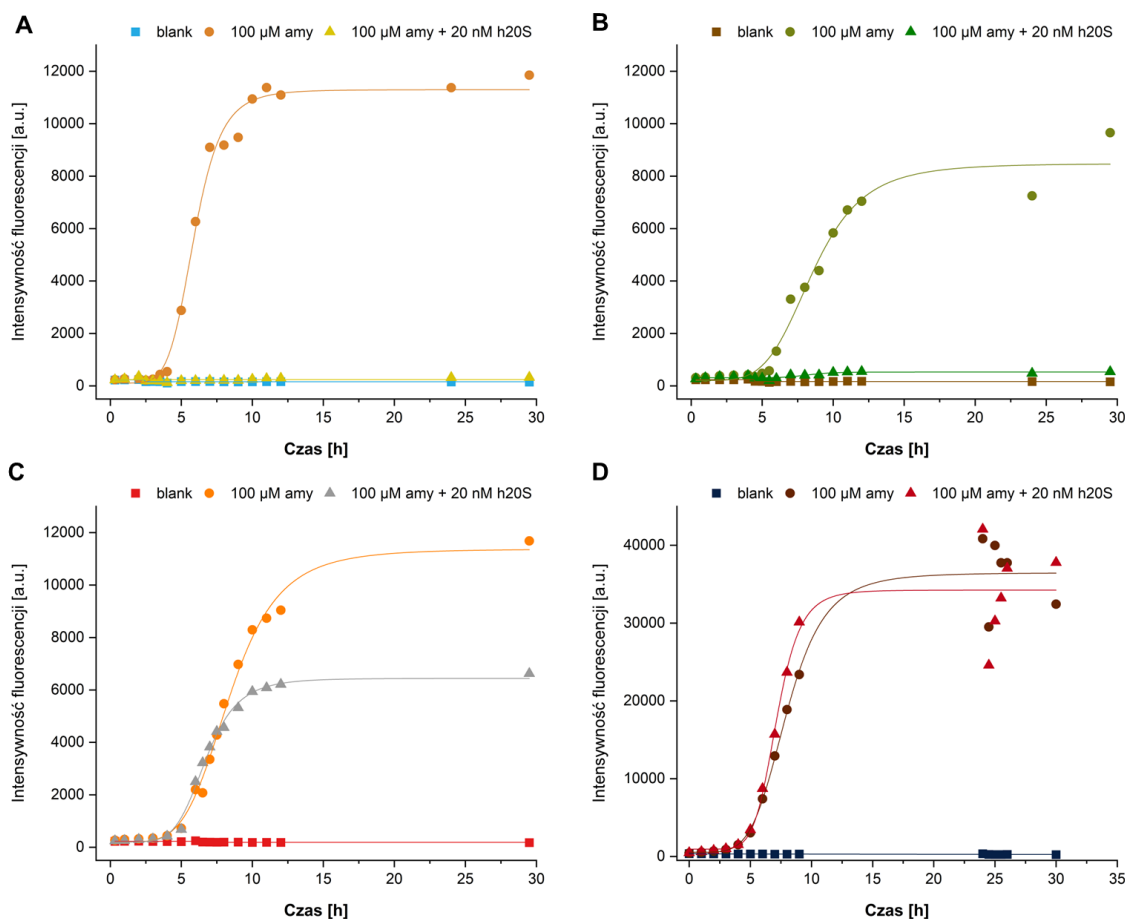
neutralizacja przeciwciałami nie skutkuje utratą zdolności do wiązania się oligomerów z proteasomem i modulowania jego aktywności.

5. Zdolność do trawienia oligomerów amyliny przez proteasom

W organizmie główną strukturą proteolityczną odpowiedzialną za degradację amyliny jest białko IDE. Natomiast w przeprowadzonych eksperymentach wykazałam, że w pierwszych etapach oligomeryzacji amyлина tworzy niskocząsteczkowe oligomery, które wykazują interakcję z proteasomem 20S. Powyższe wyniki badań skłoniły mnie do sprawdzenia, czy oligomery amyliny mogą być również substratem dla ludzkiego proteasomu 20S.

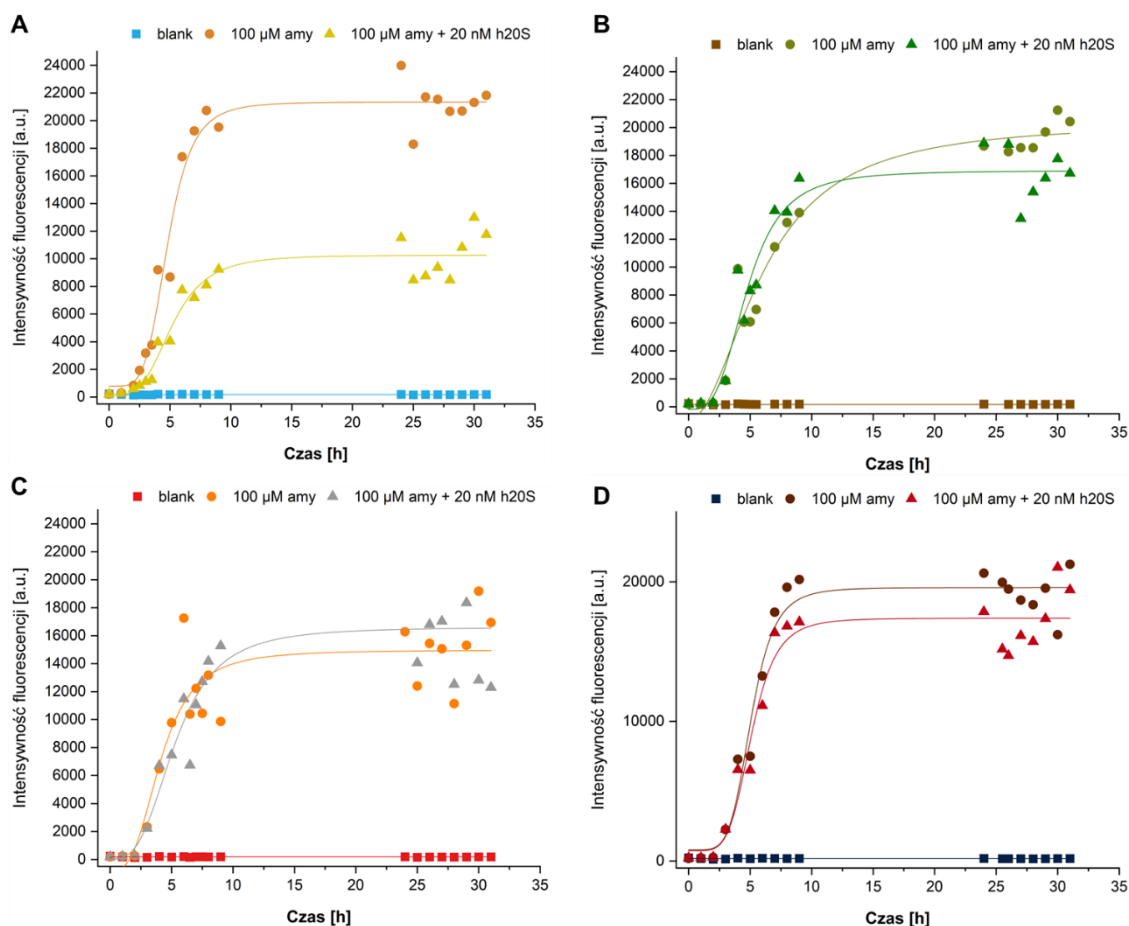
5.1. Badania na wyizolowanym proteasomie

Do weryfikacji postawionej hipotezy wykorzystałam trzy niezależne techniki analityczne: testy fluorymetryczne z Tioflawiną T, HPLC oraz elektroforezę. Jako pierwszą metodę zastosowałam testy fluorymetryczne. Warunki temperatury pokojowej pozwalają na wolniejszy przebieg oligomeryzacji, co okazało się niezbędne w charakterystyce tego procesu, natomiast nie odzwierciedlają natywnych warunków organizmu ludzkiego. Ponadto aktywność proteolityczna h20S również zależna jest od temperatury i najwyższą wartość wykazuje w naturalnych dla niego warunkach 37°C. W związku z tym analizy przeprowadziłam zarówno w temperaturze pokojowej (Rysunek 64), jak i w 37°C (Rysunek 65), dla oligomerów utworzonych po 2, 4, 6 i 24 godzinach inkubacji.



Rysunek 64. Wpływ obecności proteasomu na postęp oligomeryzacji amyliny, obserwowany poprzez przyrost fluorescencji Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie po danym czasie inkubacji w Tpok. (A - 2h; B - 4h; C - 6h; D - 24h) został dodany do niej proteasom i dalsza inkubacja przebiegała w 37°C. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

W temperaturze pokojowej, zarówno dla 2, jak i 4 godzin inkubacji amyliny, widoczny jest wyraźny inhibujący wpływ proteasomu na przebieg jej oligomeryzacji. Dla 6-godzinnej inkubacji amyliny efekt ten stopniowo zanika, aby zniwelować się całkowicie w przypadku 24-godzinnej oligomeryzacji. Na tej podstawie stwierdzić można, że proteasom ogranicza powstawanie struktur oligomerycznych, oddziałujących z Tioflawiną T, do 6 godzin inkubacji amyliny w temperaturze pokojowej. Czas ten odpowiada początkowi elongacji w przeprowadzonych wcześniej standardowych testach z Tioflawiną T.



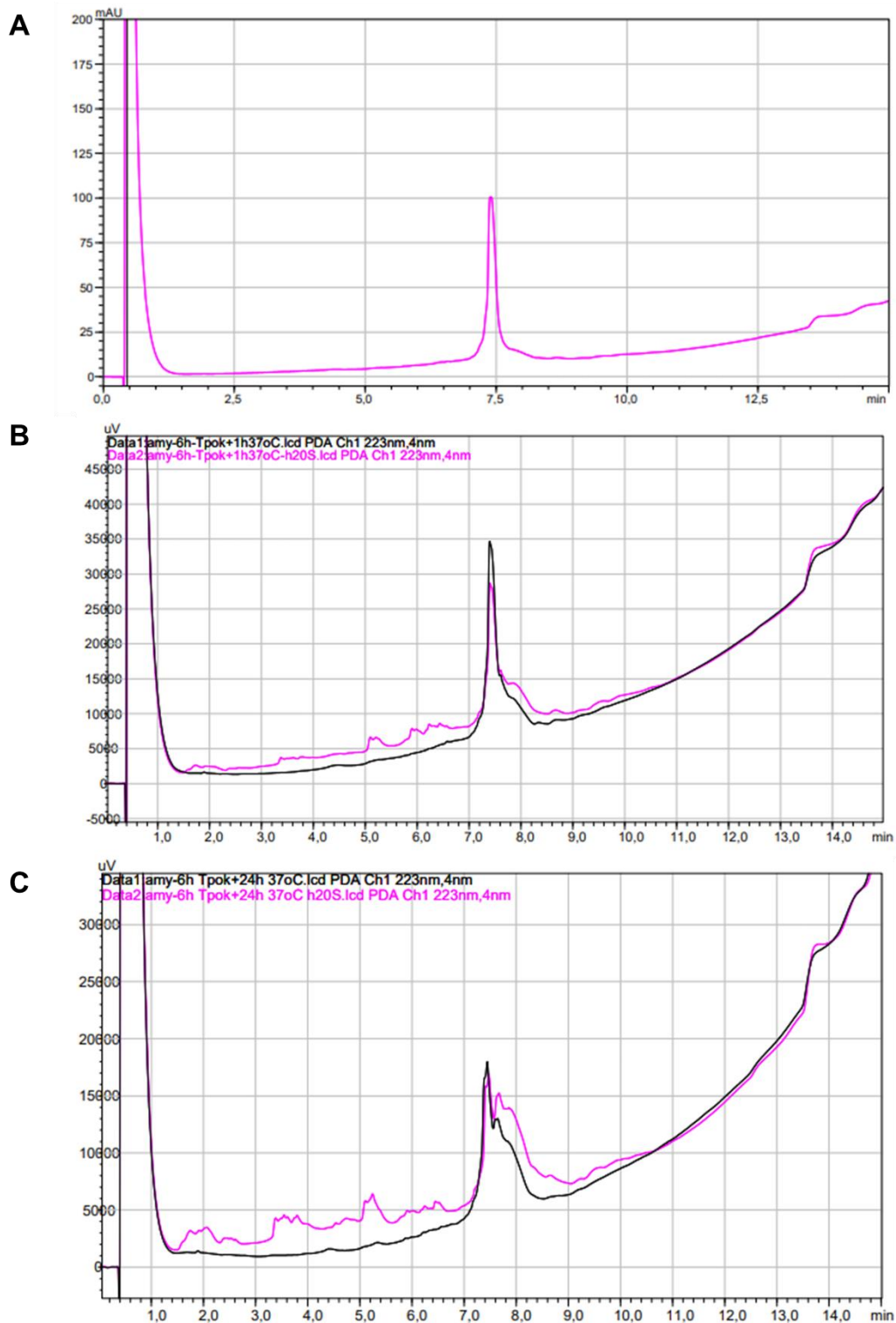
Rysunek 65. Wpływ obecności proteasomu na postęp oligomeryzacji amyliny, obserwowany poprzez przyrost fluorescencji Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie po danym czasie inkubacji w 37°C (A - 2h; B - 4h; C - 6h; D - 24h) został dodany do niej proteasom. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

W temperaturze 37°C ograniczenie oligomeryzacji spowodowane obecnością proteasomu dotyczy tylko amyliny po 2-godzinnej inkubacji. Dla 4-, 6- i 24-godzinnej inkubacji nie obserwuje się już różnic w uzyskanych krzywych tioflawinowych. Wynika to z postępu oligomeryzacji amyliny w 37°C. Faza elongacji rozpoczyna się tu zdecydowanie szybciej niż w przypadku temperatury pokojowej. Otrzymane wyniki świadczą, że proteasom jest w stanie ograniczać oligomeryzację amyliny, ale tylko w początkowych fazach jej oligomeryzacji. Jest to moment, w którym w roztworze występują głównie niskocząsteczkowe oligomery. Znajduje to pokrycie w rodzajach substratów, jakie spełniają kryteria wielkości w odniesieniu do α -bramy proteasomu, która determinuje ich dostęp do komory katalitycznej.

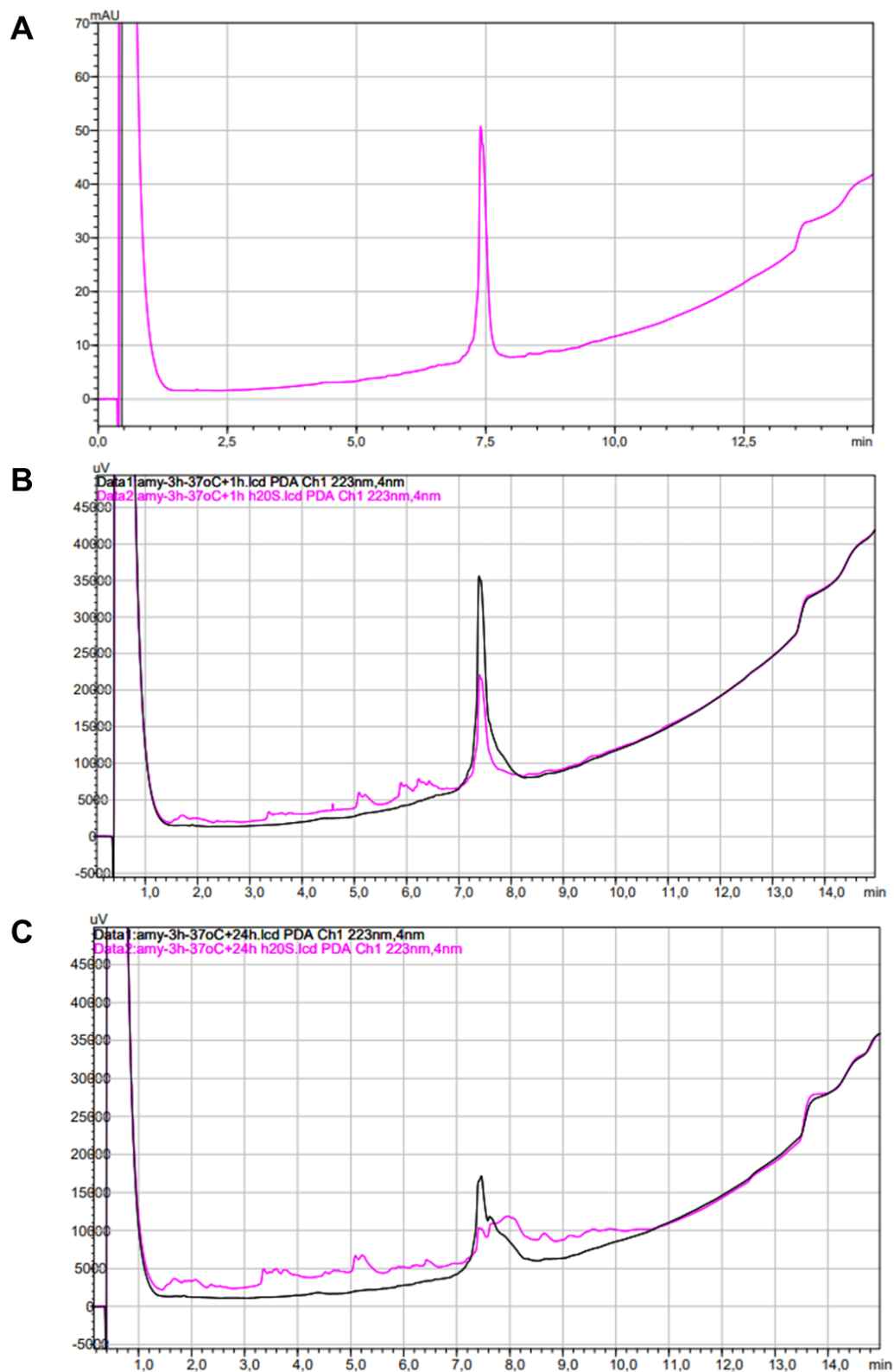
Testy fluorymetryczne wykazały, jaki wpływ ma obecność proteasomu na postęp oligomeryzacji, natomiast nie stanowią niezbitego dowodu na zdolność proteasomu 20S

do trawienia oligomerów amyliny. Nasuwać się może również hipoteza, że proteasom trawi jedynie monomer amyliny, co wpływa na słabszą agregację. Aby udowodnić, że możliwe jest również trawienie oligomerów wykorzystałam jeszcze dwie dodatkowe techniki.

Dla wybranych na podstawie testów ThT dwóch czasów inkubacji amyliny - 6 godzin w temperaturze pokojowej oraz 3 godziny w 37°C - sprawdziłam zdolności proteolityczne proteasomu z wykorzystaniem analiz HPLC. W tym celu otrzymane po danych czasach inkubacji oligomery inkubowałam 1 i 24 godziny z h2O_S w 37°C. W ten sam sposób przygotowywałam frakcje kontrolne z użyciem buforu proteasomalnego w miejsce proteasomu. Wyniki opisanych eksperymentów zamieściłam na Rysunku 66 oraz 67.



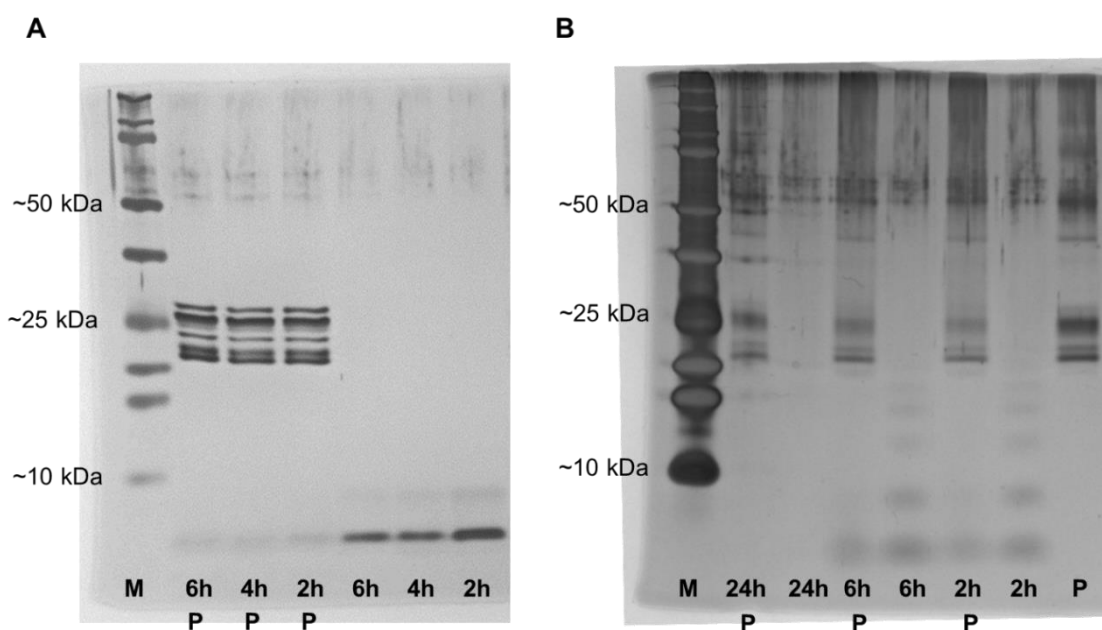
Rysunek 66. Chromatogramy z analiz HPLC przedstawiające zdolność proteasomu do degradacji amyliny. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie poddana 6-godzinnej inkubacji w Tpok. (A). Po tym czasie został dodany do niej proteasom i dalsza inkubacja przebiegała w 37°C przez 1h (B) oraz 24h (C). Czarny chromatogram przedstawia próbkę amyliny pozbawioną proteasomu, natomiast kolorem magenta oznaczyłam próbkę amyliny poddaną działaniu h20S. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.



Rysunek 67. Chromatogramy z analiz HPLC przedstawiające zdolność proteasomu do degradacji amyliny. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie poddana 3-godzinnej inkubacji w 37°C (A). Po tym, czasie został dodany do niej proteasom i dalsza inkubacja przebiegała również w 37°C przez 1h (B) oraz 24h (C). Czarny chromatogram przedstawia próbkę amyliny pozbawioną proteasomu, natomiast kolorem magenta oznaczyłam próbkę amyliny poddaną działaniu h2O2. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Technika HPLC w odwróconym układzie faz ze względu na denaturujące warunki analizy, nie może przedstawić oligomerycznego stanu próbki, a jedynie monomeryczną postać białka. Natomiast z przeprowadzonej wcześniej analizy ThT wiadome jest, że w momencie dodawania proteasomu w roztworze są obecne oligomery. W wyniku przeprowadzonej analizy w obu przypadkach wyraźnie widoczne jest zmniejszenie głównego sygnału, a także pojawienie się nowych, eluujących wcześniej fragmentów, co potwierdza hipotezę, że amyлина może być substratem dla proteasomu.

Ponieważ w dalszym ciągu nie dysponowałam bezpośrednim dowodem na zdolność proteasomu do trawienia oligomerycznych form amyliny, wykonałam jeszcze eksperymenty z wykorzystaniem elektroforezy w warunkach denaturujących. Próbki amyliny po danym czasie oligomeryzacji poddawałam inkubacji z proteasomem w 37°C, a następnie stabilizowałam uzyskany układ przez sieciowanie. Następnie, po denaturacji, próbki poddawałam analizie, a otrzymane wyniki przedstawiłam na Rysunku 68.



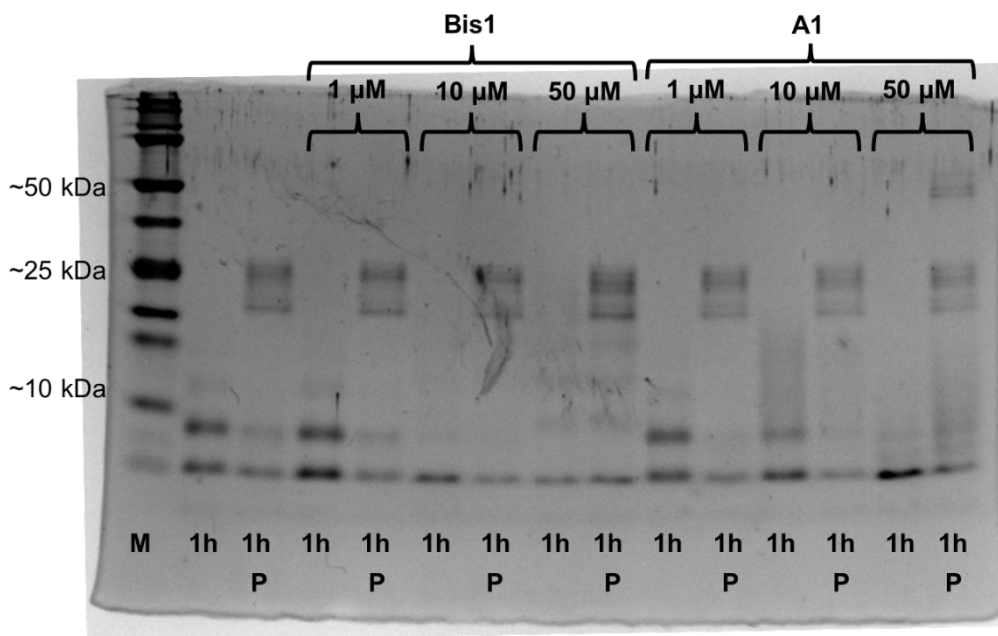
Rysunek 68. Elektroforegramy przedstawiające zdolność proteasomu do trawienia oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji w T_{po}k. (2, 4, 6, 24 godziny). Ścieżki oznaczone symbolem „P” informują o obecności proteasomu w próbce natomiast „2h”, „4h”, „6h” i „24h” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez wskazany czas w warunkach oligomeryzacyjnych. Na żelu oznaczonym A przedstawione są próbki niesieciowane, natomiast na żelu B wszystkie zostały ustabilizowane przez sieciowanie PICUP za pomocą RuBpy i zdenaturowane bezpośrednio przed elektroforezą w temperaturze 75°C przez 10 minut. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

Na przedstawionych elektroforegramach wyraźnie widoczne jest zanikanie prążków nie tylko od monomerycznej amyliny, ale również dimeru, trimeru i kolejnych merów.

Stanowi to niezbyty dowód na to, że proteasom jest zdolny do trawienia niskocząsteczkowych oligomerów amyliny.

5.2. Wpływ aktywatorów na zdolności degradacyjne proteasomu wobec oligomerów amyliny

Otrzymywane w naszej grupie badawczej związki mają za zadanie stymulować aktywność proteasomu 20S. Ich efektywność została potwierdzona w badaniach aktywności z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych substratów. Potwierdziłam również ich zdolność do przełamania inhibicyjnego wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną h20S. W poprzednim podrozdziale ustaliłam, że amyлина oraz jej niskocząsteczkowe oligomery mogą być substratami dla proteasomu. Stąd w kolejnym kroku chciałam sprawdzić, czy otrzymywane przez nas aktywatory mogą stymulować degradację amyliny przez proteasom. Jako technikę badawczą wybrałam elektroforezę w warunkach denaturujących, która najlepiej zobrazowała zdolność h20S do trawienia oligomerów amyliny (Rys.68). Przebieg eksperymentu był niemal taki sam, z tą różnicą, że po 5-minutowej inkubacji oligomerów z proteasomem dodawałam odpowiedni modulator. Wyniki zaprezentowałam na Rysunku 69.



Rysunek 69. Elektroforegram przedstawiający zdolność proteasomu pod nieobecność i w obecności aktywatorów A1 i Bis1 do trawienia oligomerów amyliny otrzymanych po godzinnej inkubacji. Stężenia aktywatorów opisane są na górze żelu. Ścieżki oznaczone symbolem „P” informują o obecności proteasomu w próbce, natomiast „1h” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez 1h w warunkach oligomeryzacyjnych. Wszystkie próbki zostały ustabilizowane przez sieciowanie PICUP za pomocą RuBpy i zdenaturowane bezpośrednio przed elektroforezą w temperaturze 75°C przez 10 minut. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.

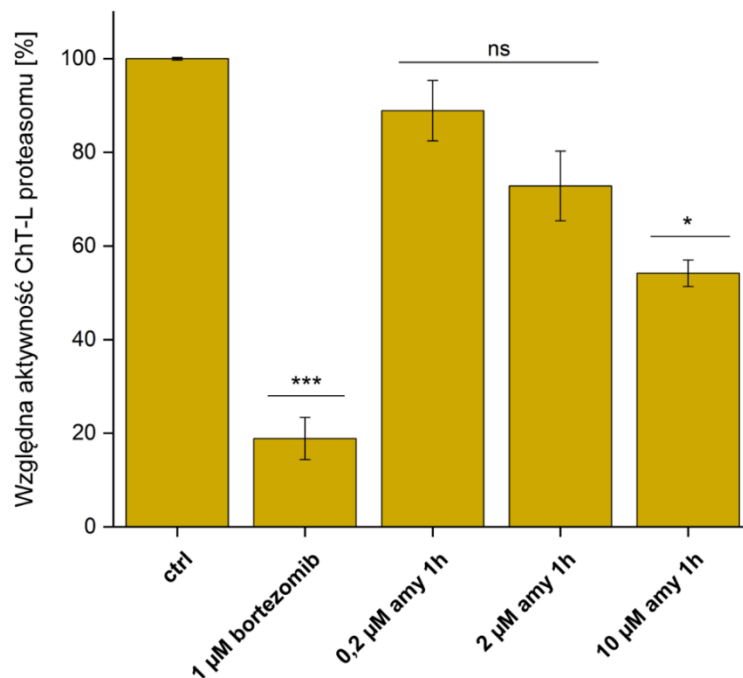
W przedstawionych wynikach widoczny jest stymulujący wpływ aktywatorów na degradację amyliny i jej oligomerów przez proteasom. Szczególnie wyraźnie uwidacznia się on dla 10 μM stężenia modulatorów.

6. Badania biologiczne

Przedstawione powyżej badania dotyczyły eksperymentów na proteasomie 20S wyizolowanym z ludzkich erytrocytów. Wykazany wpływ i sposób interakcji oligomerów amyliny z proteasomem stanowią dobry punkt wyjściowy do rozszerzenia badań w stronę bardziej natywnych układów, jakimi są komórki.

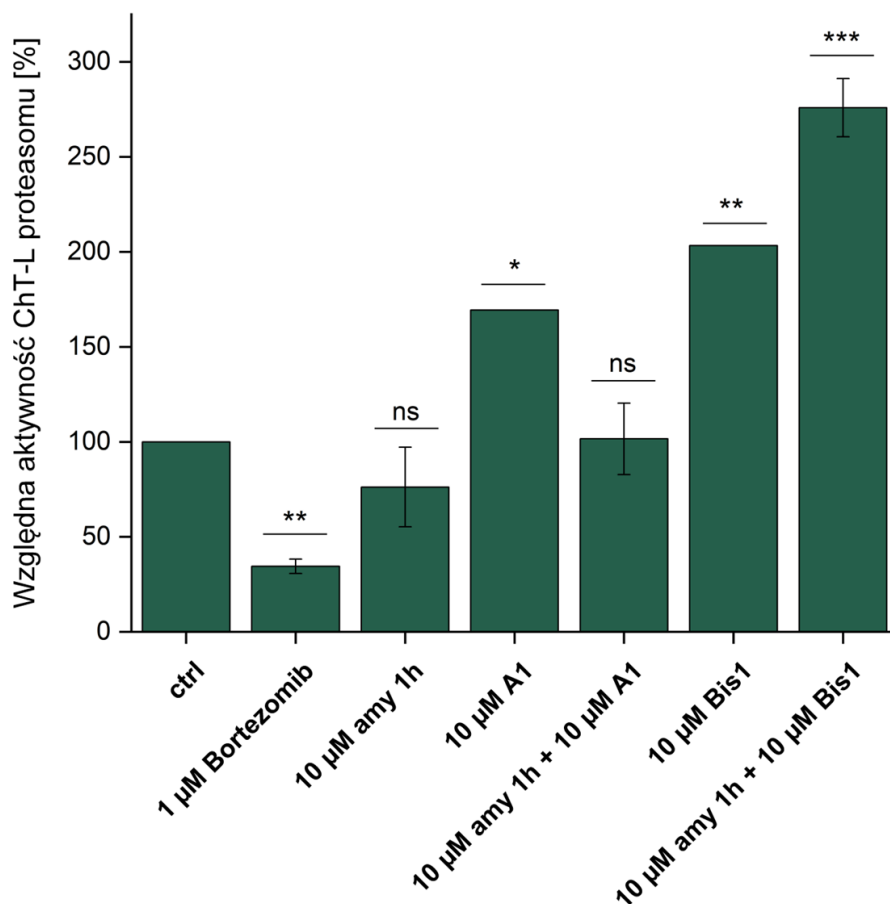
6.1. Badania na lizatach ludzkich linii komórkowych HEK293-T

W środowisku naturalnym komórki wpływ na zachodzące przemiany ma wiele czynników, których brakuje w sztucznych modelach, w których prowadziłam wcześniejsze badania. W związku z tym zbadalam wpływ oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną h20S w lizacie ludzkich komórek HEK293-T. Jest to linia komórkowa standardowo stosowanych komórek osób zdrowych. Rezultaty przeprowadzonego eksperymentu zamieściłam na Rysunku 70.



Rysunek 70. Wykres przedstawiający wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 1 godzinie inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu w lizacie komórek HEK 293-T. Obecność znanego inhibitora aktywności ChT-L proteasomu (bortezomibu) stanowi dodatkową kontrolę. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowałam hamujący, zależny od stężenia, wpływ oligomerów na aktywność proteasomu. W najwyższym badanym stężeniu amyliny aktywność proteolityczna enzymu spadała prawie o połowę w stosunku do kontroli. W związku z otrzymanymi wynikami postanowiłam sprawdzić, czy aktywatory A1 i Bis1, testowane także we wcześniejszych eksperymentach, są w stanie znieść inhibicyjny wpływ amyliny na proteasom w lizacie komórkowym (Rysunek 71).



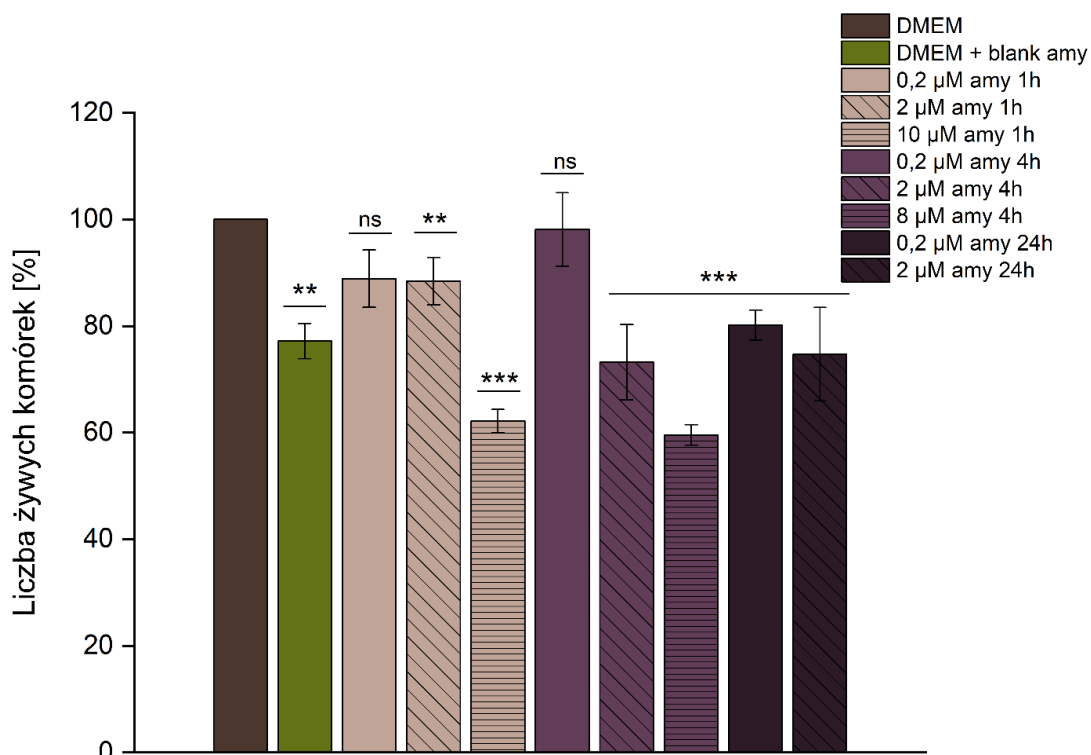
Rysunek 71. Wykres przedstawiający wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 1 godzinie inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu w lizacie komórek HEK293-T, pod nieobecność i w obecności modulatorów A1 i Bis1. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Otrzymane wyniki pokazują, że oba aktywatory w badanych stężeniach są w stanie co najmniej przywracać standardową aktywność proteasomu. Takie przywrócenie zdolności proteolitycznych do poziomu obserwowanego pod nieobecność oligomerów amyliny widoczne jest w przypadku modulatora A1. Natomiast aktywator Bis1 wyraźnie

zwiększa aktywność enzymu i powoduje, że zdolność trawienia substratu fluorogenicznego rośnie niemal 4-krotnie względem próby inhibowanej oligomerami.

6.2. Cytotoksyczność oligomerów amyliny

Drugim z przeprowadzonych badań biologicznych było sprawdzenie, czy oligomery amyliny są cytotoksyczne dla komórek HEK293-T. Opisane w literaturze badania nad destrukcyjnym wpływem amyliny dotyczą głównie komórek β trzustki, w których jest ona produkowana. Natomiast rozpoznany już, ogólny mechanizm cytotoksyczności oligomerów względem błony komórkowej skłonił mnie do sprawdzenia wpływu oligomerycznej amyliny na zdrowe, niezwiązane z cukrzycą komórki. Wyniki prezentuje Rysunek 72.



Rysunek 72. Wykres przedstawiający cytotoksyczny wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (1, 4, 24h) na żywotność komórek HEK293-T. Każda z próbek amyliny inkubowana była przez 2h z komórkami, a następnie wykonywano test MTT. „Blank amy” oznacza bufor, w którym prowadzona była oligomeryzacja białka. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędów standardowych średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey’a (ns - nieistotny statystycznie; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Z przeprowadzonych badań wynika, że oligomery po 2-godzinnej inkubacji z komórkami HEK293-T powodują ich destrukcję i spadek liczby żywych komórek nawet o około 40% względem samej pożywki. Zaobserwowałam również zależność

stężeniową cytotoxyczości oligomerów uzyskiwanych po każdym z testowanych czasów oligomeryzacji. Dla inkubacji 24-godzinnej przetestowałam jedynie dwa stężenia, ponieważ ze względu na spadek zawartości rozpuszczalnych oligomerów w tych próbkach niemożliwe było uzyskanie stężenia 8 μM . Otrzymane wyniki wskazują, że oligomery amyliny mają cytotoxyczny wpływ również na inne komórki, niezwiązane bezpośrednio z lokalizacją ich wydzielania. Wpływ ten nie jest jednak określany jako wysoka cytotoxyczość, co również jest spójne z rozwojem i postępem cukrzycy typu 2, który zwykle trwa latami zanim doprowadzi do uszkodzeń wielonarządowych.

IV Podsumowanie

Choroby konformacyjne stanowią coraz większe wyzwanie dla medycyny. Obecnie nie są znane żadne skuteczne metody terapii chorób o podłożu amyloidowym, wpływających nie tylko na centralny układ nerwowy, ale też na inne tkanki i narządy w organizmie, dlatego tak ważne jest poznawanie mechanizmów rozwoju tych jednostek chorobowych, aby móc opracowywać skuteczne terapie. Postuluje się, że amyloidozy są bezpośrednio związane z wadliwością systemów proteolitycznych, co w konsekwencji prowadzi do nieprawidłowości w przemianach błędnie sfałdowanych białek. Do grupy układów kontroli białkowej zaliczyć można proteasom 20S, który w stanie fizjologicznym jest istotnym elementem puli proteasomów, a w warunkach stresu oksydacyjnego, przyczyniającego się do wzrostu ilości białek uszkodzonych, podatnych na oligomeryzację, dodatkowo dysocjuje z kompleksu 26S i stanowi główną strukturę proteolityczną. W tych warunkach jednak jego aktywność jest zwykle hamowana, za co przez wiele lat obarczano wysoce zorganizowane formy fibrylarne białek. W nowym podejściu zakłada się, że najbardziej toksyczne dla komórek są rozpuszczalne oligomery. W przypadku trzech chorób związanych z neurodegeneracją - choroby Alzheimera, Parkinsona oraz Huntingtona - zaobserwowano ich hamujący wpływ na aktywność proteasomu, co skutkuje koncentracją cytotoksycznych oligomerów i następnie odkładaniem się utworzonych z nich agregatów.

Z uwagi na fakt, że u większości pacjentów cukrzycowych zaobserwowano złogi amyloidowe, cukrzycę typu 2 również zaczęto rozpatrywać w kontekście amyloidoz. W trakcie rozwoju tej choroby dochodzi do gromadzenia się w trzustce cytotoksycznych form, składających się z cząsteczek amyliny, która jest 37-resztowym peptydem o silniejszych właściwościach agregacyjnych niż peptyd β -amyloidowy ($A\beta$). Wspólne właściwości amyloidogenne oraz podobne cechy biochemiczne obu peptydów sugerują wspólny mechanizm patogenny. W przypadku peptydu $A\beta$ dowiedzione zostało, że istotną rolę w tym mechanizmie odgrywa upośledzenie funkcjonowania proteasomu 20S. Skłoniło mnie to do podjęcia się zadania ustalenia znaczenia prawidłowości działania proteasomu 20S w zapobieganiu agregacji amyliny.

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

Pracę badawczą rozpoczęłam od opracowania odtwarzalnej metody syntezy ludzkiej amyliny za pomocą mikrofalowego syntezaora peptydów Liberty Blue. Dało to dostęp do wystarczających ilości białka, aby możliwe było wielokrotne powtarzanie eksperymentów na etapie optymalizacji metod badawczych.

W kolejnym kroku z zastosowaniem wielu metod badawczych (elektroforeza natywna, testy fluorymetryczne z Tioflawiną T, CD, DLS) w warunkach natywnych scharakteryzowałam przebieg oligomeryzacji amyliny. Wyzaczyłam czas, w którym w roztworze obecne są głównie rozpuszczalne oligomery (6-8 godzin w Tpok.), uważane za najbardziej cytotoksyczne, a także ustaliłam, że wysycenie i stabilizacja form fibrylarnych rozpoczyna się po około 24 godzinach od rozpoczęcia inkubacji. Ponadto wykazałam dużą polidispersyjność próbek. Następnie, z wykorzystaniem sieciowania w celu stabilizacji oligomerów, potwierdziłam w warunkach denaturujących, że charakterystyczne dla wczesnych etapów agregacji amyliny są niskocząsteczkowe oligomery, od dimeru do heptameru.

Po określeniu przebiegu oligomeryzacji ludzkiej amyliny postanowiłam sprawdzić, czy oligomery z frakcji rozpuszczalnej mają wpływ na system proteolityczny jakim jest proteasom 20S, podobnie jak ma to miejsce w przypadku wspomnianych wcześniej chorób neurodegeneracyjnych. W tym celu zweryfikowałam zdolność oddziaływania między tymi molekułami z zastosowaniem termoforezy mikroskalowej. Wyznaczone wartości EC50 świadczą o silnym oddziaływaniu. Naturalnym następnym krokiem było zidentyfikowanie miejsca tej interakcji. Z zastosowaniem sieciowania do stabilizacji tworzącego się kompleksu udało mi się dobrać warunki, w których można zaobserwować oddziaływanie, ale także je analizować. Wykorzystując metodę bottom up spektrometrii mas starałam się zdefiniować to miejsce. Interpretacja otrzymanych wyników jest trudna i wciąż trwa, ale z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że miejsc interakcji między tymi molekułami jest wiele. Potwierdzić to mogą zaplanowane pomiary z wykorzystaniem mikroskopii krioelektronowej.

W kolejnym etapie prowadzonych badań sprawdziłam wpływ oddziaływania oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną proteasomu 20S. W tym celu przeprowadziłam szereg badań z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych substratów fluorogenicznych. Wykazałam w ten sposób hamujący wpływ oligomerów amyliny zarówno na latentny, jak i aktywowany dodatkiem surfaktantu h20S. Poprzez wyznaczenie kinetyki inhibicji wykazałam allosteryczny charakter hamowania aktywności proteasomu przez amylinę.

Korzystając z posiadanej przez nas puli peptydomimetycznych aktywatorów proteasomu, przeprowadziłam testy niwelowania hamującego wpływu oligomerów na aktywność proteolityczną enzymu. Badania te przeprowadziłam na wyizolowanym z ludzkiej krwi proteasomie 20S, a także w lizatach ludzkich komórek HEK293-T. W obu systemach zarówno związki z puli Blm, jak i z puli BisBlm są w stanie przywracać aktywność proteolityczną do wartości kontrolnych, a w przypadku niektórych związków (A1 i Bis1) nawet dodatkowo ją pobudzać. Wyniki te są szczególnie atrakcyjne ze względu na stosowane stosunki stężeń i stanowią podstawę do rozpatrywania powyższych związków jako możliwych do zastosowania w terapiach chorób amyloidogennych.

Wykonałam również testy cytotoksyczności otrzymywanych rozpuszczalnych frakcji oligomerycznych amyliny na liniach komórek HEK293-T. Otrzymane wyniki wyraźnie wykazały cytotoksyczność tych form, utrzymującą przeżywalność komórek na poziomie 60% przy najwyższym stosowanym stężeniu amyliny. Pokazuje to, że oligomery amyliny wykazują wprawdzie umiarkowaną toksyczność, ale obejmuje ona też inne komórki, również te niezwiązane z trzustką.

Starając się skorelować otrzymane wyniki z badaniami zaprezentowanymi przez grupę Smitha, przeprowadziłam również eksperymenty z przeciwciałem konformacyjnym A11. Wykazałam zdolność do oddziaływania oligomerów amyliny, szczególnie o helikalnej strukturze, z powyższym przeciwciałem, natomiast nie można definitywnie stwierdzić, że tylko tego typu oligomery są odpowiedzialne za inhibicję h20S.

Dodatkowym, ale niezwykle ważnym aspektem w kontekście regulacji poziomu oligomerów poprzez aktywację systemów proteolitycznych, było sprawdzenie, czy amyлина oraz jej oligomeryczne formy mogą być substratem proteasomu 20S. Na podstawie przeprowadzonych testów fluorymetrycznych z Tioflawiną T, analiz HPLC oraz elektroforegramów można potwierdzić, że oligomery niskocząsteczkowe z frakcji rozpuszczalnej, czyli właśnie te o najwyższej cytotoksyczności, mogą być degradowane przez proteasom 20S. Wykazałam również, że degradacja oligomerów amyliny może być dodatkowo pobudzana przez wspomniane powyżej peptydomimetyczne aktywatory.

Wszystkie otrzymane wyniki zaprezentowanych badań są niezwykle obiecujące i przybliżają nas do poznania mechanizmów, które przyczyniają się do rozwoju cukrzycy typu 2. Rozpatrywanie tej jednostki chorobowej w kontekście amyloidozy sprawia, że w jej terapii należałoby uwzględnić metody zapobiegania chorobom związanym

z agregacją białek. Wykazana przeze mnie skuteczność peptydomimetycznych aktywatorów opartych na fragmencie białka B1m10 może stanowić dobre podłoże dla opracowywania nowych terapii w leczeniu amyloidozy związanej z cukrzycą typu 2, a tym samym zmniejszyć negatywne skutki tej choroby.

V Metodologia prowadzonych badań

1. Synteza i oczyszczanie amyliny oraz jej wariantów

1.1. Synteza

Ludzką amylinę i jej warianty zsyntezowałam na nośniku stałym z wykorzystaniem strategii Fmoc i mikrofalowego syntezaora peptydów Liberty Blue (CEM). Do syntez użyłam żywicy PAL-TentaGel R (Rapp Polymere) o stopniu osadzenia 0,19 mmol/g. Jako odczynnik sprzęgający wykorzystałam 0,5 M heksafluorofosforan O-(1*H*-6-chlorobenzotriazolo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy (HCTU) w dimetyloformamidzie (DMF) z dodatkiem 2 M roztworu *N,N*-diizopropylaminy (DIPEA) w *N*-metylo-2-pirolidonie (NMP). W cyklu syntezy wykorzystałam podwójne sprzęgania, trwające 2,5 minuty w temperaturze 75°C. Aby zminimalizować prawdopodobieństwo zajścia reakcji ubocznych, dla reszt aminokwasowych szczególnie na nie podatnych zastosowałam zmodyfikowane warunki sprzęgania. W związku z tym przyłączanie reszt cysteiny i histydyny prowadziłam przez 10 minut w 50°C. Usuwanie osłony Fmoc prowadziłam przez 3 minuty w 75°C, używając 20% roztworu piperydyny w DMF. Z uwagi na opisaną problematyczność syntezy amyliny, wynikającą z jej licznych fragmentów hydrofobowych, w syntezie wykorzystałam trzy rodzaje pseudoprolin, wstawiając je odpowiednio: Fmoc-Ala-Thr($\psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH w pozycji 8-9, Fmoc-Ser(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH w pozycji 19-20, Fmoc-Ser(tBu)-Leu($\psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH w pozycji 26-27.

1.2. Przyłączanie znaczników fluorescencyjnych

1.2.1. Przyłączanie NBD

3 eq. 4-chloro-7-nitrobenzofurazanu (NBD) rozpuściłam w 5 ml DMF i dodałam 3 eq. DIPEA. Tak przygotowaną mieszaninę zalałam peptydydożywicę i pozostawiłam na noc na wytrząsarce kołyskowej. Następnego dnia żywicę odsączyłam, przemyłam 3-krotnie DMF i umieściłam na kolejne 24 h w takiej samej mieszaninie NBD w DMF z dodatkiem DIPEA. Po zakończeniu drugiego sprzęgania żywicę odsączyłam, przemyłam kolejno 3x DMF, 3x metanolem (MeOH), 3x eterem dietylowym (Et₂O) oraz wysuszyłam w eksykatorze.

1.2.2. Przyłączanie FITC

Z uwagi na zachodzące reakcje uboczne przy przyłączaniu 5-izotiocyanianu fluoresceiny (FITC) niezbędne jest oddzielenie go od sekwencji peptydowej linkerem, którym może być kwas 6-aminoheksanowy czy β -alanina, którą użyłam podczas mojej syntezy. β -alaninę przyłączyłam do peptydydożywicy dodając 3 eq. Fmoc- β -Ala-OH, 2,3 eq. heksafluorofosforanu 1-[bis(dimetyloamino)metyleno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pirydyniowego (HATU), 6 eq. DIPEA. Mieszaniną odczynników rozpuszczonych w DMF zalałam żywicę i wytrząsałam przez 1,5 godziny. Następnie peptydydożywicę odsączyłam i przemyłam 3-krotnie DMF, po czym powtórzyłam sprzęganie. Deprotekcję przeprowadziłam dodając 2-krotnie na 30 minut 20% roztwór piperidyny w DMF. Po odsączeniu i przemyciu peptydydożywicy przyłączyłam znacznik FITC poprzez dodanie mieszaniny składającej się z 4 eq. FITC, 4 eq. *N,N'*-diizopropylkarbodiimidu (DIC), 4 eq. 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt), 0,5 eq. 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) w DMF. Sprzęganie przeprowadziłam 2-krotnie, przez 1,5 godziny, na wytrząsarce kołyskowej. Po zakończeniu drugiego sprzęgania żywicę odsączyłam, przemyłam kolejno 3x DMF, 3x MeOH, 3x Et₂O oraz wysuszyłam w eksykatorze.

1.3. Odszczepianie peptydów z nośnika stałego

Wysuszoną po syntezie peptydydożywicę umieściłam na 3 godziny w mieszaninie odszczepiającej (10 ml/ 1g żywicy), złożonej z 95% kwasu trifluorooctowego (TFA) i 5% triizopropylsilanu (TIPS). Dla zwiększenia efektywności procesu naczynie reakcyjne umieszczone było na wytrząsarce z ruchem drgającym. Po odszczepieniu peptydu odsączyłam żywicę, odparowałam nadmiar TFA, a surowy produkt strąciłam zimnym eterem dietylowym. W kolejnym etapie zawiesinę peptydu w eterze wirowałam w temperaturze 4°C przez 15 minut przy prędkości 4 000 rpm, a otrzymany supernatant odrzuciłam. Procedurę dodawania świeżej porcji zimnego Et₂O i wirowania powtarzałam jeszcze 2-krotnie. Po ostatnim etapie osad osuszyłam w celu usunięcia pozostałości eteru, rozpuściłam w 10% kwasie octowym i pozbyłam się rozpuszczalnika w procesie liofilizacji.

Tabela 3. Ilości otrzymanych surowych produktów z przeprowadzonych syntez amyliny i jej wariantów.

Nazwa związku	Ilość surowego produktu z 0,5 g żywicy [mg]
Amylina	235,5
AmyBpa	246,1
AmyNBD	40 (z 1/4 żywicy)
AmyFITC	52 (z 1/4 żywicy)

1.4. Tworzenie mostka disulfidowego

Utlenianie amyliny prowadziłam przez rozpuszczenie surowego produktu do stężenia 10 mg/ml w dimetylosulfotlenku (DMSO). Roztwór pozostawiałam w kolbie okrągłodennej na 4 dni. Postęp reakcji weryfikowałam za pomocą HPLC.

1.5. Oczyszczanie

Amylinę oraz jej warianty oczyszczałam za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej na semipreparatywnym chromatografie K1001 (Knauer) w porcjach po 50 mg. Bezpośrednio przed oczyszczaniem białko w roztworze utleniającym rozcieńczałam układem A do końcowego stężenia 10% DMSO. Rozdział prowadziłam w trwającym 87 minut gradiencie liniowym 100% A → 100% B przy stałym przepływie rozpuszczalników 10 ml/min. Układ A stanowiła woda z 0,1% dodatkiem TFA, natomiast układem B był 50% ACN zawierający 0,1% TFA. Do oczyszczania stosowałam kolumnę Kinetex C18, 250 mm x 21,2 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex). Jako detektor wykorzystałam lampę UV K2500 (Knauer), a obserwacja pików prowadzona była przy długości fali λ 223 nm.

Tabela 4. Warunki oczyszczania oraz charakterystyka związków otrzymanych po oczyszczaniu 50 mg surowego produktu.

Nazwa związku	Amylina	AmyBpa	AmyNBD	AmyFITC	
Charakterystyka związków	Ilość czystego produktu [mg]	9,2	9,0	4,0	1,85
	Czas retencji oczyszczonych produktów [min]	7,45	7,84	7,96	8,05
	M_{cz} obliczona [Da]	3900,868	4005,904	4064,976	4362,344
	M_{cz} wyznaczona [Da]	3902,388	4006,214	4064,180	4364,439

Do weryfikacji czystości frakcji używałam kolumny Jupiter Proteo C12, 250 mm x 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å (Phenomenex) połączonej z chromatografem HPLC Varian ProStar 240 (Varian). Końcowe, oczyszczone produkty zostały scharakteryzowane za pomocą:

- chromatografu UHPLC Nexera z detektorem PDA i kolumną analityczną: Aeris Widedpore C4, 100 mm x 2,1 mm, 3,6 μ m, 200 Å (Phenomenex) w trwającym 15 minut gradiencie liniowym 5% \rightarrow 100% B przy stałym przepływie rozpuszczalników 0,5 ml/min (układ A stanowiła woda z 0,1% dodatkiem TFA, a układ B 80% ACN zawierający 0,1% TFA)

- spektrometru mas MALDI TOF Biflex III (Bruker) z matrycą DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy) oraz CCA (kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy), a także spektrometru mas LCMS-ESI-IT-TOF (Shimadzu).

1.6. Test Ellmana

Dodatkowo w celu potwierdzenia otrzymania produktu w formie utlenionej wykonałam jakościowy test Ellmana. Przygotowałam roztwór kwasu 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB) o stężeniu 4 mg/ml w buforze reakcyjnym - 0,1 M fosforanie sodu o pH 7,4 zawierającym 1 mM wersenian disodowy (EDTA). Roztwór wzorca, którym była cysteina, oraz amyliny zredukowanej i utlenionej przygotowałam w stężeniu

1 mg/ml. W szklanych fiolkach umieściłam po 2,5 ml buforu reakcyjnego, 50 μ l roztworu DTNB oraz 250 μ l wzorca/amyliny. Mieszaninę inkubowałam 15 minut bez dostępu światła. Żółte zabarwienie roztworu, obecne w próbce z cysteiną oraz zredukowaną amyliną wskazuje na obecność wolnych grup tiolowych. Bezbarwny roztwór amyliny po utlenianiu potwierdza zaangażowanie grup tiolowych w tworzenie mostka disulfidowego.

2. Charakterystyka oligomerów amyliny

2.1. Proces oligomeryzacji amyliny

Oczyszczoną amylinę naważałam w porcjach powyżej 100 μ g na wadze analitycznej o dokładności 1 μ g. Tak przygotowane naważki rozpuszczałam w 10% kwasie octowym do stężenia 1 mg/ml i dzieliłam na porcje, przenosząc odpowiednią ilość mikrolitrów do nowych eppendorfek niskoretencyjnych o objętości 1,5 ml. Po liofilizacji gotowe do eksperymentów naważki przechowywałam w -25°C .

Oligomeryzację amyliny rozpoczynałam od doprowadzenia do temperatury pokojowej naważki peptydu i buforów do inkubacji. W pierwszym etapie liofilizat amyliny rozpuszczałam w DMSO do otrzymania 5 mM roztworu. Tak przygotowaną próbkę poddawałam działaniu ultradźwięków przez 20 sekund, a następnie rozcieńczałam odpowiednim buforem do końcowego stężenia peptydu 100 μ M. Ostateczne stężenie DMSO w próbce wynosiło 2%. Stosowane w większości eksperymentów układy buforowe zawierały odpowiednio:

- Bufor I: 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 140 mM NaCl (20 mM NaPi)
- Bufor II: 20 mM NaPi, 0,05% SDS

2.2. Testy fluorymetryczne z Tioflawiną T

Pomiary fluorymetryczne prowadziłam na czarnej płytce 96-dołkowej z dnem w kształcie litery U (Brand). Tioflawina T dodawana była na początku inkubacji amyliny, bezpośrednio na płytkę. Końcowa objętość mierzonej próbki wynosiła 106 μ l, na którą składało się 100 μ l amyliny, przygotowanej zgodnie z procedurą z podrozdziału 2.1., oraz 6 μ l 500 μ M wodnego roztworu tioflawiny T. Między pomiarami, podczas inkubacji, płytkę zaklejałam folią samoprzylepną, aby ograniczyć parowanie. Pomiar wykonywałam przy długości fali wzbudzenia λ 420 nm, obserwując emisję przy λ 482 nm

na spektrofluorymetrze Infinity M200 Pro (Tecan). Wszystkie eksperymenty wykonałam w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach.

2.3. Dichroizm kołowy

Pomiary dichroizmu kołowego zostały wykonane w Sekcji Pomiarów Fizyko-Chemicznych, znajdującej się na Wydziale Chemii UG. Badania zostały przeprowadzone w kuwetach kwarcowych o długości ścieżki optycznej 10 mm z wykorzystaniem spektropolarymetru Jasco J-815 (Jasco). Analizowane próbki amyliny przygotowałam w stężeniu 0,39 mg/ml w 20 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl oraz 0,05% kwasu octowego. Dodatkowo w analizach z dodatkiem SDS bufor inkubacyjny wzbogacony był o 0,05% SDS. Próbki inkubowałam odpowiednią ilość czasu w temperaturze pokojowej, a następnie rozcieńczałam bezpośrednio przed pomiarem do stężenia 0,15 mg/ml. Do badań struktury zależnej od składu buforu amylinę i jej warianty inkubowałam 1 godzinę, natomiast w eksperymencie pokazującym zmiany struktury wraz z czasem inkubacji wybrałam na podstawie testów ThT odpowiednio czasy 1, 4 i 24 godziny. Pomiar wykonywany był w zakresie długości fali 195-260 nm przy stałej temperaturze 25°C. Dla każdej z próbek przeprowadzone zostały trzy niezależne pomiary widma CD.

2.4. Stabilizacja oligomerów poprzez sieciowanie

W celu stabilizacji oligomerów stosowałam dwa główne rodzaje sieciowania: chemiczne oraz fotochemiczne. W przypadku sieciowania typu PICUP (ang. *photo-induced cross-linking of unmodified proteins*) użyłam chlorku tris(2,2'-bipirydylo)rutenu(II) (RuBpy). Do alternatywnej metody sieciowania z użyciem światła wykorzystałam wprowadzoną w sekwencję wariantu amyBpa resztę fotosieciującą *p*-benzoilo-L-feniloalaninę (Bpa). Sieciowanie chemiczne prowadziłam używając 0,5% roztworu glutaraldehydu, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,05%. Po 45 minutach reakcję przerywałam, dodając 0,25 M Tris o pH 8, tak aby jego końcowe stężenie wyniosło 10 mM. Do sieciowania PICUP wykorzystywałam 2 mM RuBpy oraz 20 mM nadsiarczan amonu (APS), tak aby ich ostateczne stężenie wynosiło odpowiednio 0,1 mM i 1 mM. Próbkę naświetlałam przez 30 sekund za pomocą żarówki o mocy 16 W (4000 K). Reakcję stopowałam dodając 1 M wodny roztwór DTT, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 mM. Sieciowanie przez resztę Bpa prowadziłam w insertach szklanych przez 30-minutowe naświetlanie lampą UV o długości fali λ 365 nm.

Wygaszenie utworzonych wolnych rodników uzyskiwałam przez pozostawienie próbki bez dostępu światła na około 10 minut lub przez dodatek buforu obciążającego i denaturację, jeśli próbka poddawana była w dalszych etapach elektroforezie.

2.5. Chromatografia wykluczenia

Do charakterystyki tworzących się oligomerów amyliny w ich natywnej postaci chciałam wykorzystać chromatografię wykluczenia (SEC - ang. *size exclusion chromatography*). W tym celu do analiz używałam dwa typy chromatografów: Omnisec (Malvern Panalytical) zaopatrzony w detektor refraktometryczny RI oraz detektory laserowe LALS i RALS, a także chromatograf cieczowy UFLC (Shimadzu) z detektorem UV. Próby rozdziału oligomerów przeprowadziłam zarówno na kolumnach wypełnionych złożem na bazie agarozy, jak i krzemionki. Stosowane do prób rozdziału kolumny to:

- Superdex 75 Increase 10/300 (Cytiva),
- Superdex 75 Increase 3.2/300 (Cytiva),
- Superdex 200 Increase 10/300 (Cytiva),
- Superdex 200 Increase 3.2/300 (Cytiva),
- Yarra SEC 2000 7.8/300 (Phenomenex),
- bioZen SEC-2 4.6/300 (Phenomenex),
- Enrich SEC 650 10/300 (BioRad).

Próbki amyliny testowałam zarówno bezpośrednio po jej rozpuszczeniu, a także po inkubacji w różnych czasach. Sprawdzałam próbki w formie natywnej, ale również te ustabilizowane poprzez sieciowanie chemiczne, bądź fotosieciowanie. Ponadto, w niektórych buforach do zmniejszenia oddziaływań niespecyficznych, utrudniających analizę, zastosowałam dodatek argininy lub rozpuszczalnika organicznego (acetonitrylu). Dodatkowo w przypadku pierwszego użycia kolumny kilkakrotnie nastrzykiwałam roztwór wzorcowy BSA, aby opłaszyc kolumnę. Do rozdzielów wykorzystałam poniżej opisane warunki buforowe:

- 20 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 140 mM NaCl
- 10 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
- 35 mM octan sodu pH 5,3
- 40 mM bufor cytrynianowy pH 4,6

- 40 mM bufor fosforanowy pH 4,0 (ustalone przez dodatek kwasu cytrynowego)
- 40 mM bufor cytrynianowy pH 3,8
- 40 mM bufor fosforanowy pH 7,2, 200 mM arginina
- 50 mM bufor fosforanowy pH 7,4, arginina o stężeniu 1 mg/ml
- 35 mM bufor cytrynianowy pH 4,6, 5% ACN

Żadne z powyżej opisanych warunków nie pozwoliły na charakterystykę oligomerycznych form amyliny.

2.6. Elektroforeza kapilarna

Alternatywną metodą dla chromatografii wykluczenia SEC jest elektroforeza kapilarna, za pomocą której również można charakteryzować stan oligomeryczny próbki. Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystałam standardową kapilarę krzemionkową o długości 50 cm oraz kapilarę neutralną o długości 30 cm (Sciex). Pomiary wykonywałam na dwóch typach aparatów: Beckman Coulter P/ACE zaopatrzony w detektor UV oraz Agilent 7100 z detektorem LIF. Próbki amyliny analizowane były po różnych czasach inkubacji, w buforze fosforanowym z dodatkiem i bez SDS oraz w formie natywnej i sieciowanej. Żaden z otrzymanych wyników nie był powtarzalny.

2.7. DLS

Metodą, która może służyć do charakterystyki wielkości cząstek w roztworze jest także pomiar dynamicznego rozpraszania światła - DLS (ang. *dynamic light scattering*). Ze względu na wysokie koszty syntezy amyliny, a także ograniczenia w przygotowywaniu jej rozcieńczeń, do pomiarów mogłam wykorzystać jedynie aparaty o niskim stopniu zużycia próbki (do 10 μ l). W związku z tym do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystałam dwa aparaty firmy Unchained Labs - Stunner i Uncle, a także aparat firmy NanoTemper - Prometheus Panta. Dwa ostatnie sprzęty używałam w warunkach warsztatowych, testując ograniczoną liczbę próbek, natomiast na aparacie Stunner przeprowadziłam serię eksperymentów, w których stosowałam zmienne warunki. Sprawdzałam wpływ czasu inkubacji amyliny, warunków jej wirowania lub mieszania bezpośrednio przed pomiarem, a także sposobu pipetowania próbki na płytkę pomiarową. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty jednoznacznie wykazały zbyt dużą polidispersyjność próbek, aby móc określić wielkości zawartych w nich cząstek.

2.8. Elektroforeza natywna

Jedną z najpowszechniej stosowanych metod rozdzielania białek w warunkach natywnych jest elektroforeza. W celu scharakteryzowania oligomerów amyliny wykorzystałam różne warianty tej metody, w tym: standardową Native-PAGE z odwróconym prądem, Blue Native-PAGE, High Resolution Clear Native-PAGE oraz Acidic Native-PAGE. Stosowałam również różne rodzaje wizualizacji prążków takie jak: wybarwienie SyproRuby (ThermoFisher), srebrem, Instant Blue (Gentaur) czy Blue Silver. Jedynym wynikiem wszystkich przeprowadzonych powyżej rozdzielania elektroforetycznych była obserwacja monomeru amyliny.

Obserwację form oligomerycznych amyliny umożliwiło zastosowanie katodowej elektroforezy natywnej dla zasadowych białek, opisanej przez BioRad (Bulletin nr 2376). Metoda ta znajduje zastosowanie do rozdzielania białek, których punkt izoelektryczny występuje przy pH powyżej 8. Do rozdzielania wykorzystywana jest mobilność jonów K^+ jako jonów wiodących, histydyny jako jonu opóźnionego oraz jonów buforujących z buforu TAPS. Eksperyment rozpoczynałam od przygotowania dzień wcześniej żeli według Tabeli 5. Amylinę oraz jej warianty rozpuszczałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I i inkubowałam odpowiednio 0, 2 i 4 godziny. Bezpośrednio po zakończeniu danego czasu inkubacji próbki rozcieńczałam w stosunku 3:1 buforem obciążającym. Do studzienek nanosiłam po 10 μ l próbek. Rozdział rozpoczynałam od napięcia 220 V, do momentu migracji prążków do żelu rozdzielającego, a następnie zwiększałam napięcie do 240 V. Dodatkowo komora elektroforetyczna umieszczona była w łaźni lodowej. Skład buforu elektrodowego oraz buforu obciążającego zamieściłam odpowiednio w Tabeli 6 oraz 7. Wizualizacji prążków dokonywałam przez obserwację żelu za pomocą czytnika żeli Fusion FX (Vilber) przez filtr o odpowiedniej długości fali wzbudzenia i emisji, kompatybilny ze spektrum danego fluoroforu wbudowanego w sekwencję amyliny, a także poprzez barwienie Blue Silver. Rozdziały elektroforetyczne z zastosowaniem buforu TAPS zostały przeprowadzone w trzech niezależnych powtórzeniach.

Tabela 5. Skład żelu do katodowej elektroforezy natywnej.

Odczynnik	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 10%
40% Akrylamid (19:1)	0,25 ml	1,25 ml
H₂O	1,617 ml	2,47 ml
1,5 M TAPS pH 7,5	0,625 ml	1,25 ml
TEMED	1,4 µl	2,8 µl
10% APS	14 µl	28 µl
Końcowa objętość roztworu	2,5 ml	5 ml

Tabela 6. Skład buforu elektrodowego używanego w katodowej elektroforezie natywnej.

Odczynnik	Natywny bufor elektrodowy
TAPS	20 mM
Histydyna	100 mM

Tabela 7. Skład buforu obciążającego używanego w katodowej elektroforezie natywnej.

Odczynnik	4x bufor obciążający
1,5 M TAPS pH 7,5	100 mM
Glicerol	40%
Fiolet krystaliczny	0,1%

2.9. Elektroforeza Tricine SDS-PAGE

Z uwagi na niewielką masę cząsteczkową monomerycznej amyliny rozdział jej oligomerów w warunkach denaturujących wykonywałam z użyciem elektroforezy Tricine SDS-PAGE, która jest zalecana dla małych białek. Eksperyment rozpoczynałam od przygotowania dzień wcześniej żeli według Tabeli 8 oraz 9. Próbki rozcieńczałam w stosunku 3:1 buforem obciążającym i przy obecności β -merkaptoetanolu denaturowałam 10 minut w 75°C. Do studzienek nanosiłam po 10 µl próbek. Rozdział rozpoczynałam od napięcia 70 V, do momentu migracji prążków do żelu rozdzielającego, a następnie zwiększałam stopniowo napięcie do 120 V. W przypadku przygotowania żelu wykorzystywanego następnie do eksperymentów western blot stosowałam odmianę elektroforezy z obniżonym stężeniem wszystkich soli. Skład buforu elektrodowego oraz

buforu obciążającego zamieściłam odpowiednio w Tabeli 10 oraz 11. Każdy z rozdziałów elektroforetycznych wykonałam w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach.

Tabela 8. Skład żelu do elektroforezy Tricine SDS-PAGE.

Odczynnik	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 10%
40% Akrylamid (19:1)	0,25 ml	1,25 ml
H ₂ O	1,4 ml	1,25 ml
3 M Tris pH 8,45	0,825 ml	1,65 ml
63% glicerol	-	0,795 ml
TEMED	2,5 µl	5 µl
10% APS	25 µl	50 µl
Końcowa objętość roztworu	2,5 ml	5 ml

Tabela 9. Skład żelu do elektroforezy Tricine SDS-PAGE z obniżonym stężeniem soli.

Odczynnik	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 10%
40% Akrylamid (19:1)	0,25 ml	1,25 ml
H ₂ O	1,84 ml	0,91 ml
2,5 M Tris pH 8,8	0,38 ml	2,8 ml
TEMED	2,5 µl	4,2 µl
10% APS	25 µl	35 µl
Końcowa objętość roztworu	2,5 ml	5 ml

Tabela 10. Skład buforów elektrodowych używanych do elektroforezy Tricine SDS-PAGE.

Odczynnik	Tricine SDS-PAGE	Tricine SDS-PAGE z obniżonym stężeniem soli
Tris	100 mM	25 mM
Tricine	100 mM	25 mM
SDS	0,1%	0,05%

Tabela 11. Skład używanych buforów obciążających.

Odczynnik	4x bufor obciążający	4x bufor obciążający z β -merkaptetanolem
Tris pH 6,8	400 mM	400 mM
Glicerol	40%	40%
Coomassie Blue G-250	0,08%	0,08%
SDS	0,8%	0,8%
β-merkaptetanol	-	4%

2.9.1. Wybarwianie żeli z użyciem srebra

Wysoka czułość detekcji srebrem pozwala na wizualizację prążków białka nawet w jego niskim stężeniu (ng). Dodatkowo obecność formaldehydu w roztworach utrwalających i wywołującym pozwala na ograniczenie elucji protein z żelu w czasie wieloetapowych przemywań. Zgodnie z protokołem żel w pierwszym etapie przemywałam wodą i umieszczałam na 30 minut w 50% metanolu z 0,05% formaldehydem. Po tym czasie przenosiłam go do 25% MeOH z 0,05% formaldehydem. Kolejno prowadziłam 3-krotne przepłukiwania żelu wodą, każde po 5 minut. Następnie żel umieszczałam na 1 minutę w 0,02% tiosiarczanie sodu, a po tym czasie przemywałam wodą 3x 1 min. W kolejnym etapie żel inkubowałam pod przykryciem przez 25 minut w 0,2% azotanie(V) srebra z 0,076% formaldehydem. Następnie przepłukiwałam go 3-krotnie po 1 minucie wodą i umieszczałam w roztworze wywołującym o następującym składzie: 6% węglan sodu, 0,0004% tiosiarczan sodu, 0,056% formaldehyd. Barwienie przerywałam, umieszczając żel w 10% MeOH z 5% kwasem octowym.

2.10. Elucja oligomerów z żelu

Oligomery amyliny, powstałe po 20-godzinnej inkubacji według procedury opisanej w podrozdziale 2.1. z zastosowaniem buforu II, zostały ustabilizowane przez sieciowanie glutaraldehydem. Tak przygotowana próbka w objętości 225 μ l została rozcieńczona za pomocą 75 μ l 4-krotnie stężonego buforu obciążającego, a następnie nałożona na 10% żel Tricinowy do jednej dużej studzienki o objętości 300 μ l. Po przeprowadzonym rozdziale żel przemyłam wodą, a następnie wykorzystałam protokół odwrotnego barwienia z imidazolem i chlorkiem cynku do wybarwienia tła z pozostawieniem przezroczystych prążków. W tym celu żel inkubowałam 20 minut w 0,2 M wodnym

roztworze imidazolu, następnie na około 30 sekund dodałam 0,3 M wodny roztwór $ZnCl_2$. Zwizualizowane w ten sposób prążki wycięłam za pomocą skalpela, umieściłam w eppendorfkach o objętości 1,5 ml i przemyłam wodą. Następnie każdy z wyciętych prążków rozdrobniłam przy użyciu skalpela i dodałam 200 μ l buforu elektrodowego. Elucję prowadziłam przez 3 godziny wytrząsając próbkę okazjonalnie. Po tym czasie roztwór oddzieliłam od kawałków żelu i przeniosłam do nowej eppendorfki. Próbki dializowałam przez membranę o punkcie odcięcia 3,5 kDa, przez 2 dni, do 500 ml 20 mM NaPi, trzykrotnie wymieniając bufor na świeżą porcję. Po dializie sprawdzałam stężenie białek w roztworze za pomocą reagenta Pierce BCA (ThermoFisher) opartego na reakcji biuretowej.

3. Oddziaływanie oligomerów amyliny z przeciwciałem konformacyjnym A11

3.1. Dot-blot

Próbki nanosiłam po 2 μ l na membranę nitrocelulozową (0,2 μ m) z zachowaniem równych odstępów między nimi. Po dokładnym jej wysuszeniu membranę płukałam przez 5 minut w buforze TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20). Następnie przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej prowadziłam blokowanie za pomocą komercyjnie dostępnego środka SuperBlock (ThermoFischer), dodając do niego Tween 20, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,05%. Po zablokowaniu membranę płukałam 4-krotnie przez 5 min oraz 2-krotnie przez 10 min roztworem TBS-T, a następnie prowadziłam 1-godziną inkubację w temperaturze pokojowej z przeciwciałami I-rzędowymi (A11 lub T-4157), przygotowanymi w rozcieńczeniu 1:1000 w SuperBlock. Obecność środka blokującego miała zapobiegać niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciała I-rzędowego. Po serii sześciu przepłukań buforem TBS-T (4x 5 min; 2x 10 min), prowadziłam inkubację membrany przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z przeciwciałem II-rzędowym, rozcieńczonym TBS-T w proporcji 1:5000. Następnie ponownie wykonywałam serię sześciu przepłukań buforem TBS-T (4x 5 min; 2x 10 min). Na koniec, w celu usunięcia surfaktantu, który może interferować z odczytnikiem chemiluminescencyjnym, membranę przemywałam 2-krotnie po 5 minut buforem TBS, pozbawionym Tween 20. Do detekcji wykorzystałam metodę chemiluminescencji z użyciem substratu Clarity Western ECL (BioRad), inkubując membranę przez 3 minuty. Wizualizację blotów rejestrowałam za pomocą skanera żeli

Fusion FX (Vilber). Dokładne parametry dotyczące stosowanych przeciwciał zamieściłam w Tabeli 12.

Tabela 12. Szczegółowe informacje dotyczące stosowanych przeciwciał.

Parametr	Przeciwciało I-rzędowe		Przeciwciało II-rzędowe
	A11	T-4157	antiRb IgG HRP
Rodzaj	poliklonalne	poliklonalne	poliklonalne
Pochodzenie	królik	królik	koza
Oddziaływanie	oligomery amyloidowe	IAPP 25-37	przeciwciała królicze
Firma	BioTechne	BMA Biomedicals	BioTechne
Nr katalogowy	NBP1-97930	A18PO2024	HAF008

3.2. Western blot

Próbki rozdzielałam na 10% żelu tricinowym z mniejszym stężeniem soli. Bezpośrednio po rozdzieleniu żel przemywałam przez 10 minut buforem transferowym Towbin - 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 10% MeOH. Dodatkowo, przez 5 minut inkubowałam membranę nitrocelulozową (0,2 µm) w Towbin. W celu przeniesienia prążków z żelu na membranę prowadziłam mokry transfer przez 1 godzinę przy stałym napięciu 80 V. Po transferze membranę przemywałam buforem TBS-T, a następnie blokowanie i inkubację z przeciwciałami prowadziłam tak, jak to zostało opisane w rozdziale 3.1. Jediną różnicą między protokołem dot blot, a western blot była wydłużona inkubacja z przeciwciałem I-rzędowym z godziny w temperaturze pokojowej do inkubacji całonocnej w 4°C. Każdą z analiz western blot wykonałam w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach.

4. Oczyszczanie ludzkiego proteasomu 20S

Wszystkie rozdziały chromatograficzne przeprowadziłam w temperaturze 4°C na aparacie do chromatografii cieczowej Äkta Pure (GE Healthcare).

4.1. Liza erytrocytów

Koncentrat erytrocytów ludzkich ocieplałam do temperatury pokojowej, a następnie dzieliłam na równe porcje po 20 ml do sterylnych falkonów. Kolejno do

każdego z nich dodawałam po 20 ml 10 mM PBS pH 7,4, zawierającego 137 mM NaCl i 2,7 mM KCl. Tak przygotowaną mieszaninę wirowałam przez 10 minut w 20°C przy prędkości 600 rpm. Przy przemywaniu erytrocytów istotne jest zachowanie temperatury pokojowej, zarówno buforów, jak i wirowania, a także powolne jego rozpoczęcie i hamowanie, co zapobiega pękaniu komórek. Powyższy etap ma służyć usunięciu warstwy leukocytów, w których zawarty jest immunoproteasom, który może utrudniać dalszą izolację konstytucyjnego h2OS. Po wirowaniu znajdująca się na dole warstwa erytrocytów musi zostać przeniesiona do nowych falkonów. Wykonywałam to za pomocą zestawu złożonego ze strzykawki i długiej igły o średnicy 2 mm, pobierając dolną warstwę bez naruszenia górnej.

Do podzielonej na porcje po 20 ml i chłodzonej na lodzie warstwy erytrocytów dodawałam po 30 ml buforu lizującego o następującym składzie: 10 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1,6 mM DTT. Lizę komórkową prowadziłam przez godzinę w 4°C na wytrząsarce kołyskowej. Po tym czasie lizat wirowałam przez 30 minut w 4°C na maksymalnych obrotach dostępnej wirówki (29 788 rpm). Uzyskany supernatant, powstały przez oddzielenie lizatu od niezlizowanych erytrocytów oraz pozostałości błon komórkowych, przenosiłam do sterylnych falkonów 50 ml i przechowywałam w -25°C do czasu oczyszczania.

4.2. Wysalanie

Do przeprowadzenia jednego oczyszczania wykorzystywałam 150 ml lizatu, który powoli rozmrażałam. Następnie lizat umieszczony w zlewce w 4°C na mieszadle magnetycznym wysalałam, dodając bardzo powoli, przez około 1,5 godziny, siarczan(VI) amonu do osiągnięcia 35% nasycenia. Po dodaniu ostatniej porcji soli mieszaninę pozostawiałam na mieszadle na dodatkowe 30 minut. Następnie wysolony lizat wirowałam przez 1 godzinę w 4°C przy prędkości 29 788 rpm. Otrzymany supernatant dializowałam, używając membrany o punkcie odcięcia 6-8 kDa (Spectra/Por) do buforu o składzie: 20 mM Tris pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT. Dializę do 2 l roztworu prowadziłam przez 4 godziny, następnie woreczek dializacyjny przenosiłam do świeżej porcji 2 l buforu do dializy i pozostawiałam przez noc.

4.3. HiTrap

Lizat po dializie filtrowałam przez filtr membranowy RC o porach 0,45 µm. Jeśli było to niemożliwe, to w pierwszej kolejności wykonywałam 30-minutowe wirowanie na maksymalnych obrotach wirówki, a następnie otrzymany supernatant filtrowałam. Tak uzyskany przesącz dzieliłam na porcje do oczyszczania po 65 ml. Chromatografię jonowymienną wykonywałam z wykorzystaniem kolumny HiTrap Capto Q (Cytiva) o objętości całkowitej 5 ml. Rozdział przebiegał w gradiencie stężenia soli NaCl od 10 do 100% układu B. Zastosowane układy do oczyszczania miały następujący skład: układ A: 20 mM Tris pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT; układ B: 20 mM Tris pH 7,6, 700 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT. Frakcję proteasomalną zbierałam na podstawie wartości konduktancji. Zebrane frakcje dializowałam przez noc w 4°C, używając membrany o punkcie odcięcia 6-8 kDa (Spectra/Por) do 2 l buforu o składzie: 20 mM Tris pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT.

4.4. HIC

Kolejnym etapem izolacji proteasomu 20S była chromatografia oddziaływań hydrofobowych. Do frakcji po dializie małymi porcjami przez około godzinę dodawałam siarczan(VI) amonu, do osiągnięcia 50% nasycenia. Zawartość zlewki mieszałam kolejne 30 minut, a następnie wirowałam przez 60 minut przy prędkości 29 788 rpm. Otrzymany supernatant nanosiłam w jednej porcji na pre-kondycjonowaną kolumnę. Do rozdziału wykorzystywałam kolumnę HiPrep Phenyl FF (Cytiva). Proteasom eluował w gradiencie od 60 do 100% układu B. Zastosowane układy do oczyszczania miały następujący skład: układ A: 20 mM Tris pH 7,6, 1,2 M (NH₄)₂SO₄, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT; układ B: 20 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT. Zebrane frakcje dializowałam przez noc w 4°C, używając membrany o punkcie odcięcia 6-8 kDa (Spectra/Por) do 2 l buforu o składzie: 20 mM Tris pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT.

4.5. MonoQ

Ostatnim etapem oczyszczania frakcji proteasomalnej była chromatografia jonowymienna z zastosowaniem kolumny MonoQ 5/50 GL (Cytiva) o objętości 1 ml. Frakcje po dializie filtrowałam przez filtr RC o porach 0,45 µm i nanosiłam na kolumnę w jednej porcji. Rozdział przebiegał w gradiencie stężenia soli NaCl, od 2 do 100%

układu B. Zastosowane układy od oczyszczania miały następujący skład: układ A: 20 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT; układ B: 20 mM Tris pH 7,6, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT. Frakcję proteosomalną zbierałam na podstawie wartości konduktancji. Zebrane frakcje dializowałam, używając membrany o punkcie odcięcia 15 kDa (Spectra/Por) do buforu o składzie: 20 mM Tris pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 10% glicerol. Dializę do 2 l roztworu prowadziłam przez 4 godziny, następnie woreczek dializacyjny przenosiłam do świeżej porcji 2 l buforu do dializy i pozostawiałam przez noc.

4.6. Zatężanie i określanie stężenia białka

Do zatężenia roztworu białka po dializie używałam dwóch rodzajów koncentratora: o objętości 15 ml i punkcie odcięcia 10 kDa (VivaSpin6) oraz o objętości 0,5 ml i punkcie odcięcia 30 kDa (NanoSep). Oba koncentratory w pierwszej kolejności przemywałam buforem po dializie, a następnie rozcieńczonym roztworem proteasomu w celu opłaszczenia membrany i zminimalizowania strat białka. Warunki wirowania modyfikowałam w zależności od tempa zatężania roztworu, tak aby nie było ono za szybkie, bo również wiązałyby się to z większymi stratami. Dla zatężonego do około 200 µl roztworu proteasomu wykonywałam pomiar stężenia białka z zastosowaniem metody z odczynnikiem Bradforda, mierząc absorbancję przy dwóch długościach fali λ 450 nm oraz λ 590 nm. Wyizolowany proteasom przechowywany był w stężeniu 1 mg/ml w temperaturze -25°C w roztworze o następującym składzie: 20 mM Tris pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, 1 mM DTT, 50% glicerol.

4.7. Elektroforeza SDS-PAGE i testy aktywności proteolitycznej

Czystość wyizolowanego h2OS określałam za pomocą standardowej elektroforezy w warunkach denaturujących w układzie Laemmli. Do rozdzielania wykorzystywałam 4% żel zagęszczający oraz 12% żel rozdzielający. Próbkę były rozcieńczane 4-krotnie stężonym buforem obciążającym, denaturowane w temperaturze 75°C przez 10 minut i nanoszone na żel po 10 µl na dołek. Do wizualizacji prążków używałam Instant Blue (Gentaur).

Aktywność proteolityczną wyizolowanego proteasomu określałam z zastosowaniem substratu fluorogenicznego Suc-LLVY-AMC.

5. Badania oddziaływania oligomerów amyliny z proteasomem 20S

5.1. Termoforeza mikroskalowa

Pomiary termoforezy mikroskalowej przeprowadziłam na aparacie Monolith X (NanoTemper). Eksperymenty przeprowadziłam w trzech niezależnych powtórzeniach.

5.1.1. Znakowanie ludzkiego proteasomu 20S znacznikiem fluorescencyjnym

Standardowo h20S przechowywany jest w stężeniu 1 mg/ml w 50 mM buforze Tris z dodatkiem DTT, który zapobiega utlenianiu białka. Ze względu na obecność wolnych grup aminowych w buforze Tris do znakowania reszt lizyny znacznikiem fluorescencyjnym, opartym o *N*-hydroksysukcynoimidowy (NHS) ester aktywny, niezbędna jest wymiana buforu. Wykonałam ją zgodnie z instrukcją producenta (NanoTemper), wykorzystując zawartą w zestawie kolumnę A oraz bufor NHS (130 mM NaHCO₃, 50 mM NaCl, pH 8,2-8,3).

Przyłączanie znacznika fluorescencyjnego RED-NHS 2nd Generation (NanoTemper) wykonałam zgodnie z instrukcją producenta. Po 30 minutach inkubacji znacznika z proteasomem 20S, w ciemności, naniosłam mieszaninę na złożę dołączonej do zestawu kolumny B, a następnie eluowałam wyznakowany proteasom za pomocą 50 mM buforu Tris o pH 7,2 zawierającego 5% glicerolu. Tak otrzymany eluat przechowywałam w 4°C.

Po zakończeniu procesu znakowania zmierzyłam stężenie białka w uzyskanym eluacie z zastosowaniem odczynnika Bradforda, wykonując pomiar przy dwóch długościach fali: λ 450 nm oraz λ 590 nm. Na podstawie stosunku uzyskanych wartości absorbancji oraz po podstawieniu do krzywej wzorcowej wyznaczyłam stężenie h20S, które wynosiło 200 nM. Dodatkowo wykonałam test wstępny („pretest”), w celu potwierdzenia prawidłowości wyznakowania proteasomu. Dla h20S niemożliwe jest wyznaczenie DOL (stopnia wyznakowania) według instrukcji NanoTemper z uwagi na jego nieznaną, dokładną molowy współczynnik ekstynkcji.

5.1.2. Wyznaczanie siły oddziaływania dla kompleksów proteasomu 20S z oligomerami ludzkiej amyliny

Dla amyliny dobór czasów inkubacji wynikał z przeprowadzonych wcześniej testów fluorymetrycznych z Tioflawiną T, a także z badań inhibicji względem h20S. Do eksperymentu MST wybrałam 2-godzinny czas inkubacji amyliny, odpowiadający

początkowej fazie oligomeryzacji, a także 24-godzinny, gdzie osiągnięte jest wysycenie i nie tworzą się już nowe struktury oligomeryczne. Amylina inkubowana była w temperaturze pokojowej, osobno w każdym z opisanych w podrozdziale 2.1. układów buforowych, tzn. w buforze bez SDS i z 0,05% dodatkiem SDS.

Przed przystąpieniem do właściwych eksperymentów wykonałam dla każdego z układów test wiązania („binding check”). Jest to sprawdzenie, czy w najwyższym stosowanym stężeniu amyliny (liganda) występuje oddziaływanie z wyznakowanym proteasomem (targetem). Dodatkowo możliwa jest weryfikacja, czy występuje agregacja, bądź adsorpcja próbki w kapilarze. Etap ten pozwala na optymalizację eksperymentu bez nadmiernego zużycia odczynników. Na podstawie otrzymanych wyników zdecydowałam się na korzystanie z kapilar premium, ze względu na ich obniżone właściwości adsorpcyjne. Problem agregacji rozwiązuje zastosowanie pomiaru stosunku intensywności fluorescencji 670 nm/ 650 nm (tzw. spectral shift), który jest niezależny od tego zjawiska. Wszystkie przedstawione wyniki zostały zebrane w oparciu o ten typ pomiaru.

Do eksperymentów z amyliną niezbędna okazała się wcześniejsza, półgodzinna inkubacja oligomerów z proteasomem w temperaturze pokojowej, w celu ustalenia się równowagi. Do wyznaczenia stałej oddziaływania wykorzystywałam h2OS w stężeniu 10 nM, a amylinę w najwyższym stężeniu 50 μ M. Eksperyment wykonywałam miareczkując proteasom z użyciem 16-stu stężeń liganda, powstałych metodą seryjnych rozcieńczeń z roztworu 50 μ M.

5.2. Analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas

5.2.1. Sieciowanie przez Bpa

Mutant amyliny z wprowadzoną w sekwencję resztą fotosieciującą Bpa przygotowałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I. Po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej amyBpa rozcieńczyłam buforem fosforanowym do stężenia 50 μ M. Do 18 μ l tak przygotowanej amyBpa dodałam 2 μ l 200 nM h2OS w 50 mM Tris o pH 7,6 zawierającym 5% glicerolu. Całość inkubowałam 30 minut w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksu. Kompleks ustabilizowałam dzięki sieciowaniu przeprowadzonemu poprzez 30-minutowe naświetlanie lampą UV o długości fali λ 365 nm próbki w insercie szklanym, umieszczonym na lodzie w odległości 9 cm od źródła światła. W celu redukcji mostków

disulfidowych do mieszaniny dodałam wodny roztwór DTT, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 10 mM. Dodatkowo, aby rozluźnić strukturę i ułatwić redukcję, a następnie dalsze etapy trawienia, na tym etapie wprowadziłam również surfaktant RapiGest przygotowany w 50 mM wodorowęglanie amonu o pH 8. Końcowe stężenie RapiGest wynosiło 0,2%. Tak przygotowaną mieszaninę ogrzewałam przez 30 minut w 56°C. Następnie próbki doprowadziłam do temperatury pokojowej i dodałam przygotowany w 50 mM wodorowęglanie amonu o pH 8 jodoacetamid (IAA), aby zalkilować wolne grupy tiolowe. Ostateczne stężenie IAA wynosiło 20 mM. Probki inkubowałam przez 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio przed dodaniem enzymów sprawdzałam czy pH utrzymuje się na poziomie 8. Następnie dodawałam mieszaninę enzymów złożoną z trypsyny i chymotrypsyny, przygotowaną w 50 mM buforze NH_4HCO_3 o pH 8, tak aby stosunek stężenia każdego z enzymów do sumarycznej zawartości białek w roztworze wynosił 1:20. Probki inkubowałam w 37°C przez 24 godziny, a następnie trawienie przerywałam dodając 10% kwas mrówkowy, tak aby jego ostateczne stężenie wynosiło 1%. Rejestracja widm spektrometrii mas wykonana została przez dr inż. Pawła Wityka z Zakładu Biofarmacji i Farmakokinetyki Wydziału Farmacji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Do analiz próbek wykorzystany został spektrometr mas ZenoTOF 7600 firmy Sciex. W celach kontrolnych analizie poddane zostały również przygotowane w ten sam sposób próbki zawierające samą amylinę, sam proteasom lub pozbawione białek same roztwory buforowe. Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone w co najmniej trzech niezależnych powtórzeniach.

5.2.2. Sieciowanie przez DSSO i trawienie próbek w żelu

Amylinę rozpuściłam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I. Probkę inkubowałam przez godzinę w temperaturze pokojowej, po czym rozcieńczyłam dwukrotnie (do 50 μM amyliny) i dodałam taką samą objętość 40 nM proteasomu w 20 mM buforze fosforanowym o pH 8. Całość inkubowałam 30 minut w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksu. Po tym czasie do roztworu dodałam 0,5 mM roztwór bis(2,5-dioksopirolidyn-1-ylo)-3,3'-sulfinylodipropionianu (DSSO) w DMSO, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 25 μM . Po 15 minutach reakcję sieciowania zahamowałam poprzez dodanie 440 mM buforu Tris o pH 8, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 mM. Po około 10 minutach do próbek dodałam 4x stężony bufor obciążający z β -merkaptioetanołem i denaturowałam przez 10 minut

w 75°C. Próbki nanosiłam po 10 µl na dołek na 10% żel tricynowy z mniejszym stężeniem soli, opisany w rozdziale 2.9. Każdą z próbek nakładałam do trzech kolejnych dołków. Po rozdziale elektroforetycznym żel przemyłam wodą, a następnie prążki wybarwiłam Blue Silver. Prążki znajdujące się na wysokości odpowiadającej masie cząsteczkowej proteasomu wycięłam skalpelem. W celu zwiększenia stężenia białek połączyłam ze sobą fragmenty żelu pochodzące z rozdziału tych samych próbek. Do odbarwienia prążków wykorzystałam mieszaninę acetonitrylu ze 100 mM NH₄HCO₃ o pH 8 w stosunku objętościowym 1:1, inkubując wycięte fragmenty przez 30 minut. Po odbarwieniu żel przemyłam wodą, a następnie inkubowałam przez 10 minut w acetonitrylu. Po zwirowaniu i usunięciu ACN kawałki żelu zalałam 10 mM wodnym roztworem DTT, do całkowitego ich zanurzenia, i inkubowałam przez 30 minut w 56°C. Po doprowadzeniu próbek do temperatury pokojowej i usunięciu DTT, rozdrobniony żel inkubowałam przez 10 minut w ACN. Następnie w celu alkilacji wolnych grup tiolowych żel pokryłam 100 mM roztworem IAA w 50 mM NH₄HCO₃ o pH 8 i inkubowałam przez 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po tym czasie roztwór usunęłam, a rozdrobniony żel ponownie inkubowałam przez 10 minut w ACN. Do trawienia białek w żelu wykorzystałam trypsynę i chymotrypsynę w stężeniu 20 µg/ml w 50 mM NH₄HCO₃ o pH 8. Do eppendorfek z żelem umieszczonych na lodzie dodałam po 50 µl każdego z enzymów i inkubowałam przez 30 minut. Po tym czasie, w przypadku całkowitego wchłonięcia roztworu przez żel, ponownie dodawałam mieszaninę enzymów i kontynuowałam inkubację przez kolejne 90 minut. Następnie usunęłam nadmiar roztworu, do żelu dodałam 50 mM NH₄HCO₃ o pH 8 aż do całkowitego pokrycia i prowadziłam inkubację przez noc w 37°C. Kolejnego dnia, po usunięciu roztworu, rozpoczęłam ekstrakcję produktów trawienia. W tym celu do każdej z eppendorfek dodałam po 100 µl mieszaniny 5% HCOOH i ACN (v:v; 1:2) i inkubowałam 15 minut w 37°C. Pobrany dokładnie roztwór przenieśliśmy do nowych eppendorfek i odparowałam rozpuszczalnik w 25°C na koncentratorze próżniowym. Pozostały osad rozpuściłam w 0,1% HCOOH.

5.2.3. Sieciowanie amyNBD oraz amyFITC

Warianty amyliny ze znacznikami fluorescencyjnymi przygotowywałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I. Próbki inkubowałam przez 2 lub 4 godziny w temperaturze pokojowej w celu uzyskania oligomerów.

- 1) Sieciowanie DSSO: Do oligomeryzowanych próbek dodałam 40 nM proteasom w 20 mM buforze fosforanowym o pH 8. Końcowe stężenie enzymu wynosiło 20 nM. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, która miała umożliwić utworzenie kompleksów proteasomu z oligomerami, dodawałam na 15 minut DSSO w DMSO, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło odpowiednio: 50, 125, 250, 500 μ M. Miało to na celu ustabilizowanie kompleksów poprzez ich sieciowanie. Reakcję sieciowania stopowałam dodając bufor Tris o pH 8, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 mM.
- 2) Sieciowanie glutaraldehydem: Oligomeryzowaną próbkę amyNBD rozcieńczałam do stężenia 50 μ M i dodawałam H₂O₂, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 nM. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksu, dla jego stabilizacji dodawałam na 45 minut 0,5% glutaraldehyd, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,05%. Reakcję stopowałam dodając bufor Tris o pH 8, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 10 mM.
- 3) Sieciowanie RuBpy: Oligomeryzowaną próbkę amyNBD rozcieńczałam do stężenia 50 μ M i dodawałam H₂O₂, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 nM. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksu, dla jego stabilizacji dodawałam 2 mM RuBpy i 20 mM APS, tak aby ich końcowe stężenia wynosiły odpowiednio 0,1 mM i 1 mM. Próbkę naświetlałam przez 30 sekund za pomocą żarówki o mocy 16 W (4000 K). Reakcję stopowałam dodając 1 M wodny roztwór DTT, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 20 mM.

Do tak przygotowanych próbek dodawałam 4x stężony bufor obciążający z β -merkaptioetanolem i denaturowałam przez 10 minut w 75°C. Próbki nanosiłam po 10 μ l na dołek i rozdzielałam za pomocą Tricine SDS-PAGE z mniejszym stężeniem soli na 10% żelu rozdzielającym. Wizualizacji prążków dokonywałam przez obserwację żelu za pomocą czytnika żeli Fusion FX (Vilber) przez filtr o odpowiedniej długości fali wzbudzenia i emisji, kompatybilny ze spektrum danego fluoroforu, a także poprzez barwienie srebrem. Na żelu obserwowanym za pomocą czytnika brak było prążków na wysokości proteasomu, co najprawdopodobniej spowodowane było tym, że zastosowany znacznik NBD miał zbyt niską wydajność fluorescencji, by umożliwić wizualizację niewielkiej liczby cząsteczek proteasomu z dołączonymi oligomerami. Z tego powodu

amyNBD nie mogła zostać wykorzystana do określenia miejsca oddziaływania oligomerów z proteasomem za pomocą elektroforezy 2D.

5.2.4. Analizy programem MeroX 2.0

Wszystkie dane analizowałam za pomocą bezpłatnego oprogramowania do identyfikacji miejsca sieciowania MeroX 2.0, wykorzystując pliki z rozszerzeniem .mgf. Baza danych zawierała w jednym pliku FASTA sekwencję aminokwasową proteasomu (PDB: 4R3O) oraz sekwencję ludzkiej amyliny. W przypadku amyBpa, resztą sieciującą Bpa wprowadziłam do tego pliku pod symbolem „b” jako resztę aminokwasową o masie cząsteczkowej 252,102. W zakładce dotyczącej wyboru odczynnika sieciującego, dla analiz z DSSO wybrałam dostępną opcję, natomiast dla sieciowania Bpa zdefiniowałam nowy odczynnik sieciujący o masie równej 0 Da oraz specyficzności sieciowania między „b”, a dowolną resztą aminokwasową w odległości maksymalnej 24 Å. Pełne parametry zastosowane w programie do selekcji wyników zamieściłam poniżej:

software version = 2.0.1.4.

minimal peptide mass = 200.0 Da

maximal peptide mass = 8000.0 Da

MS precision = 20.0 ppm

MS2 precision = 20.0 ppm

S/N Ratio = 0.0

ion types = a,b,y

minimal peptide length = 5

maximal peptide length = 30

neutral losses setting = neutral loss of all fragments

maximum number of neutral losses = 5

score setting = slow, precise scoring

apply prescore = OFF

score cutoff = 0.0

fdr cutoff = 0.0

ignore consecutive peptides as crosslinks = ON

deisotope = ON

mixed target/decoy = ON

decoy type = shuffle but keep protease sites

perform decoy analysis = ON

intrapeptidal crosslinks = OFF

dead end crosslinks = OFF

crosslinker = Bpa

protease = trypsin, chymotrypsin (3 missed cleavages)

modifications = static: C to B; variable: M to m (max. 2)

5.3. Mikroskopia krioelektronowa

Do pomiarów mikroskopowych wykorzystałam wariant amyliny z wprowadzoną w jej sekwencji resztą fotosieciującą Bpa. Białko rozpuszczałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I, a następnie inkubowałam 20 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próbki rozcieńczałam do stężenia 45 μM dodając do 4,5 μl roztworu amyBpa 5,5 μl roztworu proteasomu w 50 mM Tris o pH 7,6, zawierającym w opcji I: 0,005 % DMSO lub w opcji II: 10 μM bortezomib w 0,005% wodnym roztworze DMSO. Końcowe stężenie proteasomu we wszystkich próbkach wynosiło 1 mg/ml, natomiast próbki różniły się obecnością lub brakiem inhibitora aktywności proteasomu. Obie próbki inkubowałam 30 minut w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksu między białkiem a oligomerami. Dla stabilizacji tego kompleksu próbki naświetlałam na lodzie przez 30 minut w insercie szklanym latarką o długości fali λ 365 nm, oddaloną od próbki o 4,5 cm.

W czasie inkubacji próbek przygotowałam siatki Quantifoil™ R 2/1 Cu200. W pierwszym etapie przeprowadziłam glow discharge (60 s, 8 mA), a następnie na siatki została nałożona warstwa tlenku grafenu. W tym celu 3 μl wodnego roztworu tlenku grafenu o stężeniu 0,2 mg/ml, zostało nałożone na siatkę na minutę. Po tym czasie kropla została usunięta za pomocą papieru, a siatkę trzykrotnie przemyto dejonizowaną wodą

poprzez jej zanurzenie w kroplach o objętości 20 μ l. Na koniec wszystkie przygotowane siatki zostały wysuszone przez 5 minut pod dygestorium. Następnie z wykorzystaniem VitroBota przeprowadziłam aplikację i blotting próbek na siatkach z zachowaniem następujących parametrów: temperatura 4°C, ilość próbki - 3 μ l, wilgotność 100%, czas inkubacji – 30 s. Kolejno próbki zostały zamrożone w ciekłym etanie. Pomiary zostały wykonane na aparacie Glacios Krio-TEM w Narodowym Centrum Promieniowania Synchronicznego w Krakowie.

6. Zdolność proteasomu 20S do trawienia oligomerów amyliny

6.1. Testy fluorymetryczne z Tioflawiną T

Pomiary fluorymetryczne prowadziłam na czarnej płytce 96-dołkowej z dnem w kształcie litery U (Brand). Amylinę przygotowywałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I. Tioflawina T dodawana była na początku inkubacji amyliny, bezpośrednio na płytkę. Płytki były inkubowane przez odpowiednią ilość czasu, pozwalającą na otrzymanie różnych oligomerów amyliny (2, 4, 6, 24 godziny). Inkubację prowadziłam zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w 37°C. Końcowa objętość mierzonej próbki wynosiła 106 μ l, na którą składało się 90 μ l 100 μ M amyliny, 6 μ l 500 μ M roztworu wodnego tioflawiny T oraz 10 μ l 200 nM h20S. Po dodaniu proteasomu obie płytki inkubowane były w 37°C. Między pomiarami, podczas inkubacji, płytkę zaklejałam folią samoprzylepną, aby ograniczyć parowanie. Pomiar wykonywałam przy długości fali wzbudzenia λ 420 nm, obserwując emisję przy λ 482 nm. Eksperyment został wykonany w trzech niezależnych powtórzeniach.

6.1.1. Testy z aktywatorami

W sposób analogiczny jak testy z samym proteasomem prowadziłam też testy z dodatkiem jego aktywatorów. Na płytce inkubowałam przez 3 godziny w temperaturze pokojowej próbki amyliny o objętości 85 μ l i stężeniu 50 μ M, z dodatkiem 6 μ l 500 μ M wodnego roztworu ThT. Następnie dodawałam do nich po 5 μ l 100 nM h20S, inkubowałam 5 minut, po czym dodawałam po 10 μ l aktywatorów odpowiednio w stężeniach 10, 50, 100 μ M w 2% DMSO. Od tego momentu płytkę inkubowałam w 37°C. Eksperyment został wykonany w trzech niezależnych powtórzeniach.

6.2. Analizy HPLC

Analizy trawienia oligomerów amyliny przez proteasom 20S wykonałam z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz na chromatografie Nexera z detektorem PDA i kolumną analityczną Aeris Widedpore C4, 100 mm x 2,1 mm, 3,6 μm , 200 \AA (Phenomenex).

Na podstawie przeprowadzonych wcześniej testów fluorymetrycznych do analiz HPLC wybrałam dwa czasy inkubacji amyliny - 6 godzin w przypadku inkubacji w temperaturze pokojowej oraz 3 godziny dla 37°C. Amylinę o stężeniu 100 μM inkubowałam w 20 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl oraz 2% DMSO. Po odpowiednim czasie inkubacji dodawałam do niej proteasom w 20 mM Tris o pH 7,6 zawierającym 5% glicerolu, tak aby końcowe stężenie enzymu wynosiło 20 nM. Każdą z próbek inkubowałam kolejną godzinę lub 24 godziny w 37°C. Próbę kontrolną stanowiła amyлина przygotowana w ten sam sposób, ale z dodatkiem samego buforu Tris. Eksperyment został wykonany w trzech niezależnych powtórzeniach.

6.3. Elektroforeza Tricine SDS-PAGE oraz western blot

Amylinę rozpuszczałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I. Następnie inkubowałam ją przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a po tym czasie rozcieńczyłam do stężenia 50 μM i dodałam 200 nM proteasom w 50 mM Tris o pH 7,6 zawierającym 5% glicerolu. Końcowe stężenie enzymu wynosiło 10 nM. Po 5 minutach dodałam także odpowiedni aktywator przygotowany w 10% wodnym roztworze DMSO, tak aby końcowo występował w próbce w stężeniu 1, 10 i 50 μM . Sumaryczne stężenie DMSO w próbkach było stałe i wynosiło 2,6%. Tak przygotowane próbki inkubowałam przez 30 minut w 37°C. Utworzone fragmenty amyliny ustabilizowałam za pomocą sieciowania PICUP z RuBpy. Do otrzymanych próbek dodawałam 4x stężony bufor obciążający z β -merkaptotanołem i denaturowałam przez 10 minut w 75°C. Próbki nanosiłam po 10 μl na dołek na dwa 10% żele tricynowe z mniejszym stężeniem soli, których przygotowanie opisałam w rozdziale 2.9. Po rozdziale elektroforetycznym jeden z żeli wybarwiałam srebrem, a z drugiego wykonywałam western blot, według protokołu opisanego w rozdziale 3.2. Jako przeciwciało I-rzędowe wykorzystałam przeciwciało skierowane na fragment

sekwencji amyliny (T-4157). Eksperyment został wykonany w trzech niezależnych powtórzeniach.

7. Badania wpływu oligomerów amyliny na aktywność proteolityczną h20S

Eksperymenty wykonywałam na proteasomie 20S izolowanym z ludzkich erytrocytów według procedury opisanej w rozdziale 4. Enzym izolowany był z różnych partii krwi, które charakteryzowały się znaczną zmiennością w odniesieniu do zawartości i aktywności proteasomu. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach.

7.1. Badania inhibicji

Inhibicyjny wpływ oligomerów na izolowany h20S weryfikowałam poprzez pomiar przyrostu fluorescencji, pochodzącej z proteolizy substratu fluorogenicznego i uwolnienia jego fluorescencyjnej grupy AMC. Im większa inhibicja proteasomu, tym słabsza degradacja substratu i niższe wartości przyrostów fluorescencji. Do badania trzech różnych typów aktywności katalitycznej h20S wykorzystywałam odpowiednie substraty: Suc-LLVY-AMC do aktywności chymotrypsynopodobnej (ChT-L), Boc-LRR-AMC do trypsynopodobnej (T-L) oraz Z-LLE-AMC do kaspazopodobnej (C-L). Pomiary prowadziłam na czarnej płytce 96-dołkowej z płaskim dnem (Costar). Pomiary wykonywałam w buforze reakcyjnym, który w większości składał się z 50 mM Tris-HCl o pH 8. Objętość końcowa w dołku wynosiła 100 μ l. Ostateczne stężenie proteasomu wynosiło 0,002 mg/ml, a substratu 100 μ M. Oligomery amyliny po odpowiednim czasie inkubacji wirowałam w 10°C przez 5 minut przy prędkości 5 000 rpm, a następnie z zastosowaniem reagenta Pierce BCA (ThermoFisher) wyznaczałam stężenie amyliny obecnej we frakcji rozpuszczalnej. Ostateczne stężenie oligomerów amyliny na płytce wynosiło 0,04-10 μ M. Pomiary wykonywałam na spektrofluorymetrze Infinity M200Pro (Tecan) w godzinnym programie w temperaturze 37°C, podczas którego odczyt fluorescencji następował co 2 minuty. Długość fali wzbudzenia dla grupy AMC wynosiła 380 nm, a emisji 460 nm. Każdy z eksperymentów został wykonany z wykorzystaniem specjalnie opracowanej przez nas wysokowydajnej metody z użyciem pipety wielokanałowej. W znaczący sposób skróciło to czas przygotowania eksperymentu w porównaniu z pojedynczym pipetowaniem, co ma istotne znaczenie dla powtarzalności

otrzymanych rezultatów. Przedstawione wyniki zostały znormalizowane względem aktywności proteasomu 20S z samym substratem fluorogenicznym.

7.1.1. Latentny h20S

Eksperyment rozpoczynałam od nastawienia inkubacji amyliny w celu uzyskania jej oligomerycznych form. Amylinę przygotowałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I. Po danym czasie inkubacji sprawdzałam stężenie frakcji rozpuszczalnej, a następnie przygotowywałam za pomocą buforu fosforanowego odpowiednie rozcieńczenie. W badaniach z natywnym proteasomem 20S na płytkę zawierającą 60 μ l buforu reakcyjnego dodawałam 10 μ l proteasomu w stężeniu 0,02 mg/ml. Następnie nanosiłam po 20 μ l oligomerów amyliny w zakresie stężeń 0,2-50 μ M. Na koniec dodawałam 10 μ l substratu fluorogenicznego (ChT-L/ T-L/ C-L) w stężeniu 1 mM. Po dokładnym zamieszaniu zawartości dołków przystępowałam do pomiarów.

7.1.2. Aktywowany h20S

W badaniach inhibicyjnego wpływu związków na proteasom częstą praktyką jest stosowanie SDS w celu wstępnego aktywowania kompleksu proteolitycznego. Obecność tego surfaktanta w odpowiednio niskim stężeniu znana jest z właściwości destabilizujących α -bramę proteasomu, co ma wpływ na ułatwienie dostępu substratu do komory katalitycznej. W celu przeprowadzenia takiego eksperymentu do buforu reakcyjnego dodałam SDS, tak aby jego końcowe stężenie w dołku wynosiło 0,01%. Schemat przeprowadzania eksperymentu był taki sam jak opisany w podrozdziale 7.1.1., z użyciem substratu ChT-L.

7.1.3. Oligomery amyliny w buforze zawierającym SDS

Obecność SDS ma wpływ nie tylko na aktywność proteasomu, ale także na proces oligomeryzacji amyliny, ponieważ stabilizuje tworzenie się oligomerycznych form α -helikalnych. W przeprowadzonych badaniach zweryfikowałam wpływ tak przygotowanych oligomerów na aktywność proteasomu 20S. W tym celu amylinę rozpuściłam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor II. Po danym czasie inkubacji sprawdzałam stężenie frakcji rozpuszczalnej, a następnie przygotowywałam za pomocą buforu fosforanowego odpowiednie rozcieńczenia. Do natywnego proteasomu 20S w buforze reakcyjnym dodawałam po 20 μ l oligomerów

amyliny w zakresie stężeń 0,2-50 μM , tak aby końcowe stężenie SDS w dołku wynosiło 0,01%. Na koniec nanosiłam substrat fluorogeniczny (ChT-L), roztwór mieszałam i prowadziłam pomiar.

7.2. Kinetyka inhibicji

W celu charakteryzacji inhibicyjnego wpływu oligomerów amyliny na proteasom wyznaczyłam kinetykę inhibicji, zarówno dla natywnej proteazy jak i jej formy aktywowanej za pomocą 0,01% SDS. Eksperyment przeprowadziłam dla amyliny po 2- godzinnej inkubacji, w ostatecznym stężeniu 0,2 μM , 2 μM i 10 μM . Zastosowałam dziesięć stężeń substratu fluorogenicznego Suc-LLVY-AMC. Schemat przeprowadzania eksperymentu był zgodny z opisanym w podrozdziale 7.1.1.

7.3. Inhibicyjny wpływ oligomerów po neutralizacji przeciwciałami A11

100 μM amylinę przygotowałam w sposób standardowy, opisany w podrozdziale 2.1., stosując oba opisane układy buforowe. Po godzinnej inkubacji białka w temperaturze pokojowej dodałam odpowiednio 0,05 μg , 0,1 μg , 0,25 μg przeciwciała A11, rozcieńczonego 50 mM Tris o pH 7,6. Próbkę inkubowałam przez 30 minut w temperaturze 25°C, a następnie rozcieńczyłam 5-krotnie buforem I, opisanym w podrozdziale 2.1. W celu wyznaczenia wpływu oligomerów amyliny po związaniu się z przeciwciałem A11 na aktywność proteolityczną proteasomu 20S przeprowadziłam opisane w podrozdziale 7.1. badania aktywności. Na płytkę nanosiłam 60 μl buforu reakcyjnego, do którego dodawałam 10 μl proteasomu. Następnie do roztworu na płytce przenosiłam po 20 μl mieszaniny oligomerów z przeciwciałem i na koniec dodawałam 10 μl substratu fluorogenicznego Suc-LLVY-AMC. Ostateczne stężenia w dołku wynosiły odpowiednio: amyliny - 2 μM ; proteasomu - 0,002 mg/ml; SDS - 0,001%; A11 – 10 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 0,2 $\mu\text{g/ml}$; substratu - 100 μM .

Równoległe z opisanym powyżej eksperymentem wykonałam dot blot, aby potwierdzić oddziaływanie otrzymanej w tych warunkach amyliny z przeciwciałem A11. Do eksperymentu wykorzystałam membranę Immobilion-E PVDF 0,45 μM (Merck), na którą nanosiłam po 2 μl 100 μM oligomeryzowanej amyliny. Protokół wykonywania dot blot opisałam w rozdziale 3.1. Stężenie przeciwciała A11 wynosiło 0,001 mg/ml.

8. Badania komórkowe

8.1. Przygotowanie lizatów komórkowych (eksperyment przeprowadzony przez mgr Karolinę Trepczyk)

Z ludzkich komórek HEK293-T inkubowanych na płytce 96-dołkowej odciągnięto pożywkę DMEM, a komórki zostały przemyte buforem PBS. Następnie, po usunięciu PBS, dodano do nich po 100 μ l odpowiednio rozcieńzonego buforu lizującego - Reporter Lysis 5x (Promega) - i pozostawiono na 15 minut. Po tym czasie dno i ścianki każdego z dołków intensywnie oskrobano za pomocą końcówki do pipet automatycznych, a następnie przeniesiono otrzymane zawiesiny do jednej eppendorfki. Każdy z dołków przemyto świeżą porcją buforu lizującego i dołączono ten roztwór do zawiesiny. Zawartość eppendorfki została dobrze wymieszana, a następnie zwirowana przez 2 minuty w 4°C przy prędkości 16 000 rpm. Supernatant został podzielony na porcje po 200 μ l i dla każdej z nich zostało zmierzone stężenie białek za pomocą zestawu Pierce BCA (ThermoFisher). Tak przygotowane lizaty przechowywane były w -80°C.

8.2. Inhibycyjny wpływ oligomerów amyliny w lizacie komórek HEK293-T

Amylinę przygotowałam według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I i inkubowałam w temperaturze pokojowej przez godzinę. Następnie próbki poddałam wirowaniu w 10°C przez 5 minut przy prędkości 5 000 rpm, sprawdziłam stężenie frakcji rozpuszczalnej i przygotowywałam za pomocą buforu fosforanowego serię odpowiednich rozcieńczeń do badań. Lizat komórkowy, przygotowany tak jak to opisano w podrozdziale 8.1, rozcieńczyłam 50 mM buforem Tris o pH 8, tak aby dodając na płytkę 60 μ l lizatu otrzymywać w końcowej objętości 100 μ l ostateczne stężenie białek 20 μ g/ml. Następnie na płytkę nanosiłam po 20 μ l oligomerów amyliny odpowiednio w stężeniach 1, 10, 50 μ M. Kolejno do każdego dołka dodawałam 10 μ l 10% DMSO w 50 mM Tris o pH 8. Na koniec dodawałam 10 μ l substratu fluorogenicznego Suc-LLVY-AMC w stężeniu 1 mM. Po dokładnym zamieszaniu zawartości dołków przystępowałam do pomiarów. Wykonywałam je zgodnie z opisem z rozdziału 7.1., wydłużając czas pomiaru do 90 minut. Eksperymenty zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach.

8.3. Znoszenie inhibicyjnego wpływu oligomerów amyliny w lizacie komórek HEK293-T przez aktywatory proteasomu

Amylinę oraz lizat komórkowy przygotowywałam w sposób opisany w podrozdziałach 8.1. i 8.2. Na płytkę nanosiłam po 20 μl oligomerów amyliny w stężeniu 50 μM . Po 5 minutach inkubacji do każdego dołka dodawałam po 10 μl 100 μM aktywatorów przygotowanych w 10% roztworze wodnym DMSO. Na koniec dodawałam 10 μl substratu fluorogenicznego Suc-LLVY-AMC w stężeniu 1 mM. Po dokładnym zamieszaniu zawartości dołków przystępowałam do pomiarów. Wykonywałam je zgodnie z opisem z rozdziału 7.1., wydłużając czas pomiaru do 90 minut. Eksperymenty zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach.

8.4. Cytotoksyczność oligomerów amyliny względem komórek HEK293-T

Oligomery amyliny otrzymywałam poprzez jej rozpuszczanie według procedury opisanej w podrozdziale 2.1., stosując bufor I, a następnie inkubację w temperaturze pokojowej przez 1, 4 i 24 godziny. Następnie sprawdzałam stężenie frakcji rozpuszczalnej i przygotowywałam za pomocą buforu fosforanowego serię rozcieńczeń: 100, 80, 20, 2 μM . Ludzkie komórki HEK293-T w liczbie 7 tysięcy na dołek były inkubowane w pożywce DMEM w 37°C przez 2 dni od momentu ich wysiania. Bezpośrednio przed dodaniem oligomerów amyliny usuwałam pożywkę z każdego z dołków, a następnie dodawałam do każdego dołka po 100 μl amyliny rozcieńczonej w DMEM do stężenia odpowiednio 10, 8, 2 i 0,2 μM . Związki inkubowałam z komórkami przez 2 godziny w 37°C. Następnie po usunięciu roztworu dodawałam po 250 μl na dołek 5 mg/ml bromku metylotiazolilodifenylotetrazoliowego (MTT) w PBS i inkubowałam kolejne 4 godziny w 37°C. Po tym czasie roztwór z dołków usuwałam, a kryształy wytrącone w każdym z dołków rozpuszczałam przez noc w 150 μl DMSO. Płytkę zabezpieczałam przed dostępem światła. Pomiar absorbancji wykonywałam na spektrofotometrycznym Infinity M200 Pro (Tecan) przy dwóch długościach fali λ 570 nm (1) oraz λ 690 nm (2). Eksperyment wykonałam w trzech niezależnych powtórzeniach. Uzyskane wyniki powstały na podstawie obliczenia różnicy między zmierzonymi absorbancjami (2-1), a następnie ich normalizacji względem wyników dla samej pożywki z komórkami.

9. Peptydomimetyczne modulatory oparte na sekwencji naturalnego aktywatora 11S

9.1. Synteza aktywatorów 11S za pomocą automatycznego syntezyzatora mikrofalowego Liberty Blue (CEM)

Wszystkie syntezy prowadzone były w skali 0,1 mmol w atmosferze azotu. Acylowanie wykonywałam według standardowej procedury w 90°C przez 2 minuty przy użyciu 5 eq. Fmoc-aminokwasu, 5 eq. DIC oraz 5 eq. Oxyma w stosunku do masy i stopnia osadzenia żywicy. Dla reszty aminokwasowej Fmoc-Arg(Pbf)-OH acylowanie prowadziłam dwukrotnie. Odszczepienie grupy Fmoc następowało w 20% roztworze piperidyny w DMF w temperaturze 90°C przez 1 minutę. Do wszystkich syntez jako nośnik stały wykorzystywałam żywicę TentaGel R RAM o stopniu osadzenia 0,2 mmol/g.

9.2. Manualne przyłączanie kwasu bromooctowego do *N*-końcowej grupy aminowej

0,25 g peptydydożywicy namoczyłam w DMF. W eppendorfke o objętości 5 ml wymieszałam 2 ml 2 M kwasu bromooctowego z 2 ml 1 M roztworu DIC w DMF. Po delikatnym zmętnieniu mieszaniny dodałam ją do odsączonej peptydydożywicy i wytrząsałam przez 3 godziny. Na koniec żywicę przemyłam 3-krotnie DMF.

9.3. Zdejmowanie osłony Mtt z grup tiolowych

Przygotowałam mieszaninę odszczepiającą osłonę Mtt złożoną z 2% TFA i 5% TIPS, rozpuszczonych w DCM. Do peptydydożywicy dodawałam porcjami wyżej opisaną mieszaninę, aż do uzyskania żółtej barwy, co świadczyło o uwalnianej grupie Mtt. Następnie ziarna żywicy przemywałam tak długo, aż usuwany roztwór był bezbarwny. Wymagało to około 12 powtórzeń. Na koniec żywicę przemyłam 3-krotnie DCM, a także DMF.

9.4. Cyklizacja tioeterowa

Do utworzenia cyklicznej formy peptydu wykorzystywałam mieszaninę złożoną z 1,5 eq. HCTU oraz 2 eq. DIPEA, rozpuszczonych w DMF, w której wytrząsałam peptydydożywicę przez noc. Na zakończenie żywicę przemyłam 3-krotnie DMF oraz metanolem.

9.5. Odszczepianie peptydów z żywicy

Wysuszoną po syntezie peptydydożywicę umieszczałam w odpowiedniej mieszance odszczepiającej (10 ml/ 1g żywicy) na około 2-4,5 godziny. Długość czasu odszczepiania peptydu i skład mieszaniny karbokationów był zależny od sekwencji aminokwasowej. Dla zwiększenia efektywności procesu naczynie reakcyjne umieszczone było na wytrząsarce z ruchem drgającym. Po odszczepieniu peptydu żywicę odsączałam, odparowywałam nadmiar TFA, a surowy produkt strącałam zimnym eterem dietylowym. W kolejnym etapie zawiesinę wirowałam w temperaturze 4°C przez 15 minut przy prędkości 4 000 rpm, a otrzymany supernatant odrzucałam. Procedurę dodawania świeżej porcji zimnego Et₂O i wirowania powtarzałam jeszcze 2-krotnie. Po ostatnim etapie osad osuszałam w celu usunięcia pozostałości eteru, rozpuszczałam w wodzie i pozbywałam się rozpuszczalnika w procesie liofilizacji.

Skład mieszanin odszczepiających:

1. 85% TFA, 2,5% TIPS, 5% H₂O, 5% fenol, 2,5% tioanizol
2. 92,5% TFA, 5% TIPS, 2,5% H₂O

Tabela 13. Sekwencje zsyntezowanych peptydomimetyków oraz warunki otrzymywania ich w postaci surowych produktów.

Nazwa związku	Mieszanina odszczepiająca	Czas odszczepiania [h]	Masa surowego produktu [mg]
11S_5	1	3,5	235
11S_6	1	3,5	271
11S_7	1	4,5	215
11S_9	2	2	124
11S_10	2	2	120

9.6. Cyklizacja CLIPS

W kolbie znajdującej się na mieszadle magnetycznym umieściłam 50 mg nieoczyszczonego, liniowego prekursora peptydu 11S_6 i rozpuściłam go w wodzie

MilliQ do stężenia 0,5 mM. Następnie dodałam 2,5 eq. dibromo-*p*-ksylenu rozpuszczonego w ACN do stężenia 10 mM. Za pomocą papierka wskaźnikowego sprawdziłam pH roztworu, a następnie podniosłam je do wartości ok. 7,5 za pomocą 1 M wodorowęglanu amonu. Reakcję prowadziłam przez 3 godziny, monitorując jej postęp za pomocą HPLC. Przerwanie reakcji przeprowadziłam obniżając pH roztworu do 4 za pomocą 2% wodnego roztworu TFA. Mieszaninę przesączałam przez filtr strzykawkowy 0,45 µm i poddałam oczyszczaniu.

9.7. Oczyszczanie i charakterystyka związków

Otrzymane peptydomimetyki oczyszczane były za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w fazach odwróconych w gradiencie liniowym, przy wykorzystaniu semipreparatywnego chromatografu cieczowego K1001 z detektorem UV K2500 (Knauer) z detekcją przy długości fali λ 223 nm. Do rozdzieleń używane były następujące kolumny:

1. Jupiter Proteo C12, 250 mm x 21,2 mm, 4 µm, 90 Å (Phenomenex)
2. Kinetex C18, 250 mm x 21,2 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex)
3. Kromasil C8, 250 mm x 10 mm, 5 µm, 100 Å (Kromasil)

Do sprawdzenia czystości surowych i oczyszczonych produktów wykorzystany został chromatograf HPLC z detektorem PDA (Shimadzu) z kolumną analityczną Aeris Peptide XB-C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex). Analizy przeprowadziłam w trwającym 15 minut gradiencie liniowym 100% A → 100% B przy stałym przepływie rozpuszczalników 0,5 ml/min. Układ A stanowiła woda z 0,1% dodatkiem TFA, natomiast układem B był 80% ACN zawierający 0,1% TFA. Ponadto związki zostały scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas MALDI TOF Biflex III (Bruker) z matrycą DHB.

Tabela 14. Warunki oczyszczania oraz charakterystyka otrzymanych związków 11S. Oczyszczania poszczególnych związków prowadzone były w układach A i B zawierających jako przeciwjony aniony TFA w stężeniu 0,1% oraz wskazaną w tabeli ilość acetonitrylu.

Nazwa związku	Warunki oczyszczania				Charakterystyka			
	Układ A %ACN	Układ B %ACN	Kolumna	Ilość surowego produktu [mg]	Ilość oczyszczonego produktu [mg]	Czas retencji [min]	M cz. obliczona [Da]	M cz. wyznaczona [Da]
11S_1*	10	40	1	100	23	5,57	3033,610	3037,698
11S_2*	10	35	2	120	27	5,76	3015,654	3016,922
11S_3*	10	30	2	163	21	5,47	3057,659	3058,362
11S_4*	10	35	2	125	24,5	5,82	3026,671	3028,630
11S_5	0	45	2	85	49	6,58	3177,756	3178,027
11S_6	0	50	2	50	7	5,85	3198,651	3198,684
11S_7	0	40	2	65	18	6,01	3084,713	3084,882
11S_8* przed click	15	35	2	100	12	-	-	-
11S_8*	10	40	3	6	1	6,21	3193,715	3195,422
11S_9	0	40	2	124	10,5	5,57	3088,662	3089,501
11S_10	0	60	3	29	5	6,31	3087,652	3088,895

* związki zsyntezowane przez dr Małgorzatę Giżyńską

9.8. Badania wpływu analogów 11S na aktywność proteasomu 20S

Zdolność otrzymanych związków do modulowania aktywności izolowanego h20S weryfikowałam poprzez pomiar przyrostu fluorescencji, pochodzącej z proteolizy substratu fluorogenicznego i uwolnienia jego fluorescencyjnej grupy AMC. Do badania dwóch podstawowych typów aktywności katalitycznej h20S wykorzystałam odpowiednie substraty: Suc-LLVY-AMC do zbadania aktywności chymotrypsynopodobnej oraz Boc-LRR-AMC do aktywności trypsynopodobnej. Pomiary prowadziłam na czarnej płytce 96-dołkowej z płaskim dnem (Costar). Pomiary wykonywałam w buforze reakcyjnym, na który w większości składał się 50 mM Tris o pH 8. Objętość końcowa w dołku wynosiła 100 μ l. Ostateczne stężenie proteasomu w każdym dołku wynosiło 0,002 mg/ml, a substratu 100 μ M. Związki badałam w stężeniach: 1, 2,5, 5, 10, 50 μ M. Pomiary wykonywałam na spektrofluorymetrze Infinity M200Pro (Tecan) w godzinnym programie w temperaturze 37°C, podczas którego odczyt fluorescencji następował co 2 minuty. Długość fali wzbudzenia dla grupy AMC wynosiła 380 nm, a emisji 460 nm. Przedstawione wyniki zostały znormalizowane względem aktywności proteasomu 20S z samym substratem fluorogenicznym.

Summary

Amyloidoses are a group of diseases directly related to abnormalities in the metabolism of misfolded proteins, often resulting from defects in degradative machinery. Proteolytic systems controlling protein homeostasis include the 20S proteasome. In the physiological state, it is an important component of the proteasome pool, and under conditions of oxidative stress, when it is additionally released by dissociation of the 26S complex, it is the main proteolytic form that has to deal with the increasing amount of damaged proteins showing aggregation tendencies. Unfortunately, under these conditions, the activity of the 20S proteasome is usually inhibited. For many years it was thought that fibrillar forms of proteins were responsible for the observed inhibition. The current approach assumes that soluble oligomers, which precede fibrillar deposits in the aggregation pathway, are the most toxic to cells. Their causal role in proteasome inhibition has been discovered in the case of Alzheimer's disease-associated A β peptide, Parkinson's disease-associated α -synuclein, and mutant huntingtin, whose deposits have been found in Huntington's disease patients. Blocked by soluble oligomers, the proteasomal system loses its biological activity, resulting in the accumulation of cytotoxic oligomers and their subsequent transformation into protofibrils, fibrils and then amyloid fibrils. According to research by Smith's group [1], A β 1-42 oligomers inhibit the activity of the 20S proteasome in an allosteric manner. These researchers also showed that short peptides encompassing the C-terminal motif of HbYX, characteristic of natural protein activators, can stimulate the A β oligomer-inhibited 20S proteasome.

Because amyloid deposits have been observed in most diabetic patients, type 2 diabetes has begun to be considered in the context of amyloidosis. The hallmark of amyloidosis is the accumulation of cytotoxic aggregates, which in the case of type 2 diabetes are deposited mainly in the pancreas, and consist of amylin molecules, also known as IAPP. IAPP is a 37-residue peptide with stronger aggregation propensity than A β . In addition to sharing amyloidogenic properties, the two peptides share biochemical characteristics, suggesting also a common pathogenic mechanism. For the A β peptide, it is already known that the 20S proteasome is involved in this mechanism.

Therefore, the main goal of this dissertation was to characterize the oligomerization process of human amylin and investigate whether the accumulation of its oligomeric forms can be prevented by activating a proteolytic system based on the 20S proteasome.

To achieve my goals, I needed significant amounts of human amylin, so in the first step I synthesized this protein and then optimized the approach to study its oligomerization. To characterize the oligomeric forms, I applied both native and denaturing conditions, stabilizing the resulting oligomers using chemical crosslinking and photocrosslinking. In the next step, I examined the strength of interaction of fractions containing soluble amylin oligomers with the 20S proteasome isolated from human blood. The determined EC50 values, indicating a strong interaction between these molecules, were the starting point for trying to determine the site of their interaction. To this end, I also synthesized amylin variants with a photocrosslinking residue or fluorophores. To determine the binding site of the oligomers to the proteasome, I used two independent techniques: mass spectrometry and electron cryomicroscopy. Referring to the results presented by Smith's group, I also set out to verify the effect of amylin oligomers on the proteolytic activity of the 20S proteasome. To this end, I conducted a series of experiments using commercially available fluorogenic substrates, confirming the inhibitory effect of the oligomers on h20S, as well as determining the kinetics of inhibition. I also performed tests with the A11 antibody. The results obtained by Smith's group [1] indicate that fractions of oligomers interacting with the A11 antibody are responsible for the inhibitory effect on 20S proteasome activity. Similar experiments conducted for amylin proved that, unlike the A β oligomers, interaction of the amylin oligomers with the antibody does not block their ability to inhibit h20S. Using peptidomimetics from our pool of top activators, I proved that it is possible to overcome h20S inhibition by oligomers. I carried out the above study not only on isolated 20S proteasome, but also on lysate of human HEK293-T cells. In addition, I verified the cytotoxicity of fractions containing low molecular weight amylin oligomers against the above cell line. In the next step, I demonstrated that low-molecular-weight amylin oligomers can be a substrate for the 20S proteasome, and that the activating compounds we possess are able to stimulate their proteolysis. The results of the presented studies shed new light on the mechanisms that may contribute to the development of type 2 diabetes. Considering this disease entity in the context of amyloidosis makes it appropriate to include methods of preventing protein aggregation

in its therapy. The efficacy of peptidomimetic activators based on a fragment of the BIm10 protein, which I have demonstrated, may provide a good basis for the development of new therapies for the treatment of amyloidosis associated with type 2 diabetes, and thus reduce the negative consequences of this disease.

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 złoża na szlaku agregacji. Ich przyczynową rolę w hamowaniu proteasomu odkryto w przypadku peptydu A β związanego z chorobą Alzheimera, α -synukleiny związanej z chorobą Parkinsona oraz zmutowanej huntingtyny, której złoża stwierdzono u osób cierpiących na chorobę Huntingtona. Zablokowany 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 złoża 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 patogenny. 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 z badałam 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 przyczyniać 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.

Wykaz dorobku naukowego

Artykuły naukowe

1. M. Szadkowska, A. Kocot, D. Sowik, D. Wyrzykowski, E. Jankowska, Ł.P. Kozłowski, J. Makowska, M. Płotka, „Molecular characterization of the PhiKo endolysin from *Thermus thermophilus* HB27 bacteriophage phiKo and its cryptic lytic peptide RAP-29”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, 1-16, **2024**
2. K. Cekała, K. Trepczyk, D. Sowik, P. Karpowicz, A. Giełdoń, J. Witkowska, M. Giżyńska, E. Jankowska, E. Wieczerek, „Peptidomimetics based on C-terminus of Blm10 stimulate human 20S proteasome activity and promote degradation of proteins”, *Biomolecules*, vol. 12, 6, 1-13, **2022**

Konferencje naukowe

1. **Uczestnik:** D. Sowik, M. Giżyńska, K. Trepczyk, E. Wieczerek, E. Jankowska, „Amylina – nieznana strona cukrzycy typu II”, *V Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne*, online, **2023 - referat wygłoszony**
2. **Uczestnik:** D. Sowik, M. Giżyńska, K. Trepczyk, E. Wieczerek, E. Jankowska, „Stimulation of the proteolytic activity of the 20S proteasome in type II diabetes”, *BioClima*, Rzym, **2023 – poster**
3. **Uczestnik:** D. Sowik, M. Giżyńska, K. Trepczyk, E. Wieczerek, E. Jankowska, „Stabilization of oligomeric forms of amylin”, *European Peptide Synthesis Conference*, Leeds, **2023 – poster**
4. **Uczestnik:** D. Sowik, M. Giżyńska, K. Trepczyk, E. Wieczerek, E. Jankowska, „Characterization of the oligomeric forms of human amylin”, *IUBMB-FEBS-PABMB 2022 Congress*, Lizbona, **2022 – poster**
5. **Uczestnik:** D. Sowik, M. Giżyńska, K. Trepczyk, E. Jarzab, E. Wieczerek, E. Jankowska, „Zdolność proteasomu do degradacji małych oligomerów ludzkiej amyliny”, *IV Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko"*, Gdańsk, **2022 – poster**
6. **Uczestnik:** D. Sowik, M. Giżyńska, K. Trepczyk, E. Wieczerek, E. Jankowska, „Is the proteasome able to degrade small oligomers of human amylin?”, *Cystatins 2022*, Gdańsk, **2022 – poster**

7. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, E. Wieczerzak, E. Jankowska, „Human 20S proteasome activators in the fight against neurodegenerative diseases”, *Natural Science Baltic Conference*, online, **2024**
8. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, M. Giżyńska, E. Wieczerzak, E. Jankowska, „Aktywatory ludzkiego proteasomu 20S w walce z chorobami neurodegeneracyjnymi”, *V Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne*, online, **2023**
9. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, M. Giżyńska, E. Wieczerzak, E. Jankowska, „Peptidomimetic activators of the 20S proteasome, capable of penetrating cell membranes and crossing the blood-brain barrier”, *BioClima*, Rzym, **2023**
10. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, M. Giżyńska, E. Jankowska, „The effect of modulator sequence modifications on the ability to activate proteasome 20S and stability in human plasma”, *European Peptide Synthesis Conference*, Leeds, **2023**
11. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, E. Wieczerzak, E. Jankowska, „Peptidomimetics based on a fragment of Blm10 protein as allosteric modulators of proteasome activity”, *IUBMB-FEBS-PABMB 2022 Congress*, Lizbona, **2022**
12. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, M. Giżyńska, E. Jankowska, „Wpływ modulatorów na proteasom inhibowany przez toksyczne oligomery białkowe”, *IV Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko"*, Gdańsk, **2022**
13. **Współautor:** K. Trepczyk, D. Sowik, M. Giżyńska, E. Jankowska, „Can proteasome stimulation counteract the toxic effects of protein oligomers?”, *Cystatins 2022*, Gdańsk, **2022**

Udział w projektach naukowych

1. OPUS 17 – „Zapobieganie akumulacji cytotoksycznych oligomerów, które są przyczyną rozwoju chorób neurodegeneracyjnych i cukrzycy typu 2, poprzez aktywację związanego z proteasomem 20S systemu proteolitycznego”, *Narodowe Centrum Nauki*, 10.2020 – 09.2024 – **wykonawca**
2. Badania Młodych Naukowców – „Zastosowanie mikroskopii krioelektronowej w identyfikacji struktury przestrzennej kompleksu oligomerów amyliny z proteasomem 20S”, *Uniwersytet Gdański*, 03.2024 – 01.2025 – **kierownik**
3. Badania Młodych Naukowców – „Badania za pomocą termoforezy mikroskalowej siły oddziaływania ludzkiego proteasomu 20S ze związkami modulującymi jego aktywność”, *Uniwersytet Gdański*, 03.2023 – 01.2024 - **kierownik**
4. Badania Młodych Naukowców – „Synteza puli odczynników sieciujących selektywnych względem arginin”, *Uniwersytet Gdański*, 03.2022 – 01.2023 - **kierownik**

VI Przypisy

1. Spis rysunków

Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie systemu kontroli proteolitycznej w organizmie ludzkim.	20
Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie procesów komórkowych, w które zaangażowany jest proteasom 20S. Opracowanie własne na podstawie [22].	23
Rysunek 3. Struktura krystaliczna konstytucyjnego ludzkiego proteasomu 20S (PDB: 4R3O), A. widok z boku, B. rzut z góry. Na obrazie B wyraźnie widoczna jest α brama h20S zamknięta przez przeplatające się N-końce podjednostek α.	25
Rysunek 4. Struktury kompleksów proteasomu 20S z naturalnymi aktywatorami jego zdolności proteolitycznych [44].	26
Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie kaskady przemian, towarzyszących degradacji proteasomalnej na szlaku ubikwitynozależnym. Opracowanie własne na podstawie [69].	30
Rysunek 6. Struktury możliwych kompleksów proteasomu 20S z jego modulatorami [44].	31
Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie dwóch szlaków przemian białka APP, prowadzących do powstania produktów nieamyloidogennych (szlak po lewej stronie schematu) oraz amyloidogennych z uwolnieniem peptydów Aβ (szlak po prawej stronie schematu).	33
Rysunek 8. Sekwencja peptydu Aβ42 (A) oraz jego struktura przestrzenna (B) wyznaczona techniką NMR (PDB: 1IYT).	34
Rysunek 9. Schematy przedstawiające zaburzenia występujące w cukrzycy typu 1 (B) oraz cukrzycy typu 2 (C) względem prawidłowo funkcjonującego organizmu (A). Opracowanie własne na podstawie [95].	36
Rysunek 10. Światowe statystyki dotyczące cukrzycy oraz prognozy rozwoju tej jednostki chorobowej na przestrzeni najbliższych lat, przedstawione przez Międzynarodową Federację Diabetologiczną.	37
Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie połączenia łańcucha A i B insuliny (A), a także ich struktury krystaliczne (PDB: 3I40) (B).	40
Rysunek 12. Schematyczne przedstawienie budowy receptora kalcytoniny, a także receptorów amylinowych utworzonych przez związanie się z nim poszczególnych białek RAMP [133].	42

Rysunek 13. Schemat szlaku przemian preproamyliny, prowadzący do utworzenia amyliny. Opracowanie własne na podstawie [141].	43
Rysunek 14. Schematyczne przedstawienie cytotoksycznego wpływu amyliny. Wieloorganellowe uszkodzenia błon komórkowych struktur takich jak aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne czy mitochondrium (B) prowadzi do wzrostu stresu oksydacyjnego poprzez indukcję tworzenia się reaktywnych form tlenu (ROS). To z kolei wpływa na aktywność degradacyjną proteasomów (A), prowadząc do dysocjacji kompleksów 26S, co uniemożliwia proteolizę białek ubikwitynowanych. Ponadto ROS przyczyniają się do hamowania aktywności proteasomu 20S. Formy oligomeryczne uszkadzają także granulocyty (C) i zewnętrzną błonę komórkową, co wpływa na zaburzenie równowagi jonowej. W obrębie uszkodzonej komórki za usuwanie agregatów amyloidowych odpowiedzialne są struktury utworzone przez połączenie autofagosomu z lizosomem (D). Ze względu na upośledzenie w ich tworzeniu w przebiegu cukrzycy obserwuje się zaburzenia w tym szlaku. Opracowanie własne na podstawie [79].	50
Rysunek 15. Przedstawienie poszczególnych form oligomerycznych z ich podziałem na frakcje rozpuszczalną i nierozpuszczalną [197].	51
Rysunek 16. Podobieństwa między sekwencjami aminokwasowymi amyliny oraz peptydu Aβ 1-42. Na pomarańczowo zaznaczyłam najkrótsze sekwencje o najwyższej homologii, na granatowo reszty aminokwasowe biorące udział w samoasocjacji peptydów, a na zielono powtarzające się w tych samych regionach aminokwasu [207].	52
Rysunek 17. Preparaty immunohistochemiczne pacjenta chorego na chorobę Alzheimera, bez diagnozy cukrzycy, przedstawiające złogi amylinowe (A), białka Tau (B) i peptydu Aβ42 w obrębie komórek β trzustki (pasek skali dla preparatu A i B - 50 μm, C - 20 μm) [211].	53
Rysunek 18. Wpływ stężenia amyliny na postęp oligomeryzacji, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl (20 mM NaPi). Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.....	61
Rysunek 19. Wpływ rodzaju buforu do inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO,	

a następnie rozcieńczona odpowiednim 20 mM buforem o pH 7,4 zawierającym 140 mM NaCl. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń..... 62

Rysunek 20. Wpływ pH buforu do inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 63

Rysunek 21. Wpływ stężenia soli NaCl w buforze inkubacyjnym na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 64

Rysunek 22. Wpływ wytrząsania próbki na postęp oligomeryzacji, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 65

Rysunek 23. Wpływ temperatury inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 66

Rysunek 24. Wpływ zmiany temperatury inkubacji na postęp oligomeryzacji amyliny, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Próbką została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, rozcieńczona w 20 mM NaPi tak, aby końcowe stężenie DMSO wynosiło 2%, a następnie inkubowana, początkowo w temperaturze 4°C, a po upływie 32 godzin od jej rozpuszczenia inkubację przeniesiono do temperatury pokojowej..... 67

Rysunek 25. Wpływ stężenia amyBpa na postęp oligomeryzacji, badany poprzez pomiar intensywności fluorescencji pochodzącej od Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w DMSO, a następnie

rozcieńczona w 20 mM NaPi. Końcowe stężenie DMSO w każdej z próbek wynosiło 2%. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.	68
Rysunek 26. Widma CD amyliny (A-B) oraz jej wariantów (C-F), zarejestrowane dla próbek inkubowanych w 20 mM NaPi, a także w tym buforze ale wzbogaconym o 0,05% SDS (próbki oznaczone symbolem „+”). Dla każdej z danych zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).	70
Rysunek 27. Widma CD amyliny zarejestrowane po 1, 4 i 24 godzinach inkubacji A. w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, B. w takim samym buforze ale wzbogaconym o 0,05% SDS (próbki oznaczone symbolem „+”). Dla każdej z danych zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).	71
Rysunek 28. Zdjęcie stosowanej płytki pomiarowej kompatybilnej z aparatem Stunner (Unchained Labs) z przybliżeniem na wygląd komory pomiarowej.	73
Rysunek 29. Przykładowe wyniki z przeprowadzonych dla amyliny eksperymentów na aparacie Stunner (Unchained Labs). Próbką amyliny przygotowana została przez 2-godziną inkubację w stężeniu 0,39 mg/ml w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO. Po tym czasie roztwór został przeniesiony w dwóch powtórzeniach do komór pomiarowych poprzez odwrotne pipetowanie. W przypadku powtórzenia A uzyskałam PDI na poziomie 0,05 przy jednoczesnym oznaczeniu stężenia 0,22 mg/ml. W powtórzeniu B wartość PDI wyniosła 0,4, a stężenie również 0,22 mg/ml. Wyniki te nie są wiarygodne ze względu na brak prawidłowego wykresu dla funkcji korelacji, co oznacza że zarówno wykres intensywności dystrybucji, a także dystrybucji mas nie jest prawidłowy.	74
Rysunek 30. Wynik przeprowadzonej w warunkach natywnych elektroforezy próbek amyliny oraz jej wariantów po ich inkubacji (0, 2, 4 godziny) w 20 mM buforze NaPi zawierającym 2% DMSO. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.	75
Rysunek 31. Chromatogramy z analizy SEC przeprowadzonej na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 (Cytiva) w 40 mM buforze cytrynianowym o pH 4,6. Analizowana próbka amyliny została przygotowana przez jej rozpuszczenie w 2,5% kwasie octowym do stężenia 5 mM, następnie inkubowana w łaźni ultradźwiękowej przez 20 s i rozcieńczona do stężenia 100 μ M przy użyciu buforu do analizy (A) lub 20 mM NaPi (B). Wyznaczona masa cząsteczkowa została obliczona na podstawie nakładających się sygnałów pochodzących od detektora RI (kolor czerwony), a także od detektora RALS (kolor zielony).	78

Rysunek 32. Nałożone chromatogramy z analiz SEC przeprowadzonych na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 (Cytiva) w 40 mM buforze cytrynianowym o pH 4,6. Analizowane próbki amyliny zostały przygotowane przez jej rozpuszczenie w 2,5% kwasie octowym do stężenia 5 mM, inkubację w łaźni ultradźwiękowej przez 20 s i rozcieńczenie do stężenia 100 μ M przy użyciu buforu do analizy. Rozdziałowi zostały poddane: próbka bezpośrednio po rozpuszczeniu (chromatogram czerwony), po 2-godzinnej inkubacji w Tpok. i sieciowaniu bądź PICUP (chromatogram fioletowy), bądź glutaraldehydem (chromatogram zielony). Przedstawione sygnały pochodzą od detektora RALS. 79

Rysunek 33. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (2, 4, 5, 8, 24, 96 godzin) w 20 mM buforach o pH 7,4 (F – bufor fosforanowy; H - HEPES; T - Tris) zawierających 140 mM NaCl oraz 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconych o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem..... 82

Rysunek 34. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (2, 4, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Próbką oznaczona symbolem „NS” pozbawiona jest sieciowania. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 83

Rysunek 35. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (0, 2, 8, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie PICUP (R) lub glutaraldehydem (G). Sieciowanie fotochemiczne prowadziłam z wykorzystaniem RuBpy. Zastosowałam dwa warianty tego sieciowania, różniące się stosunkiem APS względem RuBpy (R1 - 200 μ M RuBpy i 200 μ M APS; R2 - 200 μ M RuBpy i 4 mM APS). Próbki oznaczone symbolem „z” bezpośrednio przed wykonywaniem elektroforezy zostały zdenaturowane przez 10 minut w temperaturze 75°C..... 84

Rysunek 36. Elektroforegramy z rozdziału oligomerów amyNBD otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (2, 4, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2%

DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Próbką oznaczona symbolem „NS” pozbawiona jest sieciowania. Wizualizacji prążków dokonałam dwoma metodami: poprzez wzbudzenie fluoroforu na żelu falą o długości 488 nm i obserwację emisji przy 590 nm (A), a także poprzez barwienie srebrem (B)..... 85

Rysunek 37. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyFITC otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (0, 2, 4, 24 godziny) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Wizualizacji prążków dokonałam przez barwienie srebrem..... 86

Rysunek 38. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyBpa otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (20, 50, 100 minut) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO. Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie za pomocą RuBpy (R), glutaraldehydu (G) lub naświetlania reszty Bpa (hv). Próbki oznaczone symbolem „NS” pozbawione są sieciowania. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. .. 87

Rysunek 39. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyBpa otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (20, 50, 100 minut) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i 0,05% SDS. Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie za pomocą RuBpy (R), glutaraldehydu (G) lub naświetlania reszty Bpa (hv). Próbki oznaczone symbolem „NS” pozbawione są sieciowania. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 87

Rysunek 40. Elektroforegram z rozdziału oligomerów amyBpa otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (20, 50, 100 minut) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Rozdział przeprowadzono w warunkach denaturujących po wcześniejszym sieciowaniu próbek przez naświetlanie w insertach (hv) przez 30 lub 60 minut. Próbki oznaczone symbolem „E” naświetlane były od góry w otwartej eppendorfcie..... 88

Rysunek 41. Elektroforegram z rozdziału wyeluowanych z żelu oligomerów amyliny otrzymanych po 20 godzinach jej inkubacji w 20 mM NaPi zawierającym 2%

DMSO i 0,05% SDS. Rozdział został przeprowadzony w warunkach denaturujących po wcześniejszym ustabilizowaniu próbek przez sieciowanie glutaraldehydem. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 89

Rysunek 42. Wykresy zmian fluorescencji proteasomu (targetu) w zależności od stężeń liganda. Pomiary wykonałam dla amyliny (po 2 lub 24 godzinach inkubacji) oraz jej wariantu amyBpa (po 2 godzinach inkubacji) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w próbce po 2h inkubacji IAPP dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczony symbolem „+”). Dla każdej z uzyskanych wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Wykresy powstały w oparciu o pomiar modułem spectral shift na aparacie Monolith X (NanoTemper), a następnie dopasowaniu krzywych według modelu Hill1 (Origin). 91

Rysunek 43. Membrana western blot (A) oraz elektroforegram wybarwiony srebrem (B) z sieciowania oligomeryzowanej amyliny do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem odczynnika DSSO. Stężenia odczynnika sieciującego podane są u góry membrany/żelu. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „2h” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez 2h w warunkach oligomeryzacyjnych. W ramce zaznaczonej na membranie (A) widoczne są pojawiające się prążki od kompleksu proteasomu z oligomerami amyliny. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 94

Rysunek 44. Wzór strukturalny reszty fotosieciującej Bpa i jej monoizotopowa masa cząsteczkowa po zajściu reakcji sieciowania z inną cząsteczką białkową. 95

Rysunek 45. Membrana western blot (A) oraz elektroforegram wybarwiony srebrem (B) z sieciowania oligomeryzowanej amyBpa do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem naświetlania reszty Bpa długością fali 365 nm. Czas naświetlania przedstawiony jest u góry membrany/żelu. Sprawdziłam różne aparaty do naświetlania, stąd A oznacza lampę UV, B latarkę, a C diodę. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „20” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez 20 minut w warunkach oligomeryzacyjnych. Ramka zaznaczona na membranie (A) odpowiada położeniu kompleksu proteasomu z oligomerami amyliny. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 96

Rysunek 46. Elektroforegramy (A - wizualizacja przez filtr; B - barwienie srebrem) z sieciowania oligomeryzowanej amyNBD do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem odczynnika DSSO. Stężenia odczynnika sieciującego opisane są u góry żeli. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „2h”

oznacza obecność amyNBD inkubowanej przez 2 godziny w warunkach oligomeryzacyjnych..... 97

Rysunek 47. Elektroforegram wybarwiony srebrem z sieciowania amyNBD do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem glutaraldehydu lub RuBpy. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „A” oznacza obecność amyNBD inkubowanej odpowiednio przez 2 lub 4 godziny w warunkach oligomeryzacyjnych, a „NS” wskazuje na brak sieciowania..... 98

Rysunek 48. Elektroforegramy (A - wizualizacja przez filtr; B - barwienie srebrem) z sieciowania amyFITC do ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem odczynnika DSSO. Stężenia odczynnika sieciującego opisane są u góry żeli. Oznaczenie symbolem „P” informuje o obecności proteasomu w próbce, „2h” oznacza obecność amyFITC inkubowanej przez 2h w warunkach oligomeryzacyjnych.. 98

Rysunek 49. Zarejestrowane mikrografy z badań wstępnych dla amyBpa usieciowanej do proteasomu 20S przez naświetlanie reszty Bpa. A - próbka zawierająca bortezomib; B - próbka bez bortezomibu. Zdjęcia wykonano na mikroskopie Glacios Crio-TEM w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie..... 102

Rysunek 50. Wykresy przedstawiające wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 2 godzinach inkubacji na wszystkie trzy aktywności latentnego proteasomu 20S (A - aktywność chymotrypsynopodobna; B - trypsynopodobna; C - kaspazopodobna). Dodatkowo wyznaczyłam hamujący wpływ oligomerów amyliny utworzonych po 1 oraz 24 godzinach inkubacji na aktywność ChT-L proteasomu (A). Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Dla otrzymanych wyników przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z następującym po niej porównaniem wielokrotnym wykonanym metodą Tukey’a (Tukey test) i potwierdziłam istotność statystyczną zaobserwowanych różnic między kontrolą a wynikami otrzymanymi dla każdej z próbek (ns- nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)..... 104

Rysunek 51. Wykres przedstawiający wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach inkubacji (1, 2, 24h) na aktywność chymotrypsynopodobną aktywowanego roztworem SDS proteasomu 20S. Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Dla otrzymanych wyników przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z następującym po niej porównaniem wielokrotnym wykonanym metodą Tukey’a (Tukey test) i potwierdziłam istotność

statystyczną zaobserwowanych różnic między kontrolą a wynikami otrzymanymi dla każdej z próbek (ns- nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).	105
Rysunek 52. Wykres przedstawiający wpływ na aktywność ChT-L latentnego proteasomu 20S oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach inkubacji (1, 2, 24h) w buforze z dodatkiem SDS . Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM). Dla otrzymanych wyników przeprowadziłam jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z następującym po niej porównaniem wielokrotnym wykonanym metodą Tukey'a (Tukey test) i potwierdziłam istotność statystyczną zaobserwowanych różnic między kontrolą a wynikami uzyskanymi dla każdej z próbek (***) $p < 0,001$).	106
Rysunek 53. Wyznaczona kinetyka inhibicji oligomerów amyliny wobec aktywności chymotrypsynopodobnej latentnego proteasomu 20S. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).....	107
Rysunek 54. Wyznaczona kinetyka inhibicji oligomerów amyliny wobec aktywności chymotrypsynopodobnej aktywowanego roztworem SDS proteasomu 20S. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM).....	107
Rysunek 55. Schematyczne przedstawienie struktur zsyntezowanych peptydomimetyków. Reszta aminokwasowa oznaczona Aib symbolizuje kwas 2-aminoizomasłowy, a Nle norleucynę.	110
Rysunek 56. Wpływ modulatorów z puli 11S na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S. Peptyd Blm46 jest kontrolą pozytywną w przeprowadzonych eksperymentach.	111
Rysunek 57. Wpływ modulatorów z puli 11S na aktywność trypsynopodobną proteasomu 20S. Peptyd Blm33 jest kontrolą pozytywną w przeprowadzonych eksperymentach. Dla każdej z wartości zaznaczyłam błąd standardowy średniej (SEM).	112
Rysunek 58. Wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po godzinie inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w obecności modulatorów z puli Blm oraz BisBlm. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).	113
Rysunek 59. Wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 2 godzinach inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w obecności modulatorów	

z puli Blm oraz BisBlm. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). 114

Rysunek 60. Wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 24 godzinach inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w obecności modulatorów z puli Blm oraz BisBlm. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). 114

Rysunek 61. Membrana western blot z przeciwciałem A11 (A) oraz elektroforegram (B) amyliny po różnych czasach inkubacji (2, 7, 24h) w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, w części próbek dodatkowo wzbogaconym o 0,05% SDS (oznaczone symbolem „+”). Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń. 117

Rysunek 62. Wpływ oligomerów amyliny na aktywność chymotrypsynopodobną ludzkiego proteasomu 20S. Amylina inkubowana była przez godzinę w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, następnie poddana inkubacji z przeciwciałem A11 w różnych jego ilościach (A - 0,05 μg ; B - 0,1 μg ; C - 0,25 μg), a na koniec do tak przygotowanej próbki dodano proteasom 20S. Na rysunku D zawarłam membranę po przeprowadzonym eksperymencie dot blot, w którym stężenie przeciwciała wynosiło 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 118

Rysunek 63. Wpływ oligomerów amyliny na aktywność chymotrypsynopodobną ludzkiego proteasomu 20S. Amylina inkubowana była przez godzinę w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i 0,05% SDS, następnie poddana inkubacji z przeciwciałem A11 w różnych jego ilościach (A - 0,05 μg ; B - 0,1 μg ; C - 0,25 μg), a na koniec do tak przygotowanej próbki dodano proteasom 20S. Na rysunku D zawarłam membranę po przeprowadzonym eksperymencie dot blot, w którym stężenie przeciwciała wynosiło 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie

jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).....	119
Rysunek 64. Wpływ obecności proteasomu na postęp oligomeryzacji amyliny, obserwowany poprzez przyrost fluorescencji Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie po danym czasie inkubacji w Tpok. (A - 2h; B - 4h; C - 6h; D - 24h) został dodany do niej proteasom i dalsza inkubacja przebiegała w 37°C. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.....	121
Rysunek 65. Wpływ obecności proteasomu na postęp oligomeryzacji amyliny, obserwowany poprzez przyrost fluorescencji Tioflawiny T. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie po danym czasie inkubacji w 37°C (A - 2h; B - 4h; C - 6h; D - 24h) został dodany do niej proteasom. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.	122
Rysunek 66. Chromatogramy z analiz HPLC przedstawiające zdolność proteasomu do degradacji amyliny. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie poddana 6-godzinnej inkubacji w Tpok. (A). Po tym czasie został dodany do niej proteasom i dalsza inkubacja przebiegała w 37°C przez 1h (B) oraz 24h (C). Czarny chromatogram przedstawia próbkę amyliny pozbawioną proteasomu, natomiast kolorem magenta oznaczyłam próbkę amyliny poddaną działaniu h20S. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.	124
Rysunek 67. Chromatogramy z analiz HPLC przedstawiające zdolność proteasomu do degradacji amyliny. Każda z próbek została przygotowana według standardowego protokołu w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO, a następnie poddana 3-godzinnej inkubacji w 37°C (A). Po tym, czasie został dodany do niej proteasom i dalsza inkubacja przebiegała również w 37°C przez 1h (B) oraz 24h (C). Czarny chromatogram przedstawia próbkę amyliny pozbawioną proteasomu, natomiast kolorem magenta oznaczyłam próbkę amyliny poddaną działaniu h20S. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń.	125
Rysunek 68. Elektroforegramy przedstawiające zdolność proteasomu do trawienia oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji w Tpok. (2, 4, 6, 24 godziny). Ścieżki oznaczone symbolem „P” informują o obecności proteasomu w próbce natomiast „2h”, „4h”, „6h” i „24h” oznacza obecność amyliny inkubowanej	

przez wskazany czas w warunkach oligomeryzacyjnych. Na żelu oznaczonym A przedstawione są próbki niesieciowane, natomiast na żelu B wszystkie zostały ustabilizowane przez sieciowanie PICUP za pomocą RuBpy i zdenaturowane bezpośrednio przed elektroforezą w temperaturze 75°C przez 10 minut. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń..... 126

Rysunek 69. Elektroforegram przedstawiający zdolność proteasomu pod nieobecność i w obecności aktywatorów A1 i Bis1 do trawienia oligomerów amyliny otrzymanych po godzinnej inkubacji. Stężenia aktywatorów opisane są na górze żelu. Ścieżki oznaczone symbolem „P” informują o obecności proteasomu w próbce, natomiast „1h” oznacza obecność amyliny inkubowanej przez 1h w warunkach oligomeryzacyjnych. Wszystkie próbki zostały ustabilizowane przez sieciowanie PICUP za pomocą RuBpy i zdenaturowane bezpośrednio przed elektroforezą w temperaturze 75°C przez 10 minut. Przedstawione wyniki reprezentują jedno z wykonanych powtórzeń..... 127

Rysunek 70. Wykres przedstawiający wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 1 godzinie inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu w lizacie komórek HEK 293-T. Obecność znanego inhibitora aktywności ChT-L proteasomu (bortezomibu) stanowi dodatkową kontrolę. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey’a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)..... 128

Rysunek 71. Wykres przedstawiający wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po 1 godzinie inkubacji na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu w lizacie komórek HEK293-T, pod nieobecność i w obecności modulatorów A1 i Bis1. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey’a (ns - nieistotny statystycznie; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)..... 129

Rysunek 72. Wykres przedstawiający cytotoksyczny wpływ oligomerów amyliny otrzymanych po różnych czasach jej inkubacji (1, 4, 24h) na żywotność komórek HEK293-T. Każda z próbek amyliny inkubowana była przez 2h z komórkami, a następnie wykonywano test MTT. „Blank amy” oznacza bufor, w którym prowadzona była oligomeryzacja białka. Dla każdego z wyników zaznaczyłam wartość błędu standardowego średniej (SEM) oraz istotność statystyczną wyznaczoną na podstawie

jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc Tukey'a (ns - nieistotny statystycznie; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)..... 130

2. Spis tabel

Tabela 1. Wyznaczone za pomocą MST wartości EC50 dla oddziaływania proteasomu 20S z oligomerami amyliny otrzymanymi po 2- lub 24-godzinnej inkubacji w 20 mM NaPi zawierającym 2% DMSO i wzbogaconym (+) lub nie o 0,05% SDS. 92

Tabela 2. Analiza wyników MS z sieciowania amyBpa do h20S za pomocą programu MeroX. Kolorem żółtym zaznaczyłam reszty aminokwasowe, przez które z tym samym prawdopodobieństwem może zachodzić sieciowanie..... 100

Tabela 3. Ilości otrzymanych surowych produktów z przeprowadzonych syntez amyliny i jej wariantów. 138

Tabela 4. Warunki oczyszczania oraz charakterystyka związków otrzymanych po oczyszczeniu 50 mg surowego produktu..... 139

3. Bibliografia

- [1] T. A. Thibaudeau et al., ‘A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers’, *Nature Communications*, 9 (2018) 1–14
- [2] C. Ferreon et al., ‘Intrinsically Disordered Proteins: An Overview’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (2022) 14050
- [3] P. Tsvetkov et al., ‘Operational definition of intrinsically unstructured protein sequences based on susceptibility to the 20S proteasome’, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70 (2008) 1357–1366
- [4] K. Tanaka et al., ‘The proteasome: Overview of structure and functions’, *Proceedings of the Japan Academy*, 85 (2009) 12–36
- [5] I. Dikic et al., ‘Proteasomal and Autophagic Degradation Systems’, *Annu Rev Biochem*, 86 (2017) 193–224
- [6] A. Ciechanover et al., ‘Proteolysis: From the lysosome to ubiquitin and the proteasome’, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2005) 79–86
- [7] W. A. Dunn et al., ‘Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation’, *Trends Cell Biol*, 4 (1994) 139–143
- [8] A. Van Der Vaart et al., ‘A Picky Eater: Exploring the Mechanisms of Selective Autophagy in Human Pathologies’, *Traffic*, 9 (2008) 281–289
- [9] S. J. Marciniak et al., ‘Endoplasmic reticulum stress signaling in disease’, *Physiol Rev*, 86 (2006) 1133–1149
- [10] Y. T. Kwon et al., ‘The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy’, *Trends Biochem Sci*, 42 (2017) 873–886
- [11] A. J. Rivett et al., ‘Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells’, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40 (1992) 1165–1172
- [12] B. Fabre et al., ‘Label-free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines’, *J Proteome Res*, 13 (2014) 3027–3037

- [13] C. T. Aiken et al., 'Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes', *Molecular & Cellular Proteomics*, 10 (2011) R110.006924
- [14] J. Winter et al., 'Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33', *Mol Cell*, 17 (2005) 381–392
- [15] M. Ralser et al., 'Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress', *J Biol*, 6 (2007) 1–18
- [16] D. Reichmann et al., 'Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress', *Mol Cell*, 69 (2018) 203–213
- [17] T. Grune et al., 'HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress', *Free Radic Biol Med*, 51 (2011) 1355–1364
- [18] J. M. Baugh et al., 'Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination', *J Mol Biol*, 386 (2009) 814–827
- [19] B. M. Stadtmueller et al., 'Proteasome Activators', *Mol Cell*, 41 (2011) 8–19
- [20] G. Ben-Nissan et al., 'Regulating the 20S Proteasome Ubiquitin-Independent Degradation Pathway', *Biomolecules* 2014, 4 (2014) 862–884
- [21] R. Raynes et al., 'Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways', *Mol Aspects Med*, 50 (2016) 41–55
- [22] F. K. Deshmukh et al., 'The Contribution of the 20S Proteasome to Proteostasis', *Biomolecules*, 9 (2019) 16
- [23] H. Solomon et al., 'Post-translational regulation of p53 function through 20S proteasome-mediated cleavage', *Cell Death Differ*, 24 (2017) 2187–2198
- [24] K. V. Ramachandran et al., 'A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function', *Nature Structural & Molecular Biology*, 24 (2017) 419–430
- [25] K. V. Ramachandran et al., 'Activity-Dependent Degradation of the Nascentome by the Neuronal Membrane Proteasome', *Mol Cell*, 71 (2018) 169–177

- [26] S. U. Sixt et al., 'Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin — Incidence and relevance', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782 (2008) 817–823
- [27] E. E. Manasanch et al., 'Enzymatic activities of circulating plasma proteasomes in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with carfilzomib, lenalidomide and dexamethasone', *Leuk Lymphoma*, 58 (2017) 639–645
- [28] M. Heubner et al., 'The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer', *Gynecol Oncol*, 120 (2011) 233–238
- [29] H. Fukasawa et al., 'Circulating 20S Proteasome Is Independently Associated with Abdominal Muscle Mass in Hemodialysis Patients', *PLoS One*, 10 (2015) e0121352
- [30] R. C. Lai et al., 'Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome', *Int J Proteomics*, 2012 (2012) 1–14
- [31] M. Dieudé et al., 'The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection', *Sci Transl Med*, 7 (2015) 318ra200
- [32] M. Groll et al., 'Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution', *Nature*, 386 (1997) 463–471
- [33] M. Unno et al., 'The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution', *Structure*, 10 (2002) 609–618
- [34] W. Harshbarger et al., 'Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib', *Structure*, 23 (2015) 418–424
- [35] E. M. Huber et al., 'A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome', *Nature Communications*, 7 (2016) 1–10
- [36] E. Seemüller et al., 'Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a Threonine Protease', *Science*, 268 (1995) 579–582

- [37] J. Löwe et al., 'Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution', *Science*, 268 (1995) 533–539
- [38] K. Sadre-Bazzaz et al., 'Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening', *Mol Cell*, 37 (2010) 728
- [39] P. Fort et al., 'Evolution of Proteasome Regulators in Eukaryotes', *Genome Biol Evol*, 7 (2015) 1363
- [40] M. Gaczynska et al., 'Proline- and Arginine-Rich Peptides Constitute a Novel Class of Allosteric Inhibitors of Proteasome Activity', *Biochemistry*, 42 (2003) 8663–8670
- [41] B. Dahlmann et al., 'Activation of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle by fatty acids or sodium dodecyl sulphate', *Biochemical Journal*, 228 (1985) 171–177
- [42] M. Chu-Ping et al., 'Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain)', *Journal of Biological Chemistry*, 267 (1992) 10515–10523
- [43] D. M. W. Zaiss et al., 'The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes', *FEBS Lett*, 457 (1999) 333–338
- [44] T. Jung et al., 'The proteasomal system', *Mol Aspects Med*, 30 (2009) 191–296
- [45] B. Khor et al., 'Proteasome Activator PA200 Is Required for Normal Spermatogenesis', *Mol Cell Biol*, 26 (2006) 2999–3007
- [46] N. Tanahashi et al., 'Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and γ -interferon regulation', *Genes to Cells*, 2 (1997) 195–211
- [47] C. Wójcik et al., 'Proteasome activator (PA28) subunits, α , β and γ (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells', *Eur J Cell Biol*, 77 (1998) 151–160
- [48] O. Coux et al., 'Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes', *Annu Rev Biochem*, 65 (1996) 801–847

- [49] A. Förster et al., 'The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions', *Mol Cell*, 18 (2005) 589–599
- [50] J. Ortega et al., 'The Axial Channel of the 20 S Proteasome Opens Upon Binding of the PA200 Activator', *J Mol Biol*, 346 (2005) 1221–1227
- [51] J. Iwanczyk et al., 'Structure of the Blm10-20S Proteasome Complex by Cryo-electron Microscopy. Insights into the Mechanism of Activation of Mature Yeast Proteasomes', *J Mol Biol*, 363 (2006) 648
- [52] V. Ustrell et al., 'PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair', *EMBO J*, 21 (2002) 3516
- [53] V. Ustrell et al., 'Purification and Assay of Proteasome Activator PA200', *Methods Enzymol*, 398 (2005) 321–329
- [54] A. M. Pickering et al., 'Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 $\alpha\beta$, Pa28 γ and Pa200 in the degradation of oxidized proteins', *Arch Biochem Biophys*, 523 (2012) 181–190
- [55] V. Ustrell et al., 'PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair', *EMBO J*, 21 (2002) 3516–3525
- [56] B. M. Stadtmueller et al., 'Structural Models for Interactions between the 20S Proteasome and Its PAN/19S Activators', *Journal of Biological Chemistry*, 285 (2010) 13–17
- [57] A. J. Marques et al., 'The C-terminal Extension of the β 7 Subunit and Activator Complexes Stabilize Nascent 20 S Proteasomes and Promote Their Maturation', *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007) 34869–34876
- [58] A. Lehmann et al., 'Blm10 binds to pre-activated proteasome core particles with open gate conformation', *EMBO Rep*, 9 (2008) 1237–1243
- [59] A. Toste Rêgo et al., 'Characterization of Fully Recombinant Human 20S and 20S-PA200 Proteasome Complexes', *Mol Cell*, 76 (2019) 138–147
- [60] R. Verma et al., 'Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome', *Science*, 298 (2002) 611–615

- [61] M. H. Glickman et al., 'A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3', *Cell*, 94 (1998) 615–623
- [62] R. J. Tomko et al., 'Heterohexameric Ring Arrangement of the Eukaryotic Proteasomal ATPases: Implications for Proteasome Structure and Assembly', *Mol Cell*, 38 (2010) 393
- [63] Y. Saeki et al., 'Unlocking the Proteasome Door', *Mol Cell*, 27 (2007) 865–867
- [64] A. H. De la Peña et al., 'Substrate-engaged 26S proteasome structures reveal mechanisms for ATP-hydrolysis-driven translocation', *Science*, 362 (2018) eaav0725
- [65] M. R. Eisele et al., 'Expanded Coverage of the 26S Proteasome Conformational Landscape Reveals Mechanisms of Peptidase Gating', *Cell Rep*, 24 (2018) 1301-1315
- [66] J. Callis et al., 'The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System', *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 12 (2014) e0174
- [67] K. D. Wilkinson et al., 'Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment', *J Nutr*, 129 (1999) 1933–1936
- [68] C. M. Pickart et al., 'Mechanisms underlying ubiquitination', *Annu Rev Biochem*, 70 (2001) 503–533
- [69] J. Adams et al., 'The proteasome: Structure, function, and role in the cell', *Cancer Treat Rev*, 29 (2003) 3–9
- [70] D. A. Dougan et al., 'The N-end rule pathway: From recognition by N-recognins, to destruction by AAA + proteases', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823 (2012) 83–91
- [71] N. Tanahashi et al., 'Hybrid Proteasomes: INDUCTION BY INTERFERON- γ AND CONTRIBUTION TO ATP-DEPENDENT PROTEOLYSIS', *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 14336–14345
- [72] Y. Murakami et al., 'Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination', *Nature*, 360 (1992) 597–599

- [73] P. Cascio et al., 'Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes', *EMBO J*, 21 (2002) 2636
- [74] C. M. Dobson et al., 'Protein misfolding, evolution and disease', *Trends Biochem Sci*, 24 (1999) 329–332
- [75] H. Puchtler et al., 'A review of early concepts of amyloid in context with contemporary chemical literature from 1839 to 1859', *J Histochem Cytochem.*, 14 (1966) 123–134
- [76] N. Friedreich et al., 'Zur Amyloidfrage', *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, 16 (1859) 50–65
- [77] M. Stefani et al., 'Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution', *J Mol Med*, 81 (2003) 678–699
- [78] P. Westermark et al., 'A primer of amyloid nomenclature', *Amyloid*, 14 (2007) 179–183
- [79] P. Westermark et al., 'Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus', *Physiol Rev*, 91 (2011) 795–826
- [80] J. A. Williamson et al., 'Helix Stabilization Precedes Aqueous and Bilayer-Catalyzed Fiber Formation in Islet Amyloid Polypeptide', *J Mol Biol*, 393 (2009) 383–396
- [81] J. A. Williamson et al., 'Direct detection of transient α -helical states in islet amyloid polypeptide', *Protein Science*, 16 (2007) 110–117
- [82] V. N. Uversky et al., 'Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics', *Protein Science*, 11 (2002) 739–756
- [83] M. Fändrich et al., 'Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures', *Trends Biochem Sci*, 36 (2011) 338
- [84] L. Vergara et al., 'Protein Misfolding, a Common Mechanism in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases', *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, (2008) 285–304

- [85] M. E. Larson et al., ‘Soluble A β oligomer production and toxicity’, *J Neurochem*, 120 (2012) 125–139
- [86] M. R. Nichols et al., ‘Biophysical comparison of soluble amyloid- β (1-42) protofibrils, oligomers, and protofilaments.’, *Biochemistry*, 54 (2015) 2193–2204
- [87] M. P. Lambert et al., ‘Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins’, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 6448–6453
- [88] D. R. Howlett et al., ‘Neurotoxicity of the Alzheimer’s β -Amyloid Peptide’, *Bioimaging in Neurodegeneration*, (2005) 61–74
- [89] J. Marx et al., ‘Alzheimer’s disease: A new take on tau’, *Science (1979)*, 316 (2007) 1416–1417
- [90] T. Tomiyama et al., ‘A Mouse Model of Amyloid β Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss In Vivo’, *The Journal of Neuroscience*, 30 (2010) 4845
- [91] T. Kawarabayashi et al., ‘Accumulation of β -amyloid fibrils in pancreas of transgenic mice’, *Neurobiol Aging*, 17 (1996) 215–222
- [92] ‘<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>’, dostęp: 10.03.24
- [93] Z. Kroner et al., ‘The relationship between Alzheimer’s disease and diabetes: Type 3 diabetes?’, *Altern Med Rev*, 14 (2009) 373-379
- [94] ‘<https://diabetyk.org.pl/>’, dostęp: 12.01.24
- [95] ‘<https://www.sciencephoto.com/media/706547/view/diabetes-i-ii-illustration>’, dostęp: 10.01.24
- [96] ‘<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>’, dostęp: 12.01.24
- [97] ‘<https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>’, dostęp: 06.02.24
- [98] H. Sone et al., ‘Diabetes Mellitus’, *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*, 1–4 (2018) 9–16
- [99] ‘<https://ptmr.info.pl/cukrzyca-wytyczne>’, dostęp: 22.01.24
- [100] ‘<https://www.who.int/health-topics/diabetes>’, dostęp: 08.02.24

- [101] D. W. Zochodne et al., 'Diabetes Mellitus', *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, (2014) 992–994
- [102] R. David Leslie et al., 'Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges', *Diabetes Care*, 44 (2021) 2449–2456
- [103] J. P. Krischer et al., 'Characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes before vs after 6 years of age in the TEDDY cohort study', *Diabetologia*, 64 (2021) 2247–2257
- [104] J. Speight et al., 'Type 1 Diabetes', *Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine: Third Edition*, (2023) 477–480
- [105] J. W. M. Höppener et al., 'Islet Amyloid and Type 2 Diabetes Mellitus', *N Engl J Med*, 343 (2000) 411–419
- [106] K. Maedler et al., ' β -Cells in Type 2 Diabetes: A Loss of Function and Mass', *Horm Res*, 62 (2004) 67–73
- [107] P. Zimmet et al., 'Global and societal implications of the diabetes epidemic', *Nature*, 414 (2001) 782–787
- [108] H. M. Al-Kuraishy et al., 'Differential effect of metformin and/or glyburide on apelin serum levels in patients with type 2 diabetes mellitus: Concepts and clinical practice', *J Adv Pharm Technol Res*, 9 (2018) 80
- [109] S. E. Kahn et al., 'The importance of the β -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus', *Am J Med*, 108 (2000) 2–8
- [110] A. S. De Toma et al., and M. H. Lim, 'Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes', *Chem Soc Rev*, 41 (2012) 608–621
- [111] M. Marszałek, 'Cukrzyca typu 2 a choroba Alzheimera-jedna czy dwie choroby? Mechanizmy asocjacji', *Postepy Hig i Med Dosw*, 67 (2013)
- [112] Y. Hirai, 'In-vivo Like Studies of the h-IAPP Amyloid Precursors Using Dielectric Relaxation Spectroscopy', *Worcester Polytechnic Institute*, (2013)
- [113] M. Bliss et al., 'The history of insulin', *Diabetes Care*, 16 (1993) 4–7
- [114] T. L. Blundell et al., 'Atomic Positions in Rhombohedral 2-Zinc Insulin Crystals', *Nature*, 231 (1971) 506–511

- [115] X. Zou et al., 'Preparation of a new type 2 diabetic miniature pig model via the CRISPR/Cas9 system', *Cell Death Dis*, 10 (2019) 823
- [116] G. Dodson et al., 'The role of assembly in insulin's biosynthesis', *Curr Opin Struct Biol*, 8 (1998) 189–194
- [117] G. Wilcox et al., 'Insulin and Insulin Resistance', *Clinical Biochemist Reviews*, 26 (2024) 19
- [118] N. Pørksen et al., 'Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes', *Diabetes*, 51 (2002) 245-254
- [119] S. E. Kahn et al., 'The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes', *Diabetologia*, 46 (2003) 3–19
- [120] '<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=380§ionid=39744057>' dostę: 18.03.24
- [121] E. L. Opie, 'On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of langerhans and to diabetes melutus', *Journal of Experimental Medicine*, 5 (1901) 397–428
- [122] P. Westermark et al., 'A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas', *Biochem Biophys Res Commun*, 140 (1986) 827–831
- [123] G. J. S. Cooper et al., 'Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1988) 7763–7766
- [124] R. G. Thompson et al., 'Effects of 4 weeks' administration of pramlintide, a human amylin analogue, on glycaemia control in patients with IDDM: effects on plasma glucose profiles and serum fructosamine concentrations', *Diabetologia*, 40 (1997) 1278–1285
- [125] M. F. Kong et al., 'Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM', *Diabetologia*, 40 (1997) 82–88

- [126] C. Weyer et al., 'Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: a physiological approach toward improved metabolic control', *Curr Pharm Des*, 7 (2001) 1353–1373
- [127] C. Goldsbury et al., 'Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin', *J Struct Biol*, 130 (2000) 352–362
- [128] S. J. Wimalawansa et al., 'Amylin, Calcitonin Gene-Related Peptide, Calcitonin, and Adrenomedullin: A Peptide Superfamily', *Critical Reviews & Trade in Neurobiology*, 11 (1997) 167–239
- [129] D. L. Hay et al., 'The calcitonin gene-related peptide family: Form, function and future perspectives', *The Calcitonin Gene-related Peptide Family: Form, Function and Future Perspectives*, (2010) 1–236
- [130] D. Naot et al., 'The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism', *Bone*, 43 (2008) 813–818
- [131] P. M. Sexton et al., 'Receptor activity modifying proteins', *Cell Signal*, 13 (2001) 73–83
- [132] M. Kawahara et al., 'Alzheimer's β -Amyloid, Human Islet Amylin, and Prion Protein Fragment Evoke Intracellular Free Calcium Elevations by a Common Mechanism in a Hypothalamic GnRH Neuronal Cell Line', *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 14077–14083
- [133] Y. Kiriya et al., 'Role and Cytotoxicity of Amylin and Protection of Pancreatic Islet β -Cells from Amylin Cytotoxicity', *Cells*, 7 (2018) 95
- [134] T. Sanke et al., 'An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing.', *Journal of Biological Chemistry*, 263 (1989) 17243–17246
- [135] S. Mosselman et al., 'The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons', *FEBS Lett*, 247 (1989) 154–158
- [136] L. Marzban et al., 'Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide', *Diabetes*, 53 (2004) 141–148

- [137] J. Wang et al., 'The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH₂-terminal cleavage site', *Diabetes*, 50 (2001) 534–539
- [138] R. Kaye et al., 'Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro', *J Mol Biol*, 287 (1999) 781–796
- [139] A. Abedini et al., 'A role for helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded polypeptides?', *Phys Biol*, 6 (2009) 15005
- [140] J. J. W. Wiltzius et al., 'Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process', *Protein Sci*, 18 (2009) 1521
- [141] '<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.17.431675v1.full>', dostę: 15.03.24
- [142] P. Westermark et al., 'Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1990) 5036
- [143] A. Abedini et al., '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 (2006) 274–281
- [144] B. W. Koo et al., 'Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide', *Protein Eng Des Sel*, 21 (2008) 147–154
- [145] M. R. Nilsson et al., 'Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin', *J Mol Biol*, 294 (1999) 1375–1385
- [146] R. P. R. Nanga et al., 'Three-dimensional structure and orientation of rat islet amyloid polypeptide protein in a membrane environment by solution NMR spectroscopy', *J Am Chem Soc*, 131 (2009) 8252–8261
- [147] R. Akter et al., 'Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology', *J Diabetes Res*, 2016 (2016)
- [148] J. Green et al., 'Full-length Rat Amylin Forms Fibrils Following Substitution of Single Residues from Human Amylin', *J Mol Biol*, 326 (2003) 1147–1156

- [149] P. Cao et al., 'Sensitivity of amyloid formation by human islet amyloid polypeptide to mutations at residue 20', *J Mol Biol*, 421 (2012) 282–295
- [150] S. Sakagashira et al., 'Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients', *Diabetes*, 45 (1996) 1279–1281
- [151] R. Azriel et al., '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 (2001) 34156–34161
- [152] P. Marek et al., '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 (2007) 3255–3261
- [153] A. K. Bishoyi et al., 'Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) - a curse in type II diabetes mellitus: insights from structure and toxicity studies', *Biol Chem*, 402 (2020) 133–153
- [154] H. Mulder et al., 'Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose in vivo in rats', *Am J Physiol*, 271 (1996) E1008–E1014
- [155] B. Åkesson et al., 'Islet amyloid polypeptide inhibits glucagon release and exerts a dual action on insulin release from isolated islets', *Regul Pept*, 111 (2003) 55–60
- [156] P. Westermark et al., 'Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation', *FEBS Lett*, 379 (1996) 203–206
- [157] S. Gilead et al., 'Molecular Mapping of the Recognition Interface between the Islet Amyloid Polypeptide and Insulin', *Angewandte Chemie International Edition*, 45 (2006) 6476–6480
- [158] J. L. Larson et al., 'The Mechanism of Insulin Action on Islet Amyloid Polypeptide Fiber Formation', *J Mol Biol*, 335 (2004) 221–231
- [159] M. A. Ravier et al., 'Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release', *Diabetes*, 54 (2005) 1798–1807

- [160] H. J. Woerle et al., 'Impaired Hyperglycemia-Induced Delay in Gastric Emptying in Patients With Type 1 Diabetes Deficient for Islet Amyloid Polypeptide', *Diabetes Care*, 31 (2008) 2325
- [161] M. Zaidi et al., 'Amylin-amide: a new bone-conserving peptide from the pancreas', *Exp Physiol*, 75 (1990) 529–536
- [162] H. Mulder et al., 'Islet amyloid polypeptide (amylin)-deficient mice develop a more severe form of alloxan-induced diabetes', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278 (2000) 684
- [163] J. Xu et al., 'Common variants in genes involved in islet amyloid polypeptide (IAPP) processing and the degradation pathway are associated with T2DM risk: A Chinese population study', *Diabetes Res Clin Pract*, 185 (2022) 109235
- [164] F. H. AlAnazi et al., 'Effects of neprilysin and neprilysin inhibitors on glucose homeostasis: Controversial points and a promising arena', *J Diabetes*, 15 (2023) 397–408
- [165] M. A. Leissring et al., 'Targeting Insulin-Degrading Enzyme in Insulin Clearance', *Int J Mol Sci*, 22 (2021) 1–21
- [166] J. P. Maianti et al., 'Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones', *Nature*, 511 (2014) 94–98
- [167] R. G. Bennett et al., 'An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures', *Diabetes*, 52 (2003) 2315–2320
- [168] W. J. Tang, 'Targeting Insulin-Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus', *Trends Endocrinol Metab*, 27 (2016) 24–34
- [169] D. Milardi et al., 'Proteostasis of Islet Amyloid Polypeptide: A Molecular Perspective of Risk Factors and Protective Strategies for Type II Diabetes', *Chem Rev*, 121 (2021) 1845–1893
- [170] M. Nakhjavani et al., 'Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes', *Cell Stress Chaperones*, 15 (2010) 959

- [171] M. Ladjimi et al., 'Inhibition of Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation in Type 2 Diabetes by Hsp70 Molecular Chaperones', 2016 (2016) 2702
- [172] D. C. David et al., 'Proteasomal degradation of tau protein', *J Neurochem*, 83 (2002) 176–185
- [173] J. L. Webb et al., 'Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome', *J Biol Chem*, 278 (2003) 25009–25013
- [174] S. Casas et al., 'Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream ER stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic β -cell apoptosis', *Diabetes*, 56 (2007) 2284
- [175] S. Singh et al., 'Proteasome regulates turnover of toxic human amylin in pancreatic cells', *Biochem J*, 473 (2016) 2655–2670
- [176] P. Westermark, 'Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides', *FEBS J*, 272 (2005) 5942–5949
- [177] R. G. Bennett et al., 'Degradation of Amylin by Insulin-degrading Enzyme', *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 36621–36625
- [178] M. Takalo et al., 'Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases', *Am J Neurodegener Dis*, 2 (2013) 1
- [179] J. A. Olzmann et al., 'Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications', *Curr Med Chem*, 15 (2008) 47
- [180] J. F. Rivera et al., 'Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic β -cells: protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions', *Cell Death & Differentiation*, 18 (2010) 415–426
- [181] A. Clark et al., 'Islet amyloid: A complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes?', *Diabetologia*, 47 (2004) 157–169
- [182] A. T. Templin et al., 'Loss of perlecan heparan sulfate glycosaminoglycans lowers body weight and decreases islet amyloid deposition in human islet amyloid polypeptide transgenic mice', *Protein Eng Des Sel*, 32 (2019) 95–102
- [183] E. H. Pilkington et al., 'Pancreatic β -Cell Membrane Fluidity and Toxicity Induced by Human Islet Amyloid Polypeptide Species', *Scientific Reports*, 6 (2016) 1–10

- [184] S. Bonner-Weir et al., 'Islets in type 2 diabetes: in honor of Dr. Robert C. Turner', *Diabetes*, 57 (2008) 2899–2904
- [185] J. Janson et al., 'The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles', *Diabetes*, 48 (1999) 491–498
- [186] R. Soong et al., 'Association of highly compact type II diabetes related islet amyloid polypeptide intermediate species at physiological temperature revealed by diffusion NMR spectroscopy', *J Am Chem Soc*, 131 (2009) 7079–7085
- [187] P. Cao et al., 'Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity', *FEBS Lett*, 587 (2013) 1106–1118
- [188] T. Gurlo, S. Costes, J. D. Hoang, J. F. Rivera, A. E. Butler, and P. C. Butler, ' β Cell-specific increased expression of calpastatin prevents diabetes induced by islet amyloid polypeptide toxicity', *JCI Insight*, vol. 1, no. 18, Nov. 2016, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.89590.
- [189] P. E. S. Smith et al., 'The Induction of Negative Curvature as a Mechanism of Cell Toxicity by Amyloidogenic Peptides: The Case of Islet Amyloid Polypeptide', *J Am Chem Soc*, 131 (2009) 4470
- [190] R. Dubey et al., 'Myricetin protects pancreatic β -cells from human islet amyloid polypeptide (hIAPP) induced cytotoxicity and restores islet function', *Biol Chem*, 402 (2020) 179–194
- [191] J. R. Brender et al., 'A single mutation in the nonamyloidogenic region of islet amyloid polypeptide greatly reduces toxicity', *Biochemistry*, 47 (2008) 12680–12688
- [192] R. P. R. Nanga et al., 'Structures of rat and human islet amyloid polypeptide IAPP(1-19) in micelles by NMR spectroscopy', *Biochemistry*, 47 (2008) 12689–12697
- [193] M. Y. Donath, 'When metabolism met immunology', *Nature Immunology*, 14 (2013) 421–422
- [194] C. M. Dobson, 'Principles of protein folding, misfolding and aggregation', *Semin Cell Dev Biol*, 15 (2004) 3–16

- [195] Y. Bram et al., ‘Apoptosis induced by islet amyloid polypeptide soluble oligomers is neutralized by diabetes-associated specific antibodies’, *Scientific Reports*, 4 (2014) 1–9
- [196] J. R. Brender et al., ‘Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation’, *J Am Chem Soc*, 132 (2010) 8973
- [197] ‘<https://acumenpharm.com/science/>’, dostę: 01.02.24
- [198] H. M. Al-Kuraishy et al., ‘A Potential Link Between Visceral Obesity and Risk of Alzheimer’s Disease’, *Neurochem Res*, 48 (2023) 745–766
- [199] H. M. Al-kuraishy et al., ‘Benzodiazepines in Alzheimer’s disease: beneficial or detrimental effects’, *Inflammopharmacology*, 31 (2023) 221–230
- [200] Z. Arvanitakis et al., ‘Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function’, *Arch Neurol*, 61 (2004) 661–666
- [201] J. Fawver et al., ‘Islet amyloid polypeptide (IAPP): a second amyloid in Alzheimer’s disease’, *Curr Alzheimer Res*, 11 (2014) 928–940
- [202] Y. Zhang et al., ‘Islet amyloid polypeptide: Another key molecule in Alzheimer’s pathogenesis?’, *Prog Neurobiol*, 153 (2017) 100–120
- [203] R. Hu et al., ‘Cross-Seeding Interaction between β -Amyloid and Human Islet Amyloid Polypeptide’, *ACS Chem Neurosci*, 6 (2015) 1759–1768
- [204] P. Bharadwaj et al., ‘Amylin and beta amyloid proteins interact to form amorphous heterocomplexes with enhanced toxicity in neuronal cells’, *Scientific Reports*, 10 (2020) 1–14
- [205] N. Wijesekara et al., ‘Amyloid- β and islet amyloid pathologies link Alzheimer’s disease and type 2 diabetes in a transgenic model’, *The FASEB Journal*, 31 (2017) 5409-5418
- [206] A. F. Raimundo et al., ‘Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime with A β in the Pathology of Alzheimer’s Disease’, *Front Mol Neurosci*, 13 (2020) 513811
- [207] E. Andretto et al., ‘Identification of Hot Regions of the A β –IAPP Interaction Interface as High-Affinity Binding Sites in both Cross- and Self-Association’, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 3081–3085

- [208] J. Miklossy et al., 'Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes', *Neurobiol Aging*, 31 (2010) 1503–1515
- [209] J. S. Roriz-Filho et al., '(Pre)diabetes, brain aging, and cognition', *Biochim Biophys Acta*, 1792 (2009) 432–443
- [210] S. B. P. Charge et al., 'Apolipoprotein E is associated with islet amyloid and other amyloidoses: implications for Alzheimer's disease', *Journal of pathology*, 179 (1996) 443447–443448
- [211] I. Martinez-Valbuena et al., 'Amylin as a potential link between type 2 diabetes and alzheimer disease', *Ann Neurol*, 86 (2019) 539–551
- [212] M. P. Mattson et al., 'Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium', *Brain Res*, 676 (1995) 219–224
- [213] Y. A. Lim *et al.*, 'A β and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction', *Proteomics*, vol. 10, no. 8, pp. 1621–1633, Apr. 2010, doi: 10.1002/PMIC.200900651.
- [214] W. Fu et al., 'Amyloid β (A β) peptide directly activates amylin-3 receptor subtype by triggering multiple intracellular signaling pathways', *J Biol Chem*, 287 (2012) 18820–18830
- [215] J. H. Jhamandas et al., 'Actions of β -Amyloid Protein on Human Neurons Are Expressed through the Amylin Receptor', *Am J Pathol*, 178 (2011) 140
- [216] '<https://www.przychodniasynexus.pl/pompa-insulinowa-jak-dziala-ile-kosztuje-dla-kogo>', dostęp: 16.01.24
- [217] C. Messer et al., 'A Review of Pramlintide in the Management of Diabetes', *Clin Med Ther*, 1 (2009) 305–311
- [218] S. V. Edelman et al., 'Pramlintide acetate in the treatment of Type 2 and Type 1 diabetes mellitus', *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2 (2007) 9–18
- [219] D. Singh-Franco et al., 'Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus', *Clin Ther*, 29 (2007) 535–562

- [220] A. Barczyk et al., ‘The genetics of obesity - Pathogenetic, clinical and diagnostic aspects’, *Dev Period Med*, 21 (2017) 186
- [221] V. Poitout et al., ‘Inhibition of Insulin Secretion by Leptin in Normal Rodent Islets of Langerhans’, *Endocrinology*, 139 (1998) 822–826
- [222] K. Chou et al., ‘Metreleptin: First global approval’, *Drugs*, 73 (2013) 989–997
- [223] ‘<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/myalepta>’, dostę: 20.03.24
- [224] H. C. Greenwood et al., ‘Peptides and Their Potential Role in the Treatment of Diabetes and Obesity’, *Rev Diabet Stud*, 8 (2011) 355
- [225] M. Katsiki et al., ‘The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Proteasome Stimulatory Properties In Vitro and Confers Life Span Extension of Human Embryonic Fibroblasts’, *Mary Ann Liebert, Inc.*, 10 (2007) 157–172
- [226] L. Huang et al., ‘Proteasome regulators: activators and inhibitors’, *Curr Med Chem*, 16 (2009) 931
- [227] K. Fosgerau et al., ‘Peptide therapeutics: current status and future directions’, *Drug Discov Today*, 20 (2015) 122–128
- [228] L. Otvos et al., ‘Current challenges in peptide-based drug discovery’, *Front Chem*, 2 (2014) 107507
- [229] K. Fosgerau et al., ‘Peptide therapeutics: current status and future directions’, *Drug Discov Today*, 20 (2015) 122–128
- [230] C. Berardet et al., ‘Evidence for different in vitro oligomerization behaviors of synthetic hIAPP obtained from different sources’, *Anal Bioanal Chem*, 412 (2020) 3103–3111
- [231] G. J. Biessels et al., ‘Increased risk of Alzheimer’s disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?’, *Biochem Soc Trans*, 33 (2005) 1041–1044
- [232] P. J. Marek et al., ‘Ionic strength effects on amyloid formation by amylin are a complicated interplay among debye screening, ion selectivity, and hofmeister effects’, *Biochemistry*, 51 (2012) 8478–8490