

Streszczenie

Ludzkie osoczowe białko amyloidu A (hSAA) jest niewielkim, zbudowanym ze 104 reszt aminokwasowych białkiem, które w warunkach fizjologicznych występuje głównie w formie oligomerycznej. Pełni ono istotną funkcję m.in. w odpowiedzi na stan zapalny, a także w transporcie i metabolizmie cholesterolu. Nadal jednak nie wiadomo, czy jest to główna rola tego białka. Średnie stężenie SAA w osoczu/surowicy zdrowego człowieka wynosi około 3 mg/l. Drastycznie zmienia się ono w odpowiedzi na urazy, stany zapalne czy infekcje, wzrastając nawet 1000-krotnie. Tak duże nagromadzenie cząsteczek SAA w organizmie sprzyja łączeniu się ich i tworzeniu agregatów amyloidowych. Agregaty te odkładają się jako złogi zewnątrzkomórkowe w różnych narządach, powodując ich obciążenie, czego skutkiem jest ich dysfunkcja, a w ostateczności nawet obumieranie.

Ponieważ natywna forma białka jest dość stabilna i trudno jest na niej prowadzić badania agregacyjne, zdecydowałam się na użycie do badań mniej stabilnej izoformy, w której proces oligomeryzacji/agregacji przebiegał znacznie szybciej. Izofорма ta ma dodatkową resztę metioniny na *N*-końcu (MetSAA1.1). Przedstawione w pracy badania weryfikują i uzupełniają dostępne w literaturze informacje odnośnie możliwego mechanizmu agregacji tej izoformy. Wykorzystując natywną elektroforezę pokazałam jak wiele form oligomerycznych bierze udział w procesie agregacji białka. Ponadto stosując fluorescencję wewnętrznych jak i zewnętrznych barwników fluorescencyjnych udowodniłam, że podczas agregacji następują istotne przekształcenia strukturalne w białku.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było uzyskanie skutecznego inhibitora fibrylizacji/agregacji białka SAA. W rozprawie przedstawiłam 24 małowiązane związki jako potencjalne inhibitory procesu fibrylizacji silnie amyloidogennego fragmentu 1-27 SAA (SAA1-27). Zaprojektowałam je w oparciu o *N*-końcową sekwencję białka SAA (RSFFS) oraz sekwencję peptydu β -amyloidowego (KLVFF). Zgodnie z założeniem peptydy te miały oddziaływać z rdzeniem amyloidogennym znajdującym się na *N*-końcu SAA i tym samym blokować ten fragment, zapobiegając agregacji białka. Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej wykazały, że większość zaprojektowanych małowiązanych związków była w stanie hamować proces fibrylizacji SAA1-27. Z puli inhibitorów do dalszych badań, już na

całym białku, wybrałam tylko jeden związek, saa3Dip, który w pozycji 3 zawierał niebiałkowy aminokwas, β,β -difenyloalaninę.

Wyniki eksperymentów z użyciem izoformy MetSAA1.1 pokazują, że związek saa3Dip hamuje agregację również całego białka. Wyniki z zastosowanych w pracy doktorskiej technik fizykochemicznych, sugerują, iż inhibitor jest w stanie wpłynąć stabilizująco na niektóre elementy natywnej drugorzędowej struktury oraz wpłynąć na natywną strukturę trzeciorzędową białka. Wykonane badania pokazują, że saa3Dip wpływa również w istotny sposób na wielkość tworzonych oligomerów/agregatów oraz ich morfologię. Dodatkowo rezultaty uzyskane z badania frakcji rozpuszczalnej pokazują, że białko ulega częściowo reakcji hydrolizy w warunkach inkubacji. Hydroliza białka wydaje się zachodzić szybciej w obecności inhibitora agregacji, saa3Dip. Bardzo prawdopodobnym jest więc, iż oddziaływanie MetSAA1.1 z saa3Dip sprzyja ekspozycji fragmentów sekwencji białka wrażliwych na reakcję hydrolizy.

W ramach pracy doktorskiej podjęłam również próbę uzyskania białka MetSAA1.1 za pomocą natywnej chemicznej ligacji. Metoda ta jest oparta na chemoselektywnym połączeniu dwóch peptydów natywnym wiązaniem peptydowym. Reakcja ta wymaga odpowiednich dwóch peptydów, w jednym na C-końcu musi znajdować się aktywny tioester, zaś w drugim na N-końcu wolna grupa cysteiny. W sekwencji aminokwasowej SAA nie ma cysteiny, dlatego też potrzebny był dodatkowy etap, etap desulfuryzacji cysteiny, aby odtworzyć natywnie występującą w sekwencji alaninę. Natywną chemiczną ligację białka MetSAA1.1 przeprowadziłam poprzez połączenie dwóch fragmentów polipeptydowych: -1-44 oraz 45-104. Zsyntezowane fragmenty peptydowe przekształciłam odpowiednio na C- lub N-końcu, aby możliwe było ich chemoselektywne połączenie. Wykorzystując CD, FTIR-ATR oraz natywną elektroforezę udowodniłam, że białko uzyskane tą metodą jest zdolne do tworzenia natywnej struktury oraz natywnych form oligomerycznych. Opracowana przeze mnie metoda syntezy nie tylko ułatwi otrzymywanie białka SAA, ale przede wszystkim umożliwi wprowadzanie w łatwy sposób modyfikacji w natywnej sekwencji, co jest istotne w kontekście badania mechanizmu oligomeryzacji/agregacji SAA.