

Received: 16.08.2017
Accepted: 12.02.2018
Published: 16.04.2018

Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylogenny potencjał kłopotliwej cząsteczki

Amylin under examination. Fibrillogenic potential of the troublesome molecule

Małgorzata Marszałek

Uniwersytet Łódzki, Instytut Biofizyki, Katedra Biofizyki Ogólnej

Streszczenie

W przebiegu cukrzycy typu 2 (diabetes mellitus type 2 DM2, non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM), w obrębie wysp Langerhansa trzustki, obserwuje się patologiczne depozyty zwane amyloidem. W skład amyloidu wchodzi m.in. wytwarzany przez komórki beta polipeptyd, pełniący funkcję neurohormonu, zwany amyliną. Nieprawidłowo zwinęta, patologiczna, bo fibrylująca cząsteczka amyliny, w postaci nierozpuszczalnych fibryli (włókien) amyloidowych, powoduje dysfunkcję, niszczenie komórek wysp, ich utratę, destrukcję narządu i postęp choroby. Jest to polipeptyd wyjątkowo trudno rozpuszczalny i błyskawicznie fibrylujący, przez co trudny do badań. Dlatego też prace eksperymentalne prowadzi się na polipeptydzie syntetycznym lub jego syntetycznych fragmentach. Artykuł jest przeglądem prowadzonych badań zmierzających do odkrycia potencjału fibrylotwórczego amyliny, a także niektórych najnowszych modeli oddziaływań monomerów tego polipeptydu. W pracy omówiono także liczne trudności metodyczne w badaniu amyliny.

Słowa kluczowe:

amylina • amyloid trzustkowy • cukrzyca typu 2 • agregacja • fibrylacja

Summary

In patients or animals affected by 2 type diabetes mellitus (diabetes mellitus type 2 DM2, non-insulin dependent diabetes mellitus NIDDM) some pathological deposits, called amyloid are observed among cells of islets of Langerhans. Among others constituents deposits consist of insoluble, fibrillar form of polipeptide neurohormone called amylin, produced by pancreatic beta cells.. It is thought that formation of fibrillar deposits of misfolded and aggregated polipeptide is highly toxic to beta cells and leads to cell dysfunction, cell loss, pancreas destruction and progress of the disease. Due to the extreme insolubility of this polipeptide and its instant fibrillation amylin constitutes a methodological problem and there is a need for a special methodology in experiments. This article reviews the most important experiments aimed at discovering fibrillogenic potential of amylin and models of interaction of the polipeptide's monomers in man and rat. Numerous methodological difficulties in amylin research has been also emphasized.

Keywords:

amylin • called amyloid • diabetes mellitus type 2 • called amyloid

GICID;	01.3001.0011.7620
DOI:	10.5604/01.3001.0011.7620
Word count:	7848
Tables:	–
Figures:	–
References:	49

Adres autorki: dr Małgorzata Marszałek Instytut Biofizyki, Katedra Biofizyki Ogólnej, rencistka, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 143, Łódź; e-mail: mtmarsz@wp.pl

Wykaz skrótów: **AFM** – technika mikroskopii sił atomowych (atomic force microscopy), **CD** – technika dichroizmu kołowego (circular dichroism), **EM** – technika mikroskopii elektronowej (electron microscopy), **FTIR** – technika badań widm w podczerwieni (fourier transform infrared spectroscopy), **hA** – amylna ludzka, **hA (1-37)** – pełnoaminokwasowa amylna ludzka (human amylin), **HFIP** – hexafluoroizopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanol), **rA** – amylna szczura, **TFA** – kwas trójtłorooctowy, **ThT** – tioflawina T (thioflavine T).

WSTĘP

Złogi (depozyty) amyloidu, odnajdywane w obrębie wysp Langerhansa trzustki u chorych na cukrzycę zwięzłą i człowieka, zawierają w swym składzie neurohormon, wytwarzany przez komórki beta wysp trzustki, zwany amyliną. Intrigującym fenomenem przyrody jest to, że ten sam polipeptyd zachowuje się różnie u różnych organizmów, tj. formuje fibryle amyloidów (włókna amyloidowe) bądź nie wykazuje tej właściwości. Mimo poznania składu aminokwasowego polipeptydu u różnych gatunków i mimo rozpoznania różnic substancyjnych w obrębie jego cząsteczki, problem fibrylacji amyliny nadal oczekuje na rozwiązanie. Jest wiele przyczyn, które powodują, że fibrylująca amylna ludzka (hA) ciągle budzi zainteresowanie eksperymentatorów. Jej cechy własne, m.in. wynikające ze składu aminokwasowego, stanowią poważne utrudnienie badawcze. Amylna jest polipeptydem wyjątkowo trudno rozpuszczalnym i błyskawicznie fibrylującym w roztworze [26,28]. Aż 10 aminokwasów hydrofobowych, obecnych w cząsteczce amyliny sprawia, że niemożliwe jest jej rozpuszczenie w roztworze wodnym, a w roztworach o wysokim stężeniu polipeptydu (np. 20 mg/ml) następuje jego natychmiastowa, spontaniczna fibrylacja. Dlatego też do badań amyliny zazwyczaj są stosowane, jako rozpuszczalniki wspomagające, roztwory fluorowanych alkoholi: trójtłorooetanolu (2,2,2-trifluoroethanol, TFE) i heksafluoroizopropanolu (1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanol, HFIP). Służą rozpuszczeniu powstających agregatów peptydu w badanym roztworze. Jednak nawet śladowe ich ilości wpływają na proces fibrylacji, który jest niezwykle wrażliwy na stosowane warunki eksperymentalne, co także utrudnia interpretację wyników [27,44].

Warunki środowiskowe układu eksperymentalnego, np. pH, ciśnienie, stężenie i rodzaj rozpuszczalnika, skład jonowy roztworu, obecność białek chaperonowych i stężenie fibrylującego peptydu, a także rodzaj i charakter chemiczny powierzchni, z którą badany peptyd

oddziałuje, tj. jej hydrofobowość, ładunek jakim jest obdarzona, odgrywają istotną rolę w procesie szeroko rozumianej agregacji. Jest nią zarówno agregacja nieswoista, która prowadzi do agregatów amorficznych, jak i agregacja wysoce swoista, prowadząca do struktur dobrze uporządkowanych, jakimi są fibryle. Procesy te można obserwować i badać na przykładzie właśnie amyliny. Zastosowane warunki eksperymentalne wyciskają swego rodzaju piętno na tworzących się depozytach, co wyraża się polimorfizmem obserwowanych agregatów czy fibryli [14,23,27,41].

Dlatego też, od chwili odkrycia amyliny, liczne prace eksperymentalne prowadzi się na polipeptydzie syntetycznym lub jego syntetycznych fragmentach. Należy o tym pamiętać, interpretując wyniki eksperymentów. Uwaga ta, odnosi się zwłaszcza do badań, na których podstawie próbuje się odnaleźć te sekwencje aminokwasów, którym można by przypisać istotną rolę w fibrylacji i dla formowania typowej dla fibryli, struktury typu β -sheet, traktowanej jako ich cecha generyczna [3]. Wyabstrahowane z całości cząsteczki jej fragmenty mogą jedynie przybliżyć rozwiązanie problemu fibrylacji, ale całkowicie nie odkryją tajemnicy tego procesu. Badań fibrylacji amyliny w warunkach *in vivo* np. w komórkach beta wysp trzustki, nie ułatwia też to, że są rozproszone w wyspach Langerhansa, przez co bardzo trudne, a wręcz niemożliwe do pozyskania. Ich ekwiwalentem są m.in. szczurze komórki nowotworu trzustki typu insulinoma, ale są jednak modelem niedoskonałym [26,43].

Niniejsza praca stanowi przegląd kolejno prowadzonych badań zmierzających do odkrycia potencjału fibrylotwórczego, jaki kryje w sobie cząsteczka amyliny, a także przegląd niektórych najnowszych, modeli oddziaływań monomerów amyliny człowieka i szczura (rA), zaproponowanych w oparciu o dorobek prac eksperymentalnych. Podkreślono także liczne trudności metodyczne, sprawiające, że w przypadku tego polipeptydu, zasadne jest odwoływanie się do analiz symulacyjnych [48,49].

Wnoszą nową wiedzę składającą się na obraz tego ciekawego fenomenu przyrody. W prezentowanej pracy, dla wszystkich struktur białkowych, pozostawiono terminologię anglojęzyczną, celowo nie wprowadzając dłuższych i opisowych nazw polskich.

FIBRYLUJĄCE FRAGMENTY POLIPEPTYDU

Fibrylacja pełnoaminokwasowej wersji syntetycznej hA imituje proces zachodzący *in vivo*, prowadzący do odkładania amyloidu trzustki. Obserwowane zjawisko nasuwało pytanie o sekwencje aminokwasowe, nadające polipeptydowi cechę jego zdolności fibrylacji. Pytanie było zasadne, zwłaszcza w kontekście obserwowanych naturalnych różnic w budowie aminokwasowej polipeptydów: fibrylującego i niefibrylującego peptydu szczura. Na tej podstawie skonstruowano liczne modele badawcze z zastosowaniem fragmentów amyliny zwierząt i człowieka. Stwierdzono, że krótkie fragmenty amyliny wykazują cechy identyczne z cechami pełnego polipeptydu. Jednak w zależności od ich pochodzenia przejawiają różną zdolność do fibrylacji i albo fibrylują, jak w przypadku polipeptydów człowieka, albo nie fibrylują, jak w polipeptydach szczura. Ale są i takie peptydowe fragmenty amyliny, które mogą fibrylować jedynie w warunkach *in vitro*, nie ujawniając tej cechy *in vivo*, np. amylin królika czy zająca [26]. Te ostatnie mogą służyć jako model badawczy, ale dopiero po ich gruntownym sprawdzeniu. Na podstawie analizy składu aminokwasowego domen budujących cały, 37-aminokwasowy polipeptyd, wyodrębniono fragment, uznany za najistotniejszy dla procesu fibrylacji amyliny. Był nim tzw. obszar centralny cząsteczki.

Obszar centralny 20-29 amyliny zwierząt i człowieka

Na amyloidogeny region syntetycznej hA, ulokowany między resztami aminokwasowymi 20 a 29, zwrócił uwagę już w 1989 r. Bestholtz i wsp. [6]. Stwierdzono wówczas, że peptyd 20-29, w warunkach *in vitro* wykazuje zdolność do spontanicznego formowania klasycznych fibryli. Stosunkowo szybko zauważono różnice w zdolności do tworzenia fibryli przez ten peptyd w zależności od gatunku zwierzęcia, od którego pochodził. To, że peptyd chomika nie fibrylował, a ludzki formował fibryle, powiązano z różnicami w budowie aminokwasowej [5]. Następnie wykazano, że syntetyczna, 10-aminokwasowa sekwencja, korespondująca z odcinkiem 20-29 hA, w warunkach *in vitro* formuje fibryle podobne do fibryli pełnoaminokwasowej wersji amyliny syntetycznej. Jednocześnie stwierdzono, że analogiczny fragment rA cechy takiej nie miał. Tak powstała koncepcja domeny centralnej cząsteczki amyliny, odpowiedzialnej za fibrylację polipeptydu [45].

W dalszych pracach zauważono, że substytucje aminokwasowe w tym obszarze hA modulują cechę fibrylogenności amyliny, np. spowalniając proces oraz że niekiedy ten sam polipeptyd nie formując fibryli *in vivo*, wykazuje tę cechę *in vitro*, w próbówce. Zwrócono uwagę na

reszty między 24 a 27 aminokwasem zdolne do formowania struktury przeciwrównoległej typu płaszczyzny beta (β -sheet), zwanej także strukturą harmonijkową czy pofałdowanej kartki. Było to potwierdzenie istotnej roli tego fragmentu polipeptydu w procesie formowania fibryli [4,45].

Przypadek formowania fibryli przez amylinę królika i zająca, ale wyłącznie w warunkach *in vitro*, przy braku identyfikowalnych depozytów amyloidu w organizmie tych zwierząt, także wydawał się mieć związek z sekwencją aminokwasową 20-29 peptydu [10]. Zbadano syntetyczną sekwencję 20-29, będącą odpowiednikiem polipeptydu obu gatunków. Stwierdzono, że w warunkach *in vitro* fragment ten formuje fibryle, przypominające pokrojem fibryle hA. Choć formowane fibryle cechowało wyraźne powinowactwo do barwnika fibryli, tj. czerwieni Kongo, to jednak zachowano ostrożność i określono je jako „podobne do amyloidu” (amyloid like fibrils). Wydaje się, że u badanych zwierząt, stężenie polipeptydu w komórce jest zbyt niskie do formowania fibryli, a to chroni je przed skutkami zdolności do fibrylacji, ujawnianej *in vitro* i odkładaniem depozytów w komórkach trzustki zwierząt.

Stwierdzono zatem, że w warunkach *in vitro* syntetyczne peptydy amyliny zwierząt, sąsiadujące z regionem 20-29 hA, także formowały fibryle oraz że syntetyczny peptyd odpowiadający peptydowi, który nie fibryluje w warunkach *in vivo*, potrafi formować fibryle także *in vitro*. Udowodniono, że dziesięć aminokwasów domeny centralnej hA wystarcza do uformowania fibryli, ale o nieco odmiennej strukturze niż fibryle pełnego polipeptydu.

Praca, niejako wieńcząca studia nad fibrylacją domeny centralnej 20-29 hA, dotyczyła analizy porównawczej zdolności fibrylacyjnej całego polipeptydu i dwóch jego fragmentów. Zbadano aspekty dynamiki i morfologii formowania fibryli. Analizie poddano cały polipeptyd (1-37), odpowiadający polipeptydowi ludzkiemu (hA1-37) oraz fragment umiejscowiony między aminokwasem 8 a 37 (hA8-37), celowo pomijając pierwsze siedem N-końcowych aminokwasów budujących amylinę, gdyż wydawało się, że ten krótki początkowy odcinek pozostaje bez wpływu na różnorodność formowanych fibryli [16].

Tak więc, zmiany konformacyjne struktury drugorzędowej, związane z tworzeniem fibryli, następują bardzo szybko i dotyczą zarówno całego polipeptydu hA1-37, jak i fragmentu hA 8-37. Analiza techniką dichroizmu kołowego (circular dichroism, CD) wykazała, że początkowa struktura amyliny typu kłębka (random coil), przybiera następnie formę β -sheet i α -helisy. Także w badaniu z markerem procesu fibrylogenezy, tj. tioflawiną T (thioflavine T, ThT) zarówno fragment 8-37, jak i hA1-37 wykazywały podobne fazy fibrylacji, choć o nieco różnych parametrach. Także wygląd tworzonych fibryli w mikroskopie elektronowym (electron microscopy, EM) wskazywał, że fragment 8-37, podobnie jak pełny poli-

peptyd, cechowało podobieństwo morfologiczne, a także że fibrylarne skupiska zbudowane były z protofibryli.

Wprawdzie potwierdzono, że dziesięć aminokwasów tworzących odcinek 20-29 hA wystarczy do powstania fibryli, to jednak zwrócono uwagę, że pozostałe segmenty polipeptydu, otaczające część rdzeniową, wyraźnie wpływają na sposób fibrylacji, co rzutuje na ostateczny wygląd fibryli, które były wysoce polimorficzne.

Wyniki wstępnych badań pozwalały przypuszczać, że ustalono domenę krytyczną dla fibrylacji amyliny. Wiadomo było, że sama struktura sekwencyjna tego regionu, będąca ważnym czynnikiem determinującym proces fibrylacji, nie wystarcza jednak do nadania polipeptydowi – lub jego fragmentowi – tej cechy. Dobrze ilustruje tę sytuację to, że amylin psa nie fibryluje i u zdrowego zwierzęcia złogi amyloidu nie powstają. Może to zaskakiwać, gdyż sekwencja aminokwasów amyliny w obszarze 20-29 u psa jest identyczna z sekwencją amyliny u kota i u człowieka, u których złogi amyloidu są obecne. Co więcej, u psów amylinę odnaleziono w złogach amyloidowych odkładanych w obrębie nowotworu trzustki typu insulinoma. Nowotwór ten to wyspiak wydodający się z komórek beta trzustki, który z powodu sekrecji nadmiernych ilości insuliny klasyfikowany jest jako funkcjonalny guz endokrynną trzustki. Ponadto w toku analizy histologicznej wykazano, że amyloid w guzach psa reagował z przeciwciałami skierowanymi przeciwko syntetycznemu fragmentowi 7-17 polipeptydu ludzkiego. Istniejące podobieństwo sekwencji aminokwasowej amyliny psa i człowieka sprawia, że peptyd ten w pewnych, nietypowych warunkach, jakie stwarza odmienne środowisko nowotworu trzustki, może być wprowadzony na szlak fibrylacji. Podniesiony poziom polipeptydu w komórkach nowotworu psa może mieć dwie przyczyny: albo jest nią nadmierne wytwarzanie polipeptydu, albo jego zaburzony katabolizm. Podobny mechanizm występuje u kota, u którego podniesiony poziom polipeptydu odpowiada za jego skłonność do fibrylacji [26].

Przykład ten ilustruje to, że dla procesu fibrylacji – oprócz cech własnych polipeptydu czy białka, takich jak sekwencja aminokwasowa, istotne znaczenie mają szeroko rozumiane, ale nierozpoznane czynniki zewnętrzne w komórce czy w organizmie, nadające białku nowe cechy bądź stwarzające w jego otoczeniu (komórce) nowe, inne parametry biochemiczne – profibrylotwórcze.

Inne regiony fibrylogenne amyliny – obszary spoza fragmentu 20-29

Wiadomo było, że odcinek amyliny między 20-29 aminokwasem jest niezwykle ważny dla formowania fibryli. Nasuwały się jednak pytania: czy region 20-29 obejmuje pełną sekwencję aminokwasową, wymaganą do fibrylacji polipeptydu oraz czy jest to jedyna sekwencja odpowiedzialna za taką zdolność amyliny.

Odrębny rodzaj pytań dotyczył warunków środowiska w jakich fibryle powstawały.

Szukając odpowiedzi skoncentrowano się na sekwencjach amyliny, związanych z sekwencjami peptydów odnajdywanych w trzustce, w surowicy krwi i w komórkach układu pokarmowego człowieka. Były to fragmenty: umiejscowiony między 24 a 37 aminokwasem (24-37) i drugi między resztami 17 a 37 (17-37) amyliny. W ten sposób przełamano schematyczne podejście do regionu centralnego 20-29, jako jednego i jedynego fibrylotwórczego w cząsteczce amyliny [34].

Skonstruowano peptydowe warianty, w których badano wpływ aminokwasów otaczających segment 20-29 od C końca, tj. zbadano wersję polipeptydu zawierającą dodatkowe trzy aminokwasy (wariant 17-37) oraz wersję, w której zawężono odcinek centralny pomniejszając jego C-koniec o 4 pierwsze aminokwasy (wariant 24-37). Już wcześniej uznawano je za istotne dla procesu fibrylacji. Jednocześnie w obu wariantach przesunięto górne ramy poza 29 aminokwas, pozostawiając wszystkie aminokwasy do 37, tak jak w peptydach odnajdywanych *in vivo*. Warunki eksperymentów dobrano tak, by odpowiadały parametrom fizjologicznym *in vivo*, tzn.: pH granul sekrecyjnych komórek beta trzustki (pH 5,5) i przestrzeni pozakomórkowej w komórkach beta (pH 7). Dlatego też wszystkie badane peptydy badano w formie protonowanej i nieprotonowanej, jako monomery niezestrukturalizowane, o czym świadczyły otrzymane widma CD. Formowane depozyty zbadano techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (transmission electron microscopy; TEM), a także techniką spektroskopii w podczerwieni (fourier transform infrared spectroscopy, FTIR). Uzyskany obraz odpowiadał typowemu dla fibryli obrazowi widm przypisanych strukturalizowanym β -sheet. W obrazie TEM rzadko obserwowano pojedyncze protofibryle. Głównie widoczne były ich skupiska formujące struktury, przypominające sznury/liny („rope”-like), a także depozyty stanowiące produkt fibrylacji bocznej. Pewne kłopoty interpretacyjne obserwowanych depozytów sprawiły testy z czerwienią Kongo. Zaobserwowane osłabienie typowej zielono-żółtej barwy, świadczące o cesze dwójłomności depozytów sprawiło, że zastanawiano się czy można je traktować jako spełniające wszystkie kryteria fibryli. Zwrócono jednak uwagę, że pozytywna reakcja z tym barwnikiem przypisywana jest depozytom powstającym *in vivo*, a w warunkach eksperymentalnych *in vitro*, dla układów ze sztucznymi, syntetycznymi peptydami, nie doczekała się odpowiedniej standaryzacji. Wszystkie pozostałe zbadane cechy formowanych depozytów pozwoliły uznać je za fibryle. Udowodniono tym samym, że inne aminokwasowe wersje domeny centralnej także formują fibryle [34].

Czy cały odcinek 20-29 jest wymagany w procesie formowania fibryli?

W kolejnych badaniach zawężono o 4 aminokwasy odcinek domeny centralnej i zbadano fragment 24-29

hA, który nie zawiera reszt aminokwasów aromatycznych. Analiza peptydu w dwóch wariantach: z wolnym i z acetylowanym N-końcem, tj. w różnym środowisku otaczającym N-końcowy aminokwas ujawniła ogromne znaczenie modyfikacji np. acetylacji dla procesu fibrylacji. Zastosowany jon parujący, przypuszczalnie łącząc się z pozytywnym ładunkiem N-końcowego aminokwasu, eliminuje jego wpływ na proces fibrylogenezy. Acetylacja N-końcowego aminokwasu prowadziła jednak do istotnych zmian w zachowaniu tego odcinka. Wydaje się, że podnosiła znacząco stopień uporządkowania depozytów, nadając im zdolność do formowania zróżnicowanych morfologicznie agregatów, ale o cechach jedynie przypominających fibryle (amyloid-like fibrils). W obrazie TEM nie były to jednak typowe fibryle. Można było zatem przypuszczać, że odcinek amyliny obejmujący resztę 20-23 nie jest konieczny dla procesu fibrylacji.

Choć nie znaleziono wówczas precyzyjnej odpowiedzi na pytanie: który element nadaje badanym fragmentom cechę fibrylogenności, to jednak zawężono obszar poszukiwań krytycznych dla tego procesu sekwencji aminokwasowych. Ponadto stwierdzono, że nawet niewielkie zmiany w warunkach eksperymentalnych okazały się niezwykle istotne – znacząco wpływały na wynik końcowy badań. Autorzy odnieśli się także do wyników innych eksperymentów, które różniąc się tylko drobnymi detalami warunków eksperymentalnych, prowadziły do odmiennych rezultatów, a w związku z tym i wniosków. Stało się pewne, że należy zachować daleko idącą ostrożność przy interpretacji otrzymanych wyników, które choć pozornie oczywiste – zawsze jednak mogą mieć ukryte w sobie pułapki metodyczne. Otrzymane depozyty nie były bowiem typowymi fibrylami [34].

Czy inne fragmenty amyliny także mogą formować fibryle?

Pierwsze opublikowane doniesienie o fibrylacji peptydu zawierającego sekwencje spoza regionu centralnego amyliny obejmowało obszar zlokalizowany między 30 a 37 aminokwasem w odpowiedniku polipeptydu ludzkiego [34]. Ośmioaminokwasowy peptyd 30-37, badany w roztworze techniką FTIR, wykazywał cechy struktury typu kłębek (random coil), ale depozyty formowane przez ten peptyd, w badaniu techniką TEM, były już identyfikowane morfologicznie jako klasyczne fibryle, z cechą dwójłomności w teście z czerwienią Kongo. Po raz pierwszy eksperymentalnie podważono dominującą rolę regionu centralnego 20-29 w procesie fibrylacji amyliny, a cecha ta stała się także atrybutem zupełnie innej domeny polipeptydu.

Okazało się, że nie jeden, ale dwa amyloidogenne peptydy, tj. krótsza wersja peptydu centralnego, między 24 a 29 aminokwasem i drugi odcinek, tzn. 30-37, także nadają cząsteczce amyliny tę cechę. Choć formowane fibryle mają podobną strukturę (podobny sygnał CD), to jednak typ obserwowanej fibrylacji i pokrój tworzonych fibryli są nieco odmienne w obu przypadkach. Sekwen-

cje aminokwasowe obu regionów warunkują zdolność do formowania fibryli, ale wpływają na ich strukturę i sposób uporządkowania depozytów. Jak wykazano, regiony te mogą działać niezależnie od siebie i, nie umniejszając znaczenia każdego z nich, odgrywać rolę w formowaniu struktur II, wyższego rzędu. Wykazano tym samym, że w warunkach *in vitro*, nowy zbadany region 30-37 jest również ważny w procesie fibrylacji. Pozostało jednak pytanie o to, czy w warunkach *in vivo* w pełnym, nienaruszonym polipeptydzie rola tych regionów w procesie fibrylacji jest podobnej „mocy”? Inną kwestią było pytanie o to, co jest bardziej istotne dla wprowadzenia natywnego białka czy polipeptydu na szlak fibrylacji: czy istotna jest sekwencja aminokwasowa, jej ułożenie w cząsteczce, czy też warunki środowiska, w jakich proces jest wyzwalany. Wydaje się, że w przypadku amyliny, przynajmniej dla dwóch zbadanych fizjologicznych wartości pH 5,5 i 7,4, jako czynników środowiskowych, ten element nie odgrywa znaczącej roli [34].

Najkrótszy fragment amyliny zdolny do fibrylacji

Inne prace badawcze skoncentrowały się na poszukiwaniu najkrótszego, zdolnego do fibrylacji fragmentu hA. Typowy, rdzeniowy deka-peptyd 20-29 skracano kolejno do odcinków między 20 a 27, 22 a 27, 23 a 27 i wreszcie 24 a 27 aminokwasem. Zsyntetyzowane peptydy, różniące się zaledwie jednym aminokwasem, zachowywały się w sposób bardzo zróżnicowany, gdyż albo w ogóle nie formowały struktur uporządkowanych, budując jedynie depozyty amorficzne albo całkowicie różniące się od siebie struktury fibrylarne. Te ostatnie były różnorodne i odmienne pod względem: typu fibrylacji, morfologii formowanych fibryli, rozmiaru cząstek i wreszcie cytotoksyczności. Pentapeptyd (sekwencja 23-27, FGAIL) tworzył stosunkowo długie (3 μM) i bardzo szerokie (300 nm) twory, przypominające – z powodu asocjacji bocznej – raczej wstęgi (ribbon-like), zbudowane z pęków lub przynajmniej dwóch filamentów. Wykazywał jednak dodatni test z czerwieni Kongo, a w badaniu techniką FTIR widmo struktury typu β -sheet co znaczyło, że były to nieco odmienne, ale jednak fibryle [42].

Pentapeptyd był najkrótszym fragmentem zdolnym do formowania fibryli, ale i heksapeptyd (sekwencja 22-27, NFGAIL), różniący się obecnością dodatkowej końcowej reszty asparaginy (Asn22), także formował fibryle i to o cechach uznanych za najbardziej typowe. Nie były to wstęgi, ale wyłącznie skręcające się wokół siebie klasyczne fibryle, z zachowaną periodycznością skrętu, które w teście z czerwieni Kongo ujawniały wyraźną zielono-złotą dwójłomność, a w badaniu techniką FTIR klasyczne widmo struktury typu β -sheet. Najkrótszy odcinek, tj. tetrapeptyd (sekwencja 24-27, GAIL), w roztworze pozostawał wyłącznie w postaci rozpuszczalnej i tracił zdolność formowania fibryli. W badaniu techniką FTIR ujawniał widmo typowe dla formy kłębka (random coil).

Wykazano, że w przypadku syntetycznych peptydów amyliny, granicę formowania depozytów o cechach

fibryli, wyznacza reszta pięcioaminokwasowa. Tylko pięć aminokwasów potrzeba, aby pojawiły się agregaty pod każdym względem spełniające definicję klasycznych fibryli. W ten sposób autorom udało się obniżyć liczbę niezbędnych do fibrylacji aminokwasów, która wcześniej wynosiła osiem, i określić przypuszczalnie ważną dla fibrylacji sekwencję fibrylujących aminokwasów, którą jest peptyd FGAIL. Dalsze skracanie badanego peptydu powoduje utratę zdolności do formowania fibryli [42].

Postawiono w ten sposób kolejne pytanie: czy ten skrócony odcinek, w porównaniu do sekwencji 20-29, to rzeczywiście właściwa sekwencja typu rdzeniowego amyliny? Dlatego też poszukując najkrótszego fibrylującego fragmentu hA, zbadano oddziaływania między pełnym 37-aminokwasowym syntetycznym polipeptydem, a kolejnymi syntetycznymi deka-peptydami amyliny, których skład aminokwasowy obejmuje całą cząsteczkę peptydu [31]. W ten sposób zidentyfikowano główną domenę molekularną amyliny, mającą duże powinowactwo do skonstruowanych deka-peptydów. Najsilniejsze wiązanie krótkiego peptydu do pełnej 37-aminokwasowej amyliny cechuje 10-aminokwasowy fragment należący do N-końca, ulokowany między aminokwasem 11 a 20, tj. sekwencja RLANFLVHSS. W jego obrębie zidentyfikowano minimalną aktywną jednostkę, zdolną do samoasocjacji polipeptydu (self-association), a następnie do uczestniczenia w formowaniu fibryli. Jest nią penta-peptyd NFLVH, umiejscowiony między 14 a 18 aminokwasem amyliny, któremu można przypisać rolę rdzenia w rozpoznaniu molekularnym.

Ten krótki peptyd formuje cienkie, długie nici, które można określić terminem protofilamentów. Drugi rozpoznany penta-peptyd to odcinek FLVHS, jest umiejscowiony między aminokwasami 15 a 19 i podobnie jak pierwszy wymieniony penta-peptyd, także i ten, wykazywał dodatni test dwójłomności. Formował odmienny typ długich szerokich wstęg, których nie można było jednak traktować jak klasyczne fibryle. Zwrócono także uwagę na podobieństwo opisanych struktur do formowanych przez penta-peptyd o sekwencji FGAIL, ale umiejscowionej w obrębie domeny centralnej, tj. między 23 a 27 aminokwasem [31,42].

Wydaje się, że granicę skracania badanych peptydów narzuca ich zdolność fibrylotwórcza. Wyznacza ją tetra-peptyd FLVH, który nie wykazuje jednak cech przypisywanych fibrylującym penta-peptydom i tworzy jedynie amorficzne agregaty. Ponadto, określając najkrótsze fibrylujące fragmenty, wkroczonego w obszar dotychczas nieco pomijanej N-końcowej domeny amyliny, a tym samym postawiono kolejne pytania badawcze, a dotyczyły C-końcowej domeny początkowej peptydu [31].

Domena początkowa 1-19 amyliny szczura i człowieka

Połowię cząsteczki amyliny, tj. resztom między 20 a 37 aminokwasem przypisano zdolność do formowa-

nia fibryli. Zrodziło się zatem pytanie o to, czy w swej strukturze, mała cząsteczka amyliny, kryje w sobie jeszcze inne odcinki nadające polipeptydowi taką cechę? Do zbadania pozostał nieco „zapomniany” region C-końcowy amyliny, tj. między aminokwasem 1 a 19. Zadano zatem pytanie: jaką rolę pełni ta domena i jakie cechy ją charakteryzują?

Okazało się, że ten zapomniany region krył w sobie dwie tajemnice. Pierwsza to to, że w obrębie tak wszechstronnie badanej cząsteczki hA kryje się dodatkowy, inny niż do tej pory ujawniony, region o właściwości formowania klasycznych fibryli. Druga, to niezmiernie interesujący fakt ujawnienia w obrębie cząsteczki niefibrylującej rA, sekwencji mającej taką cechę [21].

Zbadano zatem cały polipeptyd oraz kilka syntetycznych fragmentów fibrylującej hA i niefibrylującej rA. Zastosowano warunki początkowe, w których zarówno cały polipeptyd, jak i jego fragmenty, pozostawały w postaci kłęбка, co wskazuje na stan monomeryczny cząsteczki. Jednak w miarę upływu czasu, w zależności od badanego fragmentu amyliny, czyli od jego składu aminokwasowego, poszczególne badane odcinki ujawniały różne cechy i formowały różne struktury wyższego rzędu lub ich w ogóle nie tworzyły.

Obszar początkowy N-końca, tj. odcinek 1-13 w ogóle nie formował żadnych agregatów. Natomiast fragment z wyeliminowanymi pierwszymi aminokwasami, umiejscowiony między 8 a 20 aminokwasem, w wersji odpowiadającej hA i rA, w badaniu techniką FTIR, ujawnił podobne do siebie widma o cechach odpowiadających klasycznej strukturze β -sheet. Po raz pierwszy stworzono układ eksperymentalny, w którym „zmuszono” do fibrylacji, przynajmniej fragment, niefibrylującej rA. Aby potwierdzić ten nowo odkryty potencjał cząsteczki amyliny, zbadano fragment 8-20 techniką dyfrakcji promieni X (X-ray diffraction), której wyniki dają niepodważalny dowód obecności struktur fibrylarnych. Obraz uzyskanych dyfraktogramów jednoznacznie wskazywał na obecność tzw. struktury cross- β , charakteryzującej klasyczne fibryle [21,28].

Ważnym wynikiem było ujawnienie, iż niefibrylująca cząsteczka rA zawiera jednak sekwencje zdolne do fibrylacji. W polipeptydzie szczura są one jednak skutecznie maskowane przez pozostałe aminokwasy, gdyż pełny polipeptyd nie fibryluje. Wynik ten był niezwykle istotny, gdyż badany odcinek stanowił fragment oddzielony od pełnej cząsteczki rA. Był to niezbitý dowód na to, że przy interpretacji wyników, prowadząc jakiegokolwiek analizy, należało na ten istotny fakt zwracać szczególną uwagę [21].

Wyniki prac wskazują, że N-końcowy odcinek amyliny 1-19 odpowiada za początkowe wiązanie peptydu z błoną komórkową na zasadzie wiązań elektrostatycznych, a następnie za wbudowanie go w struktury błony komórkowej, co ostatecznie prowadzi do uszkodzenia

błony. Odcinek 1-19 niefibrylującej rA, podobnie jak peptyd hA, także może zostać wbudowany w strukturę błony komórkowej lub dwuwarstwy lipidowej, ale cechuje go mniejsze powinowactwo do błony komórkowej od peptydu ludzkiego. Interakcje międzypeptydowe (peptyd-peptyd), sprzyjają formowaniu struktur helikalnych, natomiast oddziaływania peptydu z błoną (peptyd-błona) preferują formowanie struktur niehelikalnych. Dlatego też, po wbudowaniu do błony, peptyd ludzki cechuje wyższy stopień formowania struktur helikalnych niż peptyd szczura, co najprawdopodobniej jest uwarunkowane słabszymi oddziaływaniami peptydu z błoną od silniejszych wzajemnych oddziaływań między peptydami. Natomiast peptyd szczura cechują silniejsze interakcje z błoną, co osłabia oddziaływania międzypeptydowe [18].

Poszukiwania domeny krytycznej dla procesu fibrylacji amyliny ludzkiej

Jedynie sześć aminokwasów, z których pięć leży w obrębie regionu 20-29 cząsteczki rA, różni ją od polipeptydu ludzkiego. Istotne wydają się trzy reszty proliny umiejscowione w pozycjach: 25, 28 i 29 rA. Pozostałe aminokwasy różniące polipeptyd szczura i ludzki są w pozycjach 18 – histydyna, 23 – fenyloalanina i 26 – izoleucyna. W hA substitucja tych aminokwasów odpowiednio przez: argininę, leucynę i walinę wydaje się mieć krytyczne znaczenie dla właściwości cząsteczki. Brak cechy zdolności tworzenia fibryli przez polipeptyd szczura jest łączony właśnie z obecnością trzech reszt proliny w centralnym, 10-aminokwasowym regionie, między resztami 20-29. Postawiono zatem wiele kolejnych pytań o rolę proliny w procesie fibrylacji.

Dlaczego właśnie prolina wzbudziła tak dużo emocji?

Prolina (kwas pirolidyno-2-karboksylowy) – niepoprawnie nazywana iminokwasem – jest drugorzędową aminą, a nie aminokwasem, co oznacza, że zawiera drugorzędową grupę NH-, a nie jak w klasycznym aminokwasie pierwszorzędową NH₂-. Jest to amina szczególna, gdyż nie może funkcjonować jako donor, lecz jako akceptor w wiązaniu wodorowym. Brak atomu wodoru powoduje, że niedobór tego protonu, wymaganego do formowania wiązania wodorowego sprawia, że po wytworzeniu wiązań peptydowych nie jest zdolna do formowania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Łańcuch boczny proliny wiąże się z węglem alfa i z grupą aminową tworząc strukturę cykliczną, która ma charakter niepolarny. Oznacza to, że w przypadku proliny atom azotu jest wbudowany w pierścień heterocykliczny, co uniemożliwia obrót wokół wiązania węgiel-azot. Dlatego też, w porównaniu do innych aminokwasów, jest strukturą o niezwyklej sztywności cząsteczki z mniejszą liczbą dozwolonych stopni rotacji, a to nadaje jej szczególną rolę w budowie białek. Tak właśnie jest w przypadku struktur typu β -sheet i dlatego też prolina często lokuje się na krańcach tych struktur. Obecność reszt pro-

liny w niektórych peptydach antybakteryjnych uniemożliwia im głębsze umiejscowienie się w obrębie błony komórkowej i sprawia, że możliwa jest tylko częściowa ich insercja do błony. Prolina wewnątrz łańcucha, pełni rolę elementu zaburzającego jego strukturę. Zaskakujące jest to, że mimo posiadania alifatycznego łańcucha bocznego, właśnie prolina eksponowana jest często na kontakt z rozpuszczalnikiem. Dlatego też możliwe staje się załamanie struktury białka i stąd aminokwas ten postrzegany jest jako łamacz struktur helixu i jako czynnik niszczący strukturę fibryli [20,28,39].

Czy w amylinie szczura prolina odgrywa szczególną rolę?

Czy reszty proliny, wprowadzone do cząsteczki hA w pozycjach zajętych przez ten aminokwas w cząsteczce rA, są niezbędne do zahamowania zdolności do formowania fibryli przez ten polipeptyd? Czy są to pozycje uprzywilejowane?

Badaniu poddano fragment centralny 20-29 hA (fragment dziki) oraz 10 wariantów tego polipeptydu. W jego obrębie dokonano pojedynczych substitucji proliny i wprowadzenia tego aminokwasu we wszystkie możliwe pozycje. Każdy z peptydów poddano analizie i porównano z wynikami dla polipeptydu dzikiego. Eksperyment potwierdził rolę znanej domeny, umiejscowionej między resztami 20-29, ale także zawęził jej ramy do reszt między 22 a 28 aminokwasem. Wskazano na istotną rolę substitucji aminokwasów w pozycjach 22 (asparagina), 24 (glicyna) i 26-28 (alanina, izoleucyna, leucyna). Wymienione pozycje uznano za kluczowe dla procesu formowania fibryli. Skutkiem substitucji tych pojedynczych aminokwasów prolina było formowanie depozytów bezstrukturalnych, amorficznych, o obrazie całkowicie odmiennym od obrazu klasycznych fibryli (badanie techniką TEM). Mniej istotne dla procesu formowania fibryli wydały się substitucje w pozycji 23 i 25. Za pozostające bez wpływu na wygląd formowanych fibryli uznano substitucje w pozycjach: 20, 21 i 29. Nie zaobserwowano istotnego zahamowania czy obniżenia zdolności do formowania fibryli przez badane fragmenty amyliny, w których dokonano pojedynczych substitucji prolina [32].

Uznano, że depozyty formowane przez krótsze niż pełny polipeptyd mają fragmenty mniej stabilne. Jednocześnie zauważono niezwykle istotną rolę parametrów prowadzonych eksperymentów. Wpływ na charakter, tempo i kształt formowanych depozytów – czy to fibryli, czy agregatów amorficznych, miały czynniki, takie jak np. pH, rozpuszczalniki, czas trwania ekspozycji, co było istotne dla interpretacji i analiz porównawczych prowadzonych badań [32].

W innych pracach sprawdzono i oceniono rolę proliny jako destabilizatora cząsteczki amyliny w procesie fibrylacji. Skonstruowano odpowiednik fragmentu hA, w którym, podobnie jak w rA, były trzy reszty proliny, ale ułożone odmiennie niż w cząsteczce rA czy amyliny

myszy. Do badań wybrano odcinek hA, odpowiadający aminokwasom w pozycji 8-37 (określony jako fragment dziki) [1]. Wiedzano już, że fragment ten zdolny był do formowania klasycznych fibryli, podobnych do fibryli formowanych przez pełny, tj. 37-aminokwasowy polipeptyd [16].

W tym przypadku, substytucji proliny dokonano jednocześnie w trzech miejscach, ale ułożono je poza obszarem centralnym, tj. w pozycjach 17 (walina), 19 (seryna) i 30 (treonina) tworząc fragment 8-37-3xP. Wybór pozycji 17 a nie 18 (18 aminokwas to histydylna) argumentowano koniecznością zachowania potencjalnie istotnych dla formowanych struktur wyższego rzędu, interakcji elektrostatycznych uwarunkowanych obecnością tego aminokwasu. Reszta z numerem 17 leży najbliżej kolejnego „podmienionego” aminokwasu poddanego oddziaływaniom histydylny. Badania przeprowadzono w różnych pH, tj. 7,4 (zewnętrzkomórkowe), a także – ze względów metodycznych – w pH 4 i 9 [1].

Stwierdzono, że obecność trzech reszt proliny, wprowadzonych jednocześnie do fragmentu hA, osłabia wiązanie ThT do formowanych struktur w porównaniu do wiązania ThT przez fibryle fragmentu dzikiego. Sugeruje to zaburzenie uporządkowanej struktury tego regionu, mimo obecności proliny poza obszarem centralnym. Metodami: FTIR, TEM i testem barwienia depozytów czerwienią Kongo potwierdzono te przypuszczenia.

Zdolność do formowania przez fragment 8-37-3xP wyższych struktur była znacząco osłabiona i wyrażała się obecnością depozytów niepodobnych do klasycznych fibryli, a formowanych przez fragment dziki. Nie wykazywały one cechy dwójłomności w teście z czerwienią Kongo, a także analiza widm CD fragmentu 8-37-3xP, wykonanych po 72 godzinach inkubacji, ujawniła formowanie struktur mniej stabilnych typu kłębka (random coil). Widmo tych struktur znacząco odbiegało od klasycznych widm fragmentu dzikiego. Stwierdzono, że tendencja do formowania spontanicznych fibryli przez badany fragment z trzema prolinami, ale wprowadzonymi poza obszarem rdzenia (20-29), była znacząco osłabiona. Wydaje się, że wprowadzone reszty proliny nadały cząsteczce cechę niekompatybilności w obrębie formowanych fibryli i stąd zaburzenie w ich formowaniu. Dopuszczono jednak także interferencje na etapie nukleacji, polegającą na utrzymaniu cząsteczki w obrębie regionu z inkorporowaną proliną, w stanie określonym jako natywnie niepofałdowany (natively unfolded).

Substytucja proliną, trzech aminokwasów poza obrębem „amyloidotwórczym” amylin dokonana została w izolowanym fragmencie badanego polipeptydu. Mimo to dowiodła, że obszar 20-29 nie jest jedynym obszarem odpowiedzialnym za cechę fibrylotwórczości. Badania te potwierdziły rolę i znaczenie proliny w procesie formowania fibryli, ale uświadomiły też, że nie należy tej cechy przypisywać jedynie do centralnego obszaru amyliny, umiejscowionego między 20 a 29 aminokwasem [1,40].

Czy niefibrylującej cząsteczce amyliny szczura można nadać cechy polipeptydu ludzkiego?

Kolejnym pytaniem, które budziło jednak największe emocje była kwestia: czy niefibrylującej cząsteczce rA można nadać cechy polipeptydu ludzkiego? Region centralny, uznawany dotychczas za główny, odpowiedzialny za tworzenie fibryli przez cząsteczki hA, tracił swoją dominującą pozycję, a wyniki następnych badań podważały taką rolę peptydu centralnego 20-29. Wiedzano, że peptydy 8-20, 30-37 również formują fibryle [21,33]. Ponadto wiedzano, że substytucje proliną aminokwasów w obrębie syntetycznego odpowiednika rdzeniowej reszty (20-29) hA wpływają na proces fibrylacji. Substytucja 28 aminokwasu (seryna) przez prolinę znacząco hamowała formowanie fibryli, natomiast substytucje w pozycjach 25 (alanina) i 29 (seryna) – jedynie osłabiała tę cechę, choć w mniejszym stopniu niż substytucja w pozycji 28. Obecność proliny w cząsteczce syntetycznego odpowiednika hA, przybliżająca strukturalnie polipeptyd ludzki do niefibrylującej rA, jest warunkiem koniecznym, ale niewystarczającym do zniesienia zdolności do fibrylacji tego odcinka. Eksperymenty w obrębie wyizolowanego regionu centralnego 20-29 hA, polegające na substytucji aminokwasów resztami proliny w pozycjach 25, 28 i 29 (pojedynczo lub trzema na raz) spowodowały jedynie osłabienie formowania fibryli, ale cechy tej nie zniosły całkowicie [32].

Aby odpowiedzieć na pytanie: co jeszcze warunkuje zdolność do formowania fibryli przez hA, zaproponowano eksperyment zmierzający w kierunku „odwrotnym” niż dotychczasowe prace, tj. postanowiono nadać niefibrylującej cząsteczce rA cechy polipeptydu ludzkiego. Zaproponowano zbadanie pełnego wariantu rA (rA1-37) z zachowanymi resztami proliny, ale zamienionymi trzema innymi aminokwasami, różniącymi cząsteczki polipeptydu szczura i człowieka. Wyniki eksperymentu spełniły oczekiwania, gdyż substytucja powyższych aminokwasów w cząsteczce rA aminokwasami będącymi odpowiednikami w ludzkim polipeptydzie, nadała niefibrylującej cząsteczce rA cechę tworzenia fibryli [17].

W cząsteczce rA szczura zamieniono trzy typowe dla szczura aminokwasy („rat specific”), ale inne niż prolina, a mianowicie: R18H, L23L, V26I. Pojedyncze substytucje aminokwasów w pełnej wersji polipeptydu szczura wystarczają do nadania utworzonemu wariantom substytucyjnym kompetencji fibrylotwórczych. Istotne było to, że obserwowane fibryle były formowane przez pełen polipeptyd, a nie mniejsze produkty jego trawienia. Wprowadzenie ludzkich aminokwasów do rA z pewnością promowało formowanie fibryli przez zmienioną cząsteczkę amyliny, choć cecha ta była znacząco mniej intensywnie wyrażona niż w przypadku hA.

Wydaje się, że to obecność proliny w cząsteczce rA sprawia, że mimo wprowadzenia do niej trzech aminokwasów swoistych dla polipeptydu człowieka, polipeptyd ten w teście z ThT zachowuje się podobnie jak niezmieniony

polipeptyd szczura, wykazując zaledwie niewielki wzrost inkorporacji znacznika, nieprzekraczający w zasadzie poziomu inkorporacji do rA. Znaczące nasilenie formowania fibryli przez polipeptyd szczura zaobserwowano po wprowadzeniu w miejsca zajmowane przez prolinę aminokwasów hA.

Zbadano, ale bez stosowania rozpuszczalników organicznych, 37-aminokwasowy peptyd człowieka i szczura, a także jego fragment między 17 a 29 aminokwasem, w którym znajduje się sześć aminokwasów, różniących fibrylującą hA i niefibrylującą rA. Okazało się, że w tych warunkach, wszystkie badane peptydy nie formowały typowych struktur typu β -sheet, ale mimo to były toksyczne dla wybranych do badań komórek nowotworu typu insulinoma RIN-M i INS-1 [43]. Wyniki przytoczonych badań stawiają kolejne pytanie o to, czy struktura ta jest niezbędna dla toksyczności amyliny. Należy jednak podkreślić, że fragment 17-29 hA czy rA zawiera w sobie przynajmniej część sekwencji peptydu (8-20), która u obu gatunków formowała fibryle, choć w przypadku niefibrylującej rA odcinek ten niejako „zmuszony” został do fibrylacji warunkami eksperymentu *in vitro*. Trudno wykluczyć, że oba peptydy, czy ich fibrylogenny fragment, nie tworzą cytotoksycznych form, ale jeszcze nieuchwytnych stosowanymi metodami detekcji. Jeszcze innym problemem jest dobór badanych komórek – nowotworu typu insulinoma.

INTERAKCJE HA A RA

Ważne stały się także oddziaływania niefibrylującej rA i fibrylującej hA. Zbadano wpływ rA na proces formowania fibryli przez hA. Okazało się, że polipeptyd szczura dodany do roztworu hA, wpływa hamująco na proces formowania fibryli przez polipeptyd ludzki: spowalnia go, zmienia wygląd morfologiczny formowanych fibryli i zmniejsza ich ilość, a inhibicja ta przebiega zależnie od stężenia rA. Przypuszcza się, że przyczyną tego zjawiska, są różnice w formowanych przez oba polipeptydy oligomerach, tzw. intermediatach helikalnych [7].

Istotne są także wyniki badań oddziaływań między hA i rA w czasie formowania fibryli w warunkach *in vitro*. Okazało się, że rA i hA wchodzi w interakcje i formują stabilne heterogenne struktury hybrydowe rA-hA, które funkcjonują w roztworze jako formy prekursorowe tworzących następnie fibryli. Stabilność hybrydowych fibryli jest większa niż stabilność homogennych fibryli utworzonych przez hA czy rA, co zapewniają oddziaływania hydrofobowe i wiązania wodorowe między C- i N-końcami struktur β -sheet obu peptydów. Obecność takich struktur w najmniejszych formowanych oligomerach sprawia, że tworzą one ziarna nukleacji, powodując wzrost fibryli. Formowane heterogenne struktury, w wyniku oddziaływań z monomeryczną formą niefibrylującą rA, powodują, że w jej cząsteczce następują zmiany konformacyjne, które sprzyjają zwiększonemu formowaniu struktur β -sheet [19,47].

Obecność rA w roztworze, w którym znajdowała się hA, tylko w początkowym stadium fibrylacji, wpływała na kinetykę formowania fibryli przez hA, gdyż wydłużaniu ulegały faza wstępna tzw. lag, jak i faza wzrostu fibryli.

Jednak ostatecznie, formowane fibryle były bardziej toksyczne niż fibryle formowane w środowisku bez rA. Co więcej, ziarna nukleacji utworzone przez hA, mogą wchodzić w interakcje z rA i mogą nawet wspomagać formowanie toksycznych fibryli hybrydowych [19].

MODYFIKACJE WOLNYCH KOŃCÓW AMYLINY I JEJ PEPTYDÓW A PROCES FIBRYLACJI

Okazało się, że nawet niewielkie modyfikacje, wprowadzone do pełnej cząsteczki amyliny, czy dokonane na jej C- lub N-końcu mają ogromny wpływ na właściwości fizyko-chemiczne i na zachowanie cząsteczki [2]. Amidacja C-końcowej reszty amyliny, którą jest tyrozyna, ma ogromny wpływ na proces jej szeroko rozumianej agregacji peptydu, w tym z jej fibrylacją, a także na formowane struktury. W przypadku hA C-końcowa amidacja sprawia, że peptyd fibryluje szybciej, ale formuje fibryle, które cechuje słabsza cytotoksyczność niż fibryle formowane przez peptyd z wolnym C-końcem. Wolne końce regionu centralnego 20-29 amyliny także mogą ulegać różnym modyfikacjom. I tak C-końcowe lub N-końcowe modyfikacje peptydu 20-29 hA, polegające na acetylacji, amidacji lub metylacji w różnych wariantach lub przy braku takiej modyfikacji na jednym z końców, prowadzą do formowania różnych rodzajów depozytów i o różnej morfologii np.: depozytów afibrylarnych, fibryli płaskich bądź fibryli ze skretem. Różna jest też kinetyka formowanych struktur [3].

ZAKOŃCZENIE

Przyjmuje się, że proces fibrylacji i ostatecznie zdolność do formowania amyloidu może dotyczyć w zasadzie wszystkich białek, a górną granicę fibrylujących aminokwasów całego białka wyznacza liczba 200, jak w przypadku apomioglobiny i masa około 20 000 [11,46]. Istotne wydaje się, że sekwencja rozpoczynająca proces fibrylacji powinna spełniać podstawowy warunek, a mianowicie natywnie niesfałdowane białko/peptyd (unfolded protein/peptide) powinno móc uformować w roztworze intermediały o strukturze helikalnej. Przypuszcza się, że to one odgrywają kluczową rolę w kierowaniu białka na szlak fibrylacji, w następstwie czego obserwuje się formowanie amyloidu.

W przypadku amyliny poszukiwania domeny odpowiedzialnej za fibrylację cząsteczki prowadzono w różnych kierunkach. Koncepcja jednej domeny centralnej, nadającej cząsteczce taką cechę, w miarę postępu badań ewoluowała. Domenę skracano o pewne liczby aminokwasów lub ją wydłużano, przesuwano jej zakres, zmieniając aminokwasowe otoczenie domeny, następnie prowadzono badania stosując metodę substytucji aminokwasowych w jej obrębie, a także rozszerzano obszar poszukiwań

na inne niż domena centralna regiony cząsteczki. Analizowano także N- i C-końcowe fragmenty polipeptydu. Poszukiwano też najkrótszej sekwencji, wystarczającej do samoasocjacji cząsteczek i najkrótszej do tworzenia fibryli.

Jak dotąd, nie zidentyfikowano jednak jednej, wspólnej dla fibrylujących fragmentów białka sekwencji aminokwasowej, tj. domeny wymaganej do rozpoczęcia procesu fibrylacji amyliny i/lub odpowiedzialnej za nadanie amylinie tej cechy. Być może taki jeden „rdzeń fibrylotwórczy” w ogóle nie istnieje, bo nie musi być zdefiniowany konkretną sekwencją aminokwasową. Być może proces fibrylacji ma charakter wysoce zindywidualizowany w tym sensie, że muszą być spełnione pewne warunki brzegowe dla wszystkich wymaganych czynników, w tym i czynników zewnętrznych, aby proces taki rozpoczął się. Dotyczy to zarówno warunków *in vitro*, czyli syntetycznych fragmentów lub pełnego polipeptydu, jak i warunków *in vivo*, czyli naturalnej amyliny w komórce. W tym ostatnim przypadku sytuacja komplikuje się z powodu narastającej liczby zmiennych badanego układu. Są one w zasadzie nie do określenia i przewidzenia. Wszystko co odnosi się do komórki jest jedynie przybliżonym opisem tego układu. Ostatecznym wyrazem różnie generowanego i różnie przebiegającego procesu asocjacji monomerów są formowane fibryle.

Jednak fibryle, choć z pozoru podobne, o wielu cechach wspólnych, to jednak są tworami wysoce różnorodnymi. Szeroko rozumiany polimorfizm tworzonej fibryli, typ ich formowania, szybkość powstawania itp. odzwierciedlają ten zindywidualizowany proces ich powstawania [48,49]. Są tworzone w konkretnym otoczeniu chemicznym, w konkretnych warunkach środowiska, czy to eksperymentu, czy komórki. Każdy z tych indywidualnych aktów tworzenia fibryli, niezależnie od położenia fibrylującej domeny białka, ma wspólny mianownik, którym jest istnienie takiej sekwencji aminokwasowej, na której środowisko wymusi zmiany konformacyjne, wprowadzające białko/peptyd na szlak fibrylacji. Można – i tak się też czyni – próbować określać w przybliżeniu z pewnym prawdopodobieństwem potencjał fibrylacyjny określonych sekwencji białka. Badania struktury białek w formie fibryli są trudne, a niekiedy wręcz niemożliwe do wykonania, zwłaszcza jeśli białko ulega gwałtownej fibrylacji, co uniemożliwia jego krystalizację [25]. To, że wykazano, iż mniejszy fragment polipeptydu, wyabstrahowany ze struktury całej cząsteczki, zdolny jest do wejścia na szlak fibrylacji, jest niezwykle ważne. Daje to podstawy i narzędzie badawcze do podjęcia dalszych studiów, niemożliwych do przeprowadzenia w przypadku całej, natywnej cząsteczki. Dlatego też badania mniejszych fragmentów dostarczają wielu cennych informacji o polipeptydach lub białkach, których to wyników nie można uzyskać w inny sposób. Najczęściej wykorzystywany jest fragment rdzeniowy amy-

liny 20-29, zwłaszcza do badań etapów procesu fibrylacji peptydu, tj. fazy nukleacji i dimeryzacji amyliny, a więc do analizy najtrudniejszych i niezbadanych, jak dotąd, etapów fibrylacji [8,22,24,27,36,37,38].

Badania fibrylujących fragmentów hA i niefibrylujących fragmentów rA, dostarczyły wielu cennych informacji o procesie fibrylacji. Choć prowadzone na fragmentach syntetycznych, to pozwoliły jednak na bliższe poznanie natury polipeptydu, jego fibrylotwórczego potencjału. Badania podstawowe rA dostarczyły także wiedzy wykorzystanej w konstruowaniu pramlintydu, leku stosowanego obecnie u chorych na cukrzycę typu 2. Ponadto badania te wzbogaciły wiedzę o strukturze fibrylotwórczych sekwencji polipeptydu [28]. Cechy amyliny świni i jej zachowanie na wstępnym etapie fibrylacji, odmienne od cech hA, sprawiają, że być może w przyszłości, komórki trzustki świni znajdą zastosowanie np. w transplantologii [35].

Od lat są prowadzone prace nad poznaniem generalnych zasad, reguł i czynników warunkujących i kontrolujących zachowanie się białek podczas procesu fibrylacji. Próbuje się określić cechy wspólne dla danej klasy białek lub peptydów, warunkujące i determinujące zachowanie się cząsteczki w roztworze [25]. Wydaje się, że pewne specyficzne sekwencje aminokwasowe są chętniej niż inne fragmenty, eksponowane przez peptyd czy białko do kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym, czyli *in vitro* z roztworem. Tym samym sekwencje te mogą być bardziej podatne na formowanie fibryli. Regiony takie cechuje wyższy, w porównaniu z innymi fragmentami, poziom aminokwasów aromatycznych. Wykazano, że sekwencja aminokwasowa i umiejscowienie aminokwasów w łańcuchu, a także ich wzajemne przestrzenne ułożenie, w dużej mierze determinuje skłonność peptydu do fibrylacji. Stwierdzono także, że zmiany konformacyjne, prowadzące do formowania struktur typu β -sheet, czynią cząsteczkę bardziej podatną na fibrylację oraz że białka o dłuższym połówkowym czasie życia i niższej termostabilności są bardziej fibrylotwórcze. Wszystkie te wnioski wysnuto na podstawie analizy, m.in. fibrylotwórczych fragmentów białek czy peptydów [13,15,25].

Badania podstawowe procesu fibrylacji, prowadzone technikami fizycznymi, fizyko-chemicznymi czy biochemicznymi, mają nie tylko wartość poznawczą, która sama w sobie jest niezwykle cenna, ale mogą także pomóc w przyszłości w znalezieniu skutecznej terapii m.in. cukrzycy typu 2, a także choroby Alzheimera. Obie choroby mają wspólny mianownik, którym jest m.in. amylin [29,30]. Konieczność podejmowania wszelkich prób opanowania procesu fibrylacji amyliny jest bezdyskusyjna i celowa. Wymaga to jednak pełnego, kompleksowego poznania i zrozumienia mechanizmów stojących u podstaw ciekawego, ale groźnego fenomenu przyrody jakim jest zjawisko fibrylacji.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abedini A., Raleigh D.P.: 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.*, 2006; 355: 274-281
- [2] Andreassen M., Nielsen S.B., Mittag T., Bjerring M., Nielsen J.T., Zhang S., Nielsen E.H., Jeppesen M., Christiansen G., Besenbacher F., Dong M., Nielsen N.C., Skrydstrup T., Otzen D.E.: Modulation of fibrillation of hIAPP core fragments by chemical modification of the peptide backbone. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1824: 274-285
- [3] Andreassen M., Skeby K.K., Zhang S., Nielsen E.H., Klausen L.H., Frahm H., Christiansen G., Skrydstrup T., Dong M., Schiøtt B., Otzen D.: The importance of being capped: Terminal capping of an amyloidogenic peptide affects fibrillation propensity and fibril morphology. *Biochemistry*, 2014; 53: 6968-6980
- [4] Ashburn T.T., Lansbury P.T.Jr.: Interspecies variations affect the kinetics and thermodynamics of amyloid formation: peptide models of pancreatic amyloid. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993; 115: 11012-11013
- [5] Betsholtz C., Christmansson L., Engström U., Rorsman F., Svensson V., Johnson K.H., Westermark P.: Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett.*, 1989; 251: 261-264
- [6] Betsholtz C., Svensson V., Rorsman F., Engström U., Westermark G.T., Wilander E., Johnson K., Westermark P.: Islet amyloid polypeptide (IAPP): cDNA cloning and identification of an amyloidogenic region associated with the species-specific occurrence of age-related diabetes mellitus. *Exp. Cell Res.*, 1989; 183: 484-493
- [7] Cao P., Meng F., Abedini A., Raleigh D.P.: The ability of rodent islet amyloid polypeptide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide has important implications for the mechanism of amyloid formation and the design of inhibitors. *Biochemistry*, 2010; 49: 872-881
- [8] Chiti F., Dobson C.M.: Protein misfolding functional amyloid and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006; 75: 333-366
- [9] Chou P.Y., Fasman G.D.: Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1978; 47: 251-276
- [10] Christmansson L., Betsholtz C., Leckström A., Engström U., Cortie C., Johnson K.H., Adrian T.E., Westermark P.: Islet amyloid polypeptide in the rabbit and European hare: studies on its relationship to amyloidogenesis. *Diabetologia*, 1993; 36: 183-188
- [11] Fändrich M., Forge V., Buder K., Kittler M., Dobson C.M., Diekmann S.: Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 15463-15468
- [12] Galzitskaya O.V.: Are the same or different amino acid residues responsible for correct and incorrect protein folding? *Biochemistry*, 2009; 74: 186-193
- [13] Galzitskaya O.V., Garbuzinskiy S.A., Lobanov M.Y.: A search for amyloidogenic regions of the protein chain. *Mol. Biol.* 2006; 40: 910-918
- [14] Gao M., Estel K., Seeliger J., Friedrich R.P., Dogan S., Wanker E.E., Winter R., Ebbinghaus S.: Modulation of human IAPP fibrillation: cosolutes, crowders and chaperones. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015; 17: 8338-8348
- [15] Garbuzinskiy S.A., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V.: FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics*, 2010; 26: 326-332
- [16] Goldsbury C., Goldie K., Pellaud J., Seelig J., Frey P., Müller S.A., Kistler J., Cooper G.J., Aebi U.: Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin. *J. Struct. Biol.*, 2000; 130: 352-362
- [17] Green J., Goldsbury C., Mini T., Sunderji S., Frey P., Kistler J., Cooper G., Aebi U.: Full-length rat amylin forms fibrils following substitution of single residues from human amylin. *J. Mol. Biol.*, 2003; 326: 1147-1156
- [18] Guo C., Côté S., Mousseau N., Wei G.: Distinct helix propensities and membrane interactions of human and rat IAPP₁₋₁₉ monomers in anionic lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B*, 2015; 119: 3366-3376
- [19] Hu R., Zhang M., Patel K., Wang Q., Chang Y., Gong X., Zhang G., Zheng J.: Cross-sequence interactions between human and rat islet amyloid polypeptides. *Langmuir*, 2014; 30: 5193-5201
- [20] Hutchinson E.G., Thornton J.M.: A revised set of potentials for β -turn formation in proteins. *Protein Sci.*, 1994; 3: 2207-2216
- [21] Jaikaran E.T., Higham C.E., Serpell L.C., Zurdo J., Gross M., Clark A., Fraser P.E.: Identification of a novel human islet amyloid polypeptide β -sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.*, 2001; 308: 515-525
- [22] Jarrett J.T., Lansbury P.T.Jr.: Seeding "one dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 1993; 73: 1055-1058
- [23] Keller A., Fritzsche M., Yu Y.P., Liu Q., Li Y.M., Dong M., Besenbacher F.: Influence of hydrophobicity on the surface-catalyzed assembly of the islet amyloid polypeptide. *ACS Nano*, 2011; 5: 2770-2778
- [24] Kumar S., Udgaonkar J.B.: Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Curr. Science*, 2010; 98: 639-656
- [25] Lobanov M.Y., Furletova E.I., Bogatyreva N.S., Roytberg M.A., Galzitskaya O.V.: Library of disordered patterns in 3D protein structures. *PLoS Comput. Biol.*, 2010; 6: e1000958
- [26] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptyd amyloidu trzustkowego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 14-24
- [27] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylacja – cytotoksyczna agregacja polipeptydu trzustki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 309-319
- [28] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptydowy hormon trzustki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 29-41
- [29] Marszałek M.: Amylina. Nowe mechanizmy regulacyjne fibrylującego hormonu trzustki – wybrane aspekty. *Postępy Biol. Kom.*, 2015; 42: 1-23
- [30] Marszałek M.: Cukrzyca typu 2 a choroba Alzheimer'a – jedna czy dwie choroby? Mechanizmy asocjacji. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 653-671
- [31] Mazor Y., Gilead S., Benhar I., Gazit E.: Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.*, 2002; 322: 1013-1024
- [32] Moriarty D.F., Raleigh D.P.: Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin 20-29. *Biochemistry*, 1999; 38: 1811-1818
- [33] Nilsson M.R., Driscoll M., Raleigh D.P.: Low levels of asparagine deamidation can have a dramatic effect on aggregation of amyloidogenic peptides: implications for the study of amyloid formation. *Protein Sci.*, 2002; 11: 342-349
- [34] Nilsson M.R., Raleigh D.P.: Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin. *J. Mol. Biol.*, 1999; 294: 1375-1385
- [35] Potter K.J., Abedini A., Marek P., Klimek A.M., Butterworth S., Driscoll M., Baker R., Nilsson M.R., Warnock G.L., Oberholzer J., Bertera S., Trucco M., Korbitt G.S., Fraser P.E., Raleigh D.P., Verchere C.B.: Islet amyloid deposition limits the viability of human islet grafts but not porcine islet grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 4305-4310

- [36] Rhoades E., Agarwal J., Gafni A.: Aggregation of an amyloidogenic fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1476: 230-238
- [37] Rhoades E., Gafni A.: Micelle formation by a fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biophys. J.*, 2003; 84: 3480-3487
- [38] Rivera E., Straub J., Thirumalai D.: Sequence and crowding effects in the aggregation of a 10-residue fragment derived from islet amyloid polypeptide. *Biophys. J.*, 2009; 96: 4552-4560
- [39] Sal-Man N., Gerber D., Shai Y.: Proline localized to the interaction interface can mediate self-association of transmembrane domains. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1838: 2313-2318
- [40] Scrocchi L.A., Chen Y., Waschuk S., Wang F., Cheung S., Darabie A.A., McLaurin J., Fraser P.E.: Design of peptide-based inhibitors of human islet amyloid polypeptide fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.*, 2002; 318: 697-706
- [41] Seeliger J., Winter R.: Islet amyloid polypeptide: aggregation and fibrillogenesis *in vitro* and its inhibition. *Subcell. Biochem*, 2012; 65: 185-209
- [42] Tenidis K., Waldner M., Bernhagen J., Fischle W., Bergmann M., Weber M., Merkle M.L., Voelter W., Brunner H., Kapurniotu A.: Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.*, 2000; 295: 1055-1071
- [43] Tomasello M.F., Sinopoli A., Attanasio F., Giuffrida M.L., Campagna T., Milardi D., Pappalardo G.: Molecular and cytotoxic properties of hIAPP17-29 and rIAPP17-29 fragments: a comparative study with the respective full-length parent polypeptides. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014; 81: 442-455
- [44] Wang L., Li Y., Lu T., Li F.: The effects of organic solvents on the membrane-induced fibrillation of human islet amyloid polypeptide and on the inhibition of the fibrillation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014; 1838: 3162-3170
- [45] Westermark P., Engström U., Johnson K.H., Westermark G.T., Betsholtz C.: Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 5036-5040
- [46] Yanagi K., Ashizaki M., Yagi H., Sakurai K., Lee Y.H., Goto Y.: Hexafluoroisopropanol induces amyloid fibrils of islet amyloid polypeptide by enhancing both hydrophobic and electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 23959-23966
- [47] Zhang M., Hu R., Liang G., Chang Y., Sun Y., Peng Z., Zheng J.: Structural and energetic insight into the cross-seeding amyloid assemblies of human IAPP and rat IAPP. *J. Phys. Chem. B.*, 2014; 118: 7026-7036
- [48] Zhao J., Yu X., Liang G., Zheng J.: Heterogeneous triangular structures of human islet amyloid polypeptide (amylin) with internal hydrophobic cavity and external wrapping morphology reveal the polymorphic nature of amyloid fibrils. *Biomacromolecules*, 2011; 12: 1781-1794
- [49] Zhao J., Yu X., Liang G., Zheng J.: Structural polymorphism of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) oligomers highlights the importance of interfacial residue interactions. *Biomacromol.*, 2011; 12: 210-220

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.