

Received: 2013.01.09
Accepted: 2013.08.21
Published: 2014.01.22

Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptydowy hormon trzustki

Amylin under examination. Fibrillogenic polypeptide hormone of the pancreas

Małgorzata Marszałek

Zakład Biofizyki Medycznej, Katedra Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

W przebiegu cukrzycy typu 2 (diabetes mellitus type 2 DM2, non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) oraz w rozwoju guza insulinowego trzustki, obserwuje się w obrębie wysp Langerhansa, patologiczne depozyty zwane amyloidem. W skład amyloidu wchodzi m.in. polipeptyd wytwarzany przez komórki beta, pełniący funkcję neurohormonu, zwany amyliną. Nieprawidłowo zwinięta, fibrylująca cząsteczka amyliny, w postaci nierozpuszczalnych fibryli powoduje dysfunkcję, niszczenie i utratę komórek wysp, postępującą destrukcję narządu i tym samym postęp choroby. Liczący tylko 37 aminokwasów polipeptyd stanowi bardzo poważne zagadnienie poznawcze, zwłaszcza dla współczesnej medycyny. W pracy przedstawiono m.in. rolę fizjologiczną amyliny, jej budowę aminokwasową, ze szczególnym podkreśleniem roli niektórych aminokwasów w procesie fibrylacji cząsteczki i jej udziału w tworzeniu amyloidu w trzustce zwierząt i człowieka.

Słowa kluczowe: amylina • amyloid trzustkowy • cukrzyca typu 2 • agregacja • fibrylacja

Summary

In patients or animals affected by type 2 diabetes mellitus (DM2, non-insulin dependent diabetes mellitus [NIDDM]) some pathological deposits, called amyloid, are observed among cells of islets of Langerhans. Among other constituents, deposits consist of an insoluble, fibrillar form of peptide neurohormone called amylin, produced by pancreatic beta cells. It is thought that formation of fibrillar deposits of misfolded and aggregated peptide is highly toxic to beta cells and leads to cell dysfunction, cell loss, pancreas destruction and progress of the disease. This relatively small 37-amino acid peptide constitutes a serious scientific, research and to some extent a medical problem. This article presents amylin as a hormone, neurohormone and as a fibrillating molecule which participates in amyloid deposit formation in human and animal pancreas. The role of some amino acids important for fibril formation has been highlighted.

Key words: amylin • pancreatic amyloid • type 2 diabetes mellitus • aggregation • fibrillation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1086072>

Word count: 5557

Tables: –

Figures: 2

References: 109

Adres autorki: dr Małgorzata Marszałek, Zakład Biofizyki Medycznej, Katedra Biofizyki Ogólnej, Instytutu Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 143, 42-635 Łódź; e-mail: mtmarsz@wp.pl

Wykaz skrótów: **AM** – adrenomedullina (adrenomedullin); **AMY1,2,3** – receptory amyliny; **AP** – pole najdalsze rdzenia przedłużonego (area postrema); **CLR** – receptor kalcytoniny (calcitonin receptor-like receptor); **CGRP** – neuropeptyd związany z genem kalcytoniny (calcitonin gene related peptide); **CRSP** – peptyd stymulujący receptor kalcytoniny i jego formy (CT receptor-stimulating peptide); **CTR** – receptor kalcytoniny (calcitonin receptor); **IAPP** – amyloidowy polipeptyd wysp trzustkowych (islet amyloid polypeptide); **komórki D** – (D-cells); **komórki G** – komórki wytwarzające gastrynę (gastrin cells, G-cells, G-type cells producing gastrin); **PE** – obszar blaszki czworaczej (medial preoptic area); **RAMP** – białko modyfikujące aktywność receptora białek związanych z białkiem G (receptor activity modifying protein); **VIP** – wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide).

WSTĘP

W przebiegu cukrzycy typu 2, a także u osób chorych na nowotwór trzustki typu insulinoma, wywodzący się z komórek beta wysp trzustkowych, obserwuje się patologiczne zmiany w obrębie wysp Langerhansa, polegające na odkładaniu depozytu zwanego amyloidem. Białkowym komponentem amyloidu jest, stosunkowo mały, bo 37-aminokwasowy polipeptyd wytwarzany głównie przez komórki beta wysp trzustki zwany amyliną. Amyloid, będący patomorfologiczną składową cukrzycy typu 2, odnajdywany jest u ponad 90% chorych, przynajmniej w jednej wyspie trzustkowej [14]. Mechanizm odpowiadający za tę samodestrukcję wysp trzustkowych nie jest poznany, ale wiadomo, że głównym jej sprawcą jest właśnie amylin. Coraz więcej wiadomo o fizjologicznej roli amyliny, nie tylko jako hormonu trzustkowego, współodpowiadającego za regulację metabolizmu glukozy w organizmie, wpływającego na funkcjonowanie komórek kości i stan kalcemii, pracę nerek czy mięśni szkieletowych. Także coraz więcej danych wskazuje na istnienie nowych, nierozpoznanych funkcjonalnych aspektów związanych z obecnością amyliny w komórkach nerwowych, w tym w komórkach mózgu. Dlatego też w piśmiennictwie coraz częściej przypisywana jest temu polipeptydowi funkcja neurohormonu [81,97].

Badania genetyczne, przeprowadzone wśród chorych na cukrzycę typu 2 w Japonii, dostarczają informacji o funkcjonalnym związku między mutacjami w obrębie genu amyliny a wczesnym rozwojem choroby. Ujawniono u chorych na cukrzycę typu 2 substytucja aminokwasowa w pozycji 20 (S20G) amyliny wydaje się istotna dla procesu wzmoczonej fibrylacji tej postaci amyliny [54,82]. Zaobserwowano także, częstsze niż u osób zdrowych, mutacje u chorych na cukrzycę w promotorowej części genu amyliny [70]. Nie wydaje się jednak prawdopodobne, aby

mutacje genu amyliny mogły w pełni wytłumaczyć obserwowane u chorych zmiany w obrębie wysp trzustkowych.

To konwersja natywnej postaci amyliny do nierozpuszczalnych fibryli, najprawdopodobniej kryje w sobie odpowiedź na podstawowe pytanie: dlaczego choroba rozwija się? Mechanizm tego procesu i sama amylin – jako polipeptyd – mimo poznania jej składu aminokwasowego i mimo wszechstronnie prowadzonych badań nad jej strukturą – stanowi problem poznawczy. Jedną z przyczyn jest to, że z natury jest to polipeptyd niezwykle trudny do badań. W pracy przedstawiono rolę fizjologiczną amyliny oraz jej udział w procesach patologicznych w organizmie, ze szczególnym podkreśleniem roli fibrylującego polipeptydu w tworzeniu amyloidu trzustki. Budowę cząsteczki amyliny i jej skład aminokwasowy zaprezentowano w kontekście procesu fibrylogenezy.

AMYLINA A RODZINA BIAŁEK I RECEPTORÓW KALCYTONINY

Amylin należy do białek z rodziny kalcytoniny (calcitonin, CT), do której zalicza się hormony peptydowe: kalcytoninę, peptyd związany z genem kalcytoniny (calcitonin gene related peptide, CGRP) występujący w dwóch postaciach – białko α CGRP i β CGRP), ponadto rodzinę adrenomedulliny: adrenomedullinę (AM) i adrenomedullinę 2 (intermedin), adrenomedullinę 5 oraz peptyd stymulujący receptor kalcytoniny (CT receptor-stimulating peptides, CRSP) w trzech postaciach CRSP 1, 2 i 3 [7,44,91].

Sekwencja aminokwasowa amyliny jest prawie w 50% homologiczna z sekwencją CGRP [8,48]. Wydaje się, że amylinę i α CGRP łączy podobny tkankowy wzór ekspresji. Obydwa polipeptydy występują w mózgu i w niektórych regionach obwodowego układu nerwowego; także obydwie występują w komórkach beta trzustki, choć w przypadku amyliny jest to główne miejsce jej wystę-

powania. Białko CGRP odnaleziono także w komórkach C grasicy [102]. CGRP, podobnie jak amylin, uczestniczy m.in. w regulacji energetycznych szlaków metabolizmu, zwłaszcza powoduje obniżenie syntezy glikogenu w mięśniach szkieletowych oraz pełni rolę czynnika regulującego przepływ krwi, utrzymując stan napięcia naczyń krwionośnych [34,105].

Receptory amyliny mają także związek z kalcytoniną, gdyż należą do grupy tzw. receptorów białek rodziny kalcytoniny, wchodzącej w skład rodziny receptorów związanych z białkiem G. Ich pobudzenie prowadzi do aktywacji cykazy adenylowej bądź fosfolipazy C. Receptory te są heterodimerami, stanowiąc kombinację dwóch elementów: siedmiotransmembranowej domeny receptora białek związanych z białkiem G i białka modyfikującego aktywność receptora (receptor activity modifying protein, RAMP). Obecność białka RAMP jest wymagana do transportu przyłączonego receptora w pobliże błony komórkowej i wpływa modulująco na odbierane i przekazywane sygnały. Wymagane partnerstwo białka RAMP do nadania receptorowi jego funkcji sprawiało, że receptory amyliny pozostawały przez długi czas nieuchwytnie, bo niemożliwe do identyfikacji [9,32,71].

Do receptorów białek związanych z białkiem G należą: receptor kalcytoniny (calcitonin receptor, CTR) i receptor podobny do receptora kalcytoniny (calcitonin receptor-like receptor, CLR), natomiast białkiem modyfikującym jego aktywność może być jedno z trzech, jak dotąd odkrytych, białek RAMP. Białko CTR może działać samodzielnie, jako receptor kalcytoniny bądź - wchodząc w interakcję z każdym z białek RAMP - może formować trzy receptory amyliny: AMY1, AMY2 i AMY3. W przypadku dimeryzacji z RAMP3 wiązanie amyliny cechuje najwyższe powinowactwo do powstającego receptora w porównaniu z innymi ligandami [8,65,80,83,107]

AMYLINA W ORGANIZMIE

Trzustkowa i pozatrzustkowa ekspresja amyliny

Pierwsze badania ekspresji amyliny wskazywały na wyłącznie trzustkowe umiejscowienie peptydu [47]. Dopiero z czasem ujawniono pozatrzustkową ekspresję polipeptydu i mRNA amyliny zlokalizowano także w: przewodzie pokarmowym szczura, myszy, kota i człowieka na odcinku od żołądka do jelita, z największą ilością w komórkach części odzwiernikowej, w komórkach G wytwarzających gastrynę (gastrin cells, G-cells, G-type cells producing gastrin) i w komórkach D wytwarzających somatostatynę (D cell) i w komórkach płuc. Następnie obecność amyliny wykazano również w komórkach układu nerwowego, co rzuciło nowe światło na funkcje tego polipeptydu. Uwagę zwracało to, że ekspresję amyliny ujawniano w komórkach o charakterze neuroendokrynnym [64].

U szczura obecność amyliny wykazano także w czuciowych komórkach zwojów nerwowych i w komórkach w rdzeniu przedłużonym. Ekspresja amyliny w neuro-

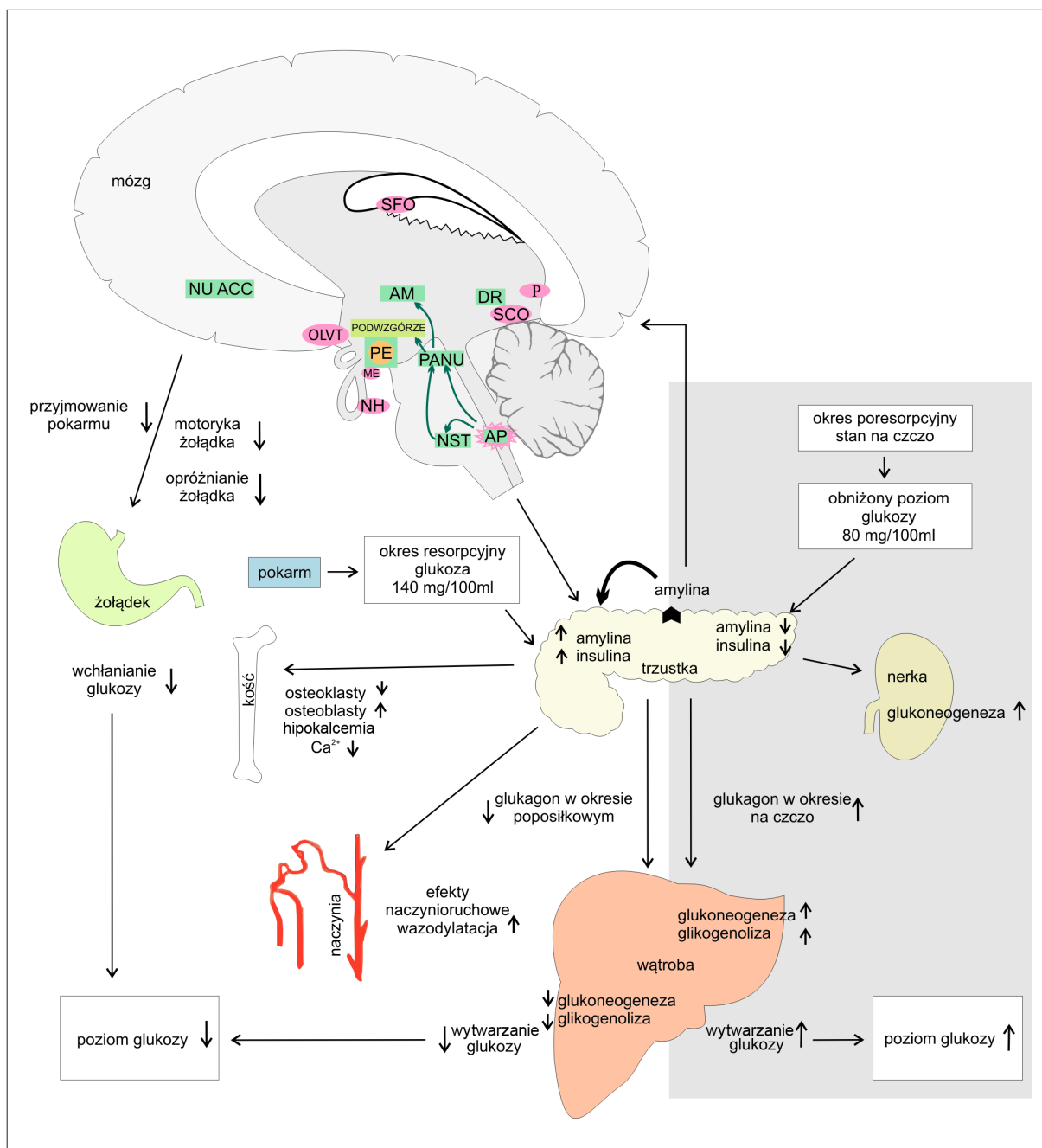
nach czuciowych nie powinna zaskakiwać. Polipeptyd jest strukturalnie powiązany z białkiem CGRP, które - odnajdywane w wielu miejscach centralnego i obwodowego układu nerwowego - pełni funkcję neuropeptydu. Zdaniem autorów, ujawniona lokalizacja amyliny potwierdza sugerowaną funkcję jako neuropeptydu i wskazuje na jego rolę w nocycepcji, czyli odbiorze bodźców o charakterze szkodliwym, w tym bodźców urazowych [64,75].

O obecności amyliny w mózgu wiadomo było niewiele. Najpierw wykryto ją w mózgu kurczaka, gdzie poziom jej ekspresji znacznie przewyższał poziom obserwowany w trzustce tych zwierząt [24]. W dalszych badaniach, stosując przeciwciała skierowane przeciwko C-terminalnej domenie tego polipeptydu, wykazano obecność amyliny w komórkach pnia mózgu szczura i immunoreaktywne neurony w obrębie podwzgórza u małp [17,18].

Zainteresowanie budziła także lokalizacja mózgowych receptorów amyliny w rejonach trudno dostępnych dla polipeptydu, ze względu na istniejącą barierę krew-mózg. Jednak ostatnio wykazano, że w rejonach wewnątrz bariery krew-mózg obserwuje się mRNA amyliny. Choć w mózgu samic szczura mRNA amyliny zlokalizowano na zaledwie dostrzegalnym poziomie, to jednak u karmiących samic szczura ekspresja polipeptydu była znacząco podwyższona. W badanych regionach mózgu nie zaobserwowano podwyższonej ekspresji innych białek CGRP. Obecność mRNA amyliny ujawniono w neuronach zlokalizowanych w podwzgórzu, a także w istocie białej półkul mózgowych (ryc.1). Znacząco podwyższony poziom mRNA amyliny, ujawniony w tych właśnie rejonach mózgu u karmiących samic szczurów, może wskazywać na bardzo swoistą rolę amyliny w ośrodkowej regulacji procesów związanych z macierzyństwem, gdy zapotrzebowanie organizmu na substancje odżywcze, w tym glukozę, jest znacząco podwyższone. Odstawienie od karmiących samic szczurów ich potomstwa powoduje przywrócenie początkowej, zaledwie ujawnianej ekspresji amyliny w mózgu badanych zwierząt [20,21,64,75,90]. Niedawo ukazało się także doniesienie, że amylinę wykryto także w mózgu człowieka [97]. Obecność amyliny w mózgu może otworzyć nowy rozdział w poznaniu i w rozumieniu fizjologicznej roli tego neuropeptydu, określanego w piśmiennictwie także mianem neurohormonu [81]

Amylina w komórkach wysp trzustki

Amylina jest wytwarzana i wydzielana wraz z insuliną głównie z komórek beta wysp trzustki. Kolokalizację amyliny i insuliny wykazano jedynie w komórkach beta trzustki człowieka, w krystalicznej części rdzeniowej (granularnej) pęcherzyków sekrecyjnych [53]. W pęcherzykach sekrecyjnych znaleziono także m.in. proinsulinę, C-polipeptyd, kationy Zn^{+2} i Ca^{+2} . Stężenie jonów wapnia w pęcherzykach sekrecyjnych jest stosunkowo wysokie, bo wynosi około 10 mM/L [10]. Na szczególne podkreślenie zasługuje to, że mimo iż w komórce organizmu w stanie prawidłowym, stężenie amyliny jest znacząco wyższe w porównaniu ze stężeniem w warunkach eksperymental-



Ryc.1. Amylina w organizmie – wybrane aspekty aktywności fizjologicznej hormonu, mózgową lokalizację receptorów i miejsc ekspresji amyliny. Szczegółowy opis w tekście pracy. Przygotowano w oparciu o cytowane w pracy piśmiennictwo

Objaśnienia skrótów i kolorów na rycinie:

- PE- obszar blaszki czworaczej podwzgórza (medial preoptic area) miejsce wykrycia amyliny w mózgu
- narządy okołomózgowe (ang. circumventricular organs) - obszary mózgu pozostające poza barierą krew-mózg: ME-wyniosłość pośrodkowa podwzgórza (median eminence of the hypothalamus), NH-przedni płat przysadki mózgowej sąsiadujący (adjacent neurohypophysis of the pituitary gland), SCO-narząd podsiodłowy (subcommissural organ), P-szyszynka (pineal gland) i obszary mózgu pozostające poza barierą krew-mózg w których wykryto receptory amyliny i miejsca jej wiązania do receptora: SFO-narząd podsłupieniowy (subfornical organ), OLV- narząd naczyniowy blaszki czworaczej, (organum vasculosum of the lamina terminalis)
- -AP-pole najdalsze rdzenia przedłużonego (area postrema) -obszar mózgu pozostający poza barierą krew-mózg bezpośrednio aktywowany amyliną
- obszary pośrednio aktywowane obecnością amyliny - strzałkami zaznaczono hipotetyczną sieć funkcjonujących zależności różnych obszarów mózgu: PANU – jądro przyramienne boczne (lateral parabrachial nucleus), NU ACC - jądro półleżące w obrębie jądra podstawnego (nucleus accumbens), DR-jądro grzbietowe szwu (dorsal raphe), NST - pasmo samotne rdzenia (nucleus of the solitary tract), AM -ciało migdałowe (amygdala)

nych *in vitro*, to polipeptyd jest chroniony i nie fibryluje. W warunkach eksperymentalnych amyliną w niskim stężeniu, poniżej 1 μM , jest wysoce toksyczna, jednak obecna w komórce w stężeniu rzędu 0,8–4 mM, nie prowadzi do uszkodzenia komórek trzustki osób zdrowych [11].

Wersje molekularne i poziom amyliny w organizmie

W organizmie zwierząt (kot, mysz, szczur) i u człowieka stwierdzono występowanie pełnej wersji polipeptydu, tj. 37-aminokwasowej oraz krótszych jego fragmentów, jako form molekularnych. Przeważającą formą jest zazwyczaj 37-aminokwasowa wersja polipeptydu, odnajdywana także w surowicy krwi obwodowej i w innych, poza trzustką, miejscach organizmu [5,84]. We krwi obwodowej, trzustce i w przewodzie pokarmowym człowieka, kota, szczura i myszy, odnajdywane są także krążące fragmenty amyliny [62,84]. Trudno stwierdzić czy krążące peptydy są produktami błędnego, proteolitycznego trawienia białka? Wydaje się, że pod tym względem amyliną nie jest odosobnionym przypadkiem chorób amyloidowych [41,66].

Szacuje się, że polipeptyd jest uwalniany z komórek trzustki w stężeniu około 0,01 pM/l [88]. U osobników zdrowych stężenie amyliny mieści się w dość szerokich granicach 5–30 pM/l. Podniesione stężenie amyliny stwierdzono w surowicy krwi osób w różnych stanach patologicznych, takich jak: otyłość, nowotwór endokryny trzustki, syndrom X, choroba nerek. Polipeptyd odnajdywany jest w większej ilości także we krwi np. po stymulacji doustną podażą glukozy [16,84]. W przebiegu cukrzycy typu 2, w początkowym okresie choroby, stężenia zarówno amyliny, jak i insuliny są podniesione. W miarę postępu choroby, wraz z postępującą destrukcją komórek beta trzustki, stężenie amyliny zaczyna spadać i u chorych na cukrzycę typu 2 jest on niższy i wynosi odpowiednio około 4,0 pM/l i 3,7 pM/l. Podobnie dzieje się u osób z nietolerancją glukozy [16].

Sekrecja amyliny jest dwufazowa i następuje jednocześnie z sekrecją insuliny w odpowiedzi na glukozę lub inne czynniki stymulujące wydzielanie, np. w odpowiedzi na bodziec pokarmowy. W surowicy krwi amyliną krąży jednak dłużej niż insulina i peptyd C [77]. Jej stężenie we krwi obwodowej wynosi około 1% stężenia insuliny [86]. Istotnym dla organizmu parametrem wydają się stosunki molowe amyliny do insuliny uwalnianej do krwi. U osób zdrowych wynoszą one 1: 100, ale mogą jednak ulegać zmianie, odzwierciedlając relatywny stan niedoboru amyliny. Masa ciała i zasoby tkanki tłuszczowej wpływają na parametry kinetyczne i stężenie zarówno insuliny, jak i amyliny. Wzajemna relacja obu hormonów jest dobrym indykatorem stanu organizmu [52].

Usuwanie amyliny z organizmu

Podniesione stężenie amyliny w surowicy krwi, zaobserwowano u pacjentów z niewydolnością nerek (15 pM), w porównaniu z osobnikami próby kontrolnej (3,2 pM).

Zastosowanie hemodializy u chorych znacząco obniżało poziom hormonu [51,95], co nasunęło przypuszczenie, że polipeptyd usuwany jest z organizmu przez nerki. Wykazano także wzrost amyliny w moczu u pacjentów po teście doustnego podania glukozy. Wyniki badań autoradiograficznych z izotopem jodu (^{125}I), przeprowadzone na szczurach, wskazywały na udział w tym procesie kanalików proksymalnych nerek, choć problem ten nadal jest przedmiotem dyskusji [87,88]. Klirens nerkowy amyliny jest szybszy niż insuliny [77].

AMYLINA — FIZJOLOGIA I PATOFIZJOLOGIA - WYBRANE ASPEKTY

Amylina działa fizjologicznie za pośrednictwem receptorów umiejscowionych m.in. na komórkach beta wysp trzustki oraz receptorów na komórkach w obrębie centralnego układu nerwowego. Miejsca wiązania amyliny do receptora wykazano także w różnych tkankach w licznych peryferycznie położonych miejscach organizmu, jednak wysoce selektywnie działające receptory amyliny ujawniono głównie w pewnych obszarach mózgu, w korze nerki i w mięśniach [75,80,92,107].

Szczególne znaczenie ma to, że receptory amyliny zlokalizowano w obszarach mózgu pozostających poza strefą, gdzie funkcjonuje bariera krew-mózg, tj. w tzw. narządach okołokomorowych (circumventricular organs). Są to stosunkowo niewielkie obszary, ułożone w ścianach układu komorowego, gdzie budowa ścian naczyń krwionośnych umożliwia swobodny dopływ związków wielkocząsteczkowych, w tym peptydów lub białek. Receptory amyliny zlokalizowano m.in. w regionie należącym do tyłomózgowia, ułożonym w dnie komory czwartej mózgu, zwanym polem najdalszym rdzenia przedłużonego (area postrema, AP) (ryc. 1). Umieszczenie receptorów w obszarze AP jest niezwykle istotne, gdyż ten właśnie region jest łatwo dostępny dla krążącej we krwi amyliny, docierającej z wysp Langerhansa. Tutaj też receptory amyliny rozmieszczone są szczególnie gęsto [25,74,75,80,83,107].

Receptory amyliny zlokalizowano także w obrębie obszaru, gdzie funkcjonuje bariera krew-mózg. W tych miejscach wiązanie amyliny do receptora jest bardzo swoiste. Wykrycie obecności mRNA amyliny w tych regionach mózgu karmiących szczurów i ostatnie doniesienia o wykryciu amyliny w mózgu ludzi wskazują na istnienie nierozpoznanych jeszcze mechanizmów działania tego neuropeptydu, a może neurohormonu [20,97]. Do pełnego poznania funkcji fizjologicznych amyliny pozostaje wyjaśnienie roli i mechanizmów transdukcji sygnałów za pośrednictwem receptorów amyliny zlokalizowanych w obszarach mózgu wewnątrz bariery krew-mózg.

Receptory amyliny charakteryzuje miejscowo swoista ekspresja, zwłaszcza wyraźna w obrębie mózgu. Receptor AMY3 jest umiejscowiony w miejscu pozostającym poza barierą krew-mózg, a receptor typu AMY1 obecny jest zarówno w miejscach w obrębie bariery, jak i w regionach poza barierą krew-mózg. W obszarze AP, który

jest dostępny dla krążącej we krwi amyliny, łatwo wiąże się ona ze swymi receptorami. W odpowiedzi na tę stymulację następuje przekazanie sygnałów do innych obszarów mózgu, gdzie zostają włączone kolejne receptory. W wyniku wzajemnej reakcji stymulacyjnej następuje generowanie centralnie sterowanego uczucia sytości, spowolnienie motoryki i opróżniania żołądka, obniżenie ilości przyjmowanego pokarmu i w efekcie anorektyczna odpowiedź organizmu. Nie bez znaczenia jest to, że w tej części mózgu aż 90% komórek, oprócz receptorów amyliny, zawiera także receptory glukozy [78,80].

Ogólnie działanie insuliny uruchamia różne mechanizmy sprzyjające obniżeniu stężenia krążącej we krwi glukozy. Z kolei następstwem działania amyliny jest ograniczenie dopływu do krwi glukozy zarówno ze źródeł egzogennych (pokarm), jak i endogennych, którymi są procesy glikogenolizy i glukoneogenezy. Procesy te pozostają pod kontrolą wytwarzanego przez komórki alfa wysp trzustki glukagonu, działającego glukoneogenicznie. Ograniczenie dostępu glukozy do krwi przez amylinę odbywa się m.in. w wyniku hamowania sekrecji glukagonu. Amylina hamuje wydzielanie glukagonu, ale jej stężenie zależy z kolei od stanu glikemii. W okresie poresorpcyjnym, spadek stężenia glukozy we krwi poniżej wartości fizjologicznych, tj. około 60 mg/dl, hamuje sekrecję zarówno insuliny, jak i amyliny. W tych warunkach amyliną nie działa już supresyjnie: bezpośrednio na uwalnianie glukagonu i pośrednio na wytwarzanie endogennej glukozy. Glukagon może działać glukoneogenicznie i powodować przywrócenie fizjologicznego stężenia glukozy we krwi. Po spożyciu pokarmu natomiast, w okresie resorpcyjnym, kiedy następuje wzrost stężenia glukozy we krwi do wartości około 140 mg/100ml (7,8 mmol/l) i występuje hiperglikemia poposiłkowa, uruchamiane są mechanizmy prowadzące do obniżenia stężenia cukru. Następuje ograniczenie dopływu cukru zarówno ze źródeł endogennych i egzogennych, jakim jest pokarm. Dzieje się to pośrednio za sprawą supresji wytwarzania glukagonu. Poposiłkowa sekrecja glukagonu jest hamowana przez amylinę również pod wpływem mechanizmu angażującego ośrodkowy układ nerwowy. Podobnie ograniczenie egzogennych źródeł glukozy w okresie poposiłkowym także angażuje ośrodkowy układ nerwowy i umiejscowione tu receptory amyliny. Za pośrednictwem nerwu błędnego następuje ograniczenie motoryki żołądka, spowolnienie jego opróżniania i redukcja ilości przyjmowanego pokarmu. Zmniejsza to ilość dostępnego cukru i jego napływ do krwiobiegu.

Receptory amyliny, umiejscowione na komórkach β trzustki, uruchamiają zarówno zwrotną inhibicję własnej sekrecji polipeptydu, jak i hamują uwalnianie insuliny. Amylina jest także modulatorem metabolizmu glukozy w mięśniach szkieletowych i wpływa na wywołanie stanu insulinooporności komórek mięśni i wątroby [35,72,80,81]. Wpływa na procesy zachodzące w tkance kostnej, hamuje resorpcję kości, gdyż obniża aktywność osteoklastów, a jednocześnie stymuluje proliferację i aktywuje osteoblasty [37,48,65]. Amylina wykazuje także słabą aktywność wazodylatacyjną, zmniejszając opór obwodowy naczyń krwionośnych [10].

U chorych na cukrzycę typu 1, z powodu zniszczenia komórek β , stężenie amyliny, podobnie jak i insuliny jest prawie zerowe. U chorych na cukrzycę typu 2 występuje zwiększona insulinooporność tkanek obwodowych oraz zaburzone, a następnie, w miarę rozwoju choroby, niewystarczające wydzielanie zarówno insuliny, jak i amyliny. Choroba rozwija się stopniowo i w zależności od jej etapu, tj. od stopnia zaawansowania i jej przebiegu, obserwuje się zmienne stężenie amyliny we krwi chorych. Jest to uwarunkowane m.in. dynamiką destrukcji komórek β i współtowarzyszącym, postępującym procesem fibrylacji amyliny. Proces fibrylacji przebiega początkowo w sposób niedostrzegalny dostępnymi technikami medycznymi. Jednak z czasem prowadzi do stopniowego niszczenia komórek β , ich destrukcji i do zastępowania ich złoгами odkładanych fibryli amyliny. Postępuje zaburzenie sekrecji amyliny i insuliny, a niedobór amyliny koreluje z niedoborem insuliny. Nie funkcjonuje tym samym droga supresji wytwarzania glukagonu, potęgując napływ glukozy ze źródeł endogennych.

W pierwszym okresie choroby hiperinsulinemia kompensuje insulinooporność tkanek obwodowych. Towarzyszy jej także wzrost stężenia amyliny we krwi i choć początkowo obserwuje się podniesione stężenie amyliny, to jednak mówi się o tzw. względnym jej niedoborze. Oznacza to, że przy podobnym stężeniu glukozy, stężenie amyliny u osobników zdrowych znacznie przewyższałoby stężenie amyliny osiągane u osób chorych. Sekrecja amyliny jest relatywnie zmniejszona i nie wystarcza do zlikwidowania u chorych stanu hiperglikemii [35,49,72,81].

PROPEPTYD AMYLINY

Gen amyliny człowieka jest umiejscowiony na krótkim ramieniu chromosomu 12. Wykazuje on homologię z genem 1 i 2 neuropeptydu związanego z genem białka CGRP, ulokowanym na 11 chromosomie, co sugeruje wspólne pochodzenie i przynależność obu peptydów do tej samej rodziny. U człowieka polipeptyd kodowany jest przez trzy eksony i dwa introny [63,69]. Jest on transkrybowany jako 89-aminokwasowy prepolipeptyd [80], którego masę skalkulowano na 9808 Da. Prekursor amyliny zbadano także u innych gatunków zwierząt: u psa, kota, szczura, myszy, świnki morskiej i u makaka. Zaobserwowane drobne różnice w budowie polipeptydów nie tłumaczą ich odmiennych własności fibrylotwórczych [47]. Domeny C- i N-końcowe propeptydu nie zawierają wysoce konserwatywnych reszt, co sugeruje brak dodatkowych i istotnych funkcji biologicznych, które można by tym fragmentom przypisać. Sekwencje propeptydu wskazują na zdolność do oddziaływania z siarczanem heparanu. Już na etapie formowania propeptydów, w obrębie peptydów sygnałowych, odnajdywana jest homologia z białkiem CGRP [68].

Podobnie jak w przypadku insuliny, 89-aminokwasowy peptyd człowieka to postać pierwotnego prekursora – pre-pro-IAPP. Powstaje on w aparacie Golgiego skąd jest przemieszczany do granul sekrecyjnych. Jednak zanim nastąpi

amylina	aminokwas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
fibrylująca	człowiek	*H ₃ K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	YCONH ₂
	kot	*H ₃ K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	I	R	S	S	N	N	L	G	A	I	L	S	P	T	N	V	G	S	N	T	YCONH ₂
	świnia	*H ₃ K	C	N	M	A	T	C	A	T	Q	H	L	A	N	F	L	D	R	S	R	N	N	L	G	T	I	F	S	P	T	K	V	G	S	N	T	YCONH ₂
niefibrylująca	szczur mysz	*H ₃ K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	L	G	P	V	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	YCONH ₂

Ryc. 2. Skład aminokwasowy amyliny wybranych gatunków zwierząt. Sporządzono w oparciu o cytowane w pracy piśmiennictwo

sekrecja polipeptydu w postaci czynnej, czyli 37-aminokwasowego hormonu, pierwotny prekursor (preproIAPP) ulega wewnątrzkomórkowemu trawieniu, najpierw do 67-aminokwasowego produktu ProIAPP, który w granulach sekrecyjnych jest następnie konwertowany do postaci ostatecznej. Trawienie odbywa się na obu C- i N-końcach cząsteczki przez enzym proproteinową konwertazę PC2, w miejscu występowania aminokwasów zasadowych. Wydaje się, że na tym etapie białko jest amidowane na C-końcu [59,68].

BUDOWA AMYLINY

Na 37-aminokwasową cząsteczkę amyliny (full length amylin) składają się domeny, wyodrębnione głównie na podstawie ich funkcjonalnego znaczenia dla polipeptydu, a także ich zdolności do formowania fibryli amyloidowych. Amylina składa się z dwóch domen terminalnych w obrębie N- i C-końca i domeny środkowej uznawanej jako tzw. fragment rdzeniowy. W budowie aminokwasowej amyliny obserwuje się różnice w zależności od gatunku zwierzęcia, z którego pochodzi. Choć pozornie wydają się one niewielkie, to jednak w rzeczywistości są niezwykle istotne i determinują cechy i zachowanie się zarówno całego polipeptydu, jak i własności poszczególnych domen budujących amylinę.

Za klasyczną, modelową fibrylującą cząsteczkę uznaje się amylinę ludzką, a za nefibrylującą cząsteczkę przyjęto uważyć polipeptyd szczura. Polipeptydy te różnią się jedynie sześcioma aminokwasami, co przekłada się jednak na diametralnie odmienne ich własności. Rzadziej do badań wykorzystuje się jako modelowe polipeptydy: fibrylujący kota, różniący się od polipeptydu człowieka czterema aminokwasami i nefibrylujący myszy, identyczny z polipeptydem szczura (ryc. 2). Skład aminokwasowy poszczególnych domen budujących amylinę jest różny w zależności od gatunku.

Domena N-terminalna, między 1-19 aminokwasem amyliny ludzkiej, zawiera aminokwasy determinujące nieco odmienny od cech C-końca charakter tego fragmentu. Jest ona

zaangażowana w wiązanie polipeptydu z błoną komórkową [40]. Pierwsze 16 aminokwasów jest identyczne u wszystkich wymienionych gatunków. Na 18 miejscu w amylinie człowieka znajduje się histydyna (H). We wszystkich innych polipeptydach jest ona zastąpiona przez argininę (R). Substytucja ta wzbudziła szczególne zainteresowanie, zwłaszcza w kontekście jej roli w procesie fibrylacji. Na tym odcinku polipeptydu człowieka są umiejscowione wszystkie aminokwasy o charakterze elektrostatycznym: w pozycji 1-lizyna (K), 11-arginina i 18-histydyna. Mogą one odgrywać istotną rolę w procesie składania, fałdowania (folding) polipeptydu, jego fibrylacji czy agregacji.

Pierwsze siedem to aminokwasy wysoce konserwatywne we wszystkich izoformach amyliny u badanych zwierząt [28]. Niezależnie od gatunku, między 2 i 7 resztą cysteiny (C) ułożona jest struktura także wysoce konserwatywna ewolucyjnie - mostek dwusiarczkowy. Najprawdopodobniej jest on formowany w utleniającym środowisku retikulum endoplazmatycznego. Sugeruje to raczej funkcjonalny charakter tego odcinka i pozwala przypuszczać, że nie odgrywa on roli w procesie fibrylacji, ale może jedynie modulować ten proces [28,40]. To, że pierwsze osiem aminokwasów amyliny ludzkiej wystarcza do wywołania aktywności receptora, potwierdza powyższą sugestię. Obecność trzech reszt treoniny (T) w tym regionie sugeruje, że w aparacie Golgiego może następować etap O-glikozytacji białka [105].

Region 20-29 uznawany jest za główny region amyloidogenny cząsteczki amyliny, choć jej część C-końcowa, pomiędzy 30 a 37 aminokwasem, także uczestniczy w procesie fibrylacji. Jako odcinek wysoce hydrofobowy albo proces fibrylacji wspomaga, albo też sam w procesie uczestniczy. W obrębie cząsteczki amyliny człowieka znajduje się aż 10 aminokwasów hydrofobowych. To one powodują, że amylina jest polipeptydem wyjątkowo trudno rozpuszczalnym, i to im przypisywana jest główna rola sprawcza w procesie fibrylacji. Hydrofobowość postrzegana jest jako jedna z najważniejszych, a może najważniejsza cecha białek fibrylujących [15].

Polipeptyd szczura, mimo że wykazuje aż 84% homologii sekwencji aminokwasowej z izoformą ludzką, to jednak zachowuje się całkowicie odmiennie, gdyż nie tworzy fibryli. Polipeptydy te różni tylko sześć aminokwasów, z których pięć znajduje się w obrębie domeny centralnej 20-29, a trzy z nich to reszty proliny. Nie bez znaczenia jest też fakt, że wszystkie proliny sąsiadują ze sobą, gdyż dwie leżą koło siebie, zajmując 28 i 29 pozycję, a trzecia reszta proliny, ulokowana w pozycji 25, oddzielona została od dwóch pierwszych zaledwie przez dwa aminokwasy: walinę i leucynę (L) [2].

Wydaje się, że różnice zachowania części rdzeniowej (20-29) amyliny szczura i człowieka są zatem uwarunkowane odmiennym składem aminokwasowym obu polipeptydów. W polipeptydach tych na rdzeń amyliny składa się jego hydrofobowa domena wewnętrzna - jako wnętrze sekwencji 20-29. Odcinek ten to reszty między 23 a 26 aminokwasem. Sekwencje C- i N- końcowe części rdzeniowej (20-29), to w przypadku szczura polarny N-koniec i niepolarny, hydrofobowy C-koniec, a w przypadku amyliny człowieka oba końce części rdzeniowej (20-29) są polarne. Wydaje się, że różnica ta ma istotne znaczenie dla odmiennych cech obu polipeptydów.

C-końcowa część cząsteczki, między resztami 30 a 37, to osiem aminokwasów, identycznych w polipeptydzie fibrylującym i niefibrylującym. Ostatni C-końcowy aminokwas, którym jest tyrozyna (Y), niezależnie od gatunku, jest amidowany i występuje w postaci amidotyrozyny. Podobnie jak mostek dwusiarczkowy, tak i ta modyfikacja potranslacyjna polipeptydu jest niezwykle ważna dla jego funkcji fizjologicznych w organizmie [105]. Modyfikacja ta nie wpływa na proces fibrylacji polipeptydu. Wskazuje na to podobna kinetyka formowania fibryli przez postać amidowaną i niezmienioną [30].

Punkt izoelektryczny amyliny ma wartość 8,90. Dla polipeptydu wartość tę wyznaczono jedynie teoretycznie i wynosi ona 9,51 [73]. W środowisku obojętnym amyliną ma zatem ładunek pozytywny. Dzieje się to za sprawą aminokwasów, które w środowisku fizjologicznym mogą być naładowane dodatnio, a są nimi: w pozycji 1 - lizyna, w pozycji 11 - arginina i w pozycji 18 histydyna [1,3]. Swoją rolę do całkowitego ładunku może wносить także N-końcowa część polipeptydu, której pK_a nie jest znane, i być może, także końcowa reszta tyrozyny. Można przypuszczać, że w pH około lub poniżej 4,0 N- koniec jest całkowicie protonowany, a w pH 8,0 deprotonowany. Ze względu na znaczenie nierozpoznanego ładunku N-końca amyliny dla potrzeb badawczych stosuje się blokowanie końcowego aminokwasu tego odcinka.

AMINOKWASY ISTOTNE W PROCESIE FIBRYLACJI AMYLINY I STRUKTURA FIBRYLUJĄCEGO POLIPEPTYDU

Jaki jest udział poszczególnych aminokwasów w procesie fibrylacji do końca nie wiadomo, jednak pewne reszty wydają się niezwykle istotne. Do aminokwasów takich należą: lizyna, histydyna, fenyloalanina i prolina. Istot-

ne wydają się też reszty cysteiny i formowany przez nie mostek dwusiarczkowy.

Lizyna jest aminokwasem polarnym, istotnym ze względu na wnoszony ładunek. Oprócz grupy α -aminowej, istotna jest także jej dodatkowa grupa ϵ -aminowa o pK 10,5. Aminokwas ten w środowisku fizjologicznych wartości pH przyjmuje ładunek pozytywny, co ma ogromne znaczenie dla interakcji z cząsteczkami wody lub innymi cząsteczkami naładowanymi ujemnie. Jednak jaka jest rola lizyny w procesie fibrylacji - nie wiadomo [15].

Histydyna jest aminokwasem o wysoce polarnym charakterze, uczestniczy w formowaniu domeny helikalnej białka i wykazuje tendencję do lokowania się w jej obrębie. Istotny wydawał się związek protonacji histydyny z formowaniem fibryli i dlatego znaczenie histydyny w procesie fibrylacji amyliny badano uważnie. Jest to ważne, zwłaszcza w kontekście fizjologicznie istniejących różnic w wartościach pH granul sekrecyjnych (pH 5,5) pęcherzyków sekrecyjnych, a pH przestrzeni pozakomórkowej (pH 7,4). Okazało się, że stan protonacji histydyny ma ogromne znaczenie, bo wpływa modulując na tworzenie fibryli zarówno przez całą cząsteczkę amyliny, jak i jej fragmenty, choć wpływ ten jest znacząco większy i intensyfikuje proces w przypadku całego polipeptydu. Deprotonacja histydyny (pH 8,8) prowadzi do znacznie szybszego formowania fibryli w porównaniu z warunkami, w jakich jest ona protonowana (pH 4,0), a sam polipeptyd jest lepiej rozpuszczalny. Roli, jaką w procesie fibrylacji amyliny odgrywa stan protonacji histydyny, nie należy jednak przeceniać, gdyż zmienne pH granul sekrecyjnych i przestrzeni pozakomórkowej dotyczą zarówno osób chorych na cukrzycę, ze złoгами amyloidu, jak i osób zdrowych. Obecność histydyny na 18 pozycji w amylinie człowieka ma ewidentny związek ze zmianą stanu konformacyjnego polipeptydu. Wydaje się, że histydyna może być ważnym elementem, który należy brać pod uwagę przy analizie nie tyle efektu prostego sumowania, ile raczej przy analizie interakcji różnych współdziałających czynników. Zwłaszcza istotny jest skutek wzmacniania czy potęgowania fibrylacji przez różnorodne czynniki środowiska [1].

Rozważając znaczenie interakcji aromatycznych w procesie fibrylacji, zwrócono uwagę na dwie reszty fenyloalaniny obecne w polipeptydzie człowieka. Fenyloalanina umiejscawia się zazwyczaj wewnątrz cząsteczki białka. Tak też jest w przypadku amyliny, gdyż zajmuje pozycję 15 i 23 w jej łańcuchu. Ma charakter wysoce hydrofobowy, a nie mając grup ulegających jonizacji, raczej powinna pozostać obojętna wobec procesu formowania struktur helikalnych [6,93,108]. Wyniki sugerowały mniej istotną rolę oddziaływań typu interakcji aromatycznych w procesie fibrylacji fragmentów amyliny, choć nie marginalizowały ich zupełnie. Brak fenyloalaniny prowadził bowiem do dezintegracji protofilamentów [57,61]. Oddziaływania aromatyczne są także istotne w interakcjach z innymi białkami np. z insuliną, która jest naturalnym inhibitorem procesu fibrylacji amyliny [27]. Fenyloalanina wydaje się istotnym aminokwasem w procesie fibrylacji, choć wagę

nadaje jej rozmiar i cecha hydrofobowości, a nie aromatyczny typ oddziaływań [93].

Odmienne zachowanie niefibrylującej amyliny szczura od fibrylującego polipeptydu ludzkiego jest przypisywane głównie trzem resztom prolina w pozycjach 25, 28 i 29. Prolina, w zasadzie nie ami-, ale imi-nokwas, pełni w białkach rolę „łamacza” struktur typu beta. Postrzegana jest jako czynnik niszczący takie struktury, a ulokowana wewnątrz łańcucha aminokwasowego na ogół pełni rolę elementu zaburzającego strukturę białka. Paradoksalnie, prolina obecna na pierwszej pozycji heliksu stabilizuje jego strukturę. Tak też jest w przypadku amyliny szczura, gdzie prolina na 28 pozycji ma całkowicie odmienne zadanie do spełnienia, od przypisywanej jej roli destabilizatora cząsteczki. Analiza porównawcza amyliny człowieka i szczura wykonana techniką symulacyjną potwierdza stabilizacyjną rolę 28 reszty prolina w polipeptydzie szczura. W polipeptydzie ludzkim, 28 aminokwas to seryna (Ser28) [4,30,39].

Nieudana próba zastosowania u chorych na cukrzycę syntetycznego analogu ludzkiego polipeptydu, jako substytutu brakującego polipeptydu sprawiła, że sięgnięto po dorobek nauk podstawowych, tj. wyniki badań niefibrylującego polipeptydu szczura. Wyrazem tego jest wykorzystanie jako leku, polipeptydu ludzkiego, ale właśnie z resztami prolina, podstawionymi - jak w polipeptydzie szczura, tj. w pozycjach 25, 28 i 29. Z powodu wprowadzonych do cząsteczki ludzkiej reszt prolina, pierwotną nazwę leku Amlintyd (Amlintide) zmieniono na Pramlintyd (Pramlintide). Pramlintyd o wzorze sumarycznym $C_{171}H_{269}N_{51}O_{53}S_2$ ma masę cząsteczkową 3951,41 g/mol, jest w 30-40% biodostępny, w 60% wiąże się z białkami, a czas półtrwania wynosi 48 min. Wszystkie reszty karboksylowe są obdarzone ładunkiem.

Pramlintyd, jako mimetyk amyliny, jest aktywnym składnikiem leku, w którym w postaci octanu (Pramlintide acetate) funkcjonuje pod nazwą Symlin® (Symlintide, Amylin Pharmaceuticals, San Diego, California) i przyjmowany jest przez pacjentów w iniekcjach podskórnych przed głównymi posiłkami, do czterech razy dziennie [60,89]. Jednak w miarę upływu czasu przechowywania leku, podobnie jak w przypadku insuliny, pojawia się problem, który wyklucza go z użycia. Jest nim agregacja. Lek, przechowywany w temperaturze 2-8 °C powinien być płynem klarownym, pojawiające się zmętnienie jest świadectwem, niemożliwej jednak do uniknięcia, agregacji cząsteczek [85].

Pramlintyd stosowany jest w leczeniu cukrzycy typu 1 i 2, a ostatnio poddawany badaniom jako lek w kombinacji z leptyną w leczeniu otyłości [31,34,35,76]. Mechanizm działania leku jest podobny do neurohormonu naturalnego i sprowadza się do obniżenia międzyposiłkowego stężenia glukozy. Obniżenie stężenia krążącej w krwiobiegu glukozy odbywa się także z zaangażowaniem wolniej opróżniającego się żołądka. W porównaniu do placebo, obniżeniu ulega o około 23% ilość przyjmowanego pokarmu, a tym samym

spada liczba kalorii, nie prowadząc do stanu hipoglikemii [22,23]. Pramlintyd, wywołując wrażenie sytości, obniża konsumpcję, co jednak sprawia, że obniżenie konsumpcji może prowadzić do poważnych powikłań z anoreksją włącznie. Stąd też nazywany jest on czasem hormonem anorektycznym [34,81]. Obecnie nie jest stosowany u kobiet w okresie ciąży, a ujawniona ostatnio ekspresja amyliny w mózgu karmiących szczurów, wymusi dodatkowe badania nad stosowaniem tego leku w okresie ciąży i laktacji nie tylko u kobiet chorych na cukrzycę [35,57,90].

Pramlintyd nie jest lekiem toksycznym i jest raczej dobrze tolerowany. Wręcz korzystnie wpływa na parametry biochemiczne krwi osób z chorobami naczyniowymi, współistniejącymi z cukrzycą typu 2, np. obniża poziom markerów stresu oksydacyjnego [14,35,76]. Choć od czasu rejestracji i dopuszczenia do stosowania w 2001 r. jedynie na terenie USA, wiąże się z lekiem poważne nadzieje terapeutyczne, to jednak obecnie wiadomo, że nie przyniesie on pełnego rozwiązania problemu leczenia cukrzycy. Ma on bowiem liczne działania niepożądane [12,33,49,94].

Cysteiny budujące mostek dwusiarczkowy są w niewielkim stopniu hydrofobowe i o słabo zaznaczonym charakterze kwaśnym, nadawanym przez ugrupowanie sulfhydrylowe. Wiązania dwusiarczkowe należą do jednych z najsilniejszych wiązań uczestniczących w formowaniu i utrzymywaniu struktury trzeciorzędowej białek. Energia tego kowalencyjnego wiązania wynosi około 210 kJ/mol (50 kcal/mol), a czynniki denaturujące, takie jak 2M moczynik nie destabilizują wiązania C2-C7 w amylinie. Dlatego też wydaje się, że wiązanie to jest niezwykle istotne dla funkcjonowania polipeptydu, stabilizując jego strukturę, zwłaszcza regionu helikalnego cząsteczki [93]. Stwierdzono, że redukcja tego wiązania powoduje utratę zdolności do tworzenia w odpowiednich warunkach struktury helikalnej [100]. Nie jest do końca wyjaśnione, czy wiązanie dwusiarczkowe jest wbudowywane w strukturę fibryli w postaci nienaruszonej. Stwierdzono jednak, że wiązanie to ma znaczenie w procesie nukleacji przebiegającej zależnie od obecności fibryli (fiber dependent secondary nucleation). Zjawisko polega na tym, że wytworzone, preegzystujące w roztworze pierwotne fibryle warunkują formowanie nowych końców kolejno tworzonych fibryli. Mechanizm tego procesu nie jest poznany. Brak mostka dwusiarczkowego pozbawia uformowane fibryle zdolności do uczestniczenia w kolejnym akcie fibrylacji i preegzystujące w układzie fibryle nie uczestniczą w formowaniu nowych fibryli. W ten sposób eliminowana jest dwustopniowość etapu początkowego fibrylacji. Ominięty zostaje etap nukleacji w tzw. procesie aktywacji, czyli przez dodanie do badanego układu jąder nukleacji. W ten sposób zaburzeniu i zmianie ulega schemat początkowego etapu fibrylacji – zjawisko tzw. podwójnej nukleacji. Być może mostek dwusiarczkowy jest istotny raczej dla fazy nukleacji, a nie elongacji fibryli [46]. Zredukowana postać IAPP agreguje jednak znacznie wolniej od utlenionej, natywnej [106]. Należy także pamiętać, że proces nukleacji zachodzący w roztworze różni się od nukleacji następującej w pobliżu lub na błonie komórkowej [100].

W oparciu o analizę składu aminokwasowego i na podstawie przeprowadzonej symulacji komputerowej amyliny ludzkiej wyróżniono trzy regiony, potencjalnie zdolne do formowania struktur, określanych mianem nici beta – β -strand. Nazwa ta określa odcinek obejmujący 5-10 aminokwasów, których szkielet jest maksymalnie rozciągnięty, ale z zagięciami pod odpowiednim kątem przy węglu α . Odcinki takie, ułożone równolegle do siebie, łączą się boczenie za pomocą kilku międzyłańcuchowych wiązań wodorowych, formując strukturę warstwową określaną terminem pofałdowanej kartki, harmonijki β -sheet. Wyróżniono: region centralny 20-29 i dwa dodatkowe, ułożone między resztą asparaginy w pozycji 14 a histydyny w pozycji 18 oraz między resztą 30 a 34 C-końca amyliny. Proponowane trzy struktury β -strand mogą warunkować formowanie wewnątrzcząsteczkowej struktury typu β -sheet [19,39,43,50,101].

Choć nie udało się próby otrzymania pełnoaminokwasowej amyliny w postaci krystalicznej, to jednak podjęto trud zbadania atomowej struktury jej krystalicznych fragmentów hepta- i heksapeptydów 21-27 i 28-33. Na tej podstawie zaproponowano symulacyjny obraz dyfraktogramów amyliny. Choć zaobserwowano pewne niezwykle, bo odmienne od znanego, zachowanie przestrzenne fragmentów polipeptydu, to otrzymany obraz przypominał obraz uzyskany w innych badaniach. Odmienne było np. zachowanie seryny w 29 pozycji, wystającej w poprzek łańcucha i tworzącej mostek wodorowy z inną seryną. Układ nazwano terminem „kissing serines”. Zaobserwowano także brak formowania typowego, wspomnianego zamka sterycznego. Na podstawie tych badań rentgenostrukturalnych fragmentów amyliny zaproponowano kolejny, atomowy model budowy fibryli amylinowych. Podstawowy schemat budowy fibryli, tj. układ struktur β -strands i β -sheets w nowym modelu nie różni się istotnie od układu opisanego wyżej, a zaprezentowanego we wcześniej zaproponowanych modelach, choć skonstruowanych na podstawie badań przeprowadzonych innymi technikami np. techniką NMR [4].

ZAKOŃCZENIE

Amylina jako hormon, a może nawet neurohormon nadal kryje w sobie nierozpoznany potencjał fibrylotwórczy. Mimo poznania składu aminokwasowego amyliny człowieka i zwierząt, nadal trudno jest wskazać najistotniejsze dla procesu fibrylacji i jego prewencji reszty polipeptydu. Dorobek nauk podstawowych, w postaci wprowadzonego do leczenia cukrzycy leku – pramlintydu, jest osiągnięciem, ale nie

rozwiązuje problemu leczenia. Trwają prace nad kolejnym amylinomimetycznym lekiem o nazwie Divalintyd. Konstruując i tą pochodną także wykorzystano wiedzę na temat aminokwasów i ich znaczenia w procesie fibrylacji [55,56].

Zaobserwowany związek między obecnością depozytów amyloidu w trzustce chorych na endokrynną nowotwór trzustki i na cukrzycę typu 2 budzi zainteresowanie. Zjawisko fibrylacji amyliny, zwłaszcza w kontekście danych statystycznych, dotyczących cukrzycy typu 2, nabiera dodatkowego wymiaru. Dane te potwierdzają, że jest to ważny problem medyczny.

Obecnie cukrzyca jest chorobą, która jawi się jako problem o charakterze pandemii w niedalekiej przyszłości, w skali globu. Szacuje się, że w 2030 r. dotknie około 366 mln ludzi, co oznacza prawie podwojenie liczby chorych w stosunku do obecnych danych. W Polsce liczba chorych to 2,5 mln osób, a dynamika wzrostu zachorowań jest ogromna. W 1995 r. chorych było około 135 mln, w 2000 r. około 171 mln, a w 2010 r. już około 285 mln ludzi na świecie. Około 85-95% tej liczby, to chorzy na cukrzycę typu 2 utożsamianą z cukrzycą wieku późnego (adult diabetes). Dotyczy to także Polski. Szczególnie wyrazisty jest wzrost liczby chorych właśnie na cukrzycę typu 2. Aż 90% przypadków tej choroby wiąże się z otyłością i nadwagą. Liczby w skali świata mówią same za siebie – szacuje się, że około 1,7 miliarda osób cierpi na nadwagę, a 312 mln to osoby otyłe. Dzieci stanowią poważny odsetek tej liczby. Około 155 mln dzieci jest otyłych lub z nadwagą. Liczba 197 mln osób cierpiących z powodu nietolerancji glukozy może wzrosnąć w 2025 r. do 420 milionów. W Polsce liczbę chorych szacuje się na około 1,6 mln. Przyczyny wydają się w chwili obecnej nie do wyeliminowania, bo są nimi styl życia, czyli nadmierna konsumpcja i brak aktywności fizycznej. Będą one dotyczyły coraz to nowych, „cywilizacyjnych” się regionów świata i będą pożerały coraz większe koszty leczenia. Dlatego też szacuje się, że w 2030 r. ponad 70% chorych na cukrzycę będzie zamieszkiwało obszary krajów rozwijających się [29,36,99,103,104,109]. Słusznie mówi się, że cukrzyca stanowi ogromne wyzwanie dla medycyny XXI wieku [38]. Wiele przemawia za tym, że takim samym, ważnym wyzwaniem XXI wieku dla nauk podstawowych będzie fibrylująca cząsteczka amyliny.

PODZIĘKOWANIE

Rysunki do pracy wykonała Pani dr Dominika Wróbel. Składam Jej wyrazy szczerzej wdzięczności.

PIŚMIENNICTWO

[1] Abedini A., Raleigh D.P.: The role of His-18 in amyloid formation by human islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, 2005; 44: 16284-16291

[2] 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

[3] Abedini A., Raleigh D.P.: A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2009; 22: 453-459

[4] Andrews M.N., Winter R.: Comparing the structural properties of human and rat islet amyloid polypeptide by MD computer simulations. *Biophys. Chem.*, 2011; 156: 43-50

- [5] Asai J., Nakazato M., Miyazato M., Kangawa K., Matsuo H., Matsukura S.: Regional distribution and molecular forms of rat islet amyloid polypeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 169: 788-795
- [6] Azriel R., Gazit E.: 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.*, 2001; 276: 34156-34161
- [7] Born W., Fischer J.A.: The calcitonin peptide family: what can we learn from receptor knock out and transgenic mice. W: *The Calcitonin Gene-related Peptide Family: Form, Function and Future Perspectives*, red.: D.L. Hay, I.M. Dickerson. Springer Science+Business Media B.V 2010, 75-86
- [8] Born W., Fischer J.A., Muff R.: Receptors for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin: the contributions of novel receptor-activity-modifying proteins. *Receptors Channels*, 2002; 8: 201-209
- [9] Born W., Muff R., Fischer J.A.: Functional interaction of G protein-coupled receptors of the adrenomedullin peptide family with accessory receptor-activity-modifying proteins (RAMP). *Microsc. Res. Tech.*, 2002; 57: 14-22
- [10] Brain S.D., Grant A.D.: Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol. Rev.*, 2004; 84: 903-934
- [11] Brender J.R., Lee E.L., Hartman K., Wong P.T., Ramamoorthy A., Steel D.G., Gafni A.: Biphasic effects of insulin on islet amyloid polypeptide membrane disruption. *Biophys. J.*, 2011; 100: 685-692
- [12] Buse J.B., Weyer C., Maggs D.G.: Amylin replacement with pramlintide in type 1 and type 2 diabetes: a physiological approach to overcome barriers with insulin therapy. *Clin. Diabetes*, 2002; 20: 137-144
- [13] Ceriello A., Lush C.W., Darsow T., Piconi L., Corgnali M., Nanayakkara N., Frias J.P., Maggs D.: Pramlintide reduced markers of oxidative stress in the postprandial period in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2008; 24: 103-108
- [14] Clark A., Nilsson M.R.: Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? *Diabetologia*, 2004; 47: 157-169
- [15] Cooper G.J.: Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr. Rev.*, 1994; 15: 163-201
- [16] Cooper G.J., Willis A.C., Reid K.B., Clark A., Baker C.A., Turner R.C., Lewis C.E., Morris J.F., Howland K., Rothbard J.B.: Diabetes-associated peptide. *Lancet*, 1987; 2: 966
- [17] D'Este L., Casini A., Wimalawansa S.J., Renda T.G.: Immunohistochemical localization of amylin in rat brainstem. *Peptides*, 2000; 21: 1743-1749
- [18] D'Este L., Wimalawansa S.J., Renda T.G.: Distribution of amylin-immunoreactive neurons in the monkey hypothalamus and their relationships with the histaminergic system. *Arch. Histol. Cytol.*, 2001; 64: 295-303
- [19] Deléage G., Roux B.: An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.*, 1987; 1: 289-294
- [20] Dobolyi A.: Central amylin expression and its induction in rat dams. *J. Neurochem.*, 2009; 111: 1490-1500
- [21] Dobolyi A.: Novel potential regulators of maternal adaptations during lactation: tuberoinfundibular peptide 39 and amylin. *J. Neuroendocrinol.*, 2011; 23: 1002-1008
- [22] Edelman S.V.: Identifying challenges with insulin therapy and assessing treatment strategies with pramlintide. *Family Practise News Internal Med. News. Supplement – Journal Scan*, 2009; 2: 3-4
- [23] Edelman S.V., Schroeder B.E., Frias J.P.: Pramlintide acetate in the treatment of type 2 and type 1 diabetes mellitus. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, 2007; 2: 9-18
- [24] Fan L., Westermark G., Chan S.J., Steiner D.F.: Altered gene structure and tissue expression of islet amyloid polypeptide in the chicken. *Mol. Endocrinol.*, 1994; 8: 713-721
- [25] Ganong W.F.: Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000; 27: 422-427
- [26] Gebre-Medhin S., Mulder H., Zhang Y., Sundler F., Betsholtz C.: Reduced nociceptive behavior in islet amyloid polypeptide (amylin) knockout mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998; 63: 180-183
- [27] Gilead S., Wolfenson H., Gazit E.: Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006; 45: 6476-6480
- [28] Goldsberry 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
- [29] Górská-Ciebiada M., Ciebiada M., Barylski M., Loba J.: Cukrzyca u osób w wieku podeszłym w świetle nowych wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Geriatrics*, 2009; 3: 228-233
- [30] Green J., Goldsberry 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
- [31] Greenwood H.C., Bloom S.R., Murphy K.G.: Peptides and their potential role in the treatment of diabetes and obesity. *Rev. Diabet. Stud.*, 2011; 8: 355-368
- [32] Hay D.L., Christopoulos G., Christopoulos A., Sexton P.M.: Amylin receptors: molecular composition and pharmacology. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004; 32: 865-867
- [33] Hayden M.R., Tyagi S.C.: "A" is for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. *JOP*, 2001; 2: 124-139
- [34] Hollander P.A., Levy P., Fineman M.S., Maggs D.G., Shen L.Z., Strobel S.A., Weyer C., Kolterman O.G.: Pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycemic and weight control in patients with type 2 diabetes: a 1-year randomized controlled trial. *Diabetes Care*, 2003; 26: 784-790
- [35] Hoogwerf B.J., Doshi K.B., Diab D.: Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vasc. Health Risk Manag.*, 2008; 4: 355-362
- [36] Hossain P., Kavar B., El Nahas M.: Obesity and diabetes in the developing world - a growing challenge. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 356: 213-215
- [37] Huebner A.K., Keller J., Catala-Lehnen P., Perkovic S., Streichert T., Emeson R.B., Amling M., Schinke T.: The role of calcitonin and α -calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008; 473: 210-217
- [38] Jagielski A.K., Piesiewicz A.: Cukrzyca wyzwaniem dla medycyny XXI wieku - wnioski z badań klinicznych i biochemicznych. *Postępy Biochemii*, 2011; 57: 191-199
- [39] Jaikaran E.T., Clark A.: Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1537: 179-203
- [40] 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
- [41] Jarrett J.L., Lansbury P.T.Jr.: Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 1993; 73: 1055-1058
- [42] Kahn S.E., Andrikopoulos S., Verchere C.B.: Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999; 48: 241-253

- [43] Kajava A.V., Aebi U., Steven A.C.: The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin. *J. Mol. Biol.*, 2005; 348: 247-252
- [44] Katafuchi T., Yasue H., Osaki T., Minamino N.: Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure. *Peptides*, 2009; 30: 1753-1762
- [45] Khemtémourian L., Engel M.F., Kruijtz J.A., Höppener J.W., Liskamp R.M., Killian J.A.: The role of the disulfide bond in the interaction of islet amyloid polypeptide with membranes. *Eur. Biophys. J.*, 2010; 39: 1359-1364
- [46] Koo B.W., Miranker A.D.: Contribution of the intrinsic disulfide to the assembly mechanism of islet amyloid. *Protein Sci.*, 2005; 14: 231-239
- [47] Leffert J.D., Newgard C.B., Okamoto H., Milburn J.L., Luskey K.L.: Rat amylin: cloning and tissue-specific expression in pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 3127-3130
- [48] Lerner U.H.: Deletions of genes encoding calcitonin/ α -CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2006; 6: 87-95
- [49] Lubieniecka-Mazur B., Czarny-Działak M., Majchowska-Kwiatnik A., Głuszek S.: Czy amylin stanowi postępowanie w leczeniu cukrzycy? *Medical Studies*, 2006; 4: 113-118
- [50] Luca S., Yau W.M., Leapman R., and Tycko R.: Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. *Biochemistry*, 2007; 46: 13505-13522
- [51] Ludvik B., Clodi M., Kautzky-Willer A., Schuller M., Graf H., Hartter E., Pacini G., Prager R.: Increased levels of circulating islet amyloid polypeptide in patients with chronic renal failure have no effect on insulin secretion. *J. Clin. Invest.*, 1994; 94: 2045-2050
- [52] Ludvik B., Lell B., Hartter E., Schnack C., Prager R.: Decrease of stimulated amylin release precedes impairment of insulin secretion in type II diabetes. *Diabetes*, 1991; 40: 1615-1619
- [53] Lukinius A., Wilander E., Westermark G.T., Engström U., Westermark P.: Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the B cell secretory granules of the human pancreatic islets. *Diabetologia*, 1989; 32: 240-244
- [54] Ma Z., Westermark G.T., Sakagashira S., Sanke T., Gustavsson A., Sakamoto H., Engström U., Nanjo K., Westermark P.: Enhanced *in vitro* production of amyloid-like fibrils from mutant (S20G) islet amyloid polypeptide. *Amyloid*, 2001; 8: 242-249
- [55] Mack C.M., Smith P.A., Athanacio J.R., Xu K., Wilson J.K., Reynolds J.M., Jodka C.M., Lu M.G., Parkes D.G.: Glucoregulatory effects and prolonged duration of action of davalintide: a novel amylinomimetic peptide. *Diabetes Obes. Metab.*, 2011; 13: 1105-1113
- [56] Mack C.M., Soares C.J., Wilson J.K., Athanacio J.R., Turek V.F., Trevaskis J.L., Roth J.D., Smith P.A., Gedulin B., Jodka C.M., Roland B.L., Adams S.H., Lwin A., Herich J., Laugero K.D. i wsp.: Davalintide (AC2307), a novel amylin-mimetic peptide: enhanced pharmacological properties over native amylin to reduce food intake and body weight. *Int. J. Obes.*, 2010; 34: 385-395
- [57] Marek P., Abedini A., Song B., Kanungo M., Johnson M.E., Gupta R., Zaman W., Wong S.S., Raleigh D.P.: 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*, 2007; 46: 3255-3261
- [58] Marek P., Mukherjee S., Zanni M.T., Raleigh D.P.: Residue-specific, real-time characterization of lag-phase species and fibril growth during amyloid formation: a combined fluorescence and IR study of p-cyanophenylalanine analogs of islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.*, 2010; 400: 878-888
- [59] Marzban L., Soukhatcheva G., Verchere C.B.: Role of carboxypeptidase E in processing of pro-islet amyloid polypeptide in β -cells. *Endocrinology*, 2005; 146: 1808-1817
- [60] Messer C., Green D.: A review of pramlintide in the management of diabetes. *Clin. Med. Insights Ther.*, 2009; 1: 305-311
- [61] Milardi D., Sciacca M.F., Pappalardo M., Grasso D.M., La Rosa C.: The role of aromatic side-chains in amyloid growth and membrane interaction of the islet amyloid polypeptide fragment LANFLVH. *Eur. Biophys. J.*, 2011; 40: 1-12
- [62] Miyazato M., Nakazato M., Shiomi K., Aburaya J., Kangawa K., Matsuo H., Matsukura S.: Molecular forms of islet amyloid polypeptide (IAPP/amylin) in four mammals. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1992; 15: 31-36
- [63] Mosselman S., Höppener J.W., Lips C.J., Jansz H.S.: The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons. *FEBS Lett.*, 1989; 247: 154-158
- [64] Mulder H.: Expression of islet amyloid polypeptide. Localization and regulation in the pancreatic islets, gastrointestinal tract and sensory nervous system. PhD thesis, University of Lund, Sweden, 1997
- [65] Naot D., Cornish J.: The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone*, 2008; 43: 813-818
- [66] 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
- [67] Nishi M., Chan S.J., Nagamatsu S., Bell G.I., Steiner D.F.: Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 5738-5742
- [68] Nishi M., Sanke T., Nagamatsu S., Bell G.I., Steiner D.F.: Islet amyloid polypeptide. A new β -cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 4173-4176
- [69] Nishi M., Sanke T., Seino S., Eddy R.L., Fan Y.S., Byers M.G., Shows T.B., Bell G.I., Steiner D.F.: Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history. *Mol. Endocrinol.*, 1989; 3: 1775-1781
- [70] Novials A., Rojas I., Casamitjana R., Usac E.F., Gomis R.: A novel mutation in islet amyloid polypeptide (IAPP) gene promoter is associated with type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2001; 44: 1064-1065
- [71] Ogoshi M., Inoue K., Naruse K., Takei Y.: Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. *Peptides*, 2006; 27: 3154-3164
- [72] Otto-Buczkowska E., Mazur-Dworzecka U., Dworzecki T.: Rola amyliny w utrzymaniu homeostazy glukozy i perspektywę jej zastosowania w terapii cukrzycy. *Przegl. Lek.*, 2008; 65: 135-139
- [73] Paulsson J.F., Andersson A., Westermark P., Westermark G.T.: Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia*, 2006; 49: 1237-1246
- [74] Pérez-Figuerá J.M., Jiménez A.J., Rodríguez E.M.: Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc. Res. Tech.*, 2001; 52: 591-607
- [75] Price C.J., Hoyda T.D., Ferguson A.V.: The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*, 2008; 14: 182-194
- [76] Pullman J., Darsow T., Frias J.P.: Pramlintide in the management of insulin-using patients with type 2 and type 1 diabetes. *Vasc. Health Risk Manag.*, 2006; 2: 203-212
- [77] Reda T.K., Geliebter A., Pi-Sunyer F.X.: Amylin, food intake, and obesity. *Obesity Res.*, 2002; 10: 1087-1091

- [78] Riediger T., Zuend D., Becskei C., Lutz T.A.: The anorectic hormone amylin contributes to feeding-related changes of neuronal activity in key structures of the gut-brain axis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004; 286: R114-R122
- [79] Roberts A.N., Leighton B., Todd J.A., Cockburn D., Schofield P.N., Sutton R., Holt S., Boyd Y., Day A.J., Foot E.A., Willis A.C., Reid K.B., Cooper G.J.: Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 9662-9666
- [80] Roth J.D., Maier H., Chen S., Roland B.L.: Implications of amylin receptor agonism: integrated neurohormonal mechanisms and therapeutic applications. *Arch. Neurol.*, 2009; 66: 306-310
- [81] Ryan G., Briscoe T.A., Jobe L.: Review of pramlintide as adjunctive therapy in treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2009; 2: 203-214
- [82] Sakagashira S., Sanke T., Hanabusa T., Shimomura H., Ohagi S., Kumagaye K.Y., Nakajima K., Nanjo K.: Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients. *Diabetes*, 1996; 45: 1279-1281
- [83] Sexton P.M., Albiston A., Morfis M., Tilakaratne N.: Receptor activity modifying proteins. *Cell. Signal.*, 2001; 13: 73-83
- [84] Shiomi K., Nakazato M., Miyazato M., Kangawa K., Matsuo H., Matsukura S.: Establishment of hypersensitive radioimmunoassay for islet amyloid polypeptide using antiserum specific for its N-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 186: 1065-1073
- [85] Singh-Franco D., Robles G., Gazze D.: Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin. Ther.*, 2007; 29: 535-562
- [86] Steiner D.E., Ohagi S., Nagamatsu S., Bell G.I., Nishi M.: Is islet amyloid polypeptide a significant factor in the pathogenesis or pathophysiology of diabetes? *Diabetes*, 1991; 40: 305-309
- [87] Stridsberg M., Sandler S., Wilander E.: Cosecretion of islet amyloid polypeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islets following stimulation or inhibition of beta-cell function. *Regul. Pept.*, 1993; 45: 363-370
- [88] Stridsberg M., Tjälve H., Wilander E.: Whole body autoradiography of 123I-labelled islet amyloid polypeptide (IAPP). Accumulation in the lung parenchyma and in the villi of the intestinal mucosa in rats. *Acta Oncol.*, 1993; 32: 155-159
- [89] SYMLIN®: pramlintide acetate. Ulotka informacyjna. Amylin Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA, USA
- [90] Szabó E.R., Cservenák M., Dobolyi A.: Amylin is a novel neuropeptide with potential maternal functions in the rat. *FASEB J.*, 2012; 26: 272-281
- [91] Takei Y.: Molecular and functional evolution of the AM family in vertebrates. W: *The Calcitonin Gene-related Peptide Family: Form, Function and Future Perspectives*, red.: D.L. Hay, I.M. Dickerson. Springer Science+Business Media B.V 2010, 1-20
- [92] Tilakaratne N., Christopoulos G., Zumpe E.T., Foord S.M., Sexton P.M.: Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000; 294: 61-72
- [93] Tracz S.M., Abedini A., Driscoll M., Raleigh D.P.: Role of aromatic interactions in amyloid formation by peptides derived from human amylin. *Biochemistry*, 2004; 43: 15901-15908
- [94] Traina A.N., Kane M.P.: Primer on pramlintide, an amylin analog. *Diabetes Educ.*, 2011; 37: 426-431
- [95] Watschinger B., Hartter E., Traindl O., Pohanka E., Pidlich J., Kovarik J.: Increased levels of plasma amylin in advanced renal failure. *Clin. Nephrol.*, 1992; 37: 131-134
- [96] Westermark P.: Amyloidosis and amyloid proteins: brief history and definitions. W: *Amyloid Proteins. The beta sheet conformation and disease*, red.: J.D. Sipe. Wiley-VCH VerlagGmbH & Co Kga A., Weinheim 2005, 3-17
- [97] Westermark P., Andersson A., Westermark G.T.: Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol. Rev.*, 2011; 91: 795-826
- [98] Westermark P., Wilander E.: Islet amyloid in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes is related to insulin. *Diabetologia*, 1983; 24: 342-346
- [99] Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H.: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 2004; 27: 1047-1053
- [100] Williamson J.A., Loria J.P., Miranker A.D.: Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.*, 2009; 393: 383-396
- [101] Wiltzius J.J., Sievers S.A., Sawaya M.R., Cascio D., Popov D., Riekel C., Eisenberg D.: Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.*, 2008; 17: 1467-1474
- [102] Wimalawansa S.J.: Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 1997; 11: 167-239
- [103] World Health Organization. Diabetes. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en (30.09.2013)
- [104] Wróbel M.: *Epidemiologia cukrzycy*. W: Strojek K.: *Diabetologia*. Wydawnictwa Medyczne Termedia, Poznań 2008; 8: 7-18
- [105] 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
- [106] Yonemoto I.T., Kroon G.J., Dyson H.J., Balch W.E., Kelly J.W.: Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry*, 2008; 47: 9900-9910
- [107] Young A.: Receptor pharmacology. *Adv. Pharmacol.*, 2005; 52: 47-65
- [108] Zanuy D., Nussinov R.: The sequence dependence of fiber organization. A comparative molecular dynamics study of the islet amyloid polypeptide segments 22-27 and 22-29. *J. Mol. Biol.*, 2003; 329: 565-584
- [109] Zimmet P., Alberti K.G., Shaw J.: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001; 414: 782-787

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.