mgr Weronika Surmacz-Chwedoruk Warszawa, 19.05.2016

AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

"Rola konformacyjnego efektu pamięci w propagacji wariantów strukturalnych amyloidu insuliny"

Promotor:
dr hab. Wojciech Dzwolak, prof. UW

W sprzyjających warunkach fizykochemicznych molekuły natywnego białka mogą ulec rozwinięciu i asocjacji tworząc tzw. włókna (fibryle) amyloidowe – nierozpuszczalne, β-kartkowe agregaty. Struktury te nie tylko pozbawione są (z reguły) prawidłowej aktywności biologicznej swoich rozpuszczalnych prekursorów, ale ich pojawienie się w organizmie może być powiązane z tzw. chorobami konformacyjnymi m.in. chorobami Alzheimera, Parkinsona, czy Creutzfeldta-Jakoba (choroba prionowa). Jedną z cech agregatów amyloidowych jest ich zdolność do zasiewania tj. indukcji patogennego procesu w natywnych molekułach. Ponadto, agregaty amyloidowe powstające z identycznych pod względem struktury kowalencyjnej prekursorów mogą mieć odmienne konformacje i odmienne właściwości biochemiczne. Uważa się obecnie, że tego rodzaju polimorfizm ma udział w silnie zróżnicowanej neurotoksyczności amyloidów Aβ (występujących w przebiegu choroby Alzheimera) czy też prionów (tzw. „szczepy prionowe"). Chociaż mechanizmy prowadzące do indukcji i propagacji różnych form strukturalnych amyloidów są słabo poznane, uważa się, że ważną rolę odgrywa w nich efekt pamięci konformacyjnej. Efekt ten polega na determinowaniu struktury potomnych pokoleń amyloidów przez fenotyp amyloidowego zarodka powielanego następnie w autokatalitycznej pętli.

Ponieważ między amyloidogenezą białek niepatogennych i tych powiązanych z etiologią chorób neurodegeneracyjnych można dostrzec szereg analogii, te pierwsze stały się cennymi układami modelowymi we współczesnych badaniach fizykochemicznych mechanizmów agregacji białek. W niniejszej pracy jako białko modelowe zastosowano insulinę, a badania prowadzono w kontrolowanych warunkach *in vitro*. Celem tych badań było podjęcie problematyki związanej z zależną od zasiewania proliferacją zarodków amyloidowych insuliny, a w szczególności: (1) wyjaśnienie kwestii termicznej stabilności zarodków amyloidu insuliny w odniesieniu do ich zdolności do indukowania pokoleń potomnych fibryli, (2) badanie wpływu punktowych podstawień w sekwencji aminokwasowej insuliny poza tzw. rejonem rdzenia amyloidowego na polimorfizm strukturalny powstających fibryli amyloidowych, (3) analiza stabilności fenotypu

amyloidowego zarodka w trakcie propagacji w pokoleniach potomnych oraz badanie addytywności efektów pochodzących od konkurencyjnych fenotypów.

Wyniki badania procesu termicznej degradacji amyloidu insuliny wykazały, że dekompozycja struktury kowalencyjnej molekuł w fibryli rozpoczyna się w temperaturze rzędu 300°C, czemu towarzyszy wysoce kooperatywne wydzielenie gazowych produktów. Proces ten poprzedzony jest zaburzeniem (już w temperaturze ok. 200°C) specyficznej struktury II-rzędowej białka. Wyniki uzyskane w toku eksperymentów z zasiewaniem pokazały natomiast, że skutkiem zmiany w sposobie upakowania łańcuchów polipeptydowych w fibryli jest utrata zdolności do destabilizowania i przyłączania monomerów do jej lepkiego końca. Zauważono ponadto, że pomimo braku istotnych zmian w supramolekularnej architekturze fibrylarnej, inkubacja w temperaturze 200°C prowadzi do utraty zdolności fibryli do katalizowania agregacji. Uzyskane w ramach tych badań wyniki są istotne, gdyż zdolność do zasiewania *in vitro* stanowi paralelę do infekcyjności prionów, która może być bardziej wrażliwa na działanie wysokiej temperatury niż jest to często przyjmowane.

Badania wpływu modyfikacji sekwencji aminokwasowej poza „krytycznym" segmentem łańcuchów polipeptydowych formujących w stanie fibrylarnym rdzeń na strukturę amyloidów przeprowadzono na grupie kilku insulin. Uzyskane wyniki pokazały, że punktowe modyfikacje sekwencji, głównie w nieamyloidogennym C-końcu łańcucha B, wpływają zarówno na skłonność molekuł do agregacji jak i na strukturę fibryli. Fibryle otrzymane z różnych typów insuliny posiadają co prawda wspólny element strukturalny – równoległą β-kartkę, jednak lokalne skręcenie płaszczyzny β-kartek i siła wiązań wodorowych między nićmi β zależą od rodzaju łańcuchów polipeptydowych tworzących te struktury *de novo*. W pracy tej postawiono tezę, iż dodatkowe reszty aminokwasowe wprowadzone do C-końca insuliny mogą wpływać na dynamikę tej części łańcucha, a w konsekwencji na sposób i skłonność do asocjacji łańcuchów polipeptydowych we wczesnej fazie amyloidogenezy, „sprowadzając" konformację białka na alternatywną ścieżkę agregacji. Ta obserwacja jest istotna zarówno w kontekście dyskusji dotyczącej roli „fragmentów rdzenia" amyloidowego, jak i w projektowaniu nowych, stabilnych analogów insuliny.

Uzyskanie odmiennych strukturalnie fibryli amyloidowych stało się punktem wyjścia dla kolejnych badań nad zjawiskiem propagacji informacji strukturalnej zgodnie z efektem pamięci konformacyjnej, przeprowadzonych na wytypowanej parze insulin BI/KR. W ramach tych badań udało się potwierdzić, że podczas zasiewania krzyżowego insuliny jednego typu (BI lub KR) zarodkami amyloidowymi insuliny drugiego typu ([KR] lub [BI]) obserwowany jest efekt pamięci konformacyjnej. Molekuły przyłączając się do heterologicznego lepkiego końca przyjmują bardzo podobną doń konformację zarówno w obrębie łańcucha głównego jak i w sposobie upakowania łańcuchów bocznych. Efekt pamięci nie obejmuje jednak wyższych

poziomów organizacji strukturalnej amyloidu. Preferencja sposobu asocjacji protofilamentów w dojrzałym włóknie zależy od struktury kowalencyjnej zainkorporowanych molekuł. Na przykład protofilamenty bardziej hydrofobowej insuliny BI, w warunkach fizykochemicznych zastosowanych w toku badań, asocjują bocznie, natomiast protofilamenty insuliny KR z naładowanymi resztami aminokwasowymi na C-końcu łańcucha są zawsze splecione. Uzyskanie tych wyników było inspiracją do postawienia pytania, w kolejnym etapie badań, czy efekt pamięci konformacyjnej determinuje także stabilność oraz scenariusze dezintegracji fibryli potomnych. Do wyjaśnienia tego problemu, jako destabilizatora agregatów białkowych, wykorzystano DMSO. Uzyskane profile denaturacyjne uwidoczniły istnienie dwóch wyraźnie różnych scenariuszy dezintegracji struktury II-rzędowej fibryli, determinowanych efektem pamięci. Z charakteru profili denaturacyjnych wywnioskowano ponadto, że stężenie, przy którym następuje całkowita denaturacja fibryli zależy od rodzaju zainkorporowanych molekuł. Okazało się też, że z przyczyn, których wyjaśnienie wymaga dalszych badań, wyższą stabilnością charakteryzują się fibryle zbudowane z BI. Całkowity zanik struktur β-kartkowych dla tych fibryli następuje dopiero w obecności 90% roztworu DMSO.

Badania nad efektem pamięci prowadzono zazwyczaj w warunkach niesprzyjających nukleacji (tj. agregacji *de novo* – inkubacja w 37°C, bez wytrząsania). W toku kolejnych badań warunki te jednak celowo zmieniono na takie, w których z procesami elongacji pojedynczego fenotypu zarodka konkurują alternatywne ścieżki agregacji – zarówno *de novo*, jak i te oparte o inne rodzaje zarodków. Przykładem tej pierwszej sytuacji było zastosowanie wyższej temperatury inkubacji (60°C) i intensywnego wytrząsania, promujących tworzenie się chiralnych superstruktur amyloidu insuliny BI. Uzyskane wyniki pokazały po pierwsze, że efekt pamięci może być obserwowany w takich warunkach, lecz przy podwyższonym stężeniu zarodków. Badania te pokazały również, że właściwości chiralooptyczne superstruktur amyloidowych mogą być również modulowane poprzez efekt pamięci konformacyjnej. Ten interesujący i nieoczekiwany rezultat może mieć implikacje w nowej gałęzi nanotechnologii opartej o włókna amyloidowe gdyż dowodzi, że właściwości bionanomateriałów mogą być optymalizowane w kontrolowany sposób poprzez wykorzystanie efektu pamięci i sił hydrodynamicznych.

W ramach badań nad efektem pamięci sprawdzono również, jak liczba lepkich końców konkurencyjnych fenotypów strukturalnych (zarodków [BI] i [KR]) współobecnych w materiale zasiewającym będzie manifestować się w widmach pokoleń potomnych. Uzyskane wyniki były zaskakujące i pokazały, po pierwsze, że nawet gdy ilość heterologicznych zarodków znacznie przewyższa ilość homologicznych zarodków, nie obserwuje się wobec nich efektu pamięci. Pierwszeństwo w proliferacji swojej struktury w pokoleniu potomnym ma zarodek homologiczny. Po drugie, zarodek heterologiczny pozostaje aktywny i katalizuje konwersję natywnej insuliny we włókna amyloidowe, „współpracując” z zarodkiem homologicznym. Ta obserwacja jednoznacznie potwierdziła postulowaną już wcześniej przez innych autorów tezę o możliwości

oddzielenia efektu katalitycznego od konformacyjnego w propagacji fibryli. Wyniki te pokazały też, że szczepy amyloidowe insuliny są stabilne kinetycznie i w skończonym przedziale czasowym nie ulegają konwersji do wariantu preferowanego termodynamicznie. Te nieintuicyjne rezultaty rzuciły światło na słabo poznany mechanizm elementarnych procesów towarzyszących przyłączaniu rozpuszczonego białka do końca fibryli, w których kontrola termodynamiczna może odgrywać kluczową rolę. Wydaje się, że głębsze poznanie tych procesów może przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w amyloidozach, opierających się o cząsteczki blokujące lepkie końce fibryli.

Jednym z ostatnich zagadnień podjętych w ramach niniejszej pracy było badanie stabilności przekazywania informacji strukturalnej w trakcie wielopokoleniowych pasaży. Uzyskane wyniki pokazały, że w przypadku insuliny KR informacja strukturalna przekazywana jest bez zmian do dwunastego pokolenia potomnego. W przypadku cyklu zasiewań homologicznych amyloidu insuliny BI obserwuje się powolną ewolucję tzw. fenotypu spontanicznego w kierunku chiralnych superstruktur. Ewolucja ta obejmuje wszystkie poziomy organizacji strukturalnej, tj. od struktury II-rzędowej po strukturę wyższych rzędów i właściwości chiralooptyczne. Ten interesujący rezultat sugeruje, że do tego samego końcowego produktu amyloidogenezy insuliny wołowej prowadzą dwie alternatywne ścieżki: szybka – indukowana siłami hydrodynamicznymi lub wolna – indukowana cyklem zasiewań.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy zostały opublikowane w następujących czasopismach: *Journal of Physical Chemistry B* (2014), *PLoS One* (2014), *Langmuir*, *ACS* (2013), *Biochemistry*, *ACS* (2012).