

Streszczenie

Amyloidy to grupa peptydów i białek, które tworzą nierozpuszczalne włókna, o bardzo regularnej i ciasno upakowanej strukturze β -cross, przypominającą strukturę zamka błyskawicznego. Są one związane z wieloma chorobami cywilizacyjnymi, takimi jak cukrzyca typu 2 i choroby neurodegeneracyjne. Pomimo tego, dzięki swoim unikalnym cechom, takim jak zdolność do agregacji oraz korzystne właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i optyczne, amyloidy mogą i są wykorzystywane w różnych dziedzinach naukowych.

Amyloidy są bardzo wrażliwe na różne warunki eksperymentalne, w których badany jest proces agregacji. Warunki eksperymentu mają duży wpływ na własności i klasyfikacje amyloidów. W wielu przypadkach dane zebrane z eksperymentów wykorzystujących różne techniki i przeprowadzane przez różne grupy naukowe, nie zawierają wszystkich informacji o istotnych szczegółach dotyczących warunków eksperymentalnych. Fakt ten może mieć istotny wpływ na skuteczność stosowanych metod bioinformatycznych, których celem jest przewidywanie skłonności amyloidów do agregacji.

Prezentowana praca doktorska skoncentrowana jest na opisie wpływu wybranych czynników wewnętrznych i zewnętrznych środowiska eksperymentalnego, na proces agregacji peptydów amyloidowych. W badaniach rozważono przede wszystkim: długość sekwencji aminokwasów, wpływ mutacji, wpływ rozpuszczalnika, a w tym rodzaju i stężenia soli, interakcje z innymi peptydami oraz bliskość i interakcję ze ścianą komórkową (środowisko lipidowe). Opisane badania dotyczyły wybranych amyloidów patologicznych i funkcjonalnych oraz ich najistotniejszych fragmentów. Badania przeprowadzono metodami eksperymentalnymi i obliczeniowymi.

Pierwszy etap badań dotyczył ustanowienia standardowego protokołu badania właściwości agregacyjnych krótkich peptydów, koniecznego do identyfikacji możliwych sekwencji aminokwasowych o charakterze amyloidogennym. Wykorzystano w tym celu narzędzie bioinformatyczne AmyloGram. Następnie zbadano, czy i w jakim stopniu niewłaściwie opisane dane treningowe mogą wpłynąć na wyniki metod bioinformatycznych. Ostatecznie, sprawdzono, czy dłuższe sekwencje mogą być traktowane w taki sam sposób jak krótsze.

W drugiej części badań wykorzystano metody eksperymentalne, zbadano długie sekwencje aminokwasowe (do 23 aminokwasów) pochodzące z funkcjonalnego amyloidu CsgA (składającego się z fragmentów R1–R5), w celu sprawdzenia czy posiadają skłonność do tworzenia amyloidów. Zbadano czy takie peptydy są bardziej wrażliwe niż amyloidy

patologiczne na wybrane czynniki wewnętrzne i zewnętrzne, takie jak: mutacje punktowe, rozpuszczalnik, rodzaj jonów, stężenie jonów. Porównano wpływ tych parametrów na właściwości agregacyjne homologicznych fragmentów pochodzących z dwóch bakterii: *Escherichia coli* i *Salmonella enterica*. W tym przypadku uwzględniono również wpływ mutacji, który został zweryfikowany przez badania obliczeniowe i teoretyczne.

W końcowej części przeprowadzono badania na amyloidach patologicznych: A β 2 i hIAPP (sekwencje do 42 aminokwasów). W celu naśladowania warunków fizjologicznych, eksperymenty i symulacje zostały przeprowadzone w obecności błony lipidowej. W tym celu zbadano wpływ błony lipidowej i interakcji z innym peptydem na agregację tych amyloidów.

Wyniki badań wskazują na istotność zbierania spójnych danych z eksperymentów przeprowadzonych w nieidentycznych warunkach. Potwierdzono, że różne metody eksperymentalne mogą dostarczać różne wyniki w odniesieniu do tych samych peptydów. Różnica ta jest bardziej widoczna w przypadku niektórych sekwencji.

Stwierdzono, że krótkie sekwencje heksapeptydów wykazują wyraźne skłonności do agregacji w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, takie jak stosowany rozpuszczalnik, w porównaniu z dłuższymi sekwencjami (do 23 aminokwasów). Elastyczność sekwencji heksapeptydów pozwala im na przyjmowanie określonych konformacji, a koncepcja przejść łamiących symetrię odgrywa istotną rolę w tym procesie.

Dodatkowo wykazano, że wybór rozpuszczalnika ma wpływ na proces agregacji. Użycie rozpuszczalnika D₂O może zmienić, na przykład, klasyfikację fragmentu R2 pochodzącego z bakterii *S. enterica*. Włókna wykryto w obecności ciężkiej wody, ale nie w roztworze NaOH+PBS. Dominująca konformacja w D₂O została przypisana do agregatów międzymolekularnych, sygnatury typowej dla struktur amyloidowych. Na podstawie tych wyników klasyfikacja fragmentu R2 jako amyloidowego lub nieamyloidowego zależy od zastosowanych warunków eksperymentalnych.

Badania wykazały, że fragment R4 pochodzący z *S. enterica* (SR4) ma większą skłonność do agregacji niż fragment R4 pochodzący z *E. coli* (ER4). Teoretyczna analiza sekwencji wykazała, że SR4 ma wyższą hydrofobowość i wartości ładunku niż ER4. Czynniki te są znane z przyspieszania agregacji białek. Dodatkowo, peptyd SR4 posiada znaczące różnice w aminokwasach regulujących proces agregacji, tzw. „gatekeeper”, które odgrywają istotną rolę w regulowaniu formowania amyloidów. Wyniki wskazują, że konkretne substytucje aminokwasów mogą znacząco wpływać na skłonność funkcjonalnych białek amyloidowych do tworzenia struktur amyloidowych, co może mieć potencjalne konsekwencje funkcjonalne.

Badania podkreśliły wpływ jonów buforowych fosforanów na morfologię peptydów, wpływając na lokalne oddziaływania elektrostatyczne między łańcuchami polipeptydowymi. Symulacje dynamiki molekularnej pokazały, że interakcje aminokwasów naładowanych dodatnio z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi w buforze przyczyniły się do powstałej morfologii agregatu. Zauważono, że mutacje jak i obecność jonów, dla peptydu M4, mogą przyczynić się do powstania kulistego agregatu, który przedstawia włókno zwinięte w sferyczną strukturę.

W ostatniej fazie, badana była stabilność peptydu A β 42 w błonie lipidowej za pomocą symulacji dynamiki molekularnej i badań mikroskopii sił atomowych. Wykazano, że peptyd A β 42 jest stabilny w błonie lipidowej, co wskazuje, że agregacja peptydów może zachodzić wewnątrz błony. Stwierdzono również, że A β 42 w interakcji z hIAPP wykazywała wyższą zawartość β -struktur przy bliskim oddziaływaniu peptydów, w porównaniu do peptydu A β 42 samodzielnie. Badania mikroskopii sił atomowych wykazały, że dwuwarstwy lipidowe były również bardziej uszkodzone w obecności obu peptydów (A β 42 i hIAPP).

Badania przedstawione w pracy doktorskiej wskazały na potencjalne wyzwania wynikające z niejednoznaczności wyników eksperymentów w kontekście badań amyloidów. Pokazały, że nawet niewielkie różnice w warunkach eksperymentalnych mogą zmienić właściwości peptydów i białek amyloidowych, co może prowadzić do otrzymywania niepoprawnych modeli i prognoz narzędzi bioinformatycznych opartych na niespójnych danych uczących. Jednak, jak pokazano w badaniu, niewielkie błędy w danych uczących nie są szkodliwe dla tych narzędzi. Metody bioinformatyczne są dość odporne na niezgodności w danych, ale ich wydajność może zostać zaburzona, jeśli nie uwzględni się wpływu warunków eksperymentalnych i nieznacznych różnic w sekwencjach homologicznych. Opisane powyżej wyniki potwierdzają, że w procesie planowania badań eksperymentalnych ważne jest wybranie odpowiednich warunków zgodnie z badanym obiektem. Na podstawie tego wyboru możemy skutecznie modulować skłonność peptydów do agregacji.

23.04.2023 Natalia Szulc

