

**AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ***“Amyloidogenne właściwości peptydów(L-Glu)<sub>n</sub>”*

Promotor:

dr hab. Wojciech Dzwolak, prof. UW

Zwijanie się białek w warunkach fizjologicznych jest spontanicznym procesem prowadzącym do utworzenia natywnej konformacji cechującej się specyficzną aktywnością biologiczną. Częściowa destabilizacja struktury natywnej białka może faworyzować zachodzenie procesu agregacji, co wiąże się z powstawaniem wysoce uporządkowanych ( $\beta$ -karkowych), fibrylarnych struktur, które noszą nazwę amyloidów. Niezależnie od białka prekursora, amyloidy charakteryzują się podobną morfologią oraz wysoką stabilnością termodynamiczną, a ich odkładanie się w tkankach jest często powiązane z etiologią szeregu chorób degeneracyjnych m.in. chorobami Alzheimera, Parkinsona, czy Huntingtona. Postulat, że formowanie fibryli amyloidowych jest generyczną cechą białek jako poliamidów poszerzył grupę badanych w tym kontekście białek o syntetyczne peptydy, w tym poli- $\alpha$ -aminokwasy. Uproszczenie sekwencji aminokwasowej sprawia, że homopolipeptydy stanowią ciekawe modele biofizyczne dla badań konformacyjnych, w tym prób scharakteryzowania wciąż niedostatecznie poznanego, a istotnego ze względów klinicznych, mechanizmu agregacji amyloidowej.

W niniejszej pracy skorzystano z modelowego homopolipeptydu – kwasu poli-L-glutaminowego (PLGA) oraz oligomerów kwasu L-glutaminowego o różnej liczbie reszt (Glu). Wykorzystano bowiem fakt, że PLGA w sprzyjających warunkach fizykochemicznych tworzy szczególny typ struktury (tzw.  $\beta_2$ ), którego  $\beta$ -karkowy szkielet wspierany jest układem wiązań wodorowych z bifurkującym akceptorem. Co, z kolei, przejawia się w nietypowych widmach w podczerwieni. Zasadniczym celem przeprowadzonych badań było głębsze poznanie molekularnego oraz fizykochemicznego mechanizmu amyloidogenezy peptydów (L-Glu)<sub>n</sub> oraz czynników mających wpływ na polimorfizm powstających fibryli amyloidowych. Szczegółowo podjęto się wyjaśnienia następujących problemów badawczych: (1) ustalenia najkrótszej sekwencji łańcucha peptydowego, złożonego z reszt kwasu L-glutaminowego, która

stanowi minimalny model przemiany konformacyjnej RC/ $\alpha$ -helisa  $\rightarrow$  struktura  $\beta_2$ , (2) zbadania pokrewieństwa przemian konformacyjnych krótkich oraz długich łańcuchów (L-Glu) $_n$ , oraz (3) wyjaśnienia konsekwencji modyfikacji kowalencyjnych na N- oraz C-końcach łańcuchów peptydowych (L-Glu) $_n$  na przebieg procesu agregacji amyloidowej.

Badania agregacji peptydów o różnej liczbie reszt kwasu glutaminowego doprowadziły do określenia krytycznego „rozmiaru” oligomeru zdolnego do tworzenia struktury  $\beta_2$  (4 reszty kwasu L-glutaminowego). Agregaty krótkich peptydów różnią się zarówno charakterystyką spektralną (pojawienie się dodatkowego pasma 1585 cm $^{-1}$  typowego dla zjonizowanych grup -COO $^{-}$ ), jak również morfologiczną tworząc mniej zwarte fibrylarne skupiska w stosunku do silnie, lateralnie zasocjowanych fibryli skręconych superstruktur PLGA. Pomimo tak dużych różnic w długości łańcucha fibryle amyloidowe peptydów (L-Glu) $_n$  charakteryzują się podobnym przekrojem określanym na 4-5 nm. Niezależnie od długości łańcucha, peptydy (L-Glu) $_n$  (gdzie  $4 \leq n < 200$ ) wykazują tendencję do indukowania agregacji za pomocą dodawanych zarodków gotowych fibryli zarówno homologicznych, jak i heterologicznych. Nie jest to jednak powiązane z występowaniem efektu pamięci konformacyjnej, gdyż fibryle potomne powstałe w wyniku zasiewania krzyżowego mają charakterystykę spektralną (FT-IR) taką jak fibryle powstałe *de novo*. W zaproponowanym modelu strukturalnym agregatów krótkich (L-Glu) $_n$  jonizacja terminalnych grup w łańcuchu peptydowym (-COO $^{-}$  - ND $_3^{+}$ ) pozwala na utworzenie sieci mostków solnych, które stabilizują całą strukturę przestrzenną. W zgodzie z tym modelem pozostaje fakt pojawienia się dodatkowego pasma 1585 cm $^{-1}$  w widmach FT-IR agregatów  $\beta_2$  krótkich (L-Glu) $_n$ .

Ustalenie minimalnej długości łańcucha złożonego z reszt kwasu L-glutaminowego stało się punktem wyjścia do rozpoczęcia badań nad koagregacją peptydów (L-Glu) $_5$  oraz PLGA. Mieszając peptydy w różnych stosunkach stechiometrycznych pokazano, że niezależnie od udziału danego peptydu w mieszaninie, za każdym razem dochodzi do znacznego przyspieszenia procesu agregacji. Niezwykle interesujący jest fakt, że zarówno na zmierzonych widmach FT-IR, jak i na obrazach AFM nie zaobserwowano żadnych, wyróżniających się cech spektralnych lub morfologicznych agregatów otrzymywanych dla krótkich peptydów (nawet w przypadku 3-krotnego nadmiaru (L-Glu) $_5$  w mieszaninie). Na tej podstawie postulowano, że krótki peptyd (L-Glu) $_5$ , w trakcie przemiany konformacyjnej, nie podąża swoją ścieżką agregacji amyloidowej, lecz tą typową dla PLGA. Zarejestrowane widma różnicowe CD pokazały, że ubytek helikalności PLGA poprzedza koagregację peptydów. Oznacza to, że na etapie nukleacji następuje pewnego rodzaju zmiana konformacyjna, którą można określić jako

„transfer nieuporządkowania”. Taki rodzaj „denaturacji” znacznie przyspiesza proces agregacji amyloidogennej, co zaobserwowano w trakcie pomiarów kinetycznych FT-IR.

Ostatnim problemem podjętym w niniejszej pracy było zbadanie wpływu modyfikacji kowalencyjnych na N-końcach oraz C-końcach krótkich peptydów (L-Glu)<sub>n</sub> (gdzie n = 3, 4, 5) na proces agregacji amyloidogennej. Pokazano, że drobne zmiany w łańcuchu peptydowym mogą sterować szybkością zachodzenia procesu agregacji. Pojedyncze modyfikacje prowadzą do znaczącego spowolnienia agregacji (lub jego całkowitego uniemożliwienia) zwłaszcza dla peptydów modyfikowanych na C-końcu, gdzie jedyny agregujący peptyd (L-Glu)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> wymagał zastosowania 21-dniowej inkubacji (w typowych warunkach). Efekt ten był mniej widoczny podczas modyfikacji na N-końcu łańcucha. Wykazano, że podwójna modyfikacja łańcucha peptydowego może przywracać zdolności do agregacji amyloidowej peptydów (L-Glu)<sub>4</sub> oraz (L-Glu)<sub>5</sub> oraz dodatkowo przesunąć granicę minimalnej liczby reszt kwasu glutaminowego potrzebnej do agregacji do stabilnej struktury β<sub>2</sub>. Okazało się bowiem, że podwójna modyfikacja łańcucha (L-Glu)<sub>3</sub>, w przeciwieństwie do jego niemodyfikowanego odpowiednika, zezwala na utworzenie stabilnego agregatu. Najprawdopodobniej jest to spowodowane usunięciem ładunków z końców łańcucha, co znacząco wzmacnia hydrofobowość molekuly promującą zachodzenie procesu agregacji. Badanie zdolności zasiewania poszczególnych peptydów pokazało, że w przypadku różnych wariantów modyfikacji krótkich peptydów jest to proces wysoce selektywny. Na podstawie zarejestrowanych widm FT-IR oraz obrazów AFM stwierdzono, że pomimo znacznej selektywności procesu zasiewania nie obserwujemy jednak konformacyjnego efektu pamięci wśród fibryli potomnych. Oznacza to, że wśród różnych modyfikacji peptydów (L-Glu)<sub>n</sub> występuje zjawisko strukturalnego polimorfizmu, do którego prowadzą różne ścieżki agregacji amyloidogennej.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy zostały opublikowane w następujących czasopismach: *Langmuir* (2015), *Biomacromolecules* (2016), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2017).