

Received: 2014.05.12
Accepted: 2015.01.07
Published: 2015.03.08

Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylacja – cytotoksyczna agregacja polipeptydu trzustki

Amylin under examination. Fibrillation – cytotoxic pancreatic polypeptide aggregation

Małgorzata Marszałek

Katedra Biofizyki Ogólnej, Instytut 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 trzustki patologiczne depozyty, zwane amyloidem. W skład amyloidu wchodzi m.in. wytwarzany przez komórki beta polipeptyd, pełniący funkcję neurohormonu, zwany amyliną. Nieprawidłowo zwinięta, patologiczna bo fibrylująca cząsteczka amyliny, w postaci nierozpuszczalnych fibryli, powoduje dysfunkcję, niszczenie komórek wysp, ich utratę, destrukcję narządu i postęp choroby. Jest to polipeptyd wyjątkowo trudno rozpuszczalny, błyskawicznie fibrylujący, dlatego trudny do badania i wymagający szczególnej metody. Mechanizm i czynniki sprzyjające konwersji natywnej postaci amyliny do nierozpuszczalnych fibryli pozostają niewyjaśnione. W pracy przedstawiono fibrylację amyliny w kontekście stosowanej metody badań różnych postaci polipeptydu na kolejnych etapach procesu fibrylacji, a także problem cytotoksyczności formowanych struktur.

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, the deposits consist of an insoluble, fibrillar form of polypeptide neurohormone called amylin, produced by pancreatic beta cells. It is thought that formation of fibrillar deposits of misfolded and aggregated polypeptide is highly toxic to beta cells and leads to cell dysfunction, cell loss, pancreas destruction and progress of the disease. Due to the extreme insolubility of this polypeptide and its instant fibrillation, amylin constitutes a methodological problem, and there is a need for a special methodology in experiments. Some mechanisms and factors that govern amylin fibrillation are rather poorly understood. This article presents amylin as a fibrillating molecule and some methods and methodological aspects and problems that emerge at successive steps during the fibrillation process, including hypothesized cytotoxicity mechanisms of this polypeptide.

Key words:

amylin • pancreatic amyloid • type 2 diabetes mellitus • aggregation • fibrillation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1143050>

Word count: 4990
Tables: –
Figures: 1
References: 79

Adres autorki: dr Małgorzata Marszałek, Uniwersytet Łódzki, Instytut Biofizyki, Katedra Biofizyki Ogólnej, 90-236 Łódź, ul. Pomorska 141/143; e-mail: mtmarsz@wp.pl

Wykaz skrótów: **AFM** - technika mikroskopii sił atomowych (atomic force microscopy); **EM** - technika mikroskopii elektronowej (electron microscopy); **HFIP** - hexafluoroizopropanol (1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanol); **NMR** - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear magnetic resonance); **ThT** - tioflawina T (thioflavine T).

WSTĘP

Złogi amyloidu, odnajdywane w obrębie wysp Langerhansa trzustki u chorych na cukrzycę zwierząt i człowieka oraz u osób chorych na endokrynną nowotwór wywodzący się z komórek beta trzustki (guz insulinowy trzustki), zawierają neurohormon, wytwarzany głównie przez komórki beta wysp trzustki, zwany amyliną. Wydaje się, że konwersja natywnej postaci amyliny do nierozpuszczalnych fibryli, w dużej mierze odpowiada za rozwój i postęp choroby. W świetle licznych badań okazało się, że najbardziej szkodliwą postacią amyliny dla komórek trzustki nie są dojrzałe, uformowane i deponowane pozakomórkowo fibryle, ale asocjaty kilku, kilkudziesięciu monomerów cząsteczek amyliny, pojawiające się na pierwszych etapach procesu fibrylacji, zwane - ze względu na swoją strukturę - helikalnymi intermediami. Strukturalnie są postacią pośrednią między monomerami amyliny a fibrylami.

Intrygującym fenomenem przyrody jest to, że ten sam polipeptyd zachowuje się różnie u różnych organizmów, tj. formuje fibryle amyloidowe bądź nie wykazuje tej właściwości. Mimo poznania składu 37-aminokwasowego polipeptydu u różnych gatunków, problem mechanizmów i czynników wpływających i determinujących różnorodność form tworzonych depozytów amyliny, zwłaszcza w postaci fibryli, nadal oczekuje na rozwiązanie. Jest wiele przyczyn, które powodują, że amyliną jest polipeptydem trudnym do badań, gdyż jest polipeptydem wyjątkowo trudno rozpuszczalnym i błyskawicznie fibrylującym w roztworze. Dlatego też, od czasu jej odkrycia, liczne prace eksperymentalne prowadzi się na amylinie syntetycznej lub jej syntetycznych fragmentach. Próbuje się znaleźć odpowiedź na pytania o polimorfizm obserwowanych postaci amyliny, na pytania dotyczące struktury polipeptydu na różnych etapach fibrylacji i związku formowanych agregatów z ich toksycznością. W pracy podjęto próbę zaprezentowania amyliny w aspekcie bogactwa jej form strukturalnych, jako cząsteczki o wielu obliczach.

AMYLINA JAKO CZĄSTECZKA AGREGUJĄCA

Agregacja, rozumiana jako proces łączenia się cząsteczek monomerycznych w większe skupiska, może przebiegać w sposób nieswoisty, tj. prowadzący do formowania agregatów nierozpuszczalnych, o strukturze wewnętrznie nieuporządkowanej, określanych mianem agregatów amorficznych. Może też przebiegać w sposób nadający łączącym się monomerom porządek strukturalny. Akt łączenia się monomerów może też prowadzić do tworzenia większych, ale rozpuszczalnych form oligomerycznych. Ostateczna forma utworzonego depozytu zależy od natury agregującej cząsteczki oraz od wielu czynników, składających się na środowisko zewnętrzne - czy to środowisko komórkowe, czy eksperymentalne *in vitro*. W przypadku form uporządkowanych, porządek strukturalny, często uwarunkowany termodynamicznie, znajduje swój wyraz w powstawaniu tworów, wyróżnianych makroskopowo, o wysoce zorganizowanej strukturze, coraz to wyższych rzędów. Przykładem takich uporządkowanych struktur mogą być fibryle, formowane przez białka lub polipeptydy o potencjale amyloidotwórczym [16,64,65].

Fibryle białkowe są odnajdywane w różnych miejscach organizmu zwierząt i człowieka, w różnych stanach patologicznych i w przebiegu licznych chorób, w tym w przebiegu procesów degeneracyjnych. Mogą też być sporadycznie identyfikowane jako depozyty, których obecności nie daje się powiązać z jawnie toczącym się procesem chorobowym, czyli u osobników potencjalnie zdrowych, ale np. starzejących się. W przypadku licznej grupy białek amyloidotwórczych, proces naśladujący formowanie fibryli białkowych w organizmie można generować i obserwować także w warunkach *in vitro* [16,68]. Obecnie przyjmuje się, że nawet białka, którym nie przypisywano cechy zdolności do formowania fibryli *in vivo*, można wprowadzić na szlak fibrylacji, narzucając stosowne warunki eksperymentalne. Przedmiotem zainteresowania są zwłaszcza te białka i peptydy, którym przypisuje



się znaczenie bądź współdział w patogenezie chorób, w których przebiegu obserwuje się formowanie zewnątrzkomórkowych nierozpuszczalnych depozytów o strukturze wysoce uporządkowanej, tj. właśnie fibryli. Stanowią podstawowy składnik odkładanej w organizmie substancji, zwanej amyloidem. Wydaje się, że u podłoża tej grupy różnorodnych chorób leżą zmiany konformacyjne, specyficznego dla danej choroby peptydu, białka czy jego fragmentu, prowadzące do tworzenia uporządkowanych strukturalnie, nierozpuszczalnych w wodnym środowisku komórki, agregatów o pokroju włókienek, które, ze względu na skrętny charakter i złożoną budowę, nazwano fibrylami. Choć liczną grupę białek, różnorodnych pod względem budowy i natury chemicznej, objęto wspólną nazwą: białka amyloidogenne, to jednak nie wyróżniono łączącego je strukturalnego, uwarunkowanego składem aminokwasowym, wspólnego mianownika. Okazuje się, że fibrylują peptydy albo białka o różnorodnej budowie, tj. takie, jakie mają nadaną strukturę drugo- czy trzeciorzędową, np. białka globularne o strukturze sztywnej, a także białka, jakie takiej struktury nie ujawniają i dlatego nazwane zostały białkami niezestrakturalizowanymi lub natywnie niepofałdowanymi. Za takie uważa się cząsteczki, które w stanie oczyszczonym, w pH obojętnym nie mają przypisanej struktury drugorzędowej. Białka fibrylujące, strukturalnie uporządkowane mogą prezentować postać α -helisy (α -helix), β -helisy (β -helix), czy płaszczyzny beta (β -sheet), zwanej także strukturą harmonijkową czy pofałdowanej kartki. Mogą też stanowić postać mieszaną struktur alfa i beta [17,39]. W pracy, dla wszystkich struktur białkowych, w wielu miejscach pozostawiono terminologię anglojęzyczną, celowo nie wprowadzając dłuższych i opisowych nazw polskich.

W przypadku białek strukturalnie zdefiniowanych, o przypisanej strukturze drugorzędowej, pierwszym i niezbędnym „wydarzeniem” na szlaku procesu fibrylacji jest etap przynajmniej częściowego pozbawienia cząsteczki jej natywnej konformacji i nadanie jej cech cząsteczki niepofałdowanej (non-native partially unfolded). Proces fibrylacji różnych strukturalnie białek komplikuje to, że białka globularne mają w swej strukturze trzykrotnie więcej miejsc niż niepofałdowane, umożliwiających i ułatwiających zajście pierwszych etapów fibrylacji. Paradoksalnie, dla licznej grupy białek czy peptydów, pozbawionych w ich natywnej postaci struktury drugorzędowej, pierwszym aktem albo wydarzeniem na szlaku ich fibrylacji jest przynajmniej częściowa stabilizacja, nadanej przez warunki otoczenia struktury drugiego rzędu. Jest to warunek wstępny, ale niezbędny dla niepofałdowanej cząsteczki aby rozpocząć proces formowania fibryli [4].

Wyzwaniem eksperymentalnym jest zarówno analiza formowanych agregatów amyliny, jak i analiza następnymi postaciami fibrylującego polipeptydu. Musi on zostać wprowadzony na szlak zmian konformacyjnych, strukturalnych i morfologicznych. Zwieńczeniem takich badań jest nie tylko określenie struktury fibrylotwórczego polipeptydu, ale także próba znalezienia odpowiedzi na pytanie: która z wyróżnionych postaci agregującej cząsteczki

odpowiada za jej cytotoksyczność, niszczenie komórek trzustki, rozwój i postęp cukrzycy typu 2?

CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE AGREGACJI A RÓZnorodność DEPOZYTÓW AMYLINY. AGREGATY AMORFICZNE A FIBRYLE

Czynniki środowiskowe odgrywają istotną rolę w procesie szeroko rozumianej agregacji. Jest nią zarówno agregacja nieswoista, która prowadzi do agregatów amorficznych, jak i agregacja wysoce swoista, prowadząca do struktur wysoce uporządkowanych, jakimi są fibryle. Można to zaobserwować i badać na przykładzie właśnie amyliny. W zależności od warunków przyjętego układu eksperymentalnego, tj. pH, stężenia i rodzaju rozpuszczalnika, składu jonowego roztworu, obserwuje się różne postaci depozytów amyliny. Jednak wielość i różnorodność zmiennych czynników eksperymentalnych sprawia, że w obrębie postaci uporządkowanych, jakimi są fibryle, także obserwuje się niezwykłą ich różnorodność. Dlatego też tworzone w warunkach eksperymentalnych fibryle amyliny cechuje niezwykle bogactwo rozmiarów, form i kształtów. Zastosowane warunki wywierają swego rodzaju piętno na tworzących się depozytach, co wyraża się polimorfizmem obserwowanych fibryli [19,20,21].

Ze względu na obecność w cząsteczce amyliny 10 aminokwasów hydrofobowych niemożliwe jest jej rozpuszczenie w roztworze wodnym, a w roztworach o wysokim stężeniu polipeptydu np. 20 mg/ml, jego spontaniczna fibrylacja jest natychmiastowa [1,2,41]. Dlatego też do badań amyliny są stosowane roztwory fluorowanych alkoholi: trójfluoroetanolu (2,2,2-trifluoroethanol, TFE) i heksafluoroizopropanolu (1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanol, HFIP), jako rozpuszczalniki wspomagające [75]. TFE działa jako rozpuszczalnik, wykorzystywany do badań struktury białek, gdyż ma wysoce elektroujemną grupę trójfluorometanową. Natomiast HFIP, mając dodatkowe atomy fluoru, staje się 34 razy bardziej kwaśny niż TFE i dlatego wykazuje wyjątkową zdolność do formowania wiązań wodorowych. HFIP, wchodząc w interakcje z ugrupowaniami, takimi jak: tlen, podwójne wiązania czy grupy aminowe, i formując wiązania wodorowe, wykazuje silne działanie rozpuszczające [61]. Alkohole stosuje się do badania agregacji białek czy peptydów w celu osłabienia wiązań hydrofobowych i wywołania w ten sposób zaburzenia ich struktury. Wpływ rozpuszczalnika na białka wiąże się z polarnością stosowanych alkoholi. Roztwory wodne alkoholi cechuje obniżona, w porównaniu z wodą, polarność i w zależności od stałej dielektrycznej, wprowadzają zaburzenia w strukturze białka czy w peptydzie natywnym. Zwłaszcza fluoroalkohole, ze względu na niższą stałą dielektryczną (TFE - 27,7 i HFIP - 20,8) od stałej dielektrycznej wody (78,3) charakteryzuje duża skuteczność takiego działania. Fluoroalkohole znacząco obniżają polarność środowiska rozpuszczalnika, sprzyjają oddziaływaniom wewnątrzcząsteczkowym, a tym samym formowaniu struktur helikalnych. Ponadto stabilizują drugorzędową strukturę białka, zwłaszcza umożliwiając zaistnienie struktur α -helikalnych, które w innym środowisku może skrywać natywna postać peptydu czy białka.

Obraz protofilamentów formowanych w środowisku bez alkoholi i w obecności HFIP bądź w środowisku z TFE jest znacząco odmienny. Różnice dotyczą stabilności, struktury i morfologii tworzonych fibryli, a tym samym odpowiadają za ich polimorfizm [5,18,50,63].

Na ogół przyjmuje się, że HFIP jest najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem i wpływa na agregację białka zależnie od stosowanego do badań stężenia. Wykazano jednak, że w zależności od stężenia stosowanego do badań alkoholu i od pH, obserwuje się różny wpływ na cząsteczki, czego wyrazem są obserwowane skutki w postaci odmiennych depozytów. Formowane fibryle i amorficzne agregaty są całkowicie odmiennymi tworami zarówno co do formy, jak i mechanizmów i oddziaływań odpowiedzialnych za ich powstawanie. Fibryle stanowią układ niezwykle skomplikowany i w wysokim stopniu uporządkowany. Cechuje je periodyczność budowy, a w związku z tym pewne charakterystyczne wspólne cechy fizyko-chemiczne, a także – do pewnego stopnia – wspólne cechy morfologiczne. Z kolei depozyty o charakterze amorficznym są układem stałym, ale pozbawionym jakiegokolwiek uporządkowania swej struktury wewnętrznej, a więc układem o odmiennych cechach fizyko-chemicznych. Oddziaływania międzycząsteczkowe są w nim na tyle silne, aby układ fizycznie zaistniał, ale nie są wystarczające do narzucenia mu wewnętrzznego porządku. W konsekwencji układ staje się mniej stabilny gdyż jest postacią wysokoenergetyczną [1,63,64,65,75].

W procesie fibrylacji istotny jest wpływ pH na warunki, w jakich bada się fragmenty lub pełnoaminokwasową wersję amyliny. Środowisko obojętne sprawia, że interakcje hydrofobowe dominują nad interakcjami elektrostatycznymi i o charakterze polarnym, a to nie pozwala na wytworzenie wiązań wodorowych i amylna w tych warunkach występuje w postaci agregatów amorficznych. Dopiero odpowiednio wysokie stężenie HFIP (25%) promuje formowanie fibryli i w roztworze obserwowane są formy α -helikalne i struktury beta. Jednak paradoksalnie, wzrost stężenia alkoholu do 40% sprawia, że w roztworze istnieje wyłącznie postać α -helikalna. Natomiast w środowisku kwaśnym, wszystkie aminokwasy występujące w postaci naładowanej, nadają cząsteczce większy ładunek niż ich ładunek w pH obojętnym. W ten sposób wzmagają zdolność amyliny do tworzenia fibryli. W tym układzie jedynie niewielki, bo 5% dodatek HFIP, maksymalnie zwiększa fibrylację. Wydaje się, że połączenie oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych narzuca ostateczną postać powstającego depozytu, którym może być kryształ, fibryla, czy agregat amorficzny [75].

Przyjmuje się, że niższe pH sprzyja szybszemu formowaniu fibryli w porównaniu do zasadowego pH, choć np. polipeptyd szczura, niezależnie od warunków pH, nigdy nie fibryluje. Pełnoaminokwasowy polipeptyd ludzki fibryluje najefektywniej w pH neutralnym i zasadowym, ale fragment rdzeniowy tej cząsteczki (20-29) w pH kwaśnym. Również w zależności od pH obraz morfologiczny powstających produktów fibrylacji, zarówno całego polipeptydu, jak i jego fragmentów jest zdecydowanie różny,

a niewielka zmiana pH może prowadzić także do precypitacji badanych fragmentów. Wpływ pH zależy także od innych czynników istotnych w eksperymencie [6,9,52,53].

Złożony proces agregacji amyliny i formowanie różnych, w zależności od warunków środowiskowych, oligomerycznych form polipeptydu zmuszał do postawienia kolejnych pytań. Który z obserwowanych procesów łączenia monomerów amyliny i jaka powstająca jej postać odpowiada za procesy patologiczne, obserwowane u chorych zwierząt i ludzi oraz jaki jest mechanizm cytotoksyczności amyliny?

POSZUKIWANIA CYTOTOKSYCZNEJ POSTACI AMYLINY

W przebiegu cukrzycy typu 2, obserwowaną degenerację komórek beta wysp trzustki, utratę ich liczby i w konsekwencji postępujące zaburzenia w funkcjonowaniu narządu wiązano z pojawianiem się i wypełnianiem utraconej masy trzustki przez złogi zewnątrzkomórkowego amyloidowego depozytu. Obfite złogi amyloidu odnajdywano również w pobliżu nieuszkodzonych komórek trzustki chorych na cukrzycę, a także w otoczeniu komórek guza typu insulinoma [8,11,54]. Czasami u osób, u których nie stwierdzano cukrzycy, obecność amyloidu wiązano jednak z obserwowanym obniżeniem liczby komórek beta trzustki [72]. Obecność amyloidu trzustkowego u starzejących się osób zdrowych w ogóle podważała koncepcję szkodliwości fibrylarnego depozytu czyniąc związek przyczynowo-skutkowy rozwoju choroby jeszcze mniej zrozumiałym. Badania komórek transfekowanych genem fibrylującej amyliny ludzkiej bądź niefibrylującej amyliny szczura dowodziły jednak, że formowany amyloid ma związek ze śmiercią komórek trzustki i zniszczeniem narządu. Ustalono, że podniesione stężenie jedynie polipeptydu ludzkiego, a nie szczura, prowadziło do pojawienia się, a następnie do gromadzenia amyloidu wewnątrz komórek i ostatecznie do ich śmierci [55]. Okazało się także, że amyloid odnajdywano u osób chorych na cukrzycę typu 1, którym przeszczepiono komórki wysp trzustki pobrane od osób zdrowych. Komórki przygotowywane do transplantacji, wyizolowane z naturalnego środowiska, mogą być jednak zagrożone procesem formowania toksycznych fibryli amyliny. Wydaje się, że to właśnie proces fibrylacji amyliny, a nie reakcje immunologiczne, są przyczyną niepowodzeń stosowanej terapii [70,71].

Poczynione obserwacje o umiejscowianiu się złogów amyloidu w pobliżu miejsc destrukcji komórek trzustki, a następnie ubytku masy narządu, pozwalały jedynie na wysunięcie przypuszczenia o zachodzeniu związku przyczynowo-skutkowego obserwowanych zjawisk. Badania rozpoczęte w układach *in vitro* przyniosły nowe fakty i nową wiedzę, a tym samym i nowe pytania, gdyż coraz wyraźniej wskazywały na brak korelacji między toksycznością a stosowanymi do badań dojrzałymi fibrylami amyliny [7,28]. Co więcej, zahamowanie procesu formowania fibryli amyloidowych przedłużało żywotność komórek beta [42,49].

Następnym krokiem było wyeliminowanie z procedur eksperymentalnych wstępnego etapu formowania fibryli,



który jest niemożliwy do wprowadzenia w badaniach *in vivo*, gdy amylna jest wytwarzana w przeszczepionych komórkach beta. Stało się to wykonalne w układzie *in vitro*, który pozwala na dobór zastosowanej postaci amyliny, tj. dojrzałych fibryli. Okazało się, że w miarę wzrostu fibryli ponad hipotetycznie założony wymiar krytyczny, dojrzałe, uformowane fibryle przestają być toksyczne wobec komórek beta trzustki.

Przełom stanowiła obserwacja, że u transgenicznych myszy z ekspresją ludzkiego genu amyliny, destrukcja komórek trzustki i rozwój choroby następuje zanim pojawiają się fibryle amyliny. Obecność małych, amorficznych agregatów, trudnych do rozpoznania i zbadania, związanych z wakuolami, pęcherzykami komórkowymi i cytoplazmą degradowanych i uszkodzonych komórek beta, dała podstawy do powiązania rozmiarów tworzonych fibryli z ich szkodliwością. Rysowała się koncepcja odwrotnej korelacji między wielkością postaci amyliny a ich cytotoksycznością: im mniejsza jednostka na szlaku fibrylacji, tym większa toksyczność [29].

W następnej pracy przedstawiono wyniki badań wpływu na przeżywalność komórek beta, świeżo przygotowanego preparatu amyliny ludzkiej i preparatu dojrzałych, uformowanych fibryli. Tylko preparat świeżo przygotowany, zawierający polimery nie większe niż 6 tysięcy cząsteczek amyliny, był wysoce toksyczny dla komórek beta i powodował destabilizację ich membrany. Preparat znacząco większych fibryli amyliny ludzkiej, bo zawierających 10^6 cząsteczek, a także preparat amyliny szczura nie prowadziły do uszkodzenia błon i do śmierci komórek. Badania te pozwoliły na wysunięcie koncepcji cytotoksyczności wczesnych, prefibrylarnych form amyliny ludzkiej, określonych w cytowanej pracy jako formy o rozmiarach pośrednich między formą monomeryczną amyliny a fibrylarną (inmediate-sized-toxic amyloid particles). Mechanizm ich działania wiązano z oddziaływaniem z błoną komórkową [28].

Istotny dla toksyczności amyliny okazał się więc wstępny etap formowania fibryli, któremu należało przypisać odpowiednią postać fizyko-chemiczną, w jakiej polipeptyd działał zabójczo. Wysunięto hipotezę, że amylna ludzka jest zabójcza dla komórek jeszcze w postaci rozpuszczonej, ale już strukturalnie zmienionej. Wyniki badań innych fibrylujących białek wzbogaciły tę koncepcję o niezbędny dla cytotoksyczności element strukturalny szkodliwego amyloidu, jakim było formowanie struktur typu alfa helisy, a następnie płaszczyzn beta [66].

ODDZIAŁYWANIA AMYliny Z BŁONĄ KOMÓRKOWĄ - BADANIA MODELOWE

Zaobserwowane gromadzenie fibryli amyliny w otoczeniu błon komórkowych, a także badania oddziaływania mniejszych jej agregatów z błoną niszczonych komórek dały podstawy do rozważania membranowego mechanizmu szkodliwego wpływu fibryli na komórkę. Zaproponowano, że membrany mogą być katalizatorami procesu

agregacji amyliny. Do badania interakcji amyliny z błoną komórkową wykorzystano układy modelowe z zastosowaniem dwuwarstw lipidowych, micelli, liposomów czy pęcherzyków komórkowych. Okazało się, że negatywnie naładowane lipidy są bardzo efektywne w akcelerowaniu procesu fibrylacji amyliny. Fosfolipidy stabilizują oddziaływanie polarne i elektrostatyczne częścią hydrofilową głowy swej cząsteczki, natomiast hydrofobowe częścią transmembranową. Przypominają pod tym względem charakter oddziaływań amyliny i fluoroalkoholi, których reszty hydrofobowe i polarne mogą brać udział w różnego typu oddziaływaniach. Fluoroalkohole, ze względu na niszczenie struktury membran, nie mogą być jednak stosowane jako rozpuszczalniki amyliny do badań interakcji z błonami [34,35].

Zbadano formowanie fibryli przez amylinę ludzką w obecności liposomów zawierających fosfolipidy, wyizolowane z trzustki pacjentów chorych na cukrzycę typu 2. Proces formowania fibryli następował 10 razy szybciej w środowisku zawierającym fosfolipidy, niż przy ich braku, a wiązanie amyliny do powierzchni błon było natychmiastowe i całkowite już na wstępnym etapie procesu fibrylacji [35]. Także fosfatydyloseryna, obecna w pęcherzykach błonowych, akcelerowała natychmiastowy proces fibrylacji amyliny ludzkiej [30]. W kolejnych badaniach stwierdzono, że dodanie amyliny ludzkiej do preparatu błon fosfolipidowych skutkowało natychmiastowymi ich zmianami: zaburzeniem dwuwarstwy, formowaniem pęcherzyków lub tubuli z fragmentów błony. Istotne było to, że zmiany następowały zanim uwidoczniło skupiska czy agregaty niezestrukturalizowanego polipeptydu. Amylna działała destrukcyjnie na błony w postaci monomerycznej [13]. W miarę upływu czasu, pojawiające się agregaty amyliny umiejscawiały się na powierzchni błony i stanowiły miejscem wyłaniania się wielokierunkowo formowanych fibryli. Z amorficznego rdzenia, zakotwiczonego do powierzchni błony, niczym promienie, odchodziło 5-20 fibryli. Wykazano, że w ich strukturę wbudowywane były lipidy, a każdej formowanej fibryli towarzyszył przynajmniej jeden lipidowy pęcherzyk błonowy. Zaobserwowano także ciekawe zjawisko izolowania formowanych fibryli od otaczających błon przez owinięcie ich warstwą lipidu. Może to mieć niezwykle istotne znaczenie w warunkach *in vivo*, gdyż izolacja taka może wpływać stabilizująco na fibryle i mieć znaczenie ochronne, uniemożliwiając usuwanie fibryli z otoczenia komórki [13].

Analizę interakcji amyliny człowieka i szczura z dwuwarstwą lipidową, unieruchomioną na powierzchni miki, przeprowadzono techniką mikroskopii sił atomowych (Atomic Force Microscopy, AFM). Stwierdzono, że interakcja amyliny ludzkiej z powierzchnią błony prowadzi do powstawania w niej małych, bo o głębokości około 1,5-2 nm, ale licznych defektów, rozprzestrzenionych na badanej powierzchni. Nie przypominały one form większych, np. porów błonowych, formowanych przez białka membranowe. Interakcja pęcherzyków lipidowych z amyliną powodowała ich uszkodzenia, co wyrażało się wyciekaniem z ich wnętrza barwnika – kalceiny. Jednak obserwowane

defekty błon były na tyle małe, że niewykrywalne ani techniką mikroskopii elektronowej (Electron Microscopy, EM) ani z zastosowaniem elektronowego mikroskopu transmisyjnego i ujawniono je dopiero techniką AFM [23].

Następnie stwierdzono, że wprowadzenie do badań czerwieni Kongo, jako inhibitora fibrylacji, prawie całkowicie znosiło defekty błon, wywołane przez amylinę człowieka, a stopień uszkodzenia błony malał kilkakrotnie w porównaniu do wartości obserwowanych przy braku inhibitora. Skuteczne działanie inhibitora fibrylacji w minimalizowaniu uszkodzeń błony, powstających na wstępnym etapie formowania fibryli, sugerowało, że wówczas powstają toksyczne dla komórek postaci amyliny ludzkiej. W toku dalszych badań potwierdzono, że istnieje korelacja między stopniem uszkodzenia błony jednowarstwowych pęcherzyków a zachodzącym procesem formowania fibryli. Postępująca permeabilizacja błony wydaje się procesem nieswoistym, następującym na skutek jej defragmentacji [14,15]. W świetle uzyskanych wyników, rysował się model interakcji cząsteczki amyliny nie tylko z powierzchnią struktur modelowych, ale i z powierzchnią i składnikami błony komórki. Istotną rolę w tym procesie wydają się odgrywać formy amyliny, pojawiające się na wstępnych etapach fibrylacji, tzw. intermediaty helikalne.

KONCEPCJA INTERMEDIATÓW HELIKALNYCH AMYLINY

Przypuszcza się, że uszkodzenie błony komórkowej, spowodowane przez fibrylującą amylinę, jest jednym z podstawowych mechanizmów prowadzących do niszczenia i śmierci komórki. Mechanizm nadal pozostaje nierozpoznany, choć rolę sprawcy zniszczeń przypisuje się właśnie intermediatom helikalnym, czyli małym formom pośrednim amyliny, formowanym na wstępnych etapach fibrylacji. Tworzenie ich poprzedza pojawianie się większych, dostrzegalnych, rozpoznawalnych dostępnymi technikami detekcji, dostatecznie dużych lub dojrzałych, ostatecznie uformowanych fibryli [31]. Funkcjonuje teoria, której podstawą jest hipoteza działania toksycznych oligomerów, jako sprawców uszkodzeń komórek beta. Pod terminem tym kryje się skupisko czy połączenie pewnej dostatecznie dużej, ale nie nadmiernie licznej grupy monomerów, w oligomeryczny twór, reprezentujący jedną z morfologicznych form etapu prefibrylarnego.

Wydaje się, że amyлина *in vivo*, czyli w roztworze wodnym, jako wolny polipeptyd, pozostaje w postaci kłęбка (random coil), co sugeruje niepofałdowany charakter cząsteczki. Także pełnoaminokwasowa amyлина syntetyczna, odpowiadająca amylinie ludzkiej, w roztworze wodnym również nie przyjmuje struktury uporządkowanej, lecz pozostaje w postaci kłęбка, co wskazuje na monomeryczność cząsteczek [26,58,60].

Obecnie przyjmuje się, że pierwszym etapem wprowadzającym białko na szlak fibrylacji jest nadawanie mu formy α -helikalnej. Czynniki indukujące zmiany konformacyjne polipeptydu czy zmiany w strukturze samego monomeru amyliny mogą być różne. Oprócz omówionej już

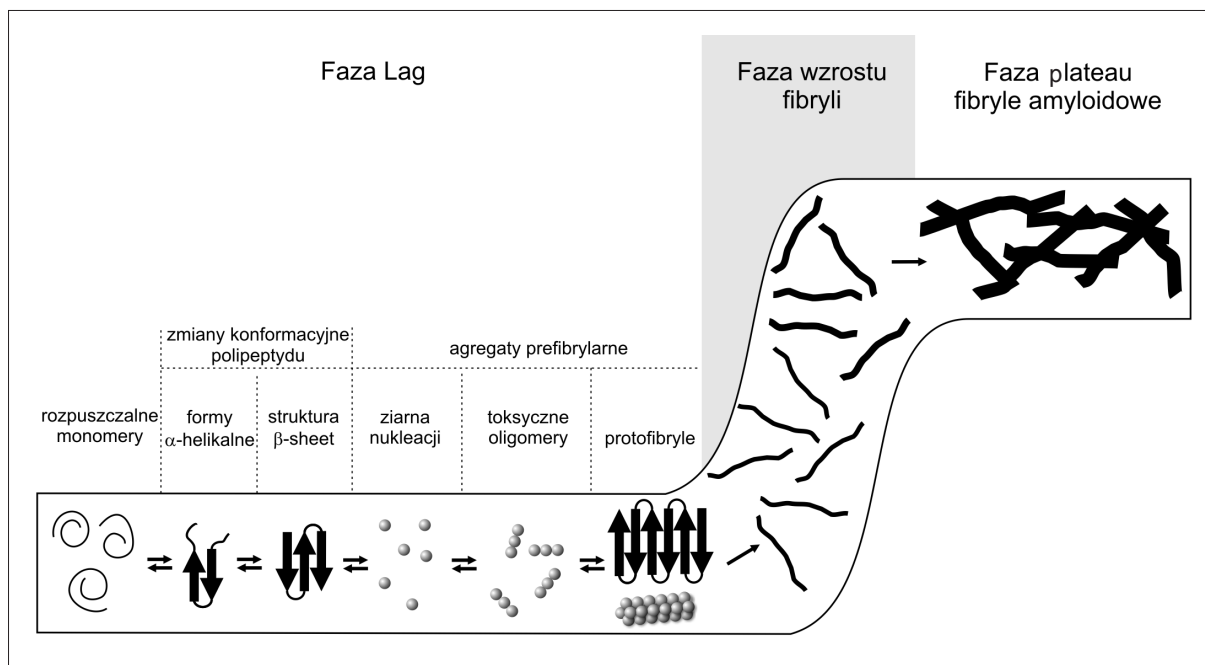
wcześniej roli pH i rozpuszczalnika, może to być kontakt z powierzchnią membrany modelowej, liposomu, błony komórkowej czy oddziaływanie ze składnikami błony lub macierzy zewnątrzkomórkowej, np. siarczanem heparanu. Zmiana taka może też być następstwem interakcji dwóch cząsteczek amyliny. Oddziaływanie z powierzchnią membrany stabilizuje postać helisy i w ten sposób katalizuje tworzenie form β -sheet [30,73].

Uchwycenie jednych z najwcześniej tworzonych i najmniejszych form oligomerycznych fibrylującej amyliny ludzkiej stanowi wyzwanie metodyczne. Niedawno udało się uwidocznić stadium formowania oligomerycznych struktur techniką ultrawidowania analitycznego, w roztworze 10% HFIP. Formowanie dimerów i pentamerów amyliny korelowało z formowaniem fibryli, choć – jak zaobserwowano – nie zawsze wymagało to obecności struktur α -helikalnych [75]. Natomiast technika AFM pozwoliła na wykrycie form oligomerycznych pojawiających się na powierzchni miki. Sprecyzowano wymiar, formowanej z 16 monomerów, jednostki oligomerycznej, budującej fibryle. Wydaje się, że wzrost oligomeru następuje do wartości 6 nm, zanim nastąpi etap jego dołączania do formowanej fibryli. W ten sposób do budowy fibryli wykorzystywana jest „jednostka montażowa” o pełnych wymiarach, tj. odpowiedniej szerokości i wysokości, która umiejscowiana niczym „cegielka na cegielce” powoduje formowanie ziaren nukleacji, a następnie wydłużenie fibryli. Dynamika przyrostu dwuwymiarowego fibryli, określona w tym modelu, wynosi, około 1,1 nm/minutę [21,22].

Na podstawie poczynionych obserwacji zaproponowano model wzrostu fibryli polegający na łączeniu form oligomerycznych, ale o pełnych wymiarach, zwłaszcza o pełnej szerokości. Model ten nie jest sprzeczny z mechanizmem bocznej asocjacji protofibryli, ale uzupełnia obraz tzw. podwójnej nukleacji w procesie fibrylacji. W myśl modelu podwójnej nukleacji, miejscem rozpoczynającym budowę fibryli są nie tylko jądra czy ziarna nukleacji, ale mogą nim być także fibryle, zwłaszcza po przekroczeniu krytycznego stężenia w roztworze [22,56].

Najpoważniejsze trudności metodyczne, z powodu braku odpowiednich narzędzi badawczych, przedstawia właśnie etap początkowy procesu fibrylacji amyliny. Wtedy to, w następstwie generowanych zmian konformacyjnych, następuje tworzenie najmniejszych struktur rozpoczynających cały proces, zwanych ziałami czy jądrami nukleacji. W 1999 r. Kaye i wsp. opublikowali pracę, w której przedstawili analizowane różnymi metodami etapy formowania fibryli przez amylinę ludzką [31]. Zaproponowano model zmian konformacyjnych cząsteczki postępujący od postaci rozpuszczalnej amyliny, przez formy helikalne i beta, następnie przez stadia nierozpuszczalne, pierwsze etapy formowania najmniejszych form na szlaku fibrylacji, tzw. jąder nukleacji, w wyniku polimeryzacji monomerów polipeptydu i kolejno przez formowanie protofibryli i ostatecznie fibryli. Są liczne dowody wskazujące na istotną rolę w procesie niszczenia komórek beta stosunkowo małych oligomerów amyliny i/lub protofibryli [32,38,47].





Ryc. 1. Schemat faz procesu fibrilacji amyliny. Esowaty kształt krzywej obrazuje etapy inkorporacji tioflawiny T (ThT) do formowanych fibryli; przygotowano w oparciu o cytowane w pracy piśmiennictwo

MONITOROWANIE PROCESU FIBRYLACJI AMYLINY

Postępujący proces fibrilacji można monitorować techniką fluorymetryczną z zastosowaniem związków amyloido-filnych, np. tioflawiny T (ThT). Jest to barwnik należący do grupy barwników benzotiazolowych (4-(3,6-dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylaniline chloride), który - w przeciwieństwie do tioflawiny S - nosi ładunek pozytywny. Tioflawina T wiąże się do struktur fibrylarnych ujawnia przesunięciem batachromowym w widmach absorpcji i emisji. Barwnik wolny, w wodzie, cechuje maksimum absorpcji przy długości fali 410 nm i maksimum fluorescencji przy długości fali 430 nm dla światła wzbudzającego o długości 342 nm. Postać związana z fibrylami wykazuje maksimum absorpcji przy długości 450 nm, a parametry widma fluorescencyjnego ulegają znaczącej zmianie, gdyż maksimum obserwowane jest przy długości 485 nm, jako zielono-niebieskawa fluorescencja, do wzbudzenia światłem o długości 450 nm. Po inkorporacji do fibryli intensywność fluoryzującego barwnika wzrasta około 1000-krotnie [24,33,37,45].

Stosując tioflawinę T, postępujący proces formowania fibryli można monitorować dopiero od chwili utworzenia pierwszych struktur fibrylarnych - protofibryli. Nieuchwytny dla tej metody pozostają wstępne etapy procesu. Następujące po sobie fazy fibrilacji obrazuje wykres w kształcie litery S (sigmoidalny). Na wykresie (ryc.1) przedstawiającym inkorporację tioflawiny T do tworzących się fibryli, etap formowania toksycznych oligomerów, zwany fazą Lag, obrazuje płasko leżący, równoległy do osi X odcinek sigmoidalnej krzywej. Jego długość zależy od stężenia polipeptydu lub białka. To faza powstawania

nierozróżnialnych czy niewyróżnialnych konwencjonalnymi technikami skupisk, których ewolucję morfologiczną, czyli ich wzrost, można monitorować, ale dopiero po przekroczeniu pewnej liczby krytycznej monomerów. Następnie część wznosząca się wykresu, obrazuje etap tworzenia fibryli i ich wydłużania, co objawia się inkorporacją barwnika do struktur fibryli. Odpowiedni rozmiar tworzonej fibryli warunkuje związanie barwnika i uwidocznienie jej wzrostu.

Ostatnia faza, przedstawiona drugim, płasko leżącym odcinkiem, równoległym do osi X, ale przesuniętym ku górze, obrazuje osiągnięcie przez układ stanu równowagi między monomerami istniejącymi w roztworze, a wbudowanymi w strukturę fibryli. Metoda z zastosowaniem tioflawiny T także narzuca pewne ograniczenia metodyczne. Nie może być stosowana w obecności związków hamujących inkorporację barwnika do fibryli, maskując w ten sposób to, że są formowane [48].

CYTOTOKSYCZNOŚĆ AMYLINY

Syntetyczna amyлина ludzka w pełnej, tj. 37-aminokwasowej wersji jest toksyczna dla komórek beta trzustki już w stężeniu 1-10 μM . Cytotoksyczne są także fibrylujące kilkunastoaminokwasowe peptydowe fragmenty amyliny oraz najkrótsze penta (23-27) i hekza (22-27) peptydy. Skrócone fragmenty, w wersji fibrylarniej są około 1000 razy mniej toksyczne niż pełen polipeptyd [40,44,51,62]. Mimo że kolejne prace przynosiły nowe dane na temat charakteru interakcji z błoną komórkową zarówno pełnej wersji amyliny, jak i jej fragmentów, nadal aktualne jest pytanie o mechanizm ich działania. Wyniki w dużej

mierze zależały od dobranego środowiska badań i zastosowanej techniki.

W obrębie 37-aminokwasowej cząsteczki, po interakcji z błoną, w początkowo niezestrukturalizowanym polipeptydzie, ujawniono obecność pojawiających się, struktur α -helikalnych o różnym zasięgu i różnym umiejscowieniu [35,51,62]. W oparciu o badania wykonane techniką spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) zaproponowano model interakcji pełnoaminokwasowej cząsteczki amyliny ludzkiej z micellami SDS, imitującymi błony komórkowe. Stwierdzono, że w obecności miceli znacząco wzrasta udział struktur α -helikalnych preparatu amyliny, a struktura cząsteczki amyliny nie jest równomiernie stabilna. Istotnym wydaje się odcinek 5-17, który stanowi najbardziej usztywnioną część obszaru helikalnego polipeptydu i zanurzając się poniżej powierzchni micelli stabilizuje obszar helisy. Fragment ten jest więc w środowisku hydrofobowym, a fibrylująca część cząsteczki, tzw. domena centralna 20-29, leży w fazie granicznej lipid-środowisko zewnętrzne, czyli rozpuszczalniku. Ta część polipeptydu może też stanowić miejsce kotwiczące cząsteczkę w błonie komórkowej. Wydaje się, że cząsteczka monomeru amyliny układa się równolegle do powierzchni miceli [42]. Zaproponowany model oddziaływania amyliny z błoną podkreśla znaczenie interakcji form helikalnych w przypadku tworzenia toksycznych oligomerów, czy wreszcie fibryli polipeptydu, uszkadzających membranę komórkową [58].

Badania oddziaływania amyliny ze strukturami błonowymi pozwoliły na skonstruowanie modeli ich wzajemnych interakcji. Czy tak jest też w przypadku układu bardziej złożonego, jakim jest błona komórkowa? Czy interakcje z powierzchnią błony są wyrazem „gotowości” cząsteczki amyliny do przyjęcia struktury helikalnej, a następnie do formowania jąder nukleacji i wejścia na szlak fibrylacji? Przez gotowość należy rozumieć subtelne zmiany w jej strukturze wymuszone zewnętrznymi czynnikami środowiska komórki, która jest już w stanie chorobowym. Nie można wykluczyć, że oddziaływanie ze zmienioną błoną chorej komórki wymuszają obserwowane zmiany struktury amyliny. Wiadomo bowiem, że anionowy skład błony komórek trzustki osób chorych na cukrzycę typu 2 ulega zmianie.

MECHANIZMY USZKODZENIA KOMÓREK BETA PRZEZ FIBRYLUJĄCĄ AMYLINĘ

Nadal pozostaje do wyjaśnienia mechanizm uszkodzania błony komórkowej przez oddziałującą z jej powierzchnią, wprowadzoną na szlak fibrylacji, cząsteczką amyliny. Wysłunięto różne koncepcje błonowego mechanizmu uszkodzania komórek beta. Sugerowano, że w wyniku oddziaływania fibryli z błoną komórkową i/lub na skutek ich inkorporacji w strukturę błony, mogą spowodować tworzenie szkodliwych pseudokanałów błonowych i zmieniać parametry fizykochemiczne bądź też powodować całkowitą jej dezintegrację [49]. Interakcja amyliny lub jej proformy ze składnikami błony komórkowej, np. proteoglikanem - siarczanem heparanu, jest także rozważana jako jedna z dróg prowadzących do fibrylacji polipeptydu [57,76]. Innym powodem może być

stres oksydacyjny [78] i zmiany w obrębie retikulum endoplazmatycznego, które także powodują tworzenie fibryli przez amylinę [27,46]. Apoptotyczny mechanizm niszczenia komórek i aktywacja systemu wewnątrzkomórkowych kaspaz jest kolejną drogą współodpowiedzialną za formowanie fibryli przez amylinę ludzką [36,62,77].

Nie można wykluczyć zachodzenia jednoczesnego współdziałania wielu czynników i kilku mechanizmów w procesie fibrylacji amyliny, których końcowy skutek z pewnością nie jest wynikiem prostego sumowania skutków działania każdego z czynników z osobna. Czynniki te wpływają na proces formowania fibryli, będąc swego rodzaju katalizatorami fibrylacji. Co więcej, funkcjonuje tu i relacja w odwrotnym kierunku. Nie można zapominać, że formowane w komórkach czy deponowane na zewnątrz fibryle wpływają na strukturę błony komórkowej i na cytoarchitektonikę uszkodzonej trzustki. Fibryle formowane w obecności liposomów wpływają na morfologię błon, powodując poważne zmiany w jej strukturze. Jednocześnie fibryle te różnią się od formowanych w środowisku bez liposomów, wskazując na wzajemność funkcjonujących relacji [35].

Mechanizm działania fibrylującej amyliny ludzkiej wiązano także z obserwowaną śmiercią apoptotyczną komórek, choć w niektórych modelach obserwowano także nekrozę komórek beta. Wykazano, że droga aktywacji kaspaz przez fibrylującą amylinę ludzką odgrywa rolę w procesie destrukcji komórek beta. Amylina, zastosowana *in vitro* w stężeniu odnajdywanym w komórkach osób chorych na cukrzycę, aktywuje kaspazę 3, co prowadzi do śmierci apoptotycznej mysich komórek. Jednak komórki bez ekspresji kaspazy 3, tj. pozbawione tego białka, a poddane działaniu amyliny ludzkiej nie ginęły śmiercią apoptotyczną. Zastosowanie czerwieni Kongo, jako inhibitora fibrylacji amyliny, znacząco hamowało aktywację kaspaz, a także obniżało toksyczny skutek fibrylującej amyliny ludzkiej. Współdziałanie aktywacji szlaku kaspaz w apoptozie komórek beta wydaje się istotny dla cytotoksycznego działania fibrylującej amyliny ludzkiej [36].

Obserwacje toksycznego wpływu fibrylującej amyliny ludzkiej dotyczyły głównie komórek beta trzustki. Okazuje się, że w układzie *in vitro*, komórki alfa wysp trzustki także mogą ulegać destrukcji pod wpływem fibrylującego polipeptydu ludzkiego, ale w znacznie mniejszym stopniu niż komórki beta. Cechuje je większa przeżywalność niż komórki beta, przynajmniej w zakresie badanych stężeń. Zaznaczyć należy, że stężenia amyliny stosowane w badaniach *in vitro* zazwyczaj są rzędu μ mol i przewyższają stężenia *in vivo* rzędu pmoli [36]. U chorych na cukrzycę typu 2, komórek typu alfa jest więcej w porównaniu z osobnikami zdrowymi i są rozproszone w masie chorej trzustki, a nie ułożone peryfericznie jak w zdrowym narządzie [12].

ZAKOŃCZENIE

Amylina jest polipeptydem o wielu zmiennych, zarówno w sensie funkcjonalnym - jako hormon/neurohormon, strukturalnym - jako polipeptyd, jak i chemicznym - ze względu na skład aminokwasowy. W zależności od sub-



telnych zmian środowiska zmienia postać, a w ślad za tym i własności. Stawia poważne wyzwania eksperymentalne, gdyż wymaga stosowania licznych, różnorodnych metod badawczych i specjalnego traktowania, zarówno na etapie pozyskiwania jej, jak i w toku dalszych etapów badawczych. Badania cytotoksyczności amyliny doprowadziły do ujawnienia najbardziej szkodliwych form, w postaci najmniejszych i trudno uchwytanych w badaniach skupisk polipeptydu. Okazało się, że dojrzałe fibryle amyliny są stosunkowo mniej szkodliwe od oligomerycznych. Nasuwa się zatem pytanie: czy formowanie mniej toksycznych fibryli nie jest postacią unieczynienia mniejszych, ale toksycznych oligomerów przez wiązanie ich w strukturę perfekcyjnie konstruowanych przez komórkę fibryli? Rozważana jest więc i taka zaskakująca koncepcja [67].

Amylina nie jest jedynym fibrylującym hormonem wytwarzanym przez trzustkę. Insulina i glukagon to także cząsteczki fibrylujące [3,10,59,68]. Wiadomo, że insulina, kosekretowana z komórek beta z amyliną, choć sama fibryluje w układach *in vitro*, to jednak wpływa hamująco na proces fibrylacji amyliny w tych warunkach. Zahamowanie procesu formowania dojrzałych fibryli amyliny minimalizowało uszkodzenie błony w miejscu rozpoczęcia budowy fibryli. Paradoxem wydaje się jednak odkrycie, że insulina, choć „radzi” sobie z dojrzałymi fibrylami amyliny, nie dopuszczając do ich formowania,

to jednak pozostaje „bezradna” wobec wczesnych, toksycznych intermediatów helikalnych. Stwierdzono, że obecność insuliny hamuje wzrost fibryli w późnej fazie fibrylacji i w ten sposób zmniejsza uszkodzenie błony. Nie znosi jednak procesu destrukcji błony, spowodowanego obecnością form oligomerycznych amyliny. Obecność insuliny nie tylko nie hamuje tworzenia oligomerów, ale wręcz sprzyja ich gromadzeniu właśnie przez hamowanie formowania fibryli [4].

Amylina należy do najbardziej fibrylotwórczych peptydów. Wiadomo także, że mechanizm fibrylacji amyliny różni się od mechanizmu działania innych amyloidoznych białek choćby tym, że jest natychmiastowy, a cytotoxyczność też następuje błyskawicznie. Nie ułatwia to prowadzonych badań. Być może teoria toksycznych intermediatów helikalnych, przyjmujących formę oligomerów, zdoła przybliżyć, a może i wyjaśnić problem toksyczności amyliny ludzkiej i przyniesie rozwiązanie w postaci środków terapeutycznych, hamujących ten proces. Dlatego też ujawnienie fibrylotwórczego potencjału amyliny stanowi wyzwanie dla nauk podstawowych i nadzieję dla medycyny.

PODZIĘKOWANIE

Rycinę wykonała Pani dr Dominika Wróbel. Składam Jej wyrazy szczerzej wdzięczności.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abedini A., Raleigh D.P.: Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. *Org. Lett.*, 2005; 7: 693-696
- [2] 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
- [3] Andersson C.B., Hicks M.R., Vetri V., Vandahl B., Rahbek-Nielsen H., Thøgersen H., Thøgersen I.B., Enghild J.J., Serpell L.C., Rischel C., Otzen D.E.: Glucagon fibril polymorphism reflects differences in protofilament backbone structure. *J. Mol. Biol.*, 2010; 397: 932-946
- [4] 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
- [5] Buck M.: Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.*, 1998; 31: 297-355
- [6] Charge S.B., de Koning E.J., Clark A.: Effect of pH and insulin on fibrillogenesis of islet amyloid polypeptide *in vitro*. *Biochemistry*, 1995; 34: 14588-14593
- [7] Clark A., Badman M.K., Lowndes S.A., Morris J.F.: Aggregated human islet amyloid polypeptide is not cytotoxic to mouse islets *in vitro*. *Diabetologia*, 1995; 38 (Suppl. 1): A91
- [8] 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
- [9] Cort J., Liu Z., Lee G., Harris S.M., Prickett K.S., Gaeta L.S., Andersen N.H.: β -structure in human amylin and 2 designer β -peptides: CD and NMR spectroscopic comparisons suggest soluble β -oligomers and the absence of significant populations of β -strand dimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 204: 1088-1095
- [10] de Jong K.L., Incledon B., Yip C.M., DeFelippis M.R.: Amyloid fibrils of glucagon characterized by high-resolution atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 2006; 91: 1905-1914
- [11] de Koning E.J., Hoppener J.W., Verbeek J.S., Oosterwijk C., van Hulst K.L., Baker C.A., Lips C.J., Morris J.F., Clark A.: Human islet amyloid polypeptide accumulates at similar sites in islets of transgenic mice and humans. *Diabetes*, 1994; 43: 640-644
- [12] Deng S., Vatamaniuk M., Huang X., Doliba N., Lian M.M., Frank A., Velidedeoglu E., Desai N.M., Koeberlein B., Wolf B., Barker C.F., Naji A., Matschinsky F.M., Markmann J.F.: Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 2004; 53: 624-632
- [13] Domanov Y.A., Kinnunen P.K.: Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.*, 2008; 376: 42-54
- [14] Engel M.F., Khemtémourian L., Kleijer C.C., Meeldijk H.J., Jacobs J., Verkleij A.J., de Kruijff B., Killian J.A., Hoppener J.W.: Membrane permeabilization by islet amyloid polypeptide. *Chem. Phys. Lipids*, 2009; 160: 1-10
- [15] Engel M.F., Khemtémourian L., Whoppener J.: Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 6033-6038
- [16] Fändrich M.: On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 2066-2078
- [17] Fink A.L.: Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005; 15: 35-41

- [18] Gast K., Siemer A., Zirwer D., Damaschun G.: Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. *Eur. Biophys. J.*, 2001; 30: 273-283
- [19] Goldsbury C., Baxa U., Simon M.N., Steven A.C., Engel A., Wall J.S., Aebi U., Muller S.A.: Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 2011; 173: 1-13
- [20] Goldsbury C.S., Cooper G.J., Goldie K.N., Muller S.A., Saafi E.L., Gruijters W.T., Misur M.P., Engel A., Aebi U., Kistler J.: Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *J. Struct. Biol.*, 1997; 119: 17-27
- [21] Goldsbury C., Green J.: Time-lapse atomic force microscopy in the characterization of amyloid-like fibril assembly and oligomeric intermediates. *Methods Mol. Biol.*, 2005; 299: 103-128
- [22] Green J.D., Goldsbury C., Kistler J., Cooper G.J., Aebi U.: Human amylin oligomer growth and fibril elongation define two distinct phases in amyloid formation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 12206-12212
- [23] Green J.D., Kreplak L., Goldsbury C., Li Blatter X., Stolz M., Cooper G.S., Seelig A., Kistler J., Aebi U.: Atomic force microscopy reveals defects within mica supported lipid bilayers induced by the amyloidogenic human amylin peptide. *J. Mol. Biol.*, 2004; 342: 877-887
- [24] Groenning M.: Binding mode of thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils - current status. *J. Chem. Biol.*, 2010; 3: 1-18
- [25] Haataja L., Gurlo T., Huang C.J., Butler P.C.: Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr. Rev.*, 2008; 29: 303-316
- [26] Higham C.E., Jaikaran E.T., Fraser P.E., Gross M., Clark A.: Preparation of synthetic human islet amyloid polypeptide (IAPP) in a stable conformation to enable study of conversion to amyloid-like fibrils. *FEBS Lett.*, 2000; 470: 55-60
- [27] Huang C.J., Lin C.Y., Haataja L., Gurlo T., Butler A.E., Rizza R.A., Butler P.C.: High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated β -cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes*, 2007; 56: 2016-2027
- [28] Janson J., Ashley R.H., Harrison D., McIntyre S., Butler P.C.: The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*, 1999; 48: 491-498
- [29] Janson J., Soeller W.C., Roche P.C., Nelson R.T., Torchia A.J., Kreutter D.K., Butler P.C.: Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7283-7288
- [30] Jayasinghe S.A., Langen R.: Lipid membranes modulate the structure of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, 2005; 44: 12113-12119
- [31] Kaye R., Bernhagen J., Greenfield N., Sweimeh K., Brunner H., Voelter W., Kapurniotu A.: Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 1999; 287: 781-796
- [32] Kaye R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G.: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003; 300: 486-489
- [33] Kelenyi G.: On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1967; 15: 172-180
- [34] Knight J.D., Hebda J.A., Miranker A.D.: Conserved and cooperative assembly of membrane-bound α -helical states of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, 2006; 45: 9496-9508
- [35] Knight J.D., Miranker A.D.: Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly. *J. Mol. Biol.*, 2004; 341: 1175-1187
- [36] Law E., Lu S., Kieffer T.J., Warnock G.L., Ao Z., Woo Z., Marzban L.: Differences between amyloid toxicity in alpha and beta cells in human and mouse islets and the role of caspase-3. *Diabetologia*, 2010; 53: 1415-1427
- [37] LeVine H.3rd: Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.*, 1999; 309: 274-284
- [38] Lin C.Y., Gurlo T., Kaye R., Butler A.E., Haataja L., Glabe C.G., Butler P.C.: Toxic human islet amyloid polypeptide (h-IAPP) oligomers are intracellular, and vaccination to induce anti-toxic oligomer antibodies does not prevent h-IAPP-induced β -cell apoptosis in h-IAPP transgenic mice. *Diabetes*, 2007; 56: 1324-1332
- [39] Linding R., Schymkowitz J., Rousseau F., Diella F., Serrano L.: A comparative study of the relationship between protein structure and β -aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J. Mol. Biol.*, 2004; 342: 345-353
- [40] Lorenzo A., Razzaboni B., Weir G.C., Yankner B.A.: Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature*, 1994; 368: 756-760
- [41] Makin O.S., Serpell L.C.: Structural characterisation of islet amyloid polypeptide fibrils. *J. Mol. Biol.*, 2004; 335: 1279-1288
- [42] Marzban L., Rhodes C.J., Steiner D.F., Haataja L., Halban P.A., Verchere C.B.: Impaired NH₂-terminal processing of human proislet amyloid polypeptide by the prohormone convertase PC2 leads to amyloid formation and cell death. *Diabetes*, 2006; 55: 2192-2201
- [43] Marzban L., Tomas A., Becker T.C., Rosenberg L., Oberholzer J., Fraser P.E., Halban P.A., Verchere C.B.: Small interfering RNA-mediated suppression of proislet amyloid polypeptide expression inhibits islet amyloid formation and enhances survival of human islets in culture. *Diabetes*, 2008; 57: 3045-3055
- [44] Mascioni A., Porcelli F., Ilangovan U., Ramamoorthy A., Veglia G.: Conformational preferences of the amylin nucleation site in SDS micelles: an NMR study. *Biopolymers*, 2003; 69: 29-41
- [45] Maskevich A.A., Stsiapura V.I., Kuzmitsky V.A., Kuznetsova I.M., Povarova O.I., Uversky V.N., Turoverov K.K.: Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 1392-1401
- [46] Matveyenko A.V., Gurlo T., Daval M., Butler A.E., Butler P.C.: Successful versus failed adaptation to high-fat diet-induced insulin resistance; the role of IAPP-induced β -cell endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*, 2009; 58: 906-916
- [47] Meier J.J., Kaye R., Lin C.Y., Gurlo T., Haataja L., Jayasinghe S., Langen R., Glabe C.G., Butler P.C.: Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent β -cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006; 291: E1317-E1324
- [48] Meng F., Marek P., Potter K.J., Verchere C.B., Raleigh D.P.: Rifampicin does not prevent amyloid fibril formation by human islet amyloid polypeptide but does inhibit fibril thioflavin-T interactions: implications for mechanistic studies of β -cell death. *Biochemistry*, 2008; 47: 6016-6024
- [49] Mirzabekov T.A., Lin M.C., Kagan B.L.: Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 1988-1992
- [50] Munishkina L.A., Phelan C., Uversky V.N., Fink A.L.: Conformational behavior and aggregation of α -synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. *Biochemistry*, 2003; 42: 2720-2730
- [51] Nanga R.P., Brender J.R., Xu J., Veglia G., Ramamoorthy A.: Structures of rat and human islet amyloid polypeptide IAPP₁₋₁₉ in micelles by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 2008; 47: 12689-12697
- [52] Nilsson M.R.: Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, 2004; 34: 151-160
- [53] 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



- [54] O'Brien T.D., Butler A.E., Roche P.C., Johnson K.H., Butler P.C.: Islet amyloid polypeptide in human insulinomas: evidence for intracellular amyloidogenesis. *Diabetes*, 1994; 43: 329-336
- [55] O'Brien T.D., Butler P.C., Kreutter D.K., Kane L.A., Eberhardt N.L.: Human islet amyloid polypeptide expression in COS-1 cells. A model of intracellular amyloidogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1995; 147: 609-616
- [56] Padrick S.B., Miranker A.D.: Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry*, 2002; 41: 4694-4703
- [57] Park K., Verchere C.B.: Identification of a heparin binding domain in the N-terminal cleavage site of pro-islet amyloid polypeptide. Implications for islet amyloid formation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 16611-16616
- [58] Patil S.M., Xu S., Sheftic S.R., Alexandrescu A.T.: Dynamic α -helix structure of micelle-bound human amylin. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 11982-11991
- [59] Pedersen J.S.: The nature of amyloid-like glucagon fibrils. *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2010; 4: 1357-1367
- [60] Plaxco K.W., Gross M.: Cell biology. The importance of being unfolded. *Nature*, 1997; 386: 657-659
- [61] Purcell K.F., Stikeleather J.A., Brunk S.D.: Spectroscopic studies of hydrogen bonding: hexafluoroisopropanol. *J. Mol. Spectrosc.*, 1969; 32: 202-213
- [62] Rumora L., Hadzija M., Barisic K., Maysinger D., Grubiic T.Z.: Amylin-induced cytotoxicity is associated with activation of caspase-3 and MAP kinases. *Biol. Chem.*, 2002; 383: 1751-1758
- [63] Sekhar A., Udgaonkar J.B.: Fluoroalcohol-induced modulation of the pathway of amyloid protofibril formation by barstar. *Biochemistry*, 2011; 50: 805-819
- [64] Serpell L.C., Sunde M., Benson M.D., Tennent G.A., Pepys M.B., Fraser P.E.: The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.*, 2000; 300: 1033-1039
- [65] Serpell L.C., Sunde M., Blake C.C.: The molecular basis of amyloidosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1997; 53: 871-887
- [66] Tenidis K., Waldner M., Bernhagen J., Fischle W., Bergmann M., Weber M., Merkle M.L., Voelter W., Brunner H., Kapurniotu A.: Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.*, 2000; 295: 1055-1071
- [67] Treusch S., Cyr D.M., Lindquist S.: Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle*, 2009; 8: 1668-1674
- [68] Uversky V.N., Fink A.L.: Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1698: 131-153
- [69] Waugh D.F.: A fibrous modification of insulin. I. The heat precipitate of insulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946; 68: 247-250
- [70] Westermark G.T., Westermark P., Berne C., Korsgren O., Nordic Network for Clinical Islet Transplantation: Widespread amyloid deposition in transplanted human pancreatic islets. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 977-979
- [71] Westermark P., Andersson A., Westermark G.T.: Is aggregated IAPP a cause of beta-cell failure in transplanted human pancreatic islets? *Curr. Diab. Rep.*, 2005; 5: 184-188
- [72] Westermark P., Grimelius L.: The pancreatic islet cells in insular amyloidosis in human diabetic and non-diabetic adults. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect A*, 1973; 81: 291-300
- [73] 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
- [74] Williamson J.A., Miranker A.D.: Direct detection of transient α -helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Sci.*, 2007; 16: 110-117
- [75] 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
- [76] Young I.D., Ailles L., Narindrasorasak S., Tan R., Kisilevsky R.: Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1992; 116: 951-954
- [77] Zhang S., Liu J., Dragunow M., Cooper G.J.: Fibrillogenic amylin evokes islet β -cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 52810-52819
- [78] Zraika S., Hull R.L., Udayasankar J., Aston-Mourney K., Subramanian S.L., Kisilevsky R., Szarek W.A., Kahn S.E.: Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis. *Diabetologia*, 2009; 52: 626-635
- [79] Zraika S., Hull R.L., Verchere C.B., Clark A., Potter K.J., Fraser P.E., Raleigh D.P., Kahn S.E.: Toxic oligomers and islet beta cell death: guilty by association or convicted by circumstantial evidence? *Diabetologia*, 2010; 53: 1046-1056

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.