

# Μια καινοτόμος προσέγγιση δυναμικής μέτρησης σε *in vitro* συστήματα, του αμυλοειδογόνου δυναμικού IAPP αναλόγων που σχεδιάστηκαν μέσω της ανασυγκρότησης αρχέγονων αλληλουχιών για την πιο αποτελεσματική θεραπεία του διαβήτη τύπου-2

**Αναστάσιος Γεωργούλης, Κωνσταντίνος Βοργιάς**

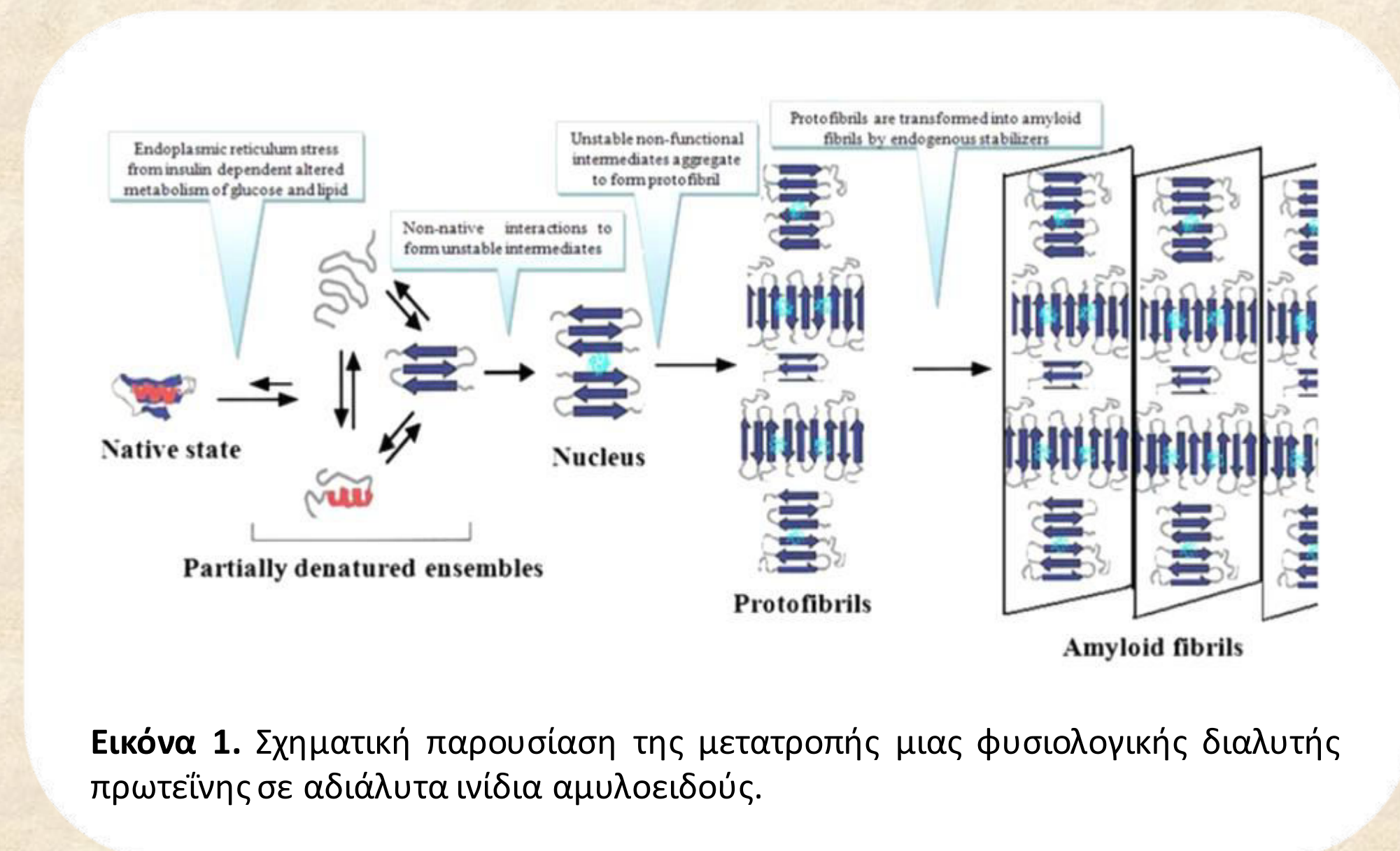
Τομέας Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## Εισαγωγή

Κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες, πολλές πρωτεΐνες αδυνατούν να αποκτήσουν/διατηρήσουν την φυσιολογική τους στερεοδιάταξη και οδηγούνται σε ένα εναλλακτικό - μη κανονικό - δίπλωμα της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας στο χώρο. Τα «λάθος» διπλωμένα πρωτεϊνικά μόρια, αυτοσυγκροτούνται είτε σε άμορφα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, είτε σε οργανωμένα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, που ονομάζονται αμυλοειδή ινίδια. Στον άνθρωπο, τα αμυλοειδή ινίδια μπορούν να προσβάλουν κάθε όργανο ή ιστό και να οδηγήσουν σε στερεοδιαταξικές ασθένειες, γνωστές ως αμυλοειδώσεις, λόγω της τοξικότητας που προκαλούν στην περιοχή συσσωρεύσεώς τους. Ο διαβήτης τύπου-2 (T2D), ασθένεια που έχει καταγραφεί ήδη σε 350 εκατομμύρια ανθρώπους, προκαλείται από την εναπόθεση του πεπτιδίου της αμυλίνης (IAPP) στα παγκρεατικά νησίδια προκαλώντας σταδιακή μείωση και τελικά πλήρη εξάλειψη της μάζας των β-κυττάρων του παγκρέατος με αποτέλεσμα να προκαλούνται διαταραχές στην έκκριση ινσουλίνης.

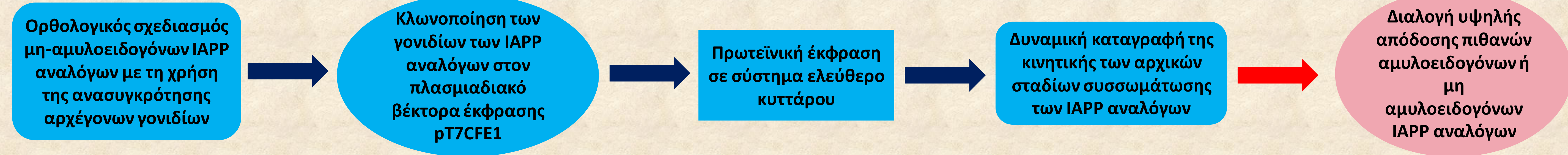
## Σκοπός της εργασίας

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι ο σχεδιασμός καινοτόμων μη-αμυλοειδογόνων αναλόγων πεπτιδίων IAPP με τη χρήση της φυλογενετικής προσέγγισης ανασυγκρότησης αρχέγονων αλληλουχιών. Παράλληλα, για πρώτη φορά θα αναπτυχθεί ένα καινοτόμο *in vitro* σύστημα δυναμικής καταγραφής της κινητικής των αρχικών σταδίων συσσωμάτωσης των πεπτιδίων αυτών, ώστε να μελετηθεί το αμυλοειδογόνο δυναμικό τους για τη πιθανή χρήση τους ως φάρμακα-αναστολείς για την πιο αποτελεσματική θεραπεία του T2D.



Εικόνα 1. Σχηματική παρουσίαση της μετατροπής μιας φυσιολογικής διαλυτής πρωτεΐνης σε αδιάλυτα ινίδια αμυλοειδούς.

## Πειραματική διαδικασία



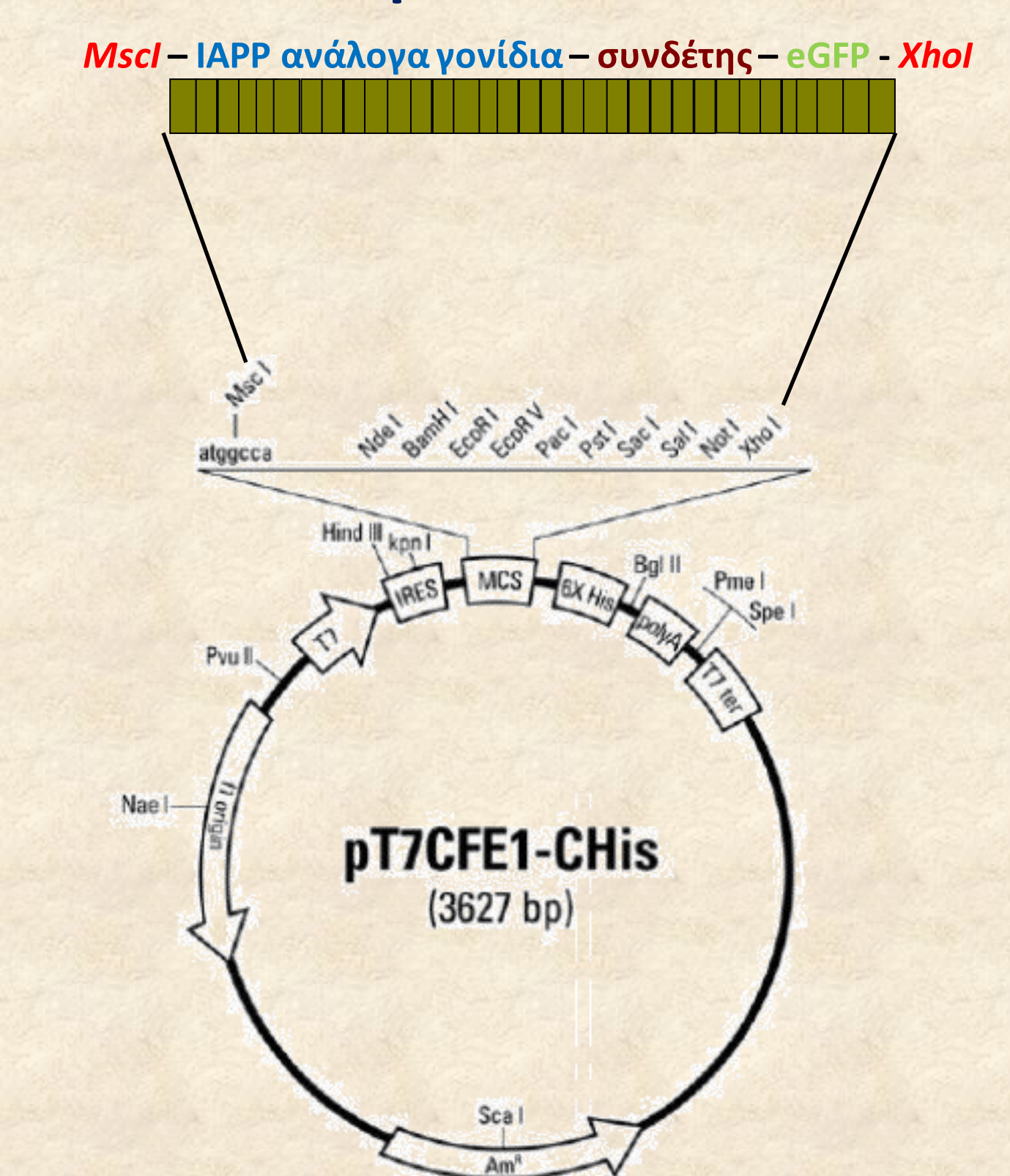
## Ορθολογικός σχεδιασμός μη-αμυλοειδογόνων IAPP αναλόγων με τη χρήση της ανασυγκρότησης αρχέγονων γονιδίων

Η ιδέα βασίζεται σε πρόσφατες μελέτες που προτείνουν ότι τα προγονικά γονίδια μιας μη διαλυτής πρωτεΐνης στόχου, παράγουν διαλυτές, σταθερές και λειτουργικές παραλλαγές της πρωτεΐνης αυτής. Για αυτό το λόγο κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με γνωστές τοπολογίες από την βιβλιογραφία για την IAPP με σκοπό να εξεταστεί το αμυλοειδογόνο δυναμικό τόσο των υπαρχόντων όσο και των προγονικών πεπτιδίων IAPP.



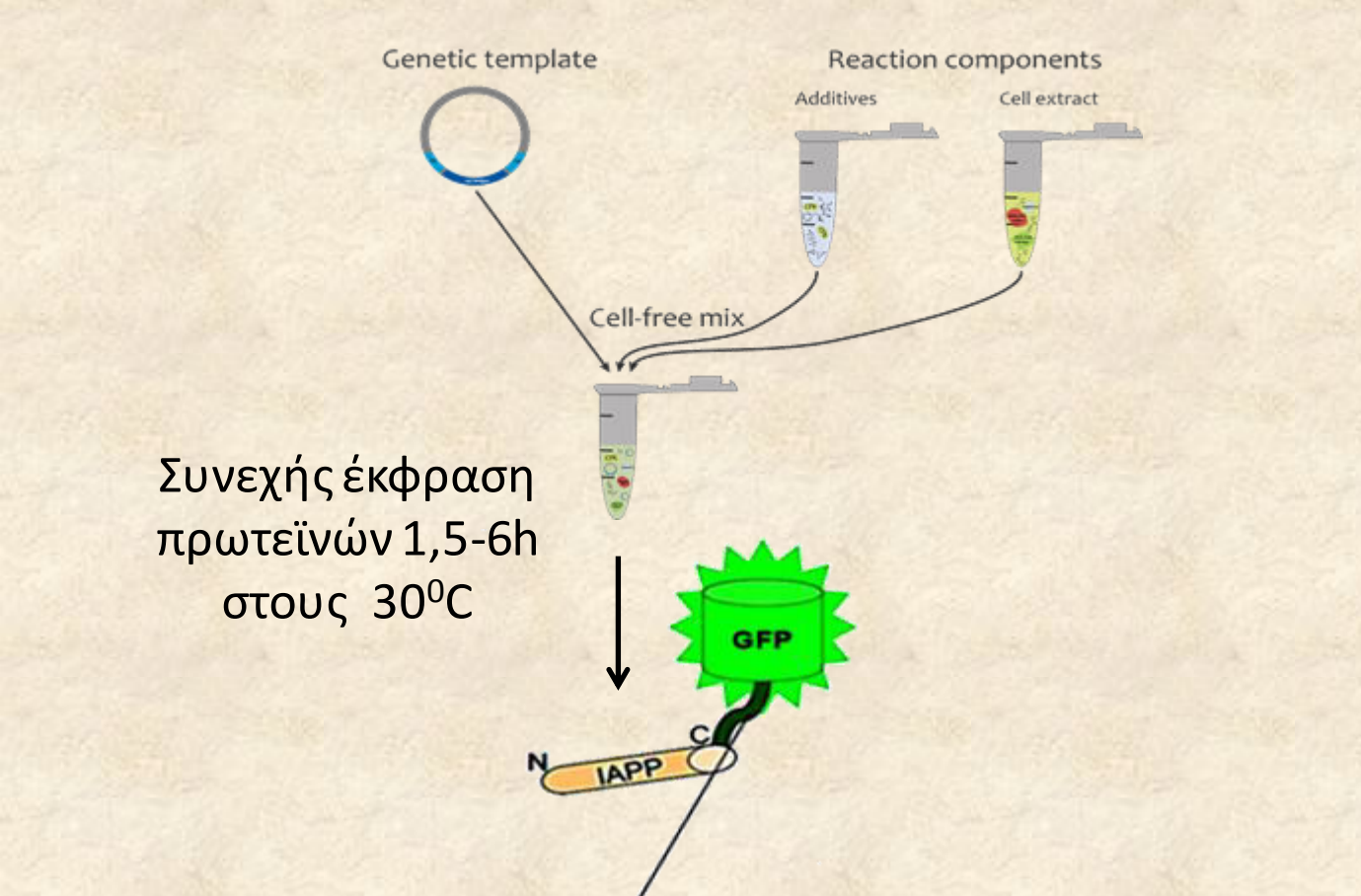
Εικόνα 2. Ανασυγκρότηση αρχέγονων γονιδίων  
Α) Bayesian φυλογενία του IAPP χρησιμοποιώντας πλήρους μήκους προπεπτιδικές αλληλουχίες (145-aa) ευθυγραμμισμένες με το πρόγραμμα Muscle και υπολογισμένες στο πρόγραμμα Phylobayes με το μοντέλο JTT+Γ4. Η αλληλουχία του πεπτιδίου IAPP κάθε ταξινομικής βαθμίδας παρουσιάζεται δίπλα της. Οι μαύροι κύκλοι υποδεικνύουν πιθανότητες τουλάχιστον 0,95. Η μπέρα κλίμακας αντιπροσωπεύει το μέσο αριθμό αντικαταστάσεων ανά τοποθεσία.  
Β) IAPP πεπτιδία που επιλέχθηκαν για σύνθεση και χαρακτηρισμό σε σύγκριση με το ανθρώπινο IAPP. Αυτές περιλαμβάνουν 5 προγονικές αλληλουχίες που προβλέπονται στο FastML, που αντιπροσωπεύουν βασικούς κόμβους στη ζωική φυλογενία, 3 υπάρχουσες αλληλουχίες που έχουν προβλεφθεί ότι έχουν χαμηλό αμυλοειδογόνο δυναμικό σύμφωνα με το Aggrescan και συνθετικές αλληλουχίες που δημιουργήσαμε μέσω σύντηξης του ανθρώπινου IAPP με τις υπάρχουσες αλληλουχίες προκειμένου να αφαιρεθούν περιοχές συσσωμάτωσης.

## Κλωνοποίηση των γονιδίων των IAPP αναλόγων στον πλασμαδιακό βέκτορα έκφρασης pT7CFE1



Εικόνα 3. Κατασκευή γονιδίων IAPP αναλόγων συντηγμένα με το γονίδιο της eGFP. Ο πλασμαδιακός βέκτορας pT7CFE1 επιτρέπει υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών και έχει σχεδιαστεί για μεταγραφή-μετάφραση ελεύθερου κυττάρου. Τα γονίδια IAPP και eGFP έχουν συνδεθεί μέσω μια ειδικά σχεδιασμένης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί τον συνδέτη GSAGSAAGSGEF.

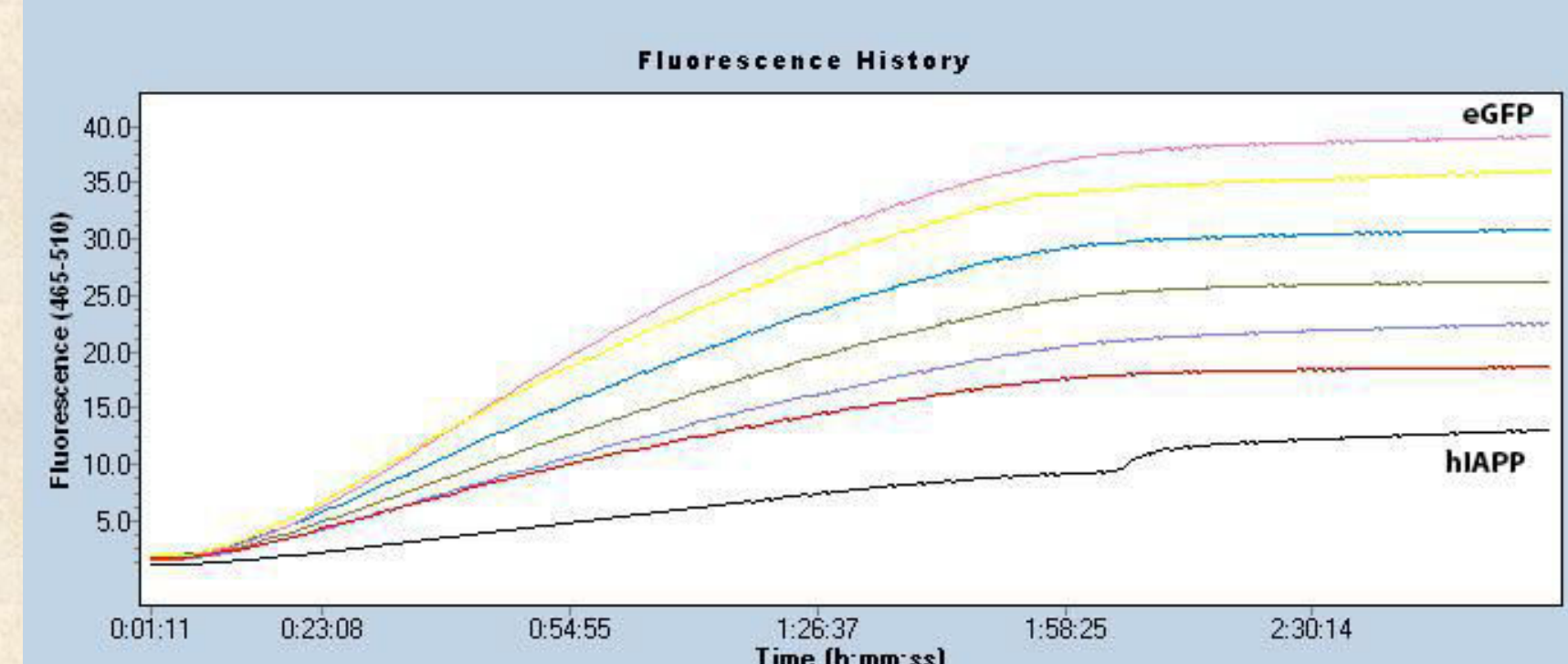
## Πρωτεϊνική έκφραση σε σύστημα ελεύθερο κυττάρου



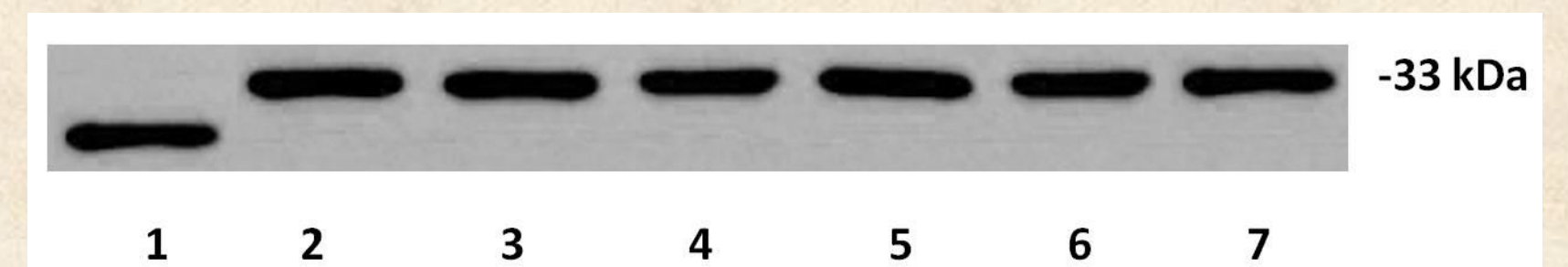
Εικόνα 4. *In vitro* σύστημα μετάφρασης βασισμένο σε εκχυλίματα HeLa κυττάρων.

## Δυναμική καταγραφή της κινητικής των αρχικών σταδίων συσσωμάτωσης των IAPP αναλόγων

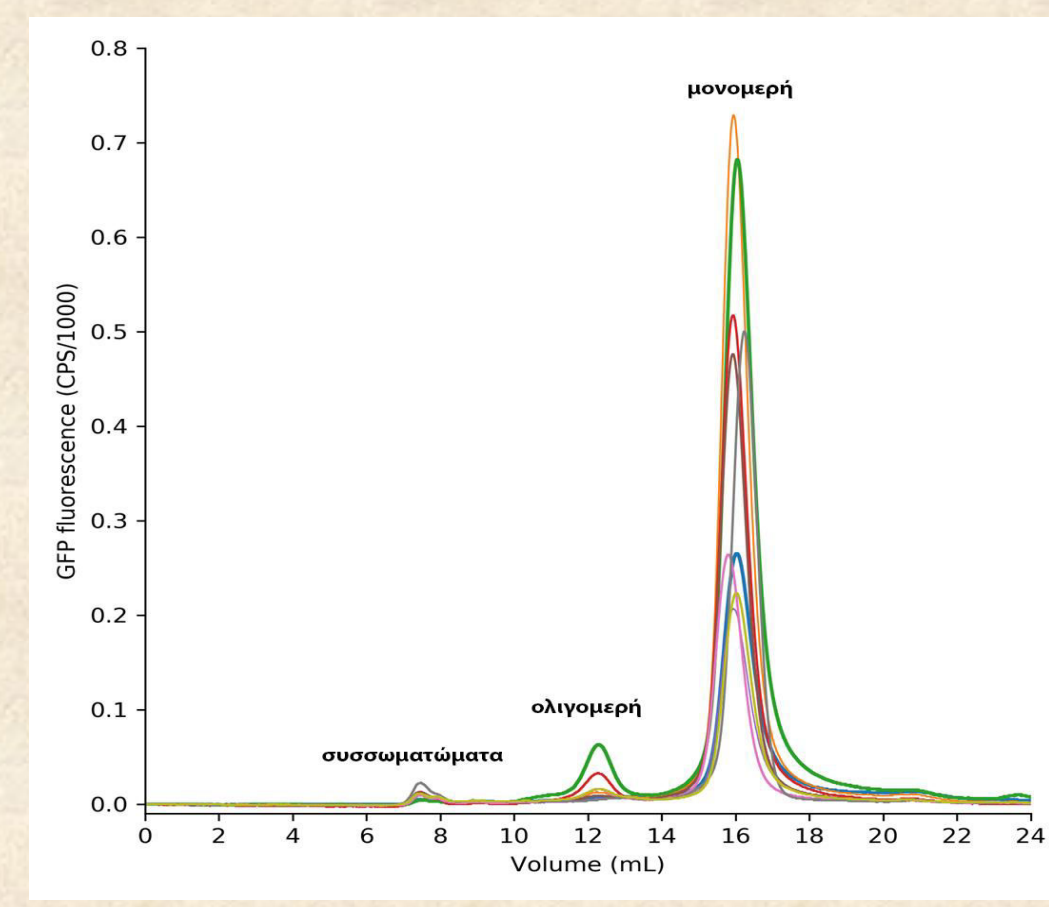
Αναπτύχθηκε μια δυναμική απεικόνιση (χρησιμοποιώντας μηχανήμα Real Time PCR) της διαδικασίας συσσωμάτωσης των αρχικών σταδίων πυρήνωσης των IAPP αναλόγων, όπου η διαδικασία είναι αντιστρεπτή. Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής-μετάφρασης η παρουσία του συνδεδεμένου πεπτιδίου δίνει τη δυνατότητα τόσο στα ανάλογα πεπτιδία του IAPP όσο και στην GFP να παραχθούν με ταυτόχρονα, αλλά να διπλωθούν ανεξάρτητα, ανάλογα με τις ενδογενείς τους ιδιότητες που σχετίζονται με τη δημιουργία ινιδίων και το φυσιολογικό δίπλωμα. Με τη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση, μορφές του IAPP που είναι αμυλοειδογόνες δεν θα επιτρέψουν το σωστό δίπλωμα της GFP με αποτέλεσμα να μην παράγεται φθορισμός. Σε αντίθετη περίπτωση, μορφές του IAPP μη αμυλοειδογόνες ή λιγότερο αμυλοειδογόνες, θα επιτρέπουν το σωστό δίπλωμα της GFP με αποτέλεσμα να φθορίζει. Η ανθρώπινη αμυλίνη (hIAPP) που εμφανίζει αυξημένο αμυλοειδογόνο δυναμικό χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ενώ η eGFP που δεν σχηματίζει ινίδια χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 5. Οι κινητικές καμπύλες της διαδικασίας συσσωμάτωσης των IAPP αναλόγων κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων πυρήνωσης μέσω της καταγραφής του φθορισμού της eGFP σε πραγματικό χρόνο.



Εικόνα 6. Ανοσοσύστημα Western. Εκφρασμένα GFP πρωτεΐνη (1), hIAPP πεπτιδί (2) και διάφορα IAPP ανάλογα πεπτιδία (3-7) εντοπίστηκαν με αντίσωμα Anti-His (1:2000).



Εικόνα 7. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size-exclusion chromatography) με τη χρήση κολώνας Superdex200 σε σύστημα υψηλής πίεσης χρωματογραφίας (HPLC) με ανιχνευτή GFP. Οι καμπύλες αντιπροσωπεύουν τον διαχωρισμό των δειγμάτων σε μονομερή, ολιγομερή και συσσωματώματα με βάση το μοριακό βάρος.

## Αποτελέσματα

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η κινητική συσσωμάτωσης διαφόρων πεπτιδίων IAPP αναλόγων επηρεάζει την κινητική αναδίπλωσης της eGFP, η οποία είναι μετρήσιμη με τρόπο παρόμοιο με την τεχνική Real Time PCR. Αν και τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών πεπτιδίων IAPP αναλόγων είναι παρόμοια (Σχήμα 6) παρατηρήθηκαν διαφορές στις καμπύλες φθορισμού. Το ποσοστό φθορισμού που εκπαιδευτή από την GFP (αρνητικός έλεγχος) είναι το υψηλότερο, ενώ στο hIAPP (θετικός έλεγχος) είναι το χαμηλότερο. Η επιβεβαίωση του σχηματισμού ολιγομερών ή συσσωματωμάτων στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους παρουσία GFP ανιχνευτή.

## Συμπεράσματα

Αναπτύχθηκε μια διαλογή υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) για πιθανά αμυλοειδογόνα ή μη αμυλοειδογόνα IAPP ανάλογα που εξετάστηκαν αποκλειστικά στα αρχικά στάδια πυρήνωσης. Καινοτόμα IAPP ανάλογα που σταματούν το μηχανισμό σχηματισμού αμυλοειδών στη φάση πυρήνωσης μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για πιο αποτελεσματική θεραπεία του T2D. Αυτή η καινοτόμος προσέγγιση μπορεί να δημιουργήσει ένα πρωτότυπο σύστημα που μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις αμυλοειδώσεις.