

## Podsumowanie rozprawy doktorskiej

### "Oddziaływanie amyloidu $\beta$ z modelowymi błonami komórkowymi – badania nad mechanizmem powstawania choroby Alzheimera i nowe podejście terapeutyczne "

Dusan Mrdenovic, MSc

Choroba Alzheimera (AD) jest powiązana z agregowaniem amyloidu  $\beta$  (A $\beta$ ) i tworzeniem złogów białek w mózgu pacjentów. Postulowane kaskadowe agregowanie A $\beta$  sugeruje, że nadprodukcja, agregacja i akumulacja A $\beta$  w ludzkim mózgu wyzwała kaskadę zdarzeń na poziomie molekularnym i komórkowym prowadzących do postępującej neurodegeneracji. Zgodnie z tą teorią, monomery A $\beta$  (A $\beta$ M) agregują do różnego rodzaju oligomerów A $\beta$  (A $\beta$ O) i włókienek A $\beta$  (A $\beta$ F). Najnowsze badania wykazały, że A $\beta$ M i A $\beta$ F nie są toksyczne, podczas gdy A $\beta$ O charakteryzują się wysoką toksycznością. A $\beta$ O przenikają przez błonę komórkową, jednak mechanizm tego zjawiska jest nadal przedmiotem dyskusji. Ponadto nie jest wiadome, jaki rodzaj A $\beta$ O przenika przez błonę komórkową, gdyż są to agregaty silnie polimorficzne. Dlatego niniejsza rozprawa ma na celu wyjaśnienie mechanizmu przenikania A $\beta$ O przez modelową błonę komórkową i zidentyfikowanie jaki typ A $\beta$ O jest odpowiedzialny za to zjawisko.

Agregowanie A $\beta$  monitorowano za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) w celu zidentyfikowania różnych form powstałych A $\beta$ O. W oparciu o rozmiar A $\beta$ O, sklasyfikowano je na oligomery o małym rozmiarze (ang. small size, SS) i o dużym rozmiarze (ang. large size, LS). Obrazowanie AFM wykazało, że LS A $\beta$ O migrują na powierzchni błony bez naruszania jej integralności. W przeciwieństwie do tego, SS A $\beta$ O przenikają przez błonę tworząc w niej pory i usuwając z niej lipidy. Co ciekawe, pomimo różnych mechanizmów oddziaływania z błoną, zarówno oligomery SS jak i LS zmniejszają moduł Younga błony o ~45%.

Następnie zbadano oddziaływanie toksycznych form A $\beta$ O z modelową błoną komórkową za pomocą technik elektrochemicznych i spektroskopii IR. Jako pomiar kontrolny, zbadano oddziaływanie nietoksycznych A $\beta$ M z modelową błoną komórkową. Pomiar pojemności różnicowej i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (ang. electrochemical impedance spectroscopy, EIS) wykazały, że na skutek tworzenia w błonie porów przez A $\beta$ O, właściwości elektryczne błony ulegają znaczącej zmianie. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni z modulacją polaryzacji (ang. polarization modulation-infrared reflection adsorption spectroscopy PM-IRRAS) wykazała, że zarówno A $\beta$ M jak i A $\beta$ O powodują zmiany w konformacji i orientacji łańcucha acylowego lipidów. Zarówno A $\beta$ M jak i A $\beta$ O oddziałują z hydrofilowymi główkami lipidów, ale w inny sposób. A $\beta$ M usuwają cząsteczki wody z obszarów hydrofilowych błony, ale nie wpływają na orientację części hydrofilowej lipidów. Natomiast A $\beta$ O nie zmieniają ilości wody, ale znacząco wpływają na orientację części hydrofilowej lipidów. Dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna (2D-COS) wykazała, że zmiany strukturalne w lipidach poprzedzają zmiany w strukturze drugorzędowej A $\beta$  zgodnie z mechanizmem ich agregacji.

Końcowym etapem badań było zrozumienie mechanizmu oddziaływania inhibitora, związku na bazie fluorenu o nazwie K162, z toksyczną formą A $\beta$ O. Badania EIS i AFM wykazały, że K162 zapobiega przenikaniu A $\beta$ O przez modelową błonę komórkową i tworzeniu w niej porów. Symulacje wykonane przy użyciu dynamiki molekularnej (ang. molecular dynamic, MD) wykazały, że po utworzeniu kompleksu A $\beta$ -K162, dalsze agregowanie takich kompleksów jest energetycznie niekorzystane. Jednakże badania AFM udowodniły, że pomimo obecności K162, A $\beta$  wciąż agreguje. Wynika to z tego, że K162 wykazuje tendencje do samoagregowania. Dlatego nie wszystkie cząsteczki K162 biorą udział w tworzeniu kompleksów A $\beta$ -K162. W konsekwencji, agregowanie A $\beta$  w obecności K162 jest jedynie spowolniona, ale nie całkowicie zahamowana. Ponadto, obecność K162 wpływa na mechanizm agregowania A $\beta$ , ponieważ K162 inhibuje powstawanie toksycznych form A $\beta$ O a jedynie nietoksyczne formy A $\beta$ , takie jak A $\beta$ Ms, A $\beta$ Ds i A $\beta$ Fs są produkowane. W przeciwieństwie do innych inhibitorów, K162 nie usuwa neurologicznie korzystnych A $\beta$ M. Rozszyfrowany mechanizm hamowania powstania toksycznych form A $\beta$  przez K162 nie tylko potwierdza wcześniejsze badania in vivo, ale także dostarcza nowatorskich rozwiązań terapeutycznych, które można wykorzystać w przyszłych badaniach nad walką z chorobą Alzheimera.

.....