

**Rola prenylacji białek w komórkach układu odpornościowego
i komórkach β wysp trzustkowych**

mgr inż. Daria Kamińska

Promotor: dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni

Drugi promotor: dr hab. inż. Katarzyna Błażewska, prof. uczelni

Cukrzyca typu 2 (T2DM, ang. *type 2 diabetes mellitus*), charakteryzująca się przewlekłą hiperglikemią, insulinoopornością i dysfunkcją układu immunologicznego, stanowi jedno z największych wyzwań zdrowia publicznego na świecie. Kluczową rolę w rozwoju tej choroby odgrywają nieprawidłowe nawyki żywieniowe – w szczególności nadmierne spożycie cukrów prostych, tłuszczów nasyconych i żywności wysokoprzetworzonej – w połączeniu z brakiem regularnej aktywności fizycznej. Nieleczona lub niewłaściwie kontrolowana cukrzyca typu 2 może prowadzić do poważnych powikłań zdrowotnych, takich jak niewydolność nerek, zawał mięśnia sercowego czy udar mózgu, znacząco zwiększając ryzyko przedwczesnej śmierci. Z uwagi na złożoność tej choroby niezbędne są dalsze badania nad molekularnymi mechanizmami leżącymi u podstaw jej patogenezy. Lepsze ich zrozumienie stworzyłoby podstawy do opracowania nowych strategii terapeutycznych, zarówno farmakologicznych, jak i dietetycznych, ukierunkowanych na skuteczniejsze leczenie i prewencję T2DM.

W obliczu pojawiających się doniesień o możliwym związku pomiędzy długoterminowym przyjmowaniem statyn (inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMGCR) – kluczowego enzymu ograniczającego efektywność całego szlaku kwasu mewalonowego (MVA, ang. *mevalonic acid*), a wzrostem liczby nowych przypadków cukrzycy typu 2, konieczne staje się zrozumienie roli nie tylko enzymów tego szlaku, ale również procesów prenylacji małych GTPaz. Inhibicja HMGCR, prowadzi bowiem nie tylko do obniżenia poziomu cholesterolu, ale także do zmniejszenia syntezy izoprenoidowych substratów niezbędnych do potranslacyjnej modyfikacji białek. Większość prenylowanych białek należy do rodziny małych GTPaz Ras, które odgrywają kluczową rolę w szeregu procesów komórkowych – od regulacji kontroli cyklu komórkowego po transport pęcherzykowy. Z tego względu zrozumienie wpływu statyn na prenylację tych białek może mieć istotne znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw diabetogennego działania tych leków.

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę zbadania, w jaki sposób inhibicja enzymów szlaku kwasu mewalonowego, prenylotransferaz oraz kinazy ROCK (ang. *Rho-associated coiled-coil forming kinase*) wpływa na sekrecję insuliny przez komórki β trzustki (linia MIN6) oraz degranulację komórek tucznych (linia RBL-2H3). Dodatkowo przeanalizowano wpływ zastosowanych inhibitorów na prenylację wybranych małych GTPaz: Rab11A, Rap1A/Rap1B, a w przypadku komórek tucznych – również Ras. Wszystkie eksperymenty poprzedzono oceną cytotoksyczności stosowanych związków względem obu

linii komórkowych. Badania te zrealizowano w jednostce macierzystej tj. Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej. W drugiej części badań zmierzono poziom ekspresji enzymów szlaku MVA oraz prenylotransferaz w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMCs, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) pochodzących od zdrowych osób oraz pacjentów chorych na cukrzycę typu 2. Badania te zrealizowano w The Core Research Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University w Chinach.

Pierwsza część badań wykazała, że prawastatyna oraz DGBP, stosowane w bezpiecznych niecytotoksycznych stężeniach (prawastatyna: 10 i 25 μM ; DGBP: 25 μM), istotnie hamowały sekrecję insuliny w warunkach wysokiego stężenia glukozy. Jednocześnie powodowały akumulację nieprenylowanych białek Rab11A oraz Rap1A/Rap1B w cytozolu, co sugeruje, że dysregulacja szlaków sygnałowych z udziałem tych małych GTPaz może być odpowiedzialna za obserwowane zmniejszenie wydzielania insuliny. Drugim związkiem wykazującym działanie hamujące względem sekrecji insuliny przy 20 mM stężeniu glukozy był kwas ryzedronowy (5 μM). Jednakże nie powodował on statystycznie istotnego obniżenia prenylacji żadnej z badanych GTPaz, co sugeruje, że mechanizm prowadzący do obniżenia sekrecji może być niezależny od prenylacji tych białek. W przypadku degranulacji komórek tłuszczowych, większość testowanych inhibitorów przyczyniła się do zahamowania tego procesu. Część z nich powodowała również obniżenie prenylacji małych GTPaz, co może sugerować, że w tych przypadkach zaburzenia prenylacji są odpowiedzialne za obserwowany efekt. Jednakże zagadnienie to pozostaje słabo poznane i wymaga dalszych, pogłębionych badań.

W drugiej części badań o charakterze przekrojowym wykazano, że poziom transkrypcji genów kodujących enzymy takie jak reduktaza HMG-CoA, syntaza difosforanu farnezyli oraz farnezylotransferaza jest istotnie zwiększony w PBMCs pochodzących od osób z cukrzycą typu 2. Zmiany te nie zawsze jednak przekładały się na poziomie translacji. Analiza cytometryczna wykazała, że poziom białek HMGCR oraz syntazy difosforanu geranylogeranyli jest istotnie podwyższony w całej populacji PBMCs pacjentów z T2DM. Co więcej, zwiększony poziom drugiego enzymu zaobserwowano w subpopulacjach PBMCs pochodzących od osób z T2DM: monocytach CD16⁺, monocytach nieklasycznych CD14⁺CD16⁺ i w komórkach dendrytycznych CD11c⁺. Z kolei w przypadku farnezylotransferazy odnotowano istotną różnicę w populacji klasycznych monocytów CD14⁺CD16⁻ - wyższy poziom tego enzymu stwierdzono u osób

zdrowych. Zaobserwowane zmiany wskazują na potencjalne znaczenie szlaku kwasu mewalonowego i jego enzymów w patofizjologii cukrzycy typu 2. Konieczne są jednak dalsze badania, które pozwolą określić, czy odnotowane zmiany w ekspresji enzymów mają wpływ na fenotyp komórek, których dotyczą i czy mogą stanowić punkt wyjścia do pogłębionych analiz mechanizmów molekularnych związanych z chorobą.

Z kolei wykonana analiza korelacji pomiędzy poziomem ekspresji enzymów (na podstawie danych z cytometrii przepływowej), a wybranymi parametrami klinicznymi ujawniła kilka interesujących zależności. Jedną z nich była odwrotna korelacja pomiędzy poziomem ekspresji geranylogeranylotransferazy typu I w całej populacji PBMCs (zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na T2DM) a stężeniem glukozy na czczo. Wynik ten może wskazywać na potencjalną rolę tego enzymu w regulacji gospodarki glukozy, co wymaga dalszych badań w celu potwierdzenia i wyjaśnienia mechanizmu tej zależności.

Podsumowując, przeprowadzone w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej eksperymenty wykazały, że zarówno pośrednia, jak i bezpośrednia inhibicja prenylacji małych GTPaz może mieć wpływ na procesy sekrecji insuliny przez komórki β trzustki oraz degranulacji komórek tucznych. Ponadto, pierwsze tego rodzaju badanie przekrojowe z zastosowaniem komórek jednojądrzastych krwi obwodowej osób zdrowych oraz pacjentów z cukrzycą typu 2 dostarczyło nowych danych na temat ekspresji kluczowych enzymów szlaku kwasu mewalonowego oraz prenylotransferaz w tych komórkach. Uzyskane wyniki mogą stanowić cenną podstawę do kolejnych analiz mających na celu lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój cukrzycy typu 2 oraz identyfikację potencjalnych celów terapeutycznych.