

STRESZCZENIE

Cukrzyca to grupa schorzeń metabolicznych charakteryzujących się podwyższonym poziomem glukozy we krwi, wynikającym z problemów z wydzielaniem insuliny, działaniem insuliny lub obydwoma tymi czynnikami. Zachorowalność i śmiertelność z powodu tej choroby osiągnęła wartości, które 25 lat temu uważano za niewyobrażalne, a konsekwencje obejmujące choroby układu krążenia, neuropatię, nefropatię, retinopatię, chorobę Alzheimera i inne, mają dramatyczny wpływ na jakość zdrowia i długość życia ludzi. Obecnie w samych Stanach Zjednoczonych na cukrzycę choruje około 28 milionów pacjentów w wieku 20 lat i starszych, a liczba nowych przypadków wynosi 180 000 rocznie. Co więcej, 186 000 osób w wieku poniżej 20 lat choruje na cukrzycę, a każdego roku u około 15 000 diagnozuje się cukrzycę typu 1. Dodatkowo, coraz więcej dzieci choruje na cukrzycę typu 2, chorobę powszechnie rozpoznawaną u dorosłych w wieku 40 lat i starszych. Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna podaje, że na całym świecie na cukrzycę choruje 537 milionów osób w wieku 20-79 lat. Przewiduje się, że liczba ta wzrośnie do 643 milionów do 2030 roku i 783 milionów do 2045 roku.

Cukrzycę typu 1 definiuje się jako chorobę polegającą na postępującym autoimmunologicznym niszczeniu komórek β , co prowadzi do poważnego niedoboru insuliny. Jednak długotrwała cukrzyca typu 1 nie prowadzi do całkowitej utraty komórek β ; komórki β znaleziono podczas sekcji zwłok, wiele lat po wystąpieniu cukrzycy, a insulina powstaje u większości pacjentów z cukrzycą po teście tolerancji glukozy. Synteza i wydzielanie endogennej insuliny ma działanie ochronne na powikłania i hipoglikemię, co wskazuje, że choć na niskim poziomie, funkcjonalne komórki β są zachowane w cukrzycy typu 1. Te komórki β są chronione przez reakcję immunologiczną, albo podlegają ciągłej regeneracji. Ta druga możliwość jest zgodna z ekspresją białek cyklu komórkowego w komórkach β w próbkach autopsyjnych pobranych od pacjentów, którzy chorowali na cukrzycę typu 1 przez ponad 50 lat. Nie wiadomo jednak, czy replikujące się komórki β są potomstwem komórek macierzystych, czy też pochodzą z podziału dojrzałych komórek β . Utrata komórek β determinuje patologię cukrzycy, a odtworzenie przedziału komórek β łagodzi cukrzycę i jej konsekwencje. Istnieje silna korelacja między resztkową masą komórek β a zaawansowaniem cukrzycy i jej powikłań. W biologii komórek β dominują dwie przeciwstawne opinie: a) komórki β nie są terminalnie zróżnicowanymi komórkami postmitotycznymi, ale raczej pulą komórek, która pomimo swojej wysoce wyrafinowanej funkcji może ponownie wejść w cykl komórkowy i dzielić się;

oraz b) komórki β są nieodwracalnie wycofane z cyklu komórkowego i mogą powstawać tylko poprzez aktywację i specyfikację linii komórek macierzystych.

Cukrzyca charakteryzuje się wieloma czynnikami obejmującymi fizjologiczne, biochemiczne i chemiczne mediatory działające jednocześnie, wyzwalane przez te same lub różne szlaki. Inhibitory kinaz o małych cząsteczkach otworzyły nowe możliwości dla badań funkcjonalnych i terapii regeneracyjnych. DYRK1A jest jednym z pięciu członków rodziny kinaz regulowanych fosforylacją tyrozyny (Y) o podwójnej specyficzności (DYRK). Gen *dyrk1a* znajduje się w regionie krytycznym zespołu Downa i reguluje procesy komórkowe związane z proliferacją i różnicowaniem neuronalnych komórek progenitorowych podczas wczesnego rozwoju. Pierwotnie koncentrowało to badania na jego roli w chorobach zwyrodnieniowych neuronów, w tym chorobie Alzheimera i zespole Downa. Jednak ostatnie badania wykazały rolę DYRK1A w cukrzycy. Badania przeprowadzone na myszach z haploinsuficytem genu *dyrk1a* dostarczyły dowodów potwierdzających, że zwierzęta te wykazują znaczną nietolerancję glukozy, zmniejszenie masy i proliferacji komórek β , co ostatecznie prowadzi do rozwoju cukrzycy. Zaobserwowano, że efekt ten jest znacznie wzmocniony przez nadekspresję DYRK1A w komórkach β .

Niniejsza rozprawa doktorska wpisuje się w aktualne trendy badawcze, które dotyczą głównie charakterystyki nowych małowcząsteczkowych inhibitorów kinazy DYRK1A oraz zastosowania organoidów komórek beta trzustki w badaniach nad cukrzycą. Głównymi celami pracy są: (1). Identyfikacja i charakterystyka właściwości strukturalnych nowych małowcząsteczkowych inhibitorów kinazy DYRK1A. (2) Ocena skuteczności tych inhibitorów w hamowaniu DYRK1A in vitro. (3) Analiza potencjalnych efektów terapeutycznych tych inhibitorów w modelach organoidów komórek β trzustki w cukrzycy. (4) Ocena wpływu wybranych inhibitorów na długotrwałe wydzielanie insuliny w modelu ludzkich organoidów wysepek trzustkowych. (5) Porównanie aktywności badanych inhibitorów z harminą, obecnie najlepiej udokumentowanym związkiem promującym proliferację komórek β , w różnych modelach, w tym w komórkach INS-1E i MIN6, izolowanych wysepkach mysich i komórkach β pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (iPSC). (6) Zbadanie skuteczności małowcząsteczkowych inhibitorów kinazy DYRK1A w promowaniu proliferacji komórek β , co może przyczynić się do lepszego zrozumienia ich roli w homeostazie insuliny. (7) Udowodnienie koncepcji, że indukowana małymi cząsteczkami proliferacja ludzkich komórek β poprzez hamowanie DYRK1A jest osiągalna, co może mieć znaczące implikacje dla medycyny regeneracyjnej w leczeniu cukrzycy typu 1 i typu 2.

Przeprowadzone badania dostarczają kluczowych informacji w celu wykazania znaczenia inhibitorów DYRK1A w cukrzycy. Opracowane inhibitory DYRK1A mają niezwykłą zdolność do zwiększania proliferacji komórek β i równoważenia poziomu glukozy we krwi.

Wcześniejsze badania wykazały, że hamowanie DYRK1A ma korzystny wpływ na wzrost komórek β i produkcję insuliny. Jednak najskuteczniejszy obecnie dostępny małącząsteczkowy inhibitor, harmina, wyróżnia się niską selektywnością kinazową. AC27 wywiera podwójne działanie, zarówno hamując aktywność DYRK1A, jak i powodując znaczne obniżenie poziomu DYRK1A w komórkach, jednocześnie wykazując lepszą selektywność wobec DYRK1A. Było to związane ze zwiększonym tempem wzrostu komórek β poddanych działaniu inhibitorów. Dodatkowo, AC27 zwiększał produkcję insuliny i peptydu C w odpowiedzi na glukozę bez znaczącego wpływu na poziom glukagonu. Zaobserwowane wyniki były istotne statystycznie, skutkując ponad 60% wzrostem ekspresji insuliny. Wpływ hamowania DYRK1A za pomocą AC27 został wzmocniony przez jednoczesną supresję TGF- β . Co najważniejsze, wyniki uzyskane w liniach komórkowych zostały powtórzone w bardziej zaawansowanych modelach wysepek trzustkowych. AC27 znacznie zwiększył stymulowaną glukozą produkcję insuliny w organoidach komórek β wytwarzanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) oraz w izolowanych wysepkach trzustkowych myszy. Przedstawione wyniki dostarczają przekonujących dowodów na to, że zastosowanie AC27 do hamowania DYRK1A skutecznie zwiększa wzrost i aktywność komórek β . Efekt ten jest szczególnie zauważalny w porównaniu do harminy, głównie ze względu na większą zdolność AC27 do selektywnego celowania w określone kinazy.

Kolejna część rozprawy koncentruje się na badaniu wpływu leucytyn na hamowanie kinazy DYRK1A i ich skuteczności w leczeniu cukrzycy. Leucytyny, które są naturalnymi pochodnymi, mogą stymulować wydzielanie insuliny w komórkach, wysepkach beta pochodzących z hiPSC i mysich wysepkach trzustkowych. Ponadto, leucytyna L41 w połączeniu z LY364947 znacząco zwiększa wydzielanie insuliny. Badania wskazują, że ta konkretna kombinacja leków zwiększa tempo proliferacji i odpowiedzi na glukozę. Sugeruje to, że te inhibitory mogą mieć wpływ na szlaki sygnałowe, które ułatwiają replikację komórek β , biosyntezę i wydzielanie insuliny.

W kolejnych badaniach wykazano, że pluronic zwiększa biodostępność AC27 w porównaniu z innymi preparatami (CrEL) *in vivo*, powodując długotrwałą normoglikemię u myszy z indukowaną cukrzycą. Jednocześnie, dzięki zastosowaniu poloksameru, możliwe było zmniejszenie dawki podawanej myszom do 10 mg/kg masy ciała. Szeroki zakres kombinacji

PPO i PEO w projektach Pluronic zapewnia zróżnicowany zakres właściwości poloksameru i umożliwia opracowanie dostosowanego systemu dostarczania leków. Im krótsza grupa PEO, tym większe prawdopodobieństwo, że pluronic będzie zachowywał się jak olej i utworzy emulsję. Pluronic P123 oferuje stabilne formułacje, zdolne do tworzenia miceli przy niskich poziomach stężenia. W porównaniu z grupą nieleczoną, analiza morfometryczna wycinków trzustki poddanych działaniu badanych związków wykazała poprawę morfologii i wzrost insuliny po leczeniu. Co więcej, AC27@P123 wykazał również zwiększony wpływ na wydzielanie insuliny w organoidach komórek β pochodzących z hiPSC. Ogólnie rzecz biorąc, nasze odkrycia dostarczają przekonujących dowodów na to, że hamowanie DYRK1A za pomocą AC27 poprawia funkcję i proliferację komórek β .

Ostatnia sekcja koncentruje się na identyfikacji nowego celu molekularnego, białka SPOP, które zmniejsza akumulację białka PDX1 w dorosłych komórkach β , prowadząc następnie do zmniejszonej ekspresji kluczowych genów, takich jak insulina, które są kluczowe dla utrzymania masy i funkcji komórek β . PDX1, znany również jako IPF1, odgrywa kluczową rolę w rozwoju i funkcjonowaniu komórek beta trzustki, co czyni go obiecującym celem strategii leczenia cukrzycy. Jako główny regulator transkrypcji genów insuliny, PDX1 jest niezbędny do utrzymania prawidłowej funkcji komórek beta, w tym ich zdolności do syntezy i wydzielania insuliny. Uzyskane wyniki potwierdzają związek między modulacją SPOP a wzrostem PDX1 i insuliny, co jest zgodne z naszymi wcześniejszymi badaniami. Wnioski są poparte także przez analizę zaobserwowanych wyników, która pokazuje spójny związek między leczeniem, zmianami w SPOP i poziomach insuliny oraz wynikającym z tego wpływem na PDX1 i syntezę insuliny. Odkrycie tego nowego szlaku regulacyjnego dla PDX1 i potwierdzenie jego roli sugeruje, że strategie terapeutyczne mające na celu modulację obrotu PDX1 poprzez SPOP mogą podnieść poziom białka PDX1, zwiększając w ten sposób przeżywalność i funkcjonalność komórek β w leczeniu cukrzycy.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska wpisuje się w aktualne trendy badawcze, które koncentrują się na analizie nowych małocząsteczkowych inhibitorów kinazy DYRK1A oraz wykorzystaniu organoidów komórek beta trzustki w badaniach nad cukrzycą.