

## Streszczenie

Choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera, Parkinsona) związane są z zaburzeniami funkcjonowania i stopniowym obumieraniem neuronów. W ostatnich latach liczba osób chorych znacznie wzrosła, dlatego choroby neurodegeneracyjne uważane są za plagę XXI wieku. Szacuje się, iż liczba pacjentów z chorobą Alzheimera potroi się do 2050 roku, jest to m.in. konsekwencją wydłużającej się średniej długości życia. W związku z brakiem skutecznych form leczenia, trudnościami we wczesnym wykrywaniu choroby, a także kosztami opieki, choroby neurodegeneracyjne stanowią poważny globalny problem społeczno-ekonomiczny.

Cechą charakterystyczną chorób neurodegeneracyjnych jest odkładanie się uszkodzonych białek (białka tau oraz amyloidu  $\beta$  w chorobie Alzheimera,  $\alpha$ -synukleiny w przypadku choroby Parkinsona), które w zdrowych komórkach są usuwane przez systemy proteolityczne.

W fizjologicznych warunkach za degradację błędnie ukształtowanych struktur białkowych odpowiedzialny jest m.in. proteasom 20S – multiproteaza składająca się z 28 podjednostek, tworzących cztery heptameryczne, współosiowo ułożone pierścienie. Znajdujące się na zewnątrz pierścienie  $\alpha$  nie są aktywne proteolitycznie. Ich główną funkcją jest kontrola dostępu do centrów aktywnych, znajdujących się wewnątrz kanału katalitycznego. Aktywność proteolityczną w przypadku eukariotów wykazują trzy podjednostki  $\beta$  każdego z pierścieni:  $\beta 1$  (kaspazopodobną),  $\beta 2$  (trypsynopodobną),  $\beta 5$  (chymotrypsynopodobną).

Niestety, z upływem czasu wydajność enzymatyczna proteasomu spada, co ułatwia rozwój chorób neurodegeneracyjnych. Wyniki ostatnich badań przekonują, że stosowanie małocząsteczkowych modulatorów w celu aktywacji proteasomu może zapobiegać akumulacji uszkodzonych białek i może być skuteczną strategią terapeutyczną.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza stymulatorów proteasomu zdolnych do przenikania przez błony komórkowe oraz stabilnych w warunkach proteolitycznych. Modulatory te zaprojektowane zostały w oparciu o sekwencję aktywatora Blm-pep. Chcąc uzyskać modulatory o podwyższonej odporności na działanie enzymów proteolitycznych wykonano syntezę modulatorów z wprowadzonymi modyfikacjami w postaci wiązania peptoidowego lub *N*-metylowanych aminokwasów. Zsyntezowano również aktywatory posiadające zduplikowany C-końcowy fragment macierzystego modulatora, chcąc w ten

sposób uzyskać związki zdolne do wiązania się w dwóch sąsiadujących kieszeniach proteasomu 20S.

W pierwszym etapie przeprowadzono badania aktywności otrzymanych aktywatorów. Potwierdziły one, iż wprowadzenie modyfikacji w rejonie *N*-końca sekwencji nie wpłynęło negatywnie na zdolność do aktywacji proteasomu 20S, w przeciwieństwie do zmian w fragmencie *C*-końcowym. W kolejnym etapie przeprowadzono badania stabilności proteolitycznej w ludzkim osoczu, które wykazały, że uzyskane peptydomimetyczne analogi charakteryzują się zwiększoną stabilnością w porównaniu z wyjściowymi związkami. Za pomocą analizy MS wykazano, iż w miejscu występowania modyfikacji nie zachodzi proces degradacji. Następnie, w celu uzyskania aktywatorów zdolnych do wnikania do wnętrza komórki, do wybranych sekwencji dołączono fragment peptydowy penetrujący błony komórkowe (ang. *Cell penetrating peptide*, CPP): tat lub 6r. Poprzez zsyntezowanie znakowanych fluoroforem NBD sekwencji aktywator-CPP, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej zweryfikowano przenikalność komórkową otrzymanych związków. Na uzyskanych obrazach widoczna była fluorescencja pochodząca od aktywatorów z fluoroforem NBD wewnątrz komórek HEK293T. W kolejnych etapach badań wykazano, że związki nie są cytotoksyczne dla komórek, co sprawdzono za pomocą testu oceny cytotoksyczności MTT.

Wybrane aktywatory z sekwencją CPP były zdolne do stymulowania proteasomu w hodowli komórkowej, co potwierdzono za pomocą badania aktywności enzymu w lizacie komórkowym oraz wewnątrz komórek, dzięki wykorzystaniu specyficznej dla proteasomu 20S, przenikającej do komórek, fluorescencyjnej sondy TAS3.

Efektywność wybranych aktywatorów przetestowano z użyciem modelowych substratów białkowych. Badane związki były w stanie stymulować proteasomu 20S do wydajniejszego trawienia białka tau oraz  $\alpha$ -synukleiny. Aktywatory z dołączoną sekwencją CPP były również w stanie pokonywać barierę krew-mózg, podczas gdy przenikalność związku wyjściowego osiągała poziom kontroli negatywnej. W kolejnym etapie zostały przeprowadzone badania wykorzystujące technikę MST, które potwierdziły występowanie oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami a proteasomem 20S.

Dla wybranych aktywatorów zostały przeprowadzone testy na mysim embrionalnym modelu komórkowym. Związki A1-tat, A1-6r oraz Bis1-tat były zdolne do stymulowania proteasomu do wydajnej degradacji  $\alpha$ -synukleiny w komórkach hipokampalnych. Ponadto, po siedmiu

dniach inkubacji, związki te nie spowodowały obniżenia przeżywalności komórek neuronalnych.

Otrzymane aktywatory ze względu na wysoki poziom aktywacji proteasomu, stabilność w warunkach proteolitycznych oraz zdolność do wnikania do komórek, posiadają pożądane cechy, które umożliwiają terapeutyczne zastosowanie. Modulatory BIm mogłyby przywracać proteostazę u pacjentów cierpiących na powiązane z wiekiem schorzenia, objawiające się akumulacją uszkodzonych białek.