

Monika Łęgowska
Katedra Biochemii
Nr indeksu: 2541

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„In search of substrates and inhibitors of human cathepsin C. Design, chemical synthesis and biological studies”

Katepsyna C (Cat C), znana również jako dipeptydylowa peptydaza I (DPPI), jest lizosomalną proteazą cysteinową, która odpowiada za aktywację neutrofilnych proteinaz serynowych oraz innych enzymów, niezbędnych dla skutecznej odpowiedzi immunologicznej człowieka. Enzym ten jest również zaangażowany w inne ważne procesy fizjologiczne takie jak degradacja białek w lizosomach, wzrost komórek czy aktywacja neuraminidazy i osoczowych czynników krzepnięcia. Cat C występuje w dużych ilościach w limfocytach T oraz w dojrzałych komórkach szpikowych, ale jest obecna także w większości tkanek, głównie w płucach, trzustce oraz nerkach. Udowodniono, że proteaza ta może być wydzielana do przestrzeni międzykomórkowej, natomiast jej występowanie w ludzkich płynach ustrojowych nie zostało dokładnie zbadane.

Cechami wyróżniającymi ludzką Cat C spośród lizosomalnych proteaz cysteinowych jest jej złożony mechanizm aktywacji, tetrameryczna struktura oraz aktywność egzopeptydazy. Cat C odcina dipeptydyłowe reszty od *N*-końca białek oraz peptydów, co jest spowodowane występowaniem w strukturze enzymu domeny „wykluczania”, która częściowo blokuje jego centrum aktywne. Ponieważ Cat C wykazuje aktywność dipeptydazy, większość dotychczas otrzymanych syntetycznych substratów tego enzymu to dipeptydy połączone z różnymi grupami reporterowymi, takimi jak chromofory czy fluorofory. Związki te przyczyniły się do poznania specyficzności substratowej proteazy w pozycjach niepromowanych (według notacji Schechtera-Bergera), natomiast preferencje enzymu co do reszt aminokwasowych w pozycjach *P'* substratów nie zostały dokładnie zbadane.

Ze względu na udział enzymu w aktywacji neutrofilnych proteinaz serynowych, hamowanie aktywności Cat C uznawane jest za obiecującą strategię terapeutyczną w wielu chorobach zapalnych, w których podwyższony poziom aktywności tych enzymów prowadzi do degradacji macierzy międzykomórkowej i przewlekłego stanu zapalnego. Mając to na

uwadze, wiele grup badawczych zajęło się projektowaniem i syntezą chemiczną inhibitorów Cat C. Spośród wielu otrzymanych związków największe nadzieje pokładane są w nitylach dipeptydów, ponieważ silnie hamują one tę proteazę, a jednocześnie są mało reaktywne wobec nukleofili komórkowych.

W ramach prezentowanej pracy doktorskiej zajmowałam się poszukiwaniem nowych, peptydowych substratów i inhibitorów ludzkiej Cat C. W pierwszej części pracy poświęconej substratom, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam dwie grupy związków: substraty fluorogeniczne oraz substraty wykorzystujące przeniesienie energii wzbudzenia elektronowego. Celem tej części pracy było znalezienie specyficznego i selektywnego substratu Cat C, który pozwoliłby na detekcję oraz pomiar aktywności enzymu zarówno w złożonych próbkach biologicznych, jak i w ludzkich płynach ustrojowych. Otrzymane związki zostały poddane badaniom enzymatycznym z udziałem ludzkiej rekombinowanej Cat C oraz innych cysteinowych katepsyn. W drugiej części pracy, w ramach poszukiwania inhibitorów Cat C, zajęłam się projektowaniem i syntezą chemiczną nityli dipeptydów. W wyniku tych prac otrzymałam wszystkie cztery diastereoizomery nitylu β -(2-tienylo)-alanylofenyloalaniny oraz zbadałam wpływ konfiguracji obu centrów asymetrii na siłę hamowania aktywności ludzkiej Cat C oraz na ich stabilność w ludzkim osoczu. Dodatkowo, zsyntetyzowałam cztery nityle zawierające zasadowe reszty aminokwasowe w pozycji P₁ i sprawdziłam, czy związki te hamują aktywność ludzkiej Cat C.

Pierwsza grupa otrzymanych przeze mnie związków składała się z dwóch serii potencjalnych substratów ludzkiej Cat C o wzorach ogólnych **Gly-Phe-Y** oraz **Thi-Phe-Y**, gdzie Thi to β -(2-tienylo)-alanina, a Y jeden z siedmiu fluoroforów z grupy kumaryn lub chinolinonów. Sekwencje dipeptydów zostały wybrane w oparciu o częściowo już poznaną specyficzność substratową ludzkiej katepsyny C oraz na podstawie sekwencji silnego i selektywnego inhibitora tego enzymu, Thi-Phe-CN. Synteza większości związków została przeprowadzona w roztworze z zastosowaniem strategii Boc oraz silnego środka sprzęgającego HATU. Wyjątkiem była synteza związków zawierających 7-amino-4-karbamoilometylokumarynę (ACC), która została przeprowadzona w fazie stałej z zastosowaniem strategii Fmoc. Otrzymane związki zostały oczyszczone z wykorzystaniem kolumnowej chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym. Czystość związków została określona przy pomocy analizy RP-HPLC, a ich masy cząsteczkowe potwierdzone przez spektrometrię mas.

Otrzymane związki zostały poddane badaniom enzymatycznym z rekombinowaną ludzką Cat C oraz rekombinowaną ludzką katepsyną L (Cat L), która była stosowana do aktywacji proenzymu Cat C. Wyniki pokazują, że związki o wzorze ogólnym Thi-Phe-Y, zaprojektowane na podstawie struktury silnego i specyficznego inhibitora ludzkiej Cat C, są efektywnie hydrolizowane przez Cat C i wykazują większe powinowactwo do tego enzymu niż związki z serii Gly-Phe-Y. Zróżnicowana budowa chemiczna zastosowanych fluoroforów pozwoliła na zbadanie jej wpływu na szybkość proteolizy omawianych substratów. Zaobserwowałam, że najszybciej hydrolizowane są cztery substraty zawierające grupę metylową oraz propylową w pozycji 4 pierścienia kumaryny bądź chinolinonu. Związki te poddałam badaniom kinetycznym z Cat C, podczas których wyznaczyłam wartości stałej Michaelisa (K_M), stałej katalitycznej (k_{cat}) oraz stałej specyficzności (k_{cat}/K_M) w buforze MES o pH 6. Najbardziej specyficznym substratem Cat C okazał się **Thi-Phe-APC** (gdzie APC to 7-amino-3-propylokumaryna) ze stałą specyficzności równą $(1,65 \pm 0,02) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. W celu oceny selektywności najbardziej specyficznego substratu Cat C, był on inkubowany w buforze w obecności każdej z cysteinowych katepsyn: C, L, B, V, K, S i X. Niestety otrzymany substrat ulegał proteolizie nie tylko pod wpływem Cat C, ale także Cat L, B, K i X.

Kolejną zaprojektowaną i zsyntetyzowaną grupą związków były peptydomimetyki zawierające donor i akceptor fluorescencji o wzorach ogólnych **ABZ-Bip-X-Tyr(NO₂)-NH₂**, gdzie X to białkowe reszty aminokwasowe z wyjątkiem Cys, ABZ to kwas *o*-aminobenzoowy (donor fluorescencji), a Tyr(NO₂) to 3-nitro-L-tyrozyna (akceptor fluorescencji). Ta grupa związków została zaprojektowana z myślą o opracowaniu na jej podstawie pierwszych substratów FRET Cat C. Wyniki wstępnych badań enzymatycznych pokazały, że związki te są odporne na proteolizę w obecności Cat C, natomiast są efektywnie hydrolizowane w obecności Cat L. Na podstawie sekwencji najlepszego substratu z serii, ABZ-Bip-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam dwie kolejne serie peptydów FRET o wzorach ogólnych **ABZ-Bip-Arg-X₁'-Tyr(NO₂)-NH₂** oraz **ABZ-Bip-Arg-Ala-X₂'-Tyr(NO₂)-NH₂** (gdzie X₁' i X₂' to białkowe reszty aminokwasowe z wyjątkiem Cys), które pozwoliły na zbadanie specyficzności substratowej Cat L w pozycjach nieprimowanych P₁' oraz P₂', a także na uzyskanie selektywnego i czułego substratu ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Synteza wszystkich związków została wykonana manualnie w fazie stałej, z wykorzystaniem strategii Fmoc. Czystość związków została określona przy pomocy analizy RP-HPLC, a masy cząsteczkowe otrzymanych związków zostały potwierdzone przez spektrometrię mas.

Wybrane substraty z serii heksapeptydów ABZ-Bip-Arg-Ala-X₂'-Tyr(NO₂)-NH₂ poddałam badaniom kinetycznym, a następnie wyznaczyłam ich limity detekcji oraz oznaczalności. Substrat ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ został wykorzystany do zmierzenia aktywności Cat L w lizatach komórek czerniaka złośliwego oraz porównania z aktywnością w komórkach fibroblastów oraz keratynocytów. Wyniki pokazały, że aktywność enzymu jest o 40% wyższa w komórkach nowotworowych niż w zdrowych komórkach.

Następną zaprojektowaną grupą związków były substraty FRET Cat C o wzorze ogólnym: **Thi-Ala(Mca)-X₁'-Tyr(3-NO₂)-NH₂**, gdzie X₁' to białkowe reszty aminokwasowe z wyjątkiem Cys. Zaprojektowane związki zostały zsyntetyzowane manualnie w fazie stałej z wykorzystaniem strategii Fmoc. Czystość związków została określona przy pomocy analizy RP-HPLC, a masy cząsteczkowe otrzymanych związków zostały potwierdzone przez spektrometrię mas. Przeprowadzone badania enzymatyczne z rekombinowaną ludzką Cat C pokazały, że otrzymane związki ulegają proteolizie w obecności enzymu. Na bazie efektywnie hydrolizowanego i selektywnego substratu Thi-Ala(Mca)-Ser-Tyr(3-NO₂)-NH₂, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam kolejną serię peptydów FRET, w której łańcuch peptydowy został wydłużony o kolejną resztę aminokwasową: **Thi-Ala(Mca)-Ser-X₂'-Tyr(3-NO₂)-NH₂** (X₂' to białkowe reszty aminokwasowe z wyjątkiem Cys). Substraty Thi-Ala(Mca)-Ser-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂ oraz Thi-Ala(Mca)-Ser-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ zostały poddane badaniom kinetycznym w buforach o pH 5 i 6. Wartości wyznaczonych parametrów porównałam z wartościami otrzymanymi dla krótszych substratów Cat C: Thi-Phe-AMC oraz Thi-Ala(Mca)-Ser-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Wyniki pokazały, że wydłużenie łańcucha peptydowego do 5 reszt aminokwasowych spowodowało 2-3-krotny wzrost liczby obrotów enzymu, natomiast nie miało dużego wpływu na powinowactwo do Cat C. Badanie selektywności substratów zawierających odpowiednio Gly i Gln w pozycji P₂' pokazało, że oba związki ulegały proteolizie pod wpływem Cat C oraz Cat B, przy czym wartości stałej specyficzności wyznaczone przeze mnie dla substratów z Cat B były ok. 15-20 razy mniejsze.

Otrzymany substrat Cat C, Thi-Ala(Mca)-Ser-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂, zastosowałam do pomiaru aktywności enzymu w różnych próbkach biologicznych, które są bogatym źródłem Cat C, takich jak lizat ludzkich neutrofilów, lizaty wybranych linii komórkowych, czy zagęszczony moczek. Substrat ten użyłam również do określenia stężenia aktywnej Cat C w płynach z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, które pochodziły od pacjentów cierpiących na choroby zapalne układu oddechowego: histiocytozę X i złuszczone śródmiąższowe zapalenie płuc, które charakteryzują się obecnością dużej ilości makrofagów.

Badania enzymatyczne związków wchodzących w skład dwóch serii peptydomimetyków pozwoliły mi na zbadanie specyficzności substratowej S' ludzkiej Cat C. Otrzymane związki były inkubowane z rekombinowaną Cat C w buforach o różnych pH: 5,0, 6,0 i 7,4. Wyniki pokazały, że specyficzność Cat C zależy od pH i jest najmniejsza w pH 5, czyli w środowisku lekko kwaśnym, w którym enzym odpowiada za degradację białek w lizosomach oraz aktywację proenzymów. Cat C wykazuje największe powinowactwo do substratów zawierających w pozycjach P₁' oraz P₂' polarne, zasadowe oraz małe alifatyczne reszty aminokwasowe, co wyraźnie widać analizując dane otrzymane podczas pomiarów wykonanych w buforach o pH 6 oraz 7,4.

W drugiej części mojej pracy doktorskiej zajęłam się projektowaniem i syntezą nowych inhibitorów Cat C. Otrzymałam dwie serie nitryli dipeptydów. Pierwsza z nich składała się z diastereoizomerów silnego oraz selektywnego inhibitora Cat C, Thi-Phe-CN. Badania przeprowadzone przez Guay i współpracowników wykazały, że Thi-Phe-CN silnie hamuje Cat C (IC₅₀=0,9±0,3 nM), ale w warunkach *in vivo* jest nietrwały i bardzo szybko ulega hydrolizie, co wyklucza jego stosowanie w terapii. Moim celem było zbadanie wpływu konfiguracji centrów asymetrii inhibitorów na hamowanie aktywności katepsyny C oraz na ich trwałość w płynach ustrojowych. Diastereoizomery nitrylu β-(2-tienylo)-alanylofenyloalaniny otrzymałam w wyniku reakcji sprzęgania Boc-β-(2-tienylo)-L- lub D-alaniny z nitrylem L- lub D-fenyloalaniny. Otrzymane nitryle zostały oczyszczone z wykorzystaniem RP-HPLC. Masa cząsteczkowa otrzymanych związków została potwierdzona metodą spektrometrii mas. Wpływ konfiguracji przestrzennej inhibitorów na siłę hamowania aktywności ludzkiej Cat C z badałam w dwóch układach modelowych: lizatach ludzkich neutrofilii oraz w moczu. W czasie badań substrat Gly-Phe-AMC był inkubowany w każdym układzie modelowym bez oraz w obecności nitrylu. Jako kontrolę pozytywną stosowałam silny nieodwracalny inhibitor Cat C- Gly-Phe-CHN₂. Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie diastereoizomery nitrylu β-(2-tienylo)-alanylofenyloalaniny wykazują aktywność inhibitorową wobec ludzkiej Cat C. Spośród związków posiadających w cząsteczce reszty aminokwasowe o konfiguracji D największą aktywność zarówno w lizatach ludzkich neutrofilii jak i w próbkach moczu wykazywał izomer Thi-D-Phe-CN, co wskazuje na to, że o wysokiej aktywności inhibitorowej tych związków decyduje konfiguracja przestrzenna reszty aminokwasowej inhibitora w pozycji P₂. Kolejnym zadaniem drugiej części projektu było porównanie trwałości otrzymanych związków w układach biologicznych. W celu zbadania stabilności proteolitycznej otrzymanych nitryli,

związki te były inkubowane w ludzkim osoczu, a następnie po upływie odpowiedniego czasu poddawane analizie RP-HPLC. Badania wykazały, że wyjściowy nitryl Thi-Phe-CN ulegał całkowitej hydrolizie w ciągu 3 godzin, natomiast pozostałe diastereoizomery, zawierające w cząsteczce reszty aminokwasowe o konfiguracji D, okazały się odporne na proteolizę. Thi-D-Phe-CN, jako najsilniejszy inhibitor odporny na proteolizę, znalazł zastosowanie w kontroli aktywności Cat C w analizach, których celem był pomiar aktywności enzymu w próbkach płwocin pobranych od pacjentów chorujących na mukowiscydozę.

Biorąc pod uwagę fakt, że nitryle dipeptydów należą do najsilniejszych niskocząsteczkowych inhibitorów tego enzymu, zaprojektowałam i syntetyzowałam także drugą serię dipeptydowych nitryli o wzorze ogólnym **Thi-X-CN**, gdzie X to jedna z czterech zasadowych reszt aminokwasowych, Dap, Dab, Orn i Lys, różniących się liczbą grup $-CH_2-$ w łańcuchu bocznym (Dap- kwas 2,3-diaminopropanowy, Dab- kwas 2,4-diaminobutanowy). Otrzymane związki pozwoliły mi na zbadanie wpływu obecności dodatnio naładowanej grupy funkcyjnej w pozycji P₁ na powinowactwo nitrylu dipeptydu do ludzkiej Cat C oraz tego w jaki sposób efekt ten zależy od wielkości łańcucha bocznego reszty aminokwasowej. Punktem wyjściowym syntezy związków z serii zasadowych nitryli, były następujące pochodne aminokwasowe: Z-Dap(Boc), Z-Dab(Boc), Z-Orn(Boc) oraz Boc-Lys(Fmoc), z których w pierwszej kolejności otrzymałam Boc-chronione dipeptydy o wzorze ogólnym Boc-Thi-X(Boc). W kolejnym kroku, dipeptydy zostały przeprowadzone w amidy (Boc-Thi-X(Boc)-NH₂), a następnie w nitryle w wyniku reakcji dehydratacji amidów pod wpływem bezwodnika kwasu trifluorooctowego w obecności trietyloaminy. Końcowe produkty, po zdjęciu osłony Boc, zostały oczyszczone z wykorzystaniem RP-HPLC. Aktywność otrzymanych związków zbadalam wobec rekombinowanej ludzkiej Cat C i porównałam z aktywnością Thi-Phe-CN. Wszystkie otrzymane nitryle hamowały aktywność Cat C. Zaobserwowałam wzrost siły hamowania enzymu wraz z długością łańcucha bocznego reszty aminokwasowej. Thi-Lys-CN był najsilniejszym inhibitorem Cat C w ramach serii, ale słabiej hamował aktywność Cat C niż Thi-Phe-CN.