

Magdalena Filipowicz
Katedra Biochemii Molekularnej
Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Analogi SFTI-1 ulegające splicingowi peptydowemu, jako wektory do wprowadzania peptydów o aktywności cytotoksycznej lub sond fluorescencyjnych”

Inhibitor trypsyny SFTI-1, wyizolowany z nasion słonecznika, stanowi jeden z najczęściej badanych peptydowych inhibitorów proteinaz serynowych [1]. Należy do najmniejszych i najsilniejszych inhibitorów rodziny Bowmana-Birki [2]. Jego miejsce reaktywne P₁-P₁' zlokalizowane jest między resztą Lys⁵ i Ser⁵, które odpowiadają w znacznym stopniu za specyficzność tego inhibitora [1]. Ze względu na swoją budowę i silne właściwości inhibitorowe, SFTI-1 stanowi doskonałą strukturę wyjściową do projektowania nowych związków o właściwościach terapeutycznych.

W ostatniej dekadzie odkryto, że w proteasomie dochodzi do powstania immunogennych peptydów, o sekwencjach różnych od struktury pierwszorzędowej białek, z których powstały. W wyniku badań okazało się, że zostały one utworzone z fragmentów tych białek, a proces nazwano splicingiem peptydowym. Odbywa się on wewnątrz kanału części katalitycznej proteasomu [3].

W 2010 r. pracownicy Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii UG odkryli proces splicingu peptydowego, któremu ulegają analogi inhibitora trypsyny SFTI-1 zawierające podwójne sekwencje tego inhibitora [4].

Badania wykazały, że w wyniku inkubacji tych analogów z odpowiednimi proteinazami serynowymi, następuje hydroliza dwóch miejsc reaktywnych, wycięcie środkowego fragmentu peptydowego, a następnie resynteza monocyklicznego SFTI-1 lub jego analogu [Phe⁵]SFTI-1.

Poznanie mechanizmu tego procesu, a także ustalenie minimalnych wymagań (optymalna długość łańcucha, struktura pierwszorzędowa), jakie powinien spełnić środkowy fragment peptydu ulegający splicingowi, pozwoliłoby na zaprojektowanie peptydów (peptydomimetyków) o potencjalnych walorach aplikacyjnych. Odpowiednio zaprojektowane związki przechodzą preferencyjnie przez błony komórek nowotworowych lub

mikroorganizmów ulegałyby w ich wnętrzu splicingowi, uwalniając fragment o określonej funkcji, a tworzący się inhibitor proteinaz wzmacniałby jego działanie destrukcyjne.

Celem mojej pracy było zatem zaprojektowanie i zsyntetyzowanie szeregu analogów SFTI-1 o różnej długości i sekwencji, które w uwalnianym w czasie splicingu środkowym fragmencie zawierałyby motyw wykazujący określony profil aktywności biologicznej, umożliwiającą jego wykorzystanie w terapii lub diagnostyce medycznej (marker fluorescencyjny emitujący w wyniku splicingu promieniowanie o ściśle określonej długości fali).

W ramach rozprawy doktorskiej zaprojektowałam i zsyntetyzowałam 20 nowych analogów SFTI-1, o różnej długości i sekwencji, które zawierały jeden z cytotoksycznych peptydów: RGD, GRGDNP lub cząsteczkę/i fluoroforu(ów). Moim zamiarem było, aby tak zaprojektowane peptydy, po wnikięciu do komórek ulegały w ich wnętrzu proteolizie z uwolnieniem aktywnego peptydu oraz równoczesnym utworzeniem monocyklicznego SFTI-1 - inhibitora trypsyny.

Z szeregu nowych analogów SFTI-1, ulegających splicingowi peptydowemu, wyselekcjonowałam jeden o optymalnej budowie. Ponadto, udowodniłam, że SFTI-1 stanowi doskonałą strukturę bazową, pozwalającą na wprowadzanie peptydów o pożądanej aktywności biologicznej do wnętrza komórki, poprawiając równocześnie ich stabilność, a także wpływając na wzrost ich aktywności. Dodatkowo, uzyskałam wyniki świadczące o tym, że peptydy zawierające parę FRET stanowią doskonałe narzędzie do śledzenia proteolizy przebiegającej wewnątrz komórek i mogą mieć potencjalne zastosowanie np. w diagnostyce.

[1] Luckett S., Garcia R.S., Barker J.J., Konarev A.V., Shewry P.R., Clarke A.R., Brady R.L., *J.Mol.Biol.* **1999**,209,525.

[2] Zabłotna E., Kaźmierczak K., Jaśkiewicz A., Stawikowski M., Kupryszewski G., Rolka K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 292, 855-859;

[3] Vigneron N., Stroobant V., Chapiro J., Ooms A., Degiovanni G., Morel S., van der Bruggen P., Boon T., Van den Eynde B.J., *Science*.**2004**, 304,587-590;

[4] Łęgowska A., Lesner A., Bulak E., Jaśkiewicz A., Sieradzan A., Cydzik M., Stefanowicz P., Szewczuk Z., Rolka K., *FEBS Journal* **2010**, 277,2351-2359.