

Jadwiga Popow-Stellmaszyk

Pracownia Analityki Biochemicznej

Katedra Biochemii Molekularnej

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej w charakterystyce wybranych proteinaz serynowych

Kluczowym elementem opisującym proteazy jest ich zdolność do rozpoznawania i hydrolizowania substratów o określonej sekwencji aminokwasowej. Na przestrzeni ostatnich lat rozwinęło się wiele metod chemicznych i biochemicznych wykorzystujących substraty fluorescencyjne otrzymane na drodze syntezy chemicznej, które pozwalają określić specyficzność substratową oraz ocenić aktywności enzymatyczną danej proteazy w różnych warunkach środowiska reakcji. Identyfikacja i optymalizacja takich związków daje ogromne możliwości m.in. w projektowaniu nowej generacji inhibitorów bądź markerów tych enzymów.

Obiektem prowadzonych przeze mnie badań w ramach niniejszej dysertacji były enzymy proteolityczne znajdujące się w ziarnistościach cytoplazmatycznych komórek neutrofilii, należące do rodziny proteinaz serynowych o wspólnej nazwie neutrofilne proteinazy serynowe (NSPs, ang. *Neutrophil Serine Proteinases*). Nadmierna ekspresja tych enzymów lub niedobór ich endogennych inhibitorów może prowadzić w organizmie ludzkim do powstawania poważnych stanów patologicznych.

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza substratów fluorescencyjnych opierających się zjawisku wewnątrzcząsteczkowego rezonansowego przeniesienia energii (substraty FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) dla trzech członków z rodziny NSPs: proteinazy 3 (PR3), ludzkiej elastazy neutrofilnej (HNE) i nowoodkrytej czwartej neutrofilowej proteinazy serynowej (NSP4), z wykorzystaniem metod chemii kombinatorycznej. Chemiczną syntezę bibliotek peptydowych przeprowadziłam metodą porcjowania i łączenia (ang. *split and mix*) używając żywicy polimerowej chemicznie modyfikowanej jako nośnika stałego. Sekwencje peptydów zoptymalizowałam w pozycjach nieprimowanych (numeracja reszt aminokwasowych w kierunku N-końca P₁, P₂, P₃) oraz primowanych (numeracja reszt aminokwasowych w kierunku

C-końca P₁', P₂', P₃') zgodnie nomenklaturą modelu Schechtera i Bergera W pierwszej kolejności przeanalizowałam specyficzność S-substratową proteinaz (ang. *S-site specificity*) projektując biblioteki peptydowe o ogólnym wzorze ABZ-X₃-X₂-X₁-ANB-NH₂ (dla NSP4 dodatkowo pozycja X₄), gdzie parę FRET stanowiły odpowiednio kwas 2-aminobenzoowy (donor fluorescencji) oraz amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (akceptor fluorescencji). W wyniku przeprowadzonych kolejnych etapów dekonwolucji metodą iteracyjną w roztworze otrzymałam sekwencje peptydowe, które najwydajniej ulegały hydrolizie enzymatycznej pod wpływem badanej NSP: dla HNE – ABZ-Met-Pro-Val-ANB-NH₂, dla ludzkiej NSP4 – ABZ-Met-Phe-Pro-Arg-ANB-NH₂ oraz dla mysiej NSP4 – ABZ-Met-Val-Pro-Arg-ANB-NH₂. Ww. związki posłużyły mi następnie do zaprojektowania substratów umożliwiających prześledzenie specyficzności S'-substratowej badanych proteinaz (ang. *S'-site specificity*). Ogólny wzór sekwencji bibliotek peptydowych wyglądał następująco: ABZ-peptyd-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂, gdzie sekwencje „peptydów” zostały wybrane dla każdego z enzymów w wyniku optymalizacji pozycji nieprimowanych. Do zaprojektowania nowego substratu dla PR3 o zwiększonej selektywności, w którym umieściłam trzy kolejne zmienne pozycje primowane, zdecydowałam się wykorzystać wcześniej otrzymaną w naszym zespole sekwencję ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH₂. Tym razem jako donator/akceptor fluorescencji zastosowałam parę ABZ/Tyr(3-NO₂)-NH₂ (amid 3-nitro-L-tyrozyny), ponieważ wykazuje ona transfer energii dalekiego zasięgu (powyżej pięciu reszt aminokwasowych).

W wyniku przeprowadzonych dekonwolucji ww. bibliotek peptydowych metodą iteracyjną w roztworze otrzymałam następujące sekwencje dla każdej z badanych proteinaz serynowych:

- dla PR3 ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Tyr(3-NO₂)-NH₂,
- dla HNE ABZ-Met-Pro-Val-Ala-Trp-Glu- Tyr(3-NO₂)-NH₂,
- dla ludzkiej NSP4 ABZ-Met-Phe-Pro-Arg-Thr-Leu-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂,
- dla mysiej NSP4 ABZ-Met-Val-Pro-Arg-Ser-Ala-Tyr- Tyr(3-NO₂)-NH₂,

które ulegały wydajnej hydrolizie enzymatycznej pod wpływem dedykowanego enzymu.

W pracach, do analizy ww. bibliotek peptydowych oraz wyselekcjonowanych substratów wykorzystałam metody spektrometrii mas (MALDI-TOF) oraz wysokosprawnej chromatografii ciekowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Dokonałam charakterystyki jonu masowego widm MS wykorzystując w tym celu zaprojektowaną (we współpracy ze Stefanem Popowem) aplikację KomBi Kreator. Wyznaczone sekwencje substratów poddałam testom aktywności

enzymatycznej wyznaczając dla nich parametry kinetyczne (stałe: katalityczna k_{cat} , Michaelisa K_M i specyficzności reakcji k_{cat}/K_M). Przeanalizowałam wpływ wydłużenia łańcucha peptydowego substratów o pozycje primowane (względem wyjściowych analogów) na sprawność katalityczną każdej z badanych proteinaz. Dokonałam identyfikacji miejsca proteolizy dla każdego z ww. substratów oraz sprawdziłam ich podatność na hydrolizę enzymatyczną wobec wszystkich członków NSPs. Określiłam wpływ pH środowiska reakcji na aktywność badanych proteinaz.

Ostatnim krokiem mojej pracy było wykorzystanie zaprojektowanych związków do pomiaru stężenia i oceny aktywności ludzkich NSPs na poziomie molekularnym w materiale biologicznym, który stanowiły: lizaty komórkowe, osocza, surowice, płyny z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL, ang. *bronchoalveolar lavage*), itp. pochodzące od pacjentów cierpiących na schorzenia związane z dysfunkcją tych enzymów bądź niedoborem ich endogennego inhibitora alfa-1 antytrypsyny (A1AT, A1-Pi).