

Natalia Gruba
Wydział Chemii
Katedra Biochemii Molekularnej
Pracownia Analityki Biochemicznej

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

„Badanie specyficzności ludzkiego proteasomu metodami chemii kombinatorycznej”

Proteasom jest multikatalitycznym kompleksem endopeptydazy (EC 3.4.25.1), który występuje we wszystkich żywych organizmach, zarówno *Eucaryota*, jak i *Procaryota*. Jego zadanie polega na proteolitycznej degradacji niefunkcjonalnych, nieprawidłowo zbudowanych lub uszkodzonych białek komórkowych. W związku z tym enzym pełni kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy czy angiogenezy, a jego niewłaściwe funkcjonowanie może być przyczyną chorób, w tym nowotworów.

Proteasom 20S jest zdolny do hydrolizy niemal każdego wiązania peptydowego w obrębie białka. Taka różnorodność katalityczna spowodowana jest obecnością trzech specyficzności substratowych wśród aktywnych enzymatycznie podjednostek β . Podjednostki $\beta 1$ przeprowadzają hydrolizę wiązania peptydowego występującego po reszcie aminokwasowej z kwaśnym łańcuchem bocznym (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy). Specyficzność ta została nazwana kaspazową (ang. *caspase-like specificity*), bądź peptydylo-glutamyłową hydrolizującą peptydy (ang. *peptidyl-glutamyl peptide hydrolizing*, PGPH). Podjednostki $\beta 2$ posiadają zdolność hydrolizy wiązań peptydowych występujących po karboksylowej stronie reszt aminokwasowych z zasadowym łańcuchem bocznym (lizyna, arginina). Aktywność ta określana jest jako trypsynowa (ang. *trypsin-like specificity*). Z kolei podjednostki $\beta 5$ wykazują specyficzność chymotrypsynową (ang. *chymotrypsin-like specificity*), gdyż za ich pośrednictwem hydrolizowane jest wiązanie peptydowe występujące po resztach aminokwasowych z rozbudowanym, hydrofobowym łańcuchem bocznym (tyrozyna, fenyloalanina).

W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej zajmowałam się poszukiwaniem nowych, peptydowych substratów ludzkiego proteasomu 20S, niezależnie dla trzech specyficzności katalitycznych, jakie wykazuje: trypsynowej, chymotrypsynowej i kaspazowej. Warty podkreślenia jest fakt, że analizie został poddany rejon cząsteczki substratu do tej pory nie poddany badaniom. W literaturze światowej nie odnotowałam żadnych danych na temat specyficzności proteasomu w pozycjach znajdujących się po C-końcowej stronie hydrolizowanego łańcucha peptydowego (wg. notacji Schechtera i Bergera tzw. pozycje nieprimowane).

W pierwszej części pracy zaprojektowałam i zsyntetyzowałam trzy biblioteki tetrapeptydowe, zawierające substraty fluorescencyjne i chromogeniczne ludzkiego proteasomu 20S. Ogólny wzór biblioteki przedstawiał się następująco: ABZ-X₄-X₃-X₂-X₁-ANB-NH₂, gdzie ABZ to kwas 2-aminobenzoowy (donor fluorescencji), ANB-NH₂ - amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (akceptor fluorescencji), w pozycje X₄ do X₂ wprowadziłam wszystkie aminokwasy proteinogenne (z wyjątkiem Cys). Każda z bibliotek posiadała inne reszty aminokwasowe w pozycji X₁: dla podjednostki trypsynowej były to Arg i Lys, chymotrypsynowej - Tyr, Phe, a kaspazowej był to Glu i Asp. Syntezę wykonałam na nośniku stałym z zastosowaniem metody chemii kombinatorycznej „porcjowania i łączenia”. W wyniku dekonwolucji metodą iteracyjną w roztworze wyselekcjonowałam 3 substraty zoptymalizowane w pozycjach nieprimowanych:

- podjednostka chymotrypsynowa: ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-ANB-NH₂;
- podjednostka trypsynowa: ABZ-Val-Val-Ser-Arg-ANB-NH₂;
- podjednostka kaspazowa: ABZ-Ile-Leu-Met-Asp-ANB-NH₂.

W następnym kroku otrzymane sekwencje wykorzystałam do syntezy bibliotek, tym razem heptapeptydowych, które pozwoliły mi na optymalizację pozycji primowanych. Biblioteka o wzorze: ABZ-„sekwencja dla pozycji nieprimowanych”-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂, zawierała amid 3-nitro-L-tyrozyny jako akceptor fluorescencji, z kolei w zmienne pozycje X₁'-X₃' wprowadziłam 19 aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny. Badania enzymatyczne otrzymanych bibliotek skutkowały czterema substratami specyficznymi wobec poszczególnych aktywności proteasomu 20S:

- podjednostka chymotrypsynowa: ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂;
- podjednostka trypsynowa: ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂,
ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ala-Phe-Phe-Tyr(3-NO₂)-NH₂;
- podjednostka kaspazowa: ABZ-Ile-Leu-Met-Asp-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Wyselekcjonowane substraty dla podjednostki chymotrypsynowej i trypsynowej poddałam dalszym modyfikacjom, uzyskując 24 analogi. Ustaliłam, że podstawienie reszty Tyr w substracie ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂, resztą 4-guanidylo-L-fenylalaniny (GNF), doprowadziło do odkrycia substratu selektywnego wobec podjednostki trypsynowej. Okazało się, że peptyd ten charakteryzuje się największym powinowactwem względem ludzkiego proteasomu 20S spośród wszystkich otrzymanych analogów. Poprawność przeprowadzonych syntez została określona przy pomocy analizy RP-HPLC, a masy cząsteczkowe otrzymanych bibliotek i związków potwierdziłam przez spektrometrię mas.

W kolejnej części mojej pracy doktorskiej zajęłam się badaniami enzymatycznymi próbek biologicznych na obecność proteasomu. Do eksperymentów wybrałam zoptymalizowane substraty, charakteryzujące się najlepszymi parametrami kinetycznymi. Dzięki współpracy z prof. dr hab. Joanną Chorostowską-Wynimko z Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, a także dr hab. Ewą Gorodkiewicz z Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku, byłam w stanie przebadać próbki moczu osób cierpiących na nowotwór pęcherza, a także osocza pacjentów chorych na nowotwór płuc.

W wyniku przeprowadzonych badań potwierdziłam obecność proteasomu u osób ze stwierdzoną chorobą nowotworową pęcherza moczowego. Dodatkowo okazało się, że mocz jest bardziej przydatnym materiałem do badań niż osocze, ze względu na mniejszą ilość innych enzymów, które oprócz proteasomu również mogą hydrolizować analizowane substraty. W efekcie otrzymałam substraty fluorescencyjne, mogące posłużyć jako narzędzia diagnostyczne w chorobach nowotworowych, których markerem jest podwyższona aktywność proteasomu, a jeden z nich stał się przedmiotem zgłoszenia patentowego.