

Streszczenie

Zdrowe komórki charakteryzuje obecność złożonej, dobrze funkcjonującej sieci składającej się z enzymów proteolitycznych oraz białek opiekuńczych, które utrzymują stan homeostazy. System proteasomalny jest odpowiedzialny za degradację ubikwitynowanych białek, białek wewnętrznie nieuporządkowanych, czy też takich, które uległy uszkodzeniom na skutek m. in. stresu oksydacyjnego. W okresie starzenia, zarówno zewnętrznych, jak i endogennych czynników wpływających na uszkodzanie białek przybywa. Taki zależny od wieku spadek zdolności komórek do utrzymania proteostazy jest uważany za główny czynnik powodujący związane z wiekiem dysfunkcje komórkowe, w tym odkładanie toksycznych agregatów białkowych, które ściśle powiązane z szeregiem chorób, w szczególności tych związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego. Zauważono również, iż wraz z wiekiem postępuje rozkład proteasomu 26S, z jednoczesnym wzrostem ilości proteasomu 20S, jednakże nie obserwowano przy tym zwiększonej aktywności 20S. Można zatem wnioskować, iż starzenie wpływa na powstawanie nowej puli proteasomu 20S, niezwiązanego z jego swoistymi regulatorami, takimi jak 19S, 11S lub białko Blm10. Z tego powodu kuracja polegająca na wprowadzeniu egzogennych modulatorów jego aktywności wydaje się być obiecującym sposobem zapobiegania odkładaniu toksycznych białek. Do tej pory uwaga badaczy skupiała się na poszukiwaniu aktywatorów 20S głównie wśród związków małowcząsteczkowych, które ze względu na większą stabilność oraz biodostępność wydają się być atrakcyjniejszymi farmaceutykami od związków peptydowych. Trzeba natomiast mieć na uwadze ich niską selektywność oraz często wysoką toksyczność. Dlatego też w swojej pracy zajęłam się poszukiwaniem sekwencji peptydowych stymulatorów proteasomu 20S opartych o natywne białka regulujące jego aktywność oraz sprawdzeniem ich potencjału do pobudzania proteasomu *in vitro* oraz *in cellulo*.

W pierwszym etapie mojej pracy skupiałam się na sekwencjach wywodzących się z C-końców podjednostek Rpt regulatora 19S, które, jak donosi literatura, biorą aktywny udział w tzw. bramkowaniu proteasomu. Z 6 zsyntezowanych związków najbardziej obiecującym okazał się peptyd Rpt5(8), w związku z czym w dalszych badaniach skupiałam się na optymalizacji jego sekwencji. W tym celu sprawdziłam kluczowość poszczególnych reszt aminokwasowych w tym peptydzie wydłużając jego sekwencję, stosując metodę skanowania alaninowego oraz syntezyując bibliotekę związków z podstawieniami aminokwasów o różnym charakterze łańcuchów bocznych. Badania te pozwoliły stwierdzić, iż optymalna długość aktywatora

wynosi 10 reszt (związek Rpt5(10)), przy czym w pozycjach 1, 2 i 4 tego peptydu preferowane są reszty zasadowe, natomiast pozycja 7 wydaje się być najbardziej liberalna pod względem charakteru akceptowanych reszt. W kolejnym etapie sprawdziłam stabilność peptydu Rpt5(10) względem ludzkiego proteasomu 20S oraz enzymów obecnych w ludzkim osoczu. Po 1h inkubacji w obecności h2OS, analog ten pozostawał niestrawiony w ok. 40%, natomiast już po 10 min inkubacji z plazmą pozostawało go niewiele ponad 30%. Z tego powodu zsyntezowałam 6 kolejnych związków, opartych o strukturę peptydu Rpt5(10), co zaowocowało otrzymaniem najsilniejszego aktywatora – związku Rpt5(Nle8). Peptyd ten jednak nie wykazywał stabilności wyższej od peptydu macierzystego. Silniejszą odporność na degradację zaobserwowałam natomiast dla peptydów, w których modyfikowana była pozycja 4 (związki: Rpt5(Abu4), Rpt5(β Ala4) oraz Rpt5(AzrN)).

W związku z tym, iż udało mi się otrzymać obiecujące aktywatory h2OS, postanowiłam sprawdzić, czy będą one w stanie wywołać podobny efekt w żywych komórkach. W tym celu sprawdziłam zdolność peptydu Rpt5(10) do przenikania błony komórkowej. Peptyd ten, posiadając 3 zasadowe reszty lizyny na *N*-końcu, mógłby wykazywać działanie podobne do kationowych CPP, jednakże przenikał on przez błonę jedynie w niewielkim stopniu. Sprawdziłam więc, czy przyłączenie sekwencji Tat(48-57) umożliwi przenikanie peptydu do wnętrza komórek. Jak się okazało, tak zmodyfikowana sekwencja z powodzeniem pokonała barierę błony komórkowej, a dodatkowo silniej pobudzała peptydazę ChT-L izolowanego proteasomu 20S. Zachęcona wynikami tych badań, zsyntezowałam jeszcze 3 podobne analogi, zawierające sekwencję penetrującą przyłączoną do dwóch z najsilniejszych otrzymanych aktywatorów: Rpt5(K4) oraz Rpt5(Nle8), a także peptydu Rpt5(D6), który nie wykazywał potencjału stymulującego. Wszystkie cztery związki przebadalam pod kątem pobudzania aktywności ChT-L proteasomu w lizacie komórek HEK 293T. Otrzymane wyniki korelowały z wcześniejszymi rezultatami badań na izolowanym enzymie, tj. związki Tat-Rpt5(10), Tat-K4 oraz Tat-Nle8 aktywowały enzym jeszcze skuteczniej od ich analogów bez przyłączonej sekwencji CPP, przy czym niezmiennie najsilniejszym modulatorem był peptyd zawierający resztę Nle8. Dodatkowo udało się wykluczyć, iż za efekt aktywujący odpowiada sekwencja Tat(48-57), ponieważ zarówno analogiczny związek pozbawiony sekwencji aktywatora (Tat-LLVY), jak i peptyd Tat-D6 nie były w stanie pobudzić enzymu do skuteczniejszej degradacji substratu.

Ostatnim etapem tej części badań było sprawdzenie, czy otrzymane przeze mnie związki będą w stanie zaktywować proteasom w żywych komórkach HEK 293T. W tym celu

posłużyłam się sondą TAS3, którą charakteryzuje dobra odporność na inne niż proteasom enzymy komórkowe. Otrzymane wyniki badań potwierdziły, że peptyd Tat-Nle8 stanowi najsilniejszy z przebadanych przeze mnie modulatorów proteasomu. Dodatkowo był on na tyle stabilny by zaktywować proteasom w obliczu szeregu białek proteolitycznych obecnych w żywych komórkach. Stanowi to niewątpliwy sukces, gdyż peptydy często są dyskwalifikowane jako leki ze względu na swoją niską stabilność proteolityczną oraz brak zdolności przenikania błony komórkowej. Dodatkowo, związki te nie wykazywały dużego efektu cytotoksycznego względem linii HEK 293T, co również powoduje, że są obiecującymi kandydatami do dalszych badań.

Druga część wyników, jakie przedstawiłam w tej pracy, dotyczyła peptydów wywodzących się z białka Blm10. Peptydy te zaprojektowano w oparciu o modelowanie molekularne, tak aby ustalić najbardziej optymalną długość linkera łączącego C- i N-końcowe fragmenty peptydowe oraz określić sekwencję rejonu N-końcowego umożliwiającą oddziaływanie z podjednostką $\alpha 5$ proteasomu 20S. Badania na substratach peptydowych pozwoliły ustalić, że długość łącznika powinna wynosić 4 reszty aminokwasowe. W celu ułatwienia syntezy oraz zwiększenia rozpuszczalności peptydów zastąpiłam je ugrupowaniem Peg2. N-końcowy segment zaprojektowanego modulatora miał natomiast sekwencję: Lys-Asn-Ser-Asn (peptyd M2-6).

Następnie zaprojektowano jeszcze 6 związków poprzez zadokowanie C-końca białka Blm10 w pozostałych kieszeniach utworzonych przez podjednostki α proteasomu i wyznaczenie sekwencji czterech N-końcowych aminokwasów, które potencjalnie mogłyby oddziaływać z otoczeniem w poszczególnych kieszeniach (związki M2-1, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-7). Badania przeprowadzone na dłuższym substracie peptydowym (LFP), który ze względu na słabsze trawienie przez latentny proteasom lepiej różnicuje potencjalne aktywatory, wykazały, że najsilniejszym modulatorem nadal pozostaje związek M2-6, zaprojektowany w celu oddziaływania z podjednostką $\alpha 5$. Z tego powodu, w dalszej części badań zajęłam się optymalizacją sekwencji tego właśnie peptydomimetyku. W tym celu sprawdziłam podstawienie Lys1 resztą kwasową (Glu) oraz resztą posiadającą obojętny, hydrofobowy łańcuch boczny (Leu). Peptydy te znacząco silniej od M2-6 stymulowały tylko aktywność trypsynopodobną proteasomu, w przypadku pozostałych substratów efekt był porównywalny lub słabszy od wyjściowego analogu. Najsilniejszymi modulatorami okazały się peptydy M2-10 oraz M2-20. Ten pierwszy w pozycji pierwszej posiadał nienaturalną resztę homoargininy oraz kwas asparaginowy w pozycji 6, gdzie natywnie występowała leucyna. Związek ten

najsilniej stymulował aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu. Analog M2-20, różniący się od wyjściowego peptydu M2-6 jedynie jedną resztą, posiadając Lys4 zamiast Asn4, okazał się najsilniej pobudzać proteasom do trawienia dłuższego substratu LFP oraz substratu peptydazy T-L. Związkiem, który całkowicie utracił zdolności do aktywacji enzymu okazał się peptyd M2-9, który w pozycji 10 posiadał tyrozynę o konfiguracji D, która spowodowała zapewne zablokowanie wiązania C-końca w kieszeni α proteasomu.

Ponieważ krótkie fluorogeniczne substraty nie odzwierciedlają w pełni roli proteasomu w komórkach, postanowiłam sprawdzić, czy otrzymane przeze mnie związki będą w stanie zaktywować enzym do trawienia białek. Jak wiadomo, proteasom 20S nie posiada przyłączonej części regulatorowej 19S, w związku z czym nie jest w stanie rozfałdowywać dużych, ustrukturyzowanych białek, a odpowiada głównie za trawienie białek uszkodzonych lub wewnętrznie nieuporządkowanych. Aby ocenić zdolność enzymu do oddziaływania z białkami wybranymi do testów aktywności, przeprowadziłam testy powinowactwa stosując termoforezę mikroskalową. Eksperymenty te pozwoliły zaobserwować wiązanie się białek utlenionych oraz natywnej (należącej do grupy białek wewnętrznie nieuporządkowanych) α -synukleiny do proteasomu 20S. Z kolei natywna enolaza, posiadająca uporządkowaną strukturę, nie wykazywała powinowactwa do 20S. Otrzymane przeze mnie modulatory również nie były w stanie pobudzać enzymu do trawienia tego białka, jednakże chętnie pobudzały go do trawienia białek uszkodzonych oksydacyjnie oraz natywnej synukleiny, co daje nadzieję na wykorzystanie ich w przyszłości jako leków wzmacniających usuwanie jedynie białek o potencjale agregacyjnym. Wśród otrzymanych aktywatorów znacząco wyróżnił się peptyd M2-12, który silnie przyspieszał degradację zarówno natywnej i utlenionej α -synukleiny, jak i utlenionej enolazy. Także związek M2-2 silnie pobudzał proteasom do trawienia natywnej α -synukleiny.

Wspomniane peptydy M2-2, M2-12 oraz związek M2-10 poddałam również testom cytotoksyczności. Efekt uszkadzający komórki był widoczny tylko przy zastosowaniu wysokiego stężenia modulatorów (50 μ M). Pomimo stosunkowo słabej odporności na degradację w ludzkim osoczu (ok. 20-30% niestrawionego peptydu po 15 min inkubacji), wszystkie 3 związki były w stanie zaktywować proteasom również w lizacie komórkowym.