

Agata Gitlin-Domagalska

Streszczenie rozprawy doktorskiej:

Designing and chemical syntheses of selective matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds.

Projektowanie i chemiczne syntezy selektywnych inhibitorów matryptazy-2 zaprojektowanych na podstawie inhibitora trypsyny SFTI-1 wyodrębnionego z nasion słonecznika.

Proteazy serynowe stanowią największą i najlepiej poznaną grupę enzymów proteolitycznych. Nazwa tej grupy pochodzi od reszty seryny znajdującej się w miejscu aktywnym enzymu. Seryna pełni rolę nukleofila, jej grupa hydroksylowa atakuje atom węgla grupy karbonylowej wiązania peptydowego substratu. Do proteaz serynowych należy ponad 50 rodzin proteaz, pogrupowanych w 14 klanów [1]. Przedmiotem moich badań były proteazy serynowe o specyficzności trypsynopodobnej, należące do klanu PA, rodziny S1. Pod koniec ubiegłego wieku opisano nową grupę proteaz należących do rodziny S1–transmembranowe proteazy serynowe. Ich charakterystyczną cechą jest bezpośrednie połączenie domeny katalitycznej z błoną komórkową, w taki sposób, że znajduje się ona na zewnątrz komórki. Takie umiejscowienie proteazy pozwala jej na oddziaływanie z innymi białkami znajdującymi się na powierzchni komórki, w macierzy międzykomórkowej czy na sąsiednich komórkach. Ponadto transmembranowe proteazy serynowe mają zdolność przekazywania sygnałów między komórką, a jej środowiskiem zewnętrznym, tym samym wpływając na odpowiednie reakcje komórki [2].

Głównym celem mojej pracy było znalezienie selektywnych i silnych inhibitorów matryptazy-2, enzymu odkrytego w 2002 roku [3], należącego do transmembranowych proteaz serynowych typu II (TTSPs) [2]. TTSPs charakteryzują się krótkim *N*-końcowym segmentem umiejscowionym wewnątrz komórki oraz dużą *C*-końcową częścią zawierającą domenę katalityczną (typu chymotrypsynowego) znajdującą się na zewnątrz komórki. Badania, wykazały, że u pacjentów chorych na nowotwór piersi z dobrymi prognozami obserwowano zwiększoną ekspresję matryptazy-2, w porównaniu z pacjentami o gorszych rokowaniach. Ponadto, wykazano, że zwiększenie ekspresji matryptazy-2 zmniejszało inwazyjność komórek nowotworowych [4]. Główną rolą tego enzymu,

kluczową dla celu mojej pracy doktorskiej, jest udział matryptazy-2 w kontroli homeostazy żelaza [5]. Matryptaza-2 poprzez degradację hemojuweliny, prowadzi do obniżenia ekspresji hepcydyny, a tym samym do podwyższenia stężenia żelaza. Inhibitory matryptazy-2 mogą znaleźć zastosowanie w poszukiwaniu nowych terapii chorób objawiających się nadmiernym stężeniem żelaza w organizmie.

Matryptaza-2, wykazuje dużą homologię sekwencyjną do matryptazy-1, dobrze poznanego enzymu, wydzielanego przez większość tkanek nabłonkowych zdrowego organizmu. W przypadku matryptazy-1, nadmierne wydzielanie tego enzymu jest proporcjonalne do zaawansowania nowotworu, odwrotnie niż obserwuje się dla matryptazy-2 [6]. Matryptaza-1 i matryptaza-2 charakteryzują się zbliżoną budową oraz specyficnością substratową, ale pełnią odmienne, ważne funkcje w organizmie, stąd tak ważne jest aby znaleźć związki, które pozwolą kontrolować ich aktywność selektywnie.

Badania dowiodły [7], że inhibitor trypsyny wyodrębniony z nasion słonecznika (SFTI-1) hamuje aktywność matryptazy-1, co wraz z wynikami badań współpracującej z nami grupy, nad peptydomimetycznymi, niskocząsteczkowymi inhibitorami matryptazy-2 [8] oraz wynikami badań nad poszukiwaniem substratów matryptazy-2 [9] dało bazę do zaprojektowania peptydów o potencjalnych właściwościach inhibitorowych wobec matryptazy-2.

W ramach mojej pracy doktorskiej zaprojektowałam 40 peptydowych i peptomerycznych analogów SFTI-1 z modyfikowanymi 1, 4, 5, 10 i 12, z cyklizacją przez mostek disulfidowy, oraz z dodatkową cyklizacją łańcucha głównego peptydu lub łańcucha bocznego z C-końcem. W niektórych syntetyzowanych peptydach, pomijałam reszty Thr4 i Ser6. Po zsyntezowaniu, oczyszczeniu i analizie otrzymanych związków, przeprowadziłam badania enzymatyczne analogów względem matryptazy-1, matryptazy-2, a w kolejnych etapach pracy także innych proteaz serynowych o zbliżonej specyficzności- plazminy, trombiny i trypsyny.

Udowodniłam, że zarówno monocykliczny jak i natywny SFTI-1 hamują aktywność matryptazy-2 (wartości stałych inhibicji (K_i) odpowiednio: 1,365 μM i 0,218 μM) oraz stanowią dobre struktury bazowe do projektowania kolejnych peptydów o potencjalnych właściwościach inhibitorowych. W efekcie otrzymałam dwa najsilniejsze opisane do tej pory peptydowe inhibitory

matryptazy-2 o wartościach K_i 15 nM i 19 nM oraz 5 inhibitorów wykazujących selektywność wobec matryptazy-2 względem matryptazy-1, plazminy i trombiny. Dwa z otrzymanych selektywnych inhibitorów:

- Gly-D-Arg-Cys(&)-Thr-Arg-Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp& (**7**), $K_i = 0,433 \mu\text{M}$
- &¹Gly-D-Arg-Cys(&²)-Thr-Arg-Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&²)-Phe-Pro-Asp&¹ (**12**), $K_i = 0,278 \mu\text{M}$

wykazywały silniejsze własności inhibitorowe wobec matryptazy-2 niż wobec matryptazy-1, analog **7** hamował matryptazę-1 176 razy słabiej niż matryptazę-2, a analog **12** 228 razy słabiej. Oba analogi bardzo nieznacznie hamowały aktywność plazminy i powodowały aktywację trombiny. Dodatkowo, efektem mojej pracy było opracowanie kilku silnych i wysoce specyficznych inhibitorów matryptazy-1, o wartościach K_i rzędu kilku nM, które kilkadziesiąt razy słabiej hamowały aktywność matryptazy-2, wykazywały nawet 1000 razy mniejszą zdolność inhibitorową wobec plazminy i nie wpływały na aktywność trombiny.

[1] Rawlings N. D., Barrett A. J., Finn R., *Nucleic Acids Res.*, **2016**, 44, 343-350.

[2] Szabo R., Bugge T.H., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2008**, 40, 1297-1316.

[3] Velasco G., Cal S., Quesada V., Saez L.M., Lopez-Otin S., *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 37637-37646.

[4] Parr C., Sanders A. J., Davies G., Martin T., Lane J., Mason M. D., Mansel R. E., Jiang W. G., *Clin. Cancer Res.*, **2007**, 13, 3568-3576.

[5] Folgueras A.R., de Lara F.M., Pendas A.M., Garabaya C., Rodriguez F., Astudillo A., Bernal T., Cabanillas R., Lopez-Otin C., Velasco G., *Blood*, **2008**, 112, 2539-2545.

[6] Uhland K., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, 63, 2968-2978.

[7] Avrutina O., Fittler H., Glotzbach B., Kolmar H., Empting M., *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 7753-7762.

[8] Sisay M.T., Steinmetzer T., Stirnberg M., Maurer E., Hammami M., Bajorath J., Gutschow M., *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 5523-5535.

[9] Wysocka M., Gruba N., Miecznikowska A., Popow-Stellmaszyk J., Gütschow M., Stirnberg M., Lesner A., Rolka K., *Biochimie*, 2013, **97**, 121-127.