

mgr Natalia Maria Ptaszyńska

Streszczenie rozprawy doktorskiej

„Międzycząsteczkowe mostki disulfidowe: zastosowanie w badaniu mechanizmu splicingu peptydowego katalizowanego przez proteiny i w syntezie koniugatów peptydowych”

W latach 90-tych naukowcy odkryli proces splicingu białkowego zachodzący w segmentach białkowych, nazwanych inteinami (ang. *internal protein*) [1]. Są to fragmenty, występujące wewnątrz białka, które autokatalitycznie wycinają się z prekursora białkowego w procesie potranslacyjnym. W 2004 roku został odkryty proces splicingu peptydowego, który został zdefiniowany jako tworzenie peptydu z dwóch fragmentów, które zostały wycięte i połączone w proteasomie z większego polipeptydu [2,3]. Colgrave i współ. [4] i Łęgowska i współ. [5] wykazali, że analogi SFTI-1, podczas inkubacji z odpowiednimi proteinazami, ulegają procesowi splicingu. W wyniku oddziaływania z trypsyną i/ albo chymotrypsyną, w analogach SFTI-1 zawierających dwa miejsca reaktywne następuje proteolityczne rozszczepienie tych dwóch miejsc, usunięcie fragmentu środkowego i resynteza jednego miejsca reaktywnego, w efekcie czego powstaje monocykliczny SFTI-1 lub jego analog [Phe⁵]SFTI-1 [5]. Ponieważ zachodzący w analogach SFTI-1 splicing peptydowy wydaje się podobny do tego, który ma miejsce w proteasomie, postanowiłam zweryfikować tę teorię. Jako narzędzie w badaniu mechanizmu splicingu peptydowego zaprojektowałam i otrzymałam serię peptydów zbudowanych z N- i C-końcowego fragmentu SFTI-1 lub ich analogów, połączonych międzycząsteczkowym wiązaniem disulfidowym [6,7]. W wyniku ich inkubacji z odpowiednim enzymem, zaobserwowałam tworzenie nowego wiązania peptydowego i powstanie monocyklicznego SFTI-1. Otrzymane wyniki potwierdziłam przy pomocy HPLC i spektrometrii mas oraz dodatkowo przy pomocy badań rentgenostrukturalnych, których nie wykorzystywano wcześniej w badaniach mechanizmu splicingu. Ponadto, przy użyciu znakowanej wody H₂¹⁸O, udowodniłam, że podobnie jak w proteasomie, proces splicingu peptydowego katalizowany przez proteiny serynowe zachodzi wg mechanizmu bezpośredniej transpeptydacji [7].

Kolejnym celem mojej pracy było otrzymanie biokoniugatów peptydowych wybranych fragmentów katelicydyn: [AcCys¹]CAP11(1-18m2) oraz PcCATH-1 z nystatyną oraz chimer peptydowych o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zawierających dwa łańcuchy peptydowe połączone wiązaniem izopeptydowym lub disulfidowym. W każdej z chimer jednym ze składników jest ludzka laktoferampina (LFampH), będąca fragmentem

268-284 laktoferyny, endogennego białka z grupy transferyn. Drugim składnikiem chimer jest modyfikowany fragment 15-29 ludzkiego peptydu neutrofilnego 1 (HNP-1) należącego do rodziny α -defensyn, bądź jego analog. Wszystkie te peptydy wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz hamują aktywność odwrotnej transkryptazy i integrazy HIV-1 [8]. Aby umożliwić porównanie aktywności chimer z aktywnością tworzących je peptydów, przeprowadziłam również ich syntezy. W przypadku zaplanowanych biokoniugatów, łącznikiem między nystatyną a peptydem jest mostek disulfidowy. Ugrupowanie takie wrażliwe jest na warunki redukujące panujące w komórkach. Tym samym oba biologicznie aktywne składniki koniugatu mogłyby ulegać selektywnemu uwalnianiu w komórkach docelowych. Jako łączników w syntezie koniugatów katelicydyn z nystatyną użyłam kwasu 4-(pirydyno-2-disulfonylo)butanowego i reagenta Lomant'a (DSP). Przetestowałam wiele dróg syntezy koniugatów peptyd–nystatyna. Dwie z nich (opisane w pracy) okazały się wprawdzie skuteczne, otrzymałam zaplanowane koniugaty, ale uzyskana wydajność była bardzo mała. Natomiast synteza zaplanowanych chimer peptydowych, w których peptydy je budujące zostały połączone wiązaniem izopeptydowym, przebiegła bez większych problemów z zadowalającą wydajnością. Warto tu wspomnieć, że zastosowana przeze mnie w ich syntezie pochodna Fmoc-Lys(Mtt) mimo, że tańsza niż Fmoc-Lys(ivDde), nie jest powszechnie stosowana w tego typu syntezie, w związku z problemami związanymi z jej usuwaniem. Opracowałam jednak skuteczny sposób jej zdejmowania i to umożliwiło mi jej zastosowanie, bez narażenia się na straty wydajności. Optymalizacja metod tworzenia międzycząsteczkowego wiązania disulfidowego pozwoliła również na otrzymanie chimery peptydowej, w której oba składowe peptydy były nim połączone.

Literatura:

- [1] Mootz H. D., *ChemBioChem*, **10**, 2679 (2009)
- [2] Hanada K., Yewdell J.W., Yang J.C., *Nature*, **427**, 252 (2004)
- [3] Vigneron N., Stroobant V., Chapiro J., *Science*, **304**, 587 (2004)
- [4] Colgrave M.L., Korsinczky M.J., Clark R.J., Foley F., Craik D.J., *Biopolymers*, **94**, 665, (2010)
- [5] Łęgowska A., Lesner A., Bulak E., Jaśkiewicz A., Sieradzan A., Cydzik M., Stefanowicz P., Szewczuk Z., Rolka K., *FEBS J.*, **277**, 2351 (2010)
- [6] Karna N., Dębowski D., Gitlin A., Łęgowska A., Rolka K., *FEBS J.*, **23**, 6213 (2013)
- [7] Karna N., Łęgowska A., Malicki S., Dębowski D., Golik P., Gitlin A., Grudnik P., Władyka B., Brzozowski K., Dubin G., Rolka K., *ChemBioChem*, **16**, 2036 (2015)
- [8] Wong J.H., Liu Z., Law K.W., *Peptide*, **62**, 183 (2014)