

Streszczenie rozprawy doktorskiej Małgorzaty Giżyńskiej pt.:

„Wykorzystanie C-końcowej sekwencji białka Blm10 do otrzymania efektywnych stymulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S”

promotor: dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

Nieprawidłowe funkcjonowanie systemu proteasom-ubikwityna prowadzi do zachwiania homeostazy białkowej, powodując wystąpienie zaburzeń m.in. w regulacji cyklu komórkowego czy ekspresji genów oraz do akumulacji uszkodzonych białek w komórkach, co w efekcie może doprowadzić do powstania stanów chorobowych. Proteasom wydaje się być atrakcyjnym celem w projektowaniu potencjalnych środków terapeutycznych na nowotwory, choroby układu krążenia, neurodegeneracyjne czy autoimmunologiczne. Obecnie najbardziej eksploatowana jest koncepcja wykorzystania inhibitorów w terapii przeciwnowotworowej. W ostatnich latach trzy inhibitory proteasomu zatwierdzono do leczenia szpiczaka mnogiego i chłoniaka, a wiele innych jest w trakcie prób klinicznych. W przeciwieństwie do inhibitorów, związki, które mogą zwiększyć aktywność proteasomu są nieliczne i słabo poznane. Takie związki mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii chorób, w których obserwowana obniżona aktywność proteasomu przyczynia się m.in. do akumulacji toksycznych, oligomerycznych form białek w komórkach nerwowych, zaburzając w ten sposób ich funkcjonowanie, a ostatecznie prowadząc do ich obumierania.

Obecnie aktywatorów proteasomu poszukuje się głównie przeszukując biblioteki chemiczne. Do tej pory udało się odkryć kilkanaście małowcząsteczkowych związków, które stymulują bezpośrednio lub pośrednio aktywność proteasomu. Zaobserwowano przy tym, że część z nich była w stanie zahamować procesy związane ze starzeniem, spowolnić rozwój chorób neurodegeneracyjnych, a także zwiększyć odporność komórek na stres oksydacyjny. Często były to jednak związki o szerokim spektrum działania, które musiałyby przejść długą drogę, aby stać się bardziej selektywne i by zmniejszyło się ryzyko wystąpienia

spowodowanych przez nie reakcji ubocznych. Innym podejściem jest projektowanie nowych związków na podstawie struktury naturalnych białkowych aktywatorów proteasomu: 19S, 11S czy PA200/Blm10. Jednak mimo znanych struktur kompleksów 20S z aktywatorami białkowymi, sam mechanizm aktywacji nie został w pełni poznany, co utrudnia projektowanie efektywnych modulatorów.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było otrzymanie efektywnych stymulatorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S, zaprojektowanych w oparciu o sekwencję peptydu Blm-pep. Nasz zespół od kilku lat prowadził badania dotyczące allosterycznych modulatorów aktywności proteasomu, co doprowadziło do otrzymania 14-resztowego peptydu Blm-pep, który kilkakrotnie stymulował wszystkie peptydazy proteasomu h20S. Został on zaprojektowany w oparciu o fragment wiążący białkowy aktywator Blm10 z proteasomem i zawierał w swej sekwencji sześć C-końcowych reszt aminokwasowych tego aktywatora. Rozwiązana struktura krystaliczna kompleksu drożdżowego 20S z Blm-pep wykazała, iż do enzymu trwale wiąże się jedynie pięcioaminokwasowy C-koniec aktywatora, gdyż tylko ten fragment uwidocznił się w postaci gęstości elektronowej.

W pierwszym etapie mojej pracy zbadalam znaczenie N-końcowego rejonu sekwencji Blm-pep dla jego działania aktywującego ludzki proteasom. W tym celu zsyntezowałam jedenaście peptydów o skróconej sekwencji. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, iż mimo braku w strukturze krystalicznej N-końcowego fragmentu Blm-pep, jest on niezbędny do skutecznej aktywacji proteasomu h20S, mimo prawdopodobnie przejściowego charakteru oddziaływań z enzymem.

W kolejnym etapie pracy próbowałam zoptymalizować strukturę Blm-pep w oparciu o modelowanie molekularne oraz analizę porównawczą struktur krystalicznych proteasomu h20S oraz kompleksów Blm10 z y20S oraz Blm-pep z y20S, w celu otrzymania bardziej efektywnych stymulatorów aktywności proteasomu h20S. Otrzymane wyniki wskazują, że efektywny aktywator proteasomu powinien posiadać w pozycji 8 i 9 resztę kwasową i aromatyczną, a także przynajmniej jedną resztę aromatyczną na N-końcu. Natomiast obecność reszty kwasowej w pozycji 1 lub we fragmencie łącznikowym między N- i C-końcowymi segmentami znacząco obniża zdolności stymulujące analogów Blm względem peptydaz ChT-L i PGPH. Przeprowadzone badania wykazały również, iż motyw HbYX nie może być modyfikowany, nawet jeśli ta modyfikacja mogłaby umożliwić efektywniejsze wiązanie w kieszeni między podjednostkami α . Zastąpienie bowiem reszty tyrozyny z tego motywu kwasem asparaginowym doprowadziło do kompletnego zaniku zdolności aktywujących związku.

Wprowadzając modyfikacje do *N*-końcowego rejonu peptydu udało się uzyskać modulatory działające selektywnie na peptydazę T-L proteasomu.

Wszystkie otrzymane aktywatory były podatne na proteasomalną degradację. Aby sprawdzić czy degradacja aktywatora wzmacnia efekt stymulacji poprzez zwrotne sprzężenie miejsca aktywnego z allosterycznym, podjęłam próby uzyskania modulatorów stabilnych proteolitycznie. Wprowadzanie modyfikacji w postaci aminokwasów z nienaturalnymi łańcuchami bocznymi, jak i modyfikacji zmieniających strukturę drugorzędową związków, niekorzystnie wpłynęło jednak na aktywność modulatorów. Lepiej tolerowane były modyfikacje wiązania peptydowego. Udało mi się uzyskać dwa związki o zwiększonej odporności na degradację przez h20S, które nie utraciły zdolności do aktywacji enzymu i mogą stanowić sekwencje wyjściowe do dalszych modyfikacji.

Efektywność wybranych analogów Blm została przetestowana z użyciem modelowych substratów białkowych. Badane związki były w stanie stymulować degradację białek dopiero w obecności czynnika rozluźniającego konformację rdzenia katalitycznego 20S. Zgadza się to z doniesieniami literaturowymi na temat braku możliwości trwałego otwarcia bramy prowadzącej do miejsc katalitycznych proteasomu w wyniku związania elementów naturalnego, białkowego regulatora w mniej niż czterech kieszeniach między podjednostkami α . Sygnał pochodzący wyłącznie z jednej kieszeni, bez dodatkowego wsparcia, nie umożliwia wystarczająco szerokiego otwarcia bramy, by do kanału katalitycznego mogły przedostać się cząsteczki białka.

Dla wybranych związków zostały wykonane testy aktywności z wykorzystaniem modeli komórkowych choroby Alzheimera (AD), Parkinsona (PD), Huntingtona (HD) oraz stwardnienia bocznego zanikowego (ALS). Peptyd **20** stymulował aktywność proteasomu w modelach komórkowych AD, PD, HD oraz ALS, natomiast peptyd **18** tylko w modelu ALS. Badane związki stymulowały też degradację białek o nieuporządkowanej strukturze (SOD, tau), nie wpływając na poziom ustrukturyzowanego białka kontrolnego (β -aktyny), co sugeruje, iż oddziałują tylko z proteasomem 20S, a nie z 26S, nie grożą więc niekontrolowanym wzmocnieniem całkowitej proteolizy realizowanej przez system proteolityczny UPS.

Odrębnym celem mojej pracy było zidentyfikowanie miejsca wiązania aktywatorów w strukturze ludzkiego proteasomu 20S za pomocą sieciowania chemicznego w połączeniu ze spektrometrią mas. W tym celu do sekwencji wybranych analogów Blm-pep wprowadziłam reszty sieciujące, takie jak 2,4-dihydroksyfenyloalanina lub benzoilofenyloalanina. Po utworzeniu kowalencyjnego adduktu proteasomu z modulatorem, podjednostki z przyłączonym ligandem identyfikowałam za pomocą spektrometrii mas. Okazało się, że analogi Blm wiążą

się zarówno do podjednostek α jak i β . Dla wszystkich analogów B1m zawierających resztę sieciującą Bpa najbardziej powtarzalnym miejscem wiązania była podjednostka $\alpha 3$. Aby zidentyfikować dokładne miejsca wiązania aktywatora, kompleks proteasomu i analogu B1m poddałam dodatkowo trawieniu enzymatycznemu. Jeden z badanych modulatorów wiązał się w kieszeni $\alpha 5$ - $\alpha 6$, a drugi w kieszeniach $\alpha 4$ - $\alpha 5$ oraz $\alpha 5$ - $\alpha 6$.