

Marta Lubos
Wydział Chemii UG
Katedra Biochemii Molekularnej

promotor: prof. dr hab. Krzysztof Rolka
promotor pomocniczy: dr hab. Dawid Dębowski

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania kinetyczne peptydowych niekowalencyjnych i kowalencyjnych inhibitorów proteasomu

Degradacja białek w komórkach eukariotycznych prowadzona jest wewnątrz lizosomów oraz w wyniku działania enzymów zwanych proteasomami. Lizosomy, a ściślej znajdujące się w ich wnętrzu proteazy, degradowują głównie białka zewnątrzkomórkowe i transbłonowe pobrane przez komórkę na drodze endocytozy. Większość białek wewnątrzkomórkowych (80-90%) hydrolizowanych jest jednak poza lizosomami (*ang. nonlysosomal degradation*), przez proteasomy. Proteasom jest dużym wielkocząsteczkowym kompleksem enzymatycznym. Jego zadaniem jest eliminacja starych, niefunkcyjnych, nieprawidłowo zbudowanych lub uszkodzonych białek komórkowych. Kręgowce, w przeciwieństwie np. do drożdży, posiadają trzy główne rodzaje proteasomu – proteasom konstytutywny, immunoproteasom i tymoproteasom.

W komórkach nowotworowych obserwuje się zazwyczaj podwyższoną aktywność proteasomu (głównie konstytutywnego) co stanowi rodzaj ochrony tych komórek przed apoptozą. Intensywnie proliferujące komórki nowotworów złośliwych są bardziej wrażliwe na inhibicję proteasomu niż komórki prawidłowe. Podwyższone stężenie immunoproteasomu stwierdzone jest u pacjentów z chorobami o podłożu autoimmunologicznym. Powyższe fakty tłumaczą duże zainteresowanie badaniami nad inhibitorami proteasomów. Prace takie prowadzone są już od wielu lat w licznych ośrodkach akademickich i farmaceutycznych i mają na celu, oprócz aspektów poznawczych, także poszukiwanie związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii przeciwnowotworowej.

W ramach rozprawy doktorskiej zaprojektowano oraz zsyntetyzowano dwie grupy inhibitorów ludzkiego proteasomu 20S. Pierwszą grupę stanowiły krótkie, zbudowane z 4 reszt aminokwasowych, peptydowe aldehydy wiążące się z enzymem w sposób kowalencyjny. Związki te zaprojektowane zostały na podstawie struktur pierwszorzędowych najbardziej wydajnych substratów proteasomu 20S otrzymanych na drodze chemii kombinatorycznej. Ich aktywność inhibitorową oznaczano wobec ludzkiego proteasomu 20S, a wybrane peptydy z C-kończącą grupą aldehydową zbadano wobec ludzkiego immunoproteasomu 20S.

Peptydowe aldehydy o strukturze pierwszorzędowej IPMD-al, posiadające na swym *N*-końcu grupy acylowe z długim łańcuchem hydrofilowym (O2Octa-IPMD-al) lub hydrofobowym (Ahx-IPMD-al) zakończonym grupą aminową, wykazywały najwyższą aktywność wobec podjednostki β 1c. Spośród inhibitorów zaprojektowanych aby blokować podjednostkę β 2c najsilniejszym okazał się peptydowy aldehyd O1Pent-VVMR-al.

Najsilniejszymi inhibitorami zarówno podjednostki β 5c jak i β 5i były związki O2Octa-VVFF-al, O2Octa-VLFF-al oraz O2Octa-hF-LFF-al. Najwyższą selektywność, wyrażaną jako różnica w wartościach IC_{50} wobec obu analizowanych podjednostek katalitycznych, prezentowały peptydowe aldehydy O2Octa-VLSF-al, O2Octa-VNSF-al oraz O2Octa-VNFF-al.

Drugą grupę związków stanowiły analogi inhibitora trypsyny wyodrębnionego z nasion słonecznika (SFTI-1), łączące się z proteasomem w sposób niekowalencyjny. Związkiem bazowym podlegającym dalszym modyfikacjom był analog [Arg⁵,Lys^{7,8}]SFTI-1. Wśród badanych inhibitorów znajdowały się analogi różniące się typem cyklizacji - peptydy monocykliczne (zawierające mostek disulfidowy lub cykliczny łańcuch główny), bicykliczne oraz liniowe. Ponadto badano analogi, które charakteryzowały się modyfikacją *N*-końcowego fragmentu macierzystego peptydu polegającą na usunięciu jednej lub dwóch reszt (Gly¹ i Arg²), lub wstawieniu w ich miejsce innych reszt aminokwasowych - białkowych i niebiałkowych. Następnie analizowano peptydy, których *N*-końcowa grupa aminowa poddana została różnym modyfikacjom. Przedmiotem badań były też analogi [Arg⁵,Lys^{7,8}]SFTI-1 o podwojonej sekwencji aminokwasowej, posiadające jeden lub dwa mostki disulfidowe.

Inhibitor (O2Octa)-[Arg⁵,Lys^{7,8}]SFTI-1 posiadający na swym *N*-końcu hydrofilową pochodną poli(tlenku etylenu), okazał się najsilniejszym inhibitorem podjednostki β 2c spośród wszystkich badanych analogów [Arg⁵,Lys^{7,8}]SFTI-1. Natomiast inhibitory o podwojonej sekwencji były najsilniejszymi inhibitorami podjednostek β 1c i β 5c.