

Badanie wpływu modyfikacji potranslacyjnych na aktywność wybranych enzymów proteolitycznych

Modyfikacje potranslacyjne są odpowiedzialne za kowalencyjne modyfikacje białek. Zachodzą po procesie translacji i znacząco poszerzają repertuar 20 naturalnych aminokwasów. Wpływają w ten sposób na funkcje białek zmieniając ich właściwości zarówno fizyczne jak i chemiczne, dzięki czemu zwiększają różnorodność naturalną proteomu. Jedną z powszechnie występujących modyfikacji jest przyłączenie nowej grupy funkcyjnej do łańcucha bocznego reszty aminokwasowej, co może prowadzić do zmiany charakteru chemicznego białka i stanowić jego mechanizm regulacyjny chroniący go przed degradacją za pośrednictwem enzymów proteolitycznych. Badania prowadzone w ostatnich latach pokazały, że np. fosforylacja reszt aminokwasowych w pobliżu miejsca hydrolizy (L-seryny/ L-treoniny) może całkowicie wstrzymać hydrolizę substratów przez wybrane kaspazy.

Opis badań własnych niniejszej pracy doktorskiej można podzielić na dwie części. Pierwszy z nich dotyczył zaprojektowania i syntezy markera chemicznego dedykowanego katepsynie S zawierającego w swojej strukturze resztę aminokwasową z modyfikacjami potranslacyjnymi. W tym celu określono profile specyficzności substratowej w pozycji P4-P2' ludzkich katepsyn B, L, V, S oraz K wykorzystując zdefiniowaną bibliotekę P1 oraz hybrydową kombinatoryczną bibliotekę substratów HyCoSuL (ang. *hybrid combinatorial substrate library*). Obie biblioteki w swojej strukturze zawierały oprócz aminokwasów naturalnych, pulę aminokwasów nienaturalnych, co pozwoliło na dokładniejsze poznanie preferencji kieszeni S4-S2' badanych enzymów. Wyniki otrzymane na podstawie analiz kinetycznych pozwoliły na zaprojektowanie tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych, a następnie przekształcenie optymalnego substratu w marker chemiczny (ang. *activity-based probe*). Dla zsyntetyzowanego markera chemicznego wyznaczono drugorzędową stałą inhibicji (k_{obs}/I) względem wszystkich katepsyn. Wyniki pokazały, że otrzymany związek wykazał wysoką selektywność wobec katepsyny S.

W drugiej części pracy skupiono się na analizie wpływu fosforylacji reszt seryny oraz treoniny w pozycjach P2-P2' na aktywność kaspazy-3, -7, -8 oraz -6. W tym celu zsyntetyzowano naturalne sekwencje oraz ich analogi z fosforylowanymi resztami pochodzące z białek YAP1,

VIME oraz PARP. Na podstawie przeprowadzonych analiz kinetycznych pokazano, że kaspaza-3 oraz kaspaza-7 mają zdolność do hydrolizy sekwencji zawierającej w pozycji P1 fosforylowaną L-serynę (ACC- β ADEVpS↓GVK(Dnp)D), czego nie obserwuje się w przypadku sekwencji z naturalną L-seryną w P1 (ACC- β ADEVpS↓GVK(Dnp)D). Wynik ten potwierdzono także przy wykorzystaniu chromatografii ciekłowej sprzężonej ze spektrometrią mas, co jednoznacznie potwierdziło miejsce hydrolizy substratu. W pracy pokazano także, że hydroliza ta nie występuje w przypadku substratu tetrapeptydowego (Ac-DEVpS-ACC), co wskazuje na istotną rolę długości sekwencji i odpowiedniego dopasowania łańcucha peptydowego w kieszeniach omawianych kaspaz.

Analiza preferencji substratowych proteaz za pomocą substratów zawierających reszty aminokwasowe z modyfikacjami potranslacyjnymi może poszerzyć naszą wiedzę na temat biologicznych funkcji enzymów. Zdolność do przeprowadzania reakcji hydrolizy takich substratów może pozwolić na określenie nowych funkcji enzymów proteolitycznych. Z drugiej strony obserwacja całkowitego zahamowania hydrolizy może dostarczyć informacji o mechanizmach regulacyjnych danych substratów w komórkach.