

mgr inż. Mikołaj Żmudziński

„Opracowanie strategii syntezy pochodnych ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy w celu otrzymania specyficznych i selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących”

Ubikwityna (Ub) jest występującym u eukariontów małym białkiem regulatorowym złożonym z 76 reszt aminokwasowych. W procesie ubikwitynacji cząsteczka Ub przyłączana jest kowalencyjnie do białka substratowego. Modyfikacja ta wpływa m.in. na zależną od proteasomu degradację białek, regulację ekspresji genów i cyklu komórkowego czy naprawę DNA. Sygnalizacja zależna od Ub regulowana jest przez enzymy deubikwitynujące (DUBs). Proteazy te hydrolizują wiązania pomiędzy Ub a białkami substratowymi. U ludzi występuje blisko 100 różnych DUBs, a dysregulacja aktywności wielu z nich jest związana z występowaniem nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych czy chorób zakaźnych. Poznanie dokładnej roli enzymów deubikwitynujących w procesach komórkowych jest utrudnione ze względu na brak selektywnych narzędzi chemicznych do badania tych enzymów.

Celem projektu była synteza pochodnych ubikwityny, które za sprawą wprowadzenia nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końcowego fragmentu sekwencji peptydowej, będą selektywnie rozpoznawane przez ludzki enzym UCH-L3 oraz wirusowy enzym MERS-CoV PL^{pro}. W pierwszym etapie badań zsyntezowano bibliotekę tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych o strukturze ogólnej Ac-LRXG-ACC, gdzie „X” to jeden ze 128 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów. Biblioteka ta została użyta wraz z biblioteką P4-P3 HyCoSuL do określenia profilów specyficzności UCH-L3 oraz MERS-CoV PL^{pro} w pozycjach P4-P2. Po zbadaniu preferencji substratowych obu proteaz zaprojektowano tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne zawierające w swoich strukturach reszty nienaturalnych aminokwasów. Dla substratów wyznaczono stałe specyficzności k_{cat}/K_M , a następnie zbadano ich selektywność względem badanych DUBs. Sekwencje wybranych substratów zostały użyte do zaprojektowania pochodnych Ub, które posiadały zmodyfikowany C-końcowy fragment sekwencji peptydowej. Wykorzystując technikę syntezy peptydów na podłożu stałym (SPPS) oraz strategię ligacja-desulfuryzacja, zsyntezowano cztery substraty dla DUBs:

1. Ub-ACC – pochodna Ub zawierająca C-końcową sekwencję LRGG-ACC,
2. Ub.M2-ACC – pochodna Ub dla MERS-CoV PL^{pro} zawierająca C-końcową sekwencję Tle-Phg-Gly-Gly-ACC;

3. Ub.S1-ACC – pochodna Ub dla UCH-L3 zawierająca C-kończącą sekwencję Cha-Arg-Abu-Gly-ACC;
4. Ub.S2-ACC – pochodna Ub dla UCH-L3 zawierająca C-kończącą sekwencję D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-ACC.

Substraty zbadano pod kątem selektywności względem badanych DUBs oraz wyznaczono dla nich parametry kinetyczne (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M). Substraty były selektywnie i specyficznie rozpoznawane przez badane enzymy.

Następny etap badań obejmował syntezę markerów chemicznych o strukturach opartych na strukturze Ub. Stosując SPPS oraz strategię ligacja-desulfuryzacja zsyntezowano cztery biotynylowane markery chemiczne:

1. biot-6-ahx-Ub-VME – pochodna Ub z C-kończącym motywem LRGG-VME,
2. biot-6-ahx-Ub.M2-VME – ABP do badania MERS-CoV PL^{pro} z C-kończącym motywem Tle-Phg-Gly-Gly-VME;
3. biot-6-ahx-Ub.S1-VME – ABP do badania UCH-L3, zawierający C-kończący motyw Cha-Arg-Abu-Gly-VME;
4. biot-6-ahx-Ub.S2-VME – ABP do badania UCH-L3, zawierający C-kończący motyw D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-VME.

Scharakteryzowano właściwości inhibitorowe markerów chemicznych względem MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3. Następnie użyto ABPs do selektywnego wyznaczenia badanych DUBs w lizatach komórkowych. Eksperyment potwierdził selektywną i czułą detekcję UCH-L3 oraz MERS-CoV PL^{pro} w lizatach z linii A-431, HeLa oraz HEK-293T.

Podsumowując, wprowadzenie reszt nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końcowego fragmentu sekwencji peptydowej Ub skutkuje otrzymaniem wariantów tego białka, które są selektywnie i specyficznie rozpoznawane przez DUBs. Opracowana strategia syntezy umożliwiła otrzymanie selektywnych i specyficznych substratów oraz markerów chemicznych do badania ludzkiego enzymu UCH-L3 oraz wirusowej proteazy MERS-CoV PL^{pro}. Hipoteza ta została to potwierdzona w badaniach z użyciem rekombinowanych enzymów oraz lizatów komórkowych.