

**Rozprawa doktorska “Badanie roli kalpaina-1 w procesie pyroptozy za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych” mgr inż. Natalia Horbach**

**STRESZCZENIE**

Kalpaina-1, jest enzymem proteolitycznym należącym do rodziny proteaz cysteinowych zależnych od wapnia, tj. takich, które wymagają odpowiedniego stężenia jonów wapnia do aktywacji katalitycznej. Strukturalnie, kalpaina-1 jest heterodimerem złożonym z dużej 80 kDa podjednostki katalitycznej i mniejszej 28 kDa podjednostki regulatorowej. Podjednostka katalityczna zawiera domeny odpowiedzialne za wiązanie wapnia, proteolizę oraz interakcję z podjednostką regulacyjną, która z kolei zawiera motywy EF-hand wiążące wapń. Główną rolą kalpaina-1 jest ukierunkowana hydroliza wiązań peptydowych w substratach białkowych, poprzez co enzym ten reguluje różne procesy komórkowe. Do głównych substratów kalpaina-1 należą białka cytoszkieletu (np. spektryna, talina), cząsteczki sygnałowe (np. kinaza białkowa C, kinaza ogniskowo-adhezyjna) oraz białka błonowe. Tym samym proteaza ta odgrywa kluczową rolę w przebudowie cytoszkieletu, transdukcji sygnałów oraz mobilności komórek.

W mojej pracy doktorskiej skupiłam się natomiast na roli kalpaina-1 w procesie śmierci komórki, szczególnie w procesach apoptozy i pyroptozy. Oba procesy należą do rodzaju programowanej śmierci komórki, przy czym apoptoza jest procesem niezapalnym (immunologicznie cicha), natomiast pyroptoza prowadzi do powstania lokalnego stanu zapalnego. Rola kalpaina-1 w procesie apoptozy jest znana od lat. Podczas tej śmierci komórki kalpaina-1 reguluje aktywację kluczowych białek zaangażowanych w kaskady sygnałowe apoptozy, poprzez ich selektywną hydrolizę. Głównymi substratami dla kalpaina-1 w apoptozie są białka Bid i Bax, które regulują decyzje komórek dotyczące przetrwania lub śmierci. Regulacja ta jest niezbędna do prawidłowego rozwoju i homeostazy tkanek. Ponadto, hydroliza białek cytoszkieletu przez kalpainę-1 przyczynia się do zmian morfologicznych oraz przebudowy komórek charakterystycznych dla apoptozy. Rola kalpaina-1 w procesie pyroptozy jest mniej poznana. Dopiero kilka lat temu odkryto, że kalpaina-1 bierze udział w tym procesie, hydrolizując białka cytoszkieletu, takie jak wimentyna, co prowadzi do utraty integralności strukturalnej i mechanicznej odporności komórki. Sprzyja to z kolei pękaniu błony biologicznej pod wpływem stresu mechanicznego i w konsekwencji prowadzi do uwolnienia zawartości komórkowej. Dodatkowo, kalpaina-1 uczestniczy w dojrzewaniu i uwalnianiu cytokin prozapalnych, szczególnie IL-1 $\alpha$  (interleukina-alfa), wzmacniając w ten sposób odpowiedź zapalną. Badania te jasno pokazują, że kalpaina-1 bierze udział zarówno w procesie apoptozy jak i pyroptozy, a więc w przeciwstawnych procesach komórkowych. Zrozumienie roli oraz kontekstu działania kalpaina-1 w tych procesach jest więc kluczowe dla wyjaśnienia mechanizmów programowanej śmierci komórek oraz ich znaczenia w patogenezie wielu chorób.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie roli kalpaina-1 w tych procesach, z wykorzystaniem selektywnych narzędzi chemicznych, które umożliwiają

wykrywanie aktywności katalitycznej tej proteazy z wysoką specyficznością i czułością. Tymi narzędziami były małowzrostkowe substraty, inhibitory oraz sondy aktywności (tzn. activity-based probes). Badania dotyczące specyficzności substratowej kalpajny-1 w pozycjach P4-P1 wykazały jej podwójną preferencję dla aminokwasów hydrofobowych (Phe, Tyr, Trp) oraz dodatnio naładowanych aminokwasów, takich jak Arg na pozycji P1. W pozycji P2 kalpajna-1 wykazuje silną preferencję dla leucyny (Leu), chociaż inne aminokwasy, takie jak walina (Val) i izoleucyna (Ile), również są preferowane. Pozostałe pozycje wykazują większą elastyczność, co pozwala na rozpoznawanie szerokiego zakresu aminokwasów. Aby zbadać te preferencje substratowe, wykorzystałam kombinatoryczną bibliotekę substratów fluorescencyjnych HyCoSuL (Hybrid Combinatorial Substrate Library) zawierającą naturalne oraz szeroką paletę nienaturalnych aminokwasów w swojej strukturze. Skryning kalpajny-1 za pomocą HyCoSuL umożliwił mi opracowanie optymalnych sekwencji peptydowych, które następnie przekształciłam w substraty fluorescencyjne, nieodwracalne inhibitory czy małowzrostkowe sondy aktywności enzymatycznej (ABPs). Związki te pozwoliły mi odróżnić aktywność kalpajny-1 od aktywności 20S proteasomu czy katepsyn cysteinowych, które wykazują nakładającą się specyficzność substratową.

Otrzymane sondy ABPs były szczególnie użytecznym narzędziem chemicznym, ponieważ pozwoliły na wizualizację aktywności kalpajny-1 w komórkach THP-1 traktowanych kalcymycyną (jonofor wapnia) lub nigerycyną (jonofor potasowo-protonowy), dostarczając informacji na temat dynamiki aktywacji kalpajny-1 w odpowiedzi na stres komórkowy. Co więcej, używając cytometrii masowej, przeanalizowałam wzorzec ekspresji kalpajny-1 w komórkach immunologicznych na poziomie pojedynczych komórek, pokazując dominującą ekspresję kalpajny-1 w granulocytach. Za pomocą ABPs pokazałam, że ta kalpajna-1 jest katalitycznie aktywna w tych komórkach. Ponieważ rola kalpajny-1 w apoptozie i pyroptozie nie została jeszcze w pełni zbadana, w moich badaniach chciałam zbadać jej potencjalną rolę jako przełącznika między tymi procesami. Kaspaza-1 kontroluje proces pyroptozy poprzez hydrolizę gazderminy D (GSDMD) generując fragment p30, co prowadzi do powstawania porów w błonie komórkowej i litycznej śmierci komórki. Z kolei aktywna kaspaza-3 hydrolizuje GSDMD w innym miejscu generując fragment p45, który nie ma zdolności tworzenia porów, tym samym spowalniając proces pyroptozy i promując apoptozę. Z tego powodu sprawdziłam czy kalpajny-1 potrafi hydrolizować GSDMD. Moje badania wykazały, że kalpajna-1 rzeczywiście może przecinać GSDMD. Aby zidentyfikować miejsca hydrolizy, opracowałam substraty peptydowe znakowane fluorescencyjnie na podstawie fragmentów GSDMD. Badania te wsparłam także analizą spektrometrii mas. Wyniki tych badań pokazały, że kalpajna-1 hydrolizuje GSDMD w pobliżu miejsca kaspazy-1, co może wskazywać na propyrototypyczną rolę tego enzymu.