



UNIwersytet Gdański



Streszczenie rozprawy doktorskiej mgra Przemysława Karpowicza pt.: „Poszukiwanie allosterycznych modulatorów aktywności proteasomu”, wykonanej pod opieką dr hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG oraz dr Marii Gaczynskiej (University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA)

Patogeneza wielu chorób, takich jak: nowotwory, dystrofia mięśniowa czy choroby neurodegeneracyjne jest związana z utratą kontroli komórki nad równowagą między biosyntezą a degradacją białek. Aż 90% wszystkich białek obecnych w jądrze komórkowym bądź cytoplazmie jest trawionych przez multikatalityczny kompleks, którego głównym elementem jest enzym zwany proteasomem 20S.

Szerokie spektrum działania oraz znaczne rozpowszechnienie proteasomu w komórkach sprawia, iż jego aktywność musi być ściśle kontrolowana. Jednym z poziomów tej kontroli jest sama struktura enzymu. Jego rdzeniowa część ma bowiem kształt pustego wewnątrz cylindra, którego światło prowadzi do ukrytych wewnątrz katalitycznych podjednostek β - posiadających trzy odmienne specyficzności substratowe. Dostęp do miejsc aktywnych jest kontrolowany przez niekatalityczne podjednostki α , stanowiące rodzaj zamykanej bramy molekularnej, regulującej transport substratów do komory katalitycznej. W warunkach fizjologicznych ich struktura zmienia się w momencie dołączenia do zewnętrznego pierścienia 20S tzw. cząstek regulatorowych. Białka te łącząc się z podjednostkami α nie tylko wymuszają reorganizację ich ściśle upakowanych *N*-końcowych fragmentów, otwierając wejście do kanału katalitycznego, lecz także wywierają swój wpływ na poziom aktywności poszczególnych centrów katalitycznych poprzez tzw. modulację allosteryczną. Prawdopodobnie wywołują one uwolnienie „impulsu” allosterycznego przekazywanego od pierścieni α aż do komory katalitycznej. W ten sposób zewnętrzne związanie aktywatorów oraz inhibitorów z rdzeniem 20S wpływa także na modulację jego właściwości katalitycznych, decydując o profilu degradacji i długości powstających produktów proteolizy.

W ostatnich latach proteasom stał się atrakcyjnym celem w projektowaniu leków. Znane dotąd syntetyczne inhibitory proteasomu 20S, mimo początkowego sukcesu w terapii nowotworowej, okazały się być dość problematyczne ze względu na swą cytotoksyczność oraz lekooporność wytwarzaną u długotrwale leczonych pacjentów. Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania związków opartych o nowy mechanizm działania. W świetle najnowszych badań wiele nadziei wiązać można z małowcząsteczkowymi, allosterycznymi modulatorami aktywności proteasomu. W przeciwieństwie do związków ortosterycznych, wiążą się one w miejscu odległym od centrów katalitycznych i są w stanie zmodyfikować profil aktywności 20S, tak by indukować bardziej wybiórczą proteolizę substratów.

Jednym z nielicznych opisanych dotąd allosterycznych inhibitorów jest białko HIV-1 Tat, którego zaledwie 12-aminokwasowy fragment (zwany Tat1) hamuje aktywność ludzkiego proteasomu 20S.

Niestety, mimo potencjalnie ogromnych możliwości wykorzystania fenomenu allosterii w regulacji proteasomu, w dalszym ciągu wiemy o nim bardzo niewiele. Dlatego, w celu racjonalnego projektowania potencjalnych farmaceutyków, konieczne jest zrozumienie zależności struktura-aktywność modulatorów oraz sprawdzenie na ile fenomen allosteryczności może być efektywnie wykorzystany do modulacji 20S *in vivo*.

Głównym celem mojej pracy była próba znalezienia nowych związków hamujących aktywność ludzkiego proteasomu 20S, których mechanizm działania byłby oparty o modulację allosteryczną/niekompetycyjną. Podstawę do ich zaprojektowania stanowił peptyd Tat1. Dodatkowo chciałem zbadać, które elementy tj. sekwencja, struktura czy ogólny ładunek Tat1 są najistotniejsze w regulacji ludzkiego proteasomu 20S.

Przedstawiona praca dotyczy 37 potencjalnych inhibitorów aktywności ludzkiego proteasomu 20S, których mechanizm działania jest oparty o modulację niekompetycyjną/allosteryczną. Otrzymane związki należą do analogów peptydu Tat1, z czego 10 posiada niepeptydowe modyfikacje w postaci układów potencjalnie wywołujących β -zgięcie. Wszystkie związki poddałem badaniom biochemicznym w celu wyznaczenia ich potencjału modulującego aktywność ludzkiego proteasomu 20S, wykorzystując jako modelowe substraty krótkie, fluorogenne peptydy. Jednocześnie zweryfikowałem czy badane związki same z siebie nie stanowią substratu w procesie proteasomalnej proteolizy. Dodatkowo wykorzystałem α -synukleinę by sprawdzić wpływ wybranych związków na profil degradacji białkowego substratu przez proteasomu 20S. W tym celu wykorzystałem techniki elektroforetyczne i spektrometrię mas. Wpływ wybranych związków na układy komórkowe sprawdziłem określając efekt cytotoksyczny względem nowotworowej linii komórkowej HeLa. Ponadto zastosowałem techniki takie jak: dichroizm kołowy, spektroskopia ^1H NMR w połączeniu z modelowaniem molekularnym oraz termoforeza mikroskalowa, w celu określenia korelacji struktura-aktywność badanych związków oraz oceny wpływu modyfikacji na zdolność związków do tworzenia kompleksu z proteasomem 20S.

Badania analogów Tat1 z resztami aminokwasowymi wymienionymi pojedynczo lub blokami na Ala umożliwiły mi wyznaczenie dwóch regionów farmakoforowych w pozycji 4-6 i 8-10. Analiza konformacyjna peptydu Tat1 z wykorzystaniem modelowania molekularnego wykazała, że znajdują się one w regionie pętli/zgięć. Wprowadzenie motywu potencjalnie stabilizującego konformację β -zgięcia w tych regionach wpłynęło na poprawę zdolności otrzymanych związków do hamowania aktywności ChT-L proteasomu 20S. Najlepszym związkiem z tej grupy okazał się być analog z wbudowanym motywem Tic-D-Oic w pozycji 8-9. Badania konformacyjne peptydu Tat1 oraz jego analogów ze skanu alaninowego pokazały, że wszystkie te związki posiadają strukturę nieuporządkowaną lub PPII. Z kolei wprowadzenie Tic-D-Oic w pozycji 8-9 spowodowało drastyczną zmianę widma CD, sugerując obecność konformacji typu zgięcia β II. Również modelowanie molekularne wskazało, że związek ten posiada najbardziej upakowaną strukturę. Badania ukazały, że na zdolność do inhibicji proteasomu nie ma wpływu typ modyfikacji stabilizującej związek w konformacji typu β , ale ważna jest długość sekwencji zasadowej znajdującej się po obu stronach modyfikacji.

Niektóre związki z tej grupy charakteryzują się bardzo podobnymi i niskimi wartościami IC_{50} (około 70 nM) względem aktywności ChT-L i PGPH aktywowanego proteasomu 20S, będąc około 3,5-krotnie lepszymi inhibitorami niż Tat1. Związki te posiadają nie tylko najwyższy potencjał hamujący spośród wszystkich otrzymanych przez mnie analogów, lecz także spośród małowymiarowych, niekompetycyjnych/allosterycznych inhibitorów opisanych dotąd w literaturze. Analiza zależności struktura-aktywność analogów Tat względem 20S ukazała, że fenomen allosterycznej inhibicji nie jest w tym przypadku tylko i wyłącznie efektem dużego nagromadzenia reszt o charakterze zasadowym, lecz wynika również z odpowiedniego ułożenia/rozkładu ładunku w przestrzeni. Zarówno ładunek, jak i odpowiednia konformacja inhibitora allosterycznego jest konieczna do efektywnego działania względem proteasomu. Podobne wnioski uzyskałem wyznaczając stałe dysocjacji K_d kompleksów ludzkiego proteasomu 20S z wybranymi peptydami Tat przy pomocy mikroskalowej termoforezy. Technika ta została po raz pierwszy wykorzystana do pomiaru tak dużego układu jakim jest proteasom. Niezwykle obiecujące wyniki uzyskałem badając wstępnie wybrane związki na linii komórek raka szyjki macicy (HeLa). Związek Tat1 nie jest cytotoksyczny nawet w stężeniu 10 μ M, lecz wprowadzenie modyfikacji stabilizującej konformację β w pozycjach farmakoforowych peptydu Tat1 sprawiło, że nowe analogi stały się cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. Część ze związków wykazuje zaskakująco wysoką cytotoksyczność i to już przy 1 μ M stężeniu.