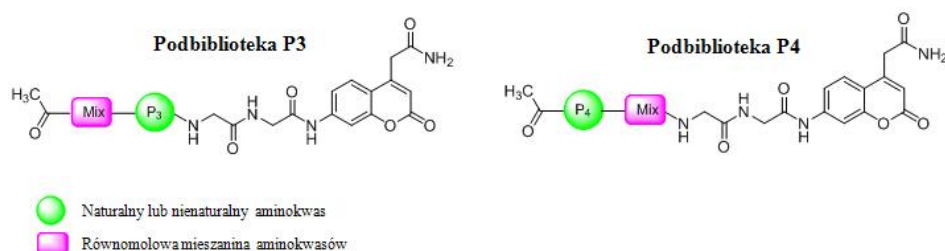


Proteazy, określane również jako peptydazy to enzymy proteolityczne degradujące białka na mniejsze fragmenty poprzez hydrolizę wiązań peptydowych. Odgrywają one bardzo ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu wszystkich komórek i organizmów. Badania prowadzone w ciągu ostatnich 50 lat dowiodły, że proteazy nie są tylko niespecyficznymi enzymami trawiennymi, lecz biorą udział w prawie wszystkich procesach biologicznych we wszystkich żywych organizmach m.in. zapłodnieniu, trawieniu, wzroście, dojrzewaniu, starzeniu się oraz śmierci. Ponadto, biorą też udział w wielu aspektach biologii komórki guza. Jednak charakter reakcji chemicznej, którą katalizują sprawia, że ich działanie musi być ściśle regulowane, tak aby uniknąć nadmiernej i niebezpiecznej proteolizy w komórkach lub tkankach. Dlatego wiele ośrodków naukowych na całym świecie zajmuje się poszukiwaniem specyficznych narzędzi do badania tej klasy enzymów. Jednym z głównych problemów utrudniających rozwój tych specyficznych narzędzi jest brak ich selektywności w stosunku do docelowych enzymów, co spowodowane jest ich nakładaniem się specyficznie do substratów. Oznacza to, że enzymy należące do danej grupy rozpoznają podobne substraty, a inhibitory projektowane w oparciu o sekwencje peptydowe tych substratów hamują aktywność nie tylko jednego enzymu, ale całej grupy enzymów. Takie rozwiązanie znacznie utrudnia prowadzenie badań w układach biologicznych, gdzie aktywnych jest kilka enzymów.

Ubikwitynacja, czyli przyłączenie małego steckowego białka – ubikwityny do docelowego substratu, jest jedną z najważniejszych modyfikacji postranslacyjnych, która ma wpływ na aktywność, regulację, oddziaływanie białko-białko, lokalizację i stabilność docelowego białka. Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny do substratów białkowych jest procesem odwracalnym, przeprowadzanym przez enzymy deubikwitynujące (ang. deubiquitinating enzymes, DUBs). Enzymy te katalizują reakcję polegającą na uwolnieniu ubikwityny z jej białkowych koniugatów lub z łańcucha poliubikwitynowego. Coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje tę grupę enzymów jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu chorób wirusowych, neurodegeneracyjnych oraz nowotworów.

W badaniach biochemicznych enzymów powszechnie wykorzystywane są małe steckowe substraty fluorogeniczne, umożliwiające pomiar sygnału fotochemicznego generowanego po hydrolizie substratu. W swej strukturze zawierają one sekwencję peptydów do której przyłączony jest znacznik fluorescencyjny. W momencie gdy taki substrat zostanie rozpoznany przez proteazę, następuje uwolnienie znacznika i wzrost fluorescencji monitorowany za pomocą spektrofлуorymetru. Do pomiaru aktywności DUBs najczęściej stosowane są substraty fluorogeniczne zawierające cząsteczkę ubikwityny połączone ze znacznikiem fluorescencyjnym (Ub-AMC), lub tylko C-końcowy tetrapeptydowy motyw ubikwityny (Z-LRGG-AMC). Niestety substraty te nie są efektywnie hydrolizowane przez enzymy deubikwitynujące. Ponadto, analiza preferencji substratowych wybranych DUBs za pomocą biblioteki substratów fluorogenicznych zawierających tylko naturalne aminokwasy (aminokwasy biogenne) ujawniła, że DUBs wykazują preferencje nie tylko do leucyny i argininy, ale mogą rozpoznawać też inne aminokwasy. Wyniki te sugerują, że pogłębiona analiza kieszeni wiążących w centrum aktywnym tych enzymów może doprowadzić do opracowania aktywnych, małych steckowych substratów lub struktur wiążących do syntezy inhibitorów selektywnie hamujących DUBs. **Analiza ta może być użyteczna do zastosowania nienaturalnych aminokwasów (powstałych drogą syntezy organicznej), z racjonalnie dobraną strukturą ich łańcuchów bocznych, stanowi idealne narzędzie do badania interakcji enzym-substrat.** Zastosowanie biblioteki substratów fluorogenicznych zawierających naturalne, a przede wszystkim szeroki gam nienaturalnych aminokwasów pozwoli poznać dokładny rozmiar, kształt i preferencje aminokwasowe kieszeni wiążących DUBs, **czego rezultatem będzie znalezienie nowych, bardziej aktywnych substratów fluorogenicznych, a także specyficznej sekwencji peptydowej dla docelowego enzymu, co jest celem niniejszego projektu.**

Realizacja przedstawionego celu badawczego zostanie podzielona na dwie sekcje: pierwsza będzie obejmowała syntezę biblioteki oraz indywidualnych substratów fluorogenicznych, natomiast druga analizę biochemiczną. Synteza biblioteki i substratów zostanie przeprowadzona według standardowej metody syntezy peptydów na podłożu stałym. Metoda ta polega na przyłączeniu aminokwasu do nierozpuszczalnego polimeru, posiadającego odpowiednie ugrupowanie chemiczne. Następnie łańcuch peptydowy jest wydłużany poprzez przyłączenie kolejnych aminokwasów. Biblioteka będzie składała się z dwóch podbibliotek (P4 i P3). Każda z nich będzie zawierała znacznik fluorogeniczny ACC, do którego zostanie przyłączona glicyna. W kolejnej pozycji również zostanie przyłączona glicyna, ponieważ taka struktura biblioteki zapewni i zostanie ona rozpoznana przez DUBs. Natomiast w dwóch pozostałych pozycjach będzie zawierała 19 naturalnych i około 90 nienaturalnych aminokwasów lub równomolowe mieszaniny naturalnych aminokwasów. Kolejny etap badania będzie obejmował wykorzystanie biblioteki do otrzymania profilu specyficzności substratowej DUBs. Badanie to umożliwi poznanie dokładnych preferencji aminokwasowych kieszeni wiążących w centrum aktywnym. Na ich podstawie zostaną zaprojektowane i zsyntetyzowane nowe, aktywne substraty fluorogeniczne, a także specyficzne sekwencje peptydowe do badania aktywności DUBs, dla których zostaną wyznaczone parametry katalityczne (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M).



Rys. 1 Struktura biblioteki substratów fluorogenicznych.

Poznanie pełnej specyficzności substratowej enzymów deubikwitynujących pozwoli na znalezienie nowych narzędzi chemicznych

do badania ich aktywności. Nowe, bardziej aktywne, a także specyficzne substraty fluorogeniczne pozwolą na badania biologicznych funkcji tych enzymów. Ponadto, zsyntetyzowana biblioteka może zostać użyta do profilowania specyficzności substratowej każdego enzymu wykazującego aktywność deubikwitinującą.