

Celem przedstawionego projektu badawczego jest poszukiwanie nowych substratów enzymów proteolitycznych z rodziny proteaz cysteinowych oraz serynowych (w tym kaspazy 3, 7, 9; ludzka elastaza neutrofilowa, proteinaza 3), z zastosowaniem peptydowych bibliotek kombinatorycznych typu jedno ziarno - jeden związek (ang. One-Bead One-Compound, OBOC), modyfikowanych znacznikiem jonizacyjnym w postaci czwartorzędowej grupy amoniowej (quaternary ammonium group, QA) na nośniku stałym. Synteza takich bibliotek została opracowana przez wnioskodawcę [1, 2], a możliwość jej zastosowania została potwierdzona na niewielkiej modelowej bibliotece kombinatorycznej substratów dla  $\alpha$ -chymotrypsyny. W ramach niniejszego projektu planuje się optymalizację zaproponowanej metody oraz sprawdzenie możliwości jej zastosowania w kombinatorycznym poszukiwaniu nowych substratów licznych enzymów proteolitycznych. Istota proponowanych bibliotek kombinatorycznych polega na derywatacji ich komponentów na nośniku stałym znacznikiem jonizacyjnym w postaci czwartorzędowej grupy amoniowej takiej jak *N,N,N*-trialkiloamonioacetyl. Wnioskodawcy wykazali, że taka derywatacja powoduje zwiększenie wydajności jonizacji próbek, umożliwiając jednoznaczny analiz sekwencyjny nawet atomolowych ilości związków metodą tandemowej spektrometrii mas z elektrosprejowym źródłem jonów (ESI-MS/MS) [3]. W ramach niniejszego projektu planuje się zaprojektowanie oraz syntezy wielu różnorodnych bibliotek kombinatorycznych zawierających zarówno białkowe jak i niebiałkowe reszty aminokwasowe.

Należy oczekiwać, że synteza stosunkowo dużych i skomplikowanych bibliotek QA-OBOC (liczących od kilkuset do kilku tysięcy związków) znacznie rozszerzy zakres dotychczas prowadzonych badań i zwiększy szanse na znalezienie nowych i nieznanych wcześniej substratów enzymów proteolitycznych. Sekwencje peptydów uwolnionych z pojedynczych ziaren  $\alpha$ -chymotrypsyny zostaną zanalizowane metodą ESI-MS/MS. Dotychczas taka analiza była znacznie ograniczona z uwagi na niską czułość stosowanych metod analitycznych w chemii kombinatorycznej.

W ramach realizacji niniejszego projektu planuje się przeprowadzenie wieloetapowych syntez bibliotek kombinatorycznych oraz modyfikacji peptydów na nośniku stałym (Zadania 1-5). Zsyntezowane zostaną biblioteki OBOC zawierające grupy QA w linkerze na końcu C Biblioteki peptydowa QA-OBOC zostanie zsyntezowana na nośniku stałym metodą opisaną przez wnioskodawcę [1, 2]. Analiza enzymatyczna zostanie przeprowadzona zgodnie ze standardowymi procedurami przedstawionymi wcześniej przez Dr. Gałę i wsp. [4]. Aktywne sekwencje peptydowe na ziarnach  $\alpha$ -chymotrypsyny zostaną zidentyfikowane za pomocą barwnej reakcji wolnej grupy aminowej w testach ninhydrynowym, izatynowym lub chloranilowym. Wszystkie produkty zostaną zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas. Związki zsyntezowane do badań w roztworze zostaną oczyszczone metodą HPLC i zanalizowane metodą ESI-MS/MS. Wskazane reakcje wykorzystanych w projekcie białek przebiegały przy użyciu typowego sprzętu laboratoryjnego i procedur odpowiednich do syntezy w roztworze i na nośniku stałym.

Enzymy proteolityczne odgrywają kluczowe role w funkcjonowaniu szlaków sygnalizacyjnych, powstawaniu infekcji i stanów zapalnych, apoptozie, krzepnięciu krwi czy kontrolowaniu cyklu komórkowego. Nieprawidłowa regulacja proteolizy peptydów i białek zazwyczaj bywa przyczyną powstania licznych stanów patologicznych [5]. Specyficzność substratowa enzymów proteolitycznych jest determinowana przez sekwencję aminokwasów rozpoznawanego fragmentu białka, zawierającego białkowe (kodowane przez genom) reszty aminokwasowe. Dotychczas opracowano wiele różnorodnych metod określenia specyficzności substratowej enzymów wykorzystując białkowe aminokwasy w konstrukcji bibliotek kombinatorycznych [6]. Uzyskane wyniki umożliwiły zaprojektowanie substratów, inhibitorów oraz markerów pozwalających monitorować aktywność wielu enzymów w testach *in-vivo* i *in-vitro* [7]. Jednakże zastosowanie wyłącznie białkowych aminokwasów w poszukiwaniach nowych substratów proteaz znacznie zawęża obszar poszukiwań, uniemożliwiając rozróżnienie enzymów prezentujących zbliżoną specyficzność [4, 8]. W celu ominięcia tego problemu, Dr. Gałę i wsp. [9] jako pierwsi zastosowali w syntezie bibliotek kombinatorycznych zarówno białkowe jak i niebiałkowe (nie kodowane przez genom) reszty aminokwasowe. Opracowana strategia pozwoliła odkryć nowe, bardziej aktywne substraty wielu różnorodnych enzymów proteolitycznych, które następnie posłużyły do zaprojektowania i zsyntezowania potencjalnych markerów wielu proteaz [10-12].

Biblioteki kombinatoryczne OBOC zawierające wiele tysięcy komponentów stanowi niezastąpione narzędzie przy poszukiwaniu nowych, aktywnych biologicznie związków chemicznych [13, 14]. W metodzie tej wyszukuje się za pomocą odpowiednich testów ziaren  $\alpha$ -chymotrypsyny zawierających związki oddziałujące z badanym białkiem i przeprowadza się jego analizę po uwolnieniu z pojedynczego ziarna  $\alpha$ -chymotrypsyny. Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod analitycznych w chemii kombinatorycznej jest ESI-MS [15]. Pomimo szybkiego rozwoju tej techniki w ostatnich latach, jej podstawowym ograniczeniem jest ładowa ilość substancji uwolnionej z pojedynczego ziarna  $\alpha$ -chymotrypsyny. Z uwagi na zbyt małą wydajność jonizacji niektórych peptydów ich analiza sekwencyjna metodą MS/MS wymaga zastosowania większej ilości peptydów od znajdującej się na pojedynczym ziarnie  $\alpha$ -chymotrypsyny. Rozwiązaniem tego problemu może być zaprojektowana przez wnioskodawcę [1, 2] wydajna derywatacja komponentów bibliotek OBOC znacznikiem jonizacyjnym w postaci grupy QA, która zwiększyła jonizowalność ładowych ilości analizowanych z pojedynczych ziaren OBOC ułatwiając ich jednoznaczne sekwencjonowanie metodą ESI-MS/MS. Okazało się, że nawet 10% analitu uzyskanego z pojedynczego ziarna  $\alpha$ -chymotrypsyny OBOC było wystarczające do określenia sekwencji peptydu metodą MS/MS. Uzyskane wyniki przeprowadzonej analizy były zgodne ze znaną specyficznością substratów  $\alpha$ -chymotrypsyny. Dodatkowo wspomniane badania (wyniki nieopublikowane i nieprezentowane na konferencjach) potwierdziły możliwość zastosowania opracowanej metody w analizie bibliotek OBOC zawierających substraty dla proteinazy 3, ludzkiej elastazy neutrofilowej oraz katepsyny G.

Można sugerować, że odpowiednio zaprojektowane i zsyntezowane biblioteki QA-OBOC na  $\alpha$ -chymotrypsynie mogłyby być użyteczne w poszukiwaniu nowych substratów enzymów proteolitycznych, w tym z punktu widzenia diagnostyki medycznej. Zgodnie z naszymi dotychczasowymi wiedzą znaczniki jonizacyjne w postaci grup QA nie zostały zastosowane w analizie bibliotek kombinatorycznych OBOC przy poszukiwaniu nowych substratów wariantów enzymów proteolitycznych z grupy proteaz cysteinowych i serynowych.

Według naszej wiedzy, prezentowana strategia poszukiwania substratów enzymów proteolitycznych jest jedną z najczulszych obecnie metod analizy, bazującej na metodzie ESI-MS/MS. Można przypuszczać, że proponowana metoda badań bibliotek OBOC zrewolucjonizuje współczesną chemię kombinatoryczną, umożliwiając szybki i jednoznaczny analiz sekwencyjny metodą ESI-MS/MS ładowych ilości peptydów uwolnionych z pojedynczych ziaren  $\alpha$ -chymotrypsyny. Umożliwi to jednoczesną analizę setek tysięcy sekwencji peptydowych, możliwych do otrzymania w ciągu kilku tygodni metodą „dzielenia i łączenia” (ang. split and mix). Opisany rozwój ma duże znaczenie poznawcze, ponieważ umożliwia odkrycie nowych i nieznanych wcześniej

biomodulatorów, które pozostawały nieodkryte z uwagi na niską czułość obecnie stosowanych metod analitycznych. Można przypuszczać, że w przyszłości odkryte związki mogą zostać zastosowane w diagnostyce medycznej jako specyficzne markery.

- [1] Borch R., Cydzik M., Rudowska M., Kluczyk A., Stefanowicz P., Szewczuk Z. *Mol. Divers.*, **2012**, *16*, 613-618.
- [2] Borch R., Kluczyk A., Stefanowicz P., Szewczuk Z. *Mol. Divers.*, **2013**, *17*, 605-611.
- [3] Borch R., Mielczarek P., Rudowska M., Silberring J., Szewczuk Z. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2014**, *362*, 32-38.
- [4] Drugg M., Salvesen G.S. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, *9*, 690-701.
- [5] Turk B. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5*, 785-799.
- [6] Poruba M., Drugg M. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 3968-3995.
- [7] Deu E., Verdoes M., Bogoy M. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2012**, *19*, 9-16.
- [8] McStay G.P., Salvesen G.S., Green D.R. *Cell Death Differ.*, **2008**, *15*, 322-331.
- [9] Drugg M., Bogoy M., Ellman J.A., Salvesen G.S. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 3310-3318.
- [10] Kasperkiewicz P., Poruba M., Snipas S.J., Parker H., Winterbourne C.C., Salvesen G.S., Drugg M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2014**, *111*, 2518-2523.
- [11] Poruba M., McGowan S., Skinner-Adams T.S., Trenholme K.R., Gardiner D.L., Whisstock J.C., To J., Salvesen G.S., Dalton J.P., Drugg M. *PLoS One*, **2012**, *7*, e31938.
- [12] Poruba M., Kasperkiewicz P., Snipas S.J., Fasci D., Salvesen G.S., Drugg M. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1482-1492.
- [13] Lowe G. *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, *24*, 309-317.
- [14] Furka A., Sebestyén F., Asgedom M., Dibo G. *Int. J. Pept. Res.*, **1991**, *37*, 487-493.
- [15] Kassel D.B. *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 255-267.