

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU BADAWCZEGO

Proteazy (enzymy proteolityczne, peptydazy) to enzymy mające na celu degradację białek na mniejsze fragmenty poprzez hydrolizę wiązań peptydowych. Odgrywają one kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu ludzkiego. Niezliczona ilość badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich pięćdziesięciu lat świadczy o ich fundamentalnej roli w niemal wszystkich procesach biologicznych wpływających na rozwój różnicowanie i prawidłowe funkcjonowanie komórek. Kaspazy, należące do rodziny proteaz cysteinowych, swoją nazwę zawdzięczają niemal absolutnej preferencji katalitycznej względem reszty kwasu asparaginowego znajdującego się w pozycji P1 substratów białkowych. Enzymy te od ponad dwudziestu lat przyciągają uwagę społeczności naukowej ze względu na swój udział w procesach zwanych apoptozą oraz pyroptozą, czyli dwiema odrębnymi ścieżkami programowanej śmierci komórki. Wspomniane procesy są jednymi z najważniejszych zdarzeń komórkowych, dzięki którym możliwe jest zachowanie odpowiedniej liczby komórek w organizmie, pozbycie się tych niepotrzebnych, zmutowanych bądź zniszczonych, co wpływa na utrzymanie się równowagi biologicznej. Brak odpowiedniej regulacji procesu programowanej śmierci komórki może doprowadzić do niezwykle niebezpiecznych schorzeń, takich jak zawał serca, udar mózgu czy nowotworzenie. Ze względu na tak istotną rolę, apoptoza oraz pyroptozę od lat stanowią obiekt zainteresowań naukowców, starających się zgłębić mechanizmy kierujące tymi procesami. Oba te procesy różnią się od siebie, zarówno morfologicznie jak i na poziomie molekularnym. Pyroptozę charakteryzuje się znacznym powiększeniem się komórki i pękaniem błony komórkowej, co z kolei skutkuje uwolnieniem prozapalnych cytokin. Proces ten jest zależny od kaspazy 1 co stanowi jego cechę charakterystyczną. Z kolei podczas apoptozy dochodzi raczej do upakowania zawartości komórkowej (komórka zmniejsza swoje rozmiary) oraz fagocytozy ciałek apoptotycznych charakterystycznych dla tego procesu, a wszystko to dzieje się bez wywołania stanu zapalnego. Można zatem powiedzieć, iż apoptoza, w przeciwieństwie do pyroptozy, jest procesem immunologicznie „cichym”. Enzymem odpowiedzialnym za przeprowadzenie apoptozy jest kaspaza 3. Ostatnie badania wskazują jednak, że oba te procesy, choć tak odmienne, mogą być ze sobą powiązane. Model dwukierunkowej interakcji pomiędzy tymi procesami, a co za tym idzie, między kaspazą 1 a 3, został niedawno opisany przez grupę dra Bachovchina. Zaproponowany model jest jednak wciąż niepełny. Głównym problemem, utrudniającym dokładny opis zdarzeń mających miejsce podczas samobójczej śmierci komórki, jest brak specyficznych narzędzi, które pozwoliłyby na zobrazowanie i analizę szlaków prowadzących do eliminacji komórek. W przypadku kaspaz, jednym z problemów jest fakt, iż wykazują one nakładającą się specyficzność substratową. Oznacza to, iż rozpoznają podobne substraty, a markery chemiczne projektowane w oparciu o sekwencje peptydowe tych substratów, powodują obrazowanie aktywności kilku enzymów jednocześnie, co skutkuje nieprecyzyjną analizą. Krzyżowa specyficzność tych enzymów znacznie utrudnia prowadzenie badań w układach biologicznych. Problem ten mógłby zostać rozwiązany dzięki użyciu specyficznych substratów fluorogenicznych, zawierających w swojej sekwencji nie tylko naturalne, ale również nienaturalne aminokwasy, co znacząco zwiększa szanse na rozróżnienie poszczególnych enzymów. Niestety, w przypadku takich związków, grupa fluorescencyjna po uwolnieniu z substratu opuszcza miejsce aktywne enzymu, przez co sygnał fluorescencji jest słaby i rozproszony, a to z kolei wpływa negatywnie na zastosowanie tego typu cząsteczek w celach lokalizacji enzymów w komórce. Drugą możliwością badania aktywności enzymów w komórce jest zastosowanie nieodwracalnych inhibitorów, które silnie wiążą się z enzymem w stosunku 1:1. Pozwala to na precyzyjne określenie lokalizacji danej proteazy. Niemniej jednak zastosowanie elektrofilowej cząsteczki łączącej się z miejscem aktywnym białka często powoduje całkowite zahamowanie ich aktywności, przez co dalsza obserwacja mechanizmów komórkowych staje się niemożliwa. Ponadto w przypadku zastosowania związków chemicznych opartych o inhibitory nie występuje zjawisko amplifikacji sygnału jak ma to miejsce podczas stosowania substratów fluorogenicznych. Opisane problemy mogą zostać rozwiązane poprzez precyzyjny dobór markerów chemicznych o określonych właściwościach i mechanizmach działania. Niniejszy projekt ma na celu zaprojektowanie i syntezę specyficznych niskocząsteczkowych markerów chemicznych, które łączą w sobie zalety substratów (amplifikacja sygnału) oraz inhibitorów (możliwość lokalizacji enzymów). Ponadto, planowana jest analiza biochemiczna oraz biologiczna uzyskanych związków jak również porównanie ich właściwości z powszechnie stosowanymi narzędziami chemicznymi. Umożliwi to bezpośrednio obrazowanie aktywności kaspaz w poszczególnych mechanizmach śmierci komórki, takich jak apoptoza czy pyroptozę.