

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD) lub stwardnienie zanikowe boczne (ALS) są niezwykle poważnym i narastającym problemem społecznym. Występowanie tych schorzeń jest silnie powiązane z wiekiem i charakteryzuje się postępującą neurodegeneracją oraz demencją. Ich cechą charakterystyczną jest odkładanie się uszkodzonych białek, które w zdrowych komórkach są usuwane przez systemy proteolityczne, głównie przez proteasom 20S. Ten ogromny kompleks enzymatyczny usuwa z komórek zmutowane, nieprawidłowo sfałdowane i utlenione białka. Niestety, wraz z wiekiem jego efektywność słabnie. Aktywacja proteasomu, czy to na poziomie ekspresji genów, czy przy użyciu naturalnych lub syntetycznych związków, może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną, zapewniającą opóźnienie wystąpienia związanych z wiekiem chorób neurodegeneracyjnych. Jednak mechanizm aktywacji proteasomu 20S przez związki małowcząsteczkowe nie jest dokładnie wyjaśniony, co utrudnia projektowanie potencjalnych terapeutyków. Struktur wiodących do ich projektowania można poszukiwać opierając się na kompleksach proteasomu z jego naturalnymi, białkowymi aktywatorami. Liczne badania wykazują, że krótkie peptydy wywodzące się z regulatorów 19S i PA200, zawierające ich C-końcowy motyw HbYX (reszta hydrofobowa - tyrozyna - dowolna reszta aminokwasowa) są w stanie stymulować proteasom 20S. Wyniki naszych badań również to potwierdzają - podczas realizacji poprzedniego grantu Opus odkryliśmy nową grupę bardzo skutecznych aktywatorów proteasomu, których sekwencje wywodzą się z C-końcowego fragmentu innego naturalnego regulatora proteasomu, białka Blm10 (drożdżowego ortologu białka PA200). Zdolność tych peptydów do stymulowania proteasomu 20S została przez nas udowodniona zarówno w testach aktywności ze standardowymi substratami fluorogenicznymi, jak i z modelowymi białkami (α -synukleina, Tau441). Okazało się jednak, że w obecnej postaci analogi Blm nie są w stanie wnikać do komórek, a także charakteryzują się niską stabilnością proteolityczną. Poprawa tych dwóch parametrów jest niezbędna do zaproponowania nowej struktury wiodącej, mogącej pomóc zaprojektować skuteczne stymulatory proteasomu, które ograniczyłyby gromadzenie się nieprawidłowych białek w komórkach.

Głównym celem projektu jest zaprojektowanie stymulatorów proteasomu, zdolnych do przenikania przez błony komórkowe i stabilnych w warunkach proteolitycznych. Realizacja projektu obejmuje kilka zadań badawczych. Po pierwsze, z puli naszych aktywatorów typu Blm wybierzemy 3-5 związków, które zmodyfikujemy wprowadzając nienaturalne aminokwasy, dostępne komercyjnie lub uzyskane przez nas w wyniku syntezy chemicznej. Kolejny sposób modyfikacji sekwencji polegać będzie na wprowadzeniu mimetyków wiązania peptydowego, co powinno zapewnić większą stabilność proteolityczną powstałych peptydomimetyków. Następnie określimy wpływ otrzymanych związków na aktywność katalityczną ludzkiego proteasomu 20S przy użyciu standardowych substratów fluorogenicznych. Dla najbardziej aktywnych związków zsyntezujemy znakowane fluorescencyjnie analogi i przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej określimy ich zdolność przenikania przez błonę komórkową. W kolejnym kroku sprawdzimy stabilność w osoczu analogów zdolnych do wnikania do komórek. Planujemy również sprawdzić, czy uzyskane związki będą stymulować proteasom 20S do wydajniejszego trawienia białek podatnych na agregację. Jeśli wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* będą zadowalające, modulatory zostaną przetestowane w modelu choroby Alzheimera zaimplementowanym w muszkach owocowych (*D. melanogaster*).

Planowane przez nas badania powinny pozwolić na otrzymanie małowcząsteczkowych peptydomimetyków, które pozbawione będą dwóch głównych wad ograniczających terapeutyczne zastosowanie peptydowych aktywatorów Blm: krótkiego okresu półtrwania w osoczu i braku przepuszczalności przez błony komórkowe, ale zachowają zdolność do pobudzania aktywności proteasomu. Związki tego typu mogłyby przywracać proteostazę u pacjentów cierpiących na powiązane z wiekiem schorzenia objawiające się akumulacją uszkodzonych białek, takie jak choroba Alzheimera i Parkinsona.