

Enzymy to biokatalizatory, które przyspieszają reakcje chemiczne. Reakcje te zachodzą w komórkach, których wnętrze jest zatłoczone. Komórki, oprócz wody i jonów, zawierają wiele innych cząsteczek, takich jak kwasy nukleinowe, białka, rybosomy, lipidy i metabolity. Dodatkowo, wnętrze komórki jest przedzielone błonami fosfolipidowymi. Błony służą do ochrony komórki, transportu związków oraz organizacji przestrzeni komórkowej. Oznacza to, że dana reakcja biochemiczna zachodzi w obecności innych makrocząsteczek, które w komórkach ssaków mogą zajmować 30% objętości. Poza ograniczeniem przestrzeni dostępnej dla enzymu, makrocząsteczki i błony oddziałują niespecyficycznie z enzymem i jego substratami. Ograniczenie przestrzeni i oddziaływania mogą wpływać na szybkość reakcji w porównaniu z warunkami w samej wodzie. Ponadto, takie warunki wpływają również na wiązanie i skuteczność inhibitorów tych enzymów, które są stosowane jako leki.

Jednakże, żeby ułatwić interpretację wyników, enzymy są często badane w rozcieńczonych roztworach buforowych, które nie odzwierciedlają warunków fizjologicznych i środowiska komórki. Aby zrozumieć co kontroluje aktywność enzymatyczną i uzyskać wiarygodne parametry reakcji oraz skuteczności inhibitorów, będziemy badać reakcje enzymatyczne uwzględniając ich złożone otoczenie.

Proteazy to ważna klasa enzymów, które rozszczepiają wiązania peptydowe i pełnią wiele funkcji biologicznych. Również genomy wirusów kodują proteazy, które rozszczepiają prekursorzy łańcuchów białkowych po ich translacji przez maszynę komórki gospodarza. Ponieważ proteazy te są kluczowe dla replikacji wirusów, stały się celem dla leków. Leki hamujące proteazy ludzkiego wirusa niedoboru odporności i wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) są stosowane w przeciwwirusowych terapiach skojarzonych u ludzi. Główna proteaza wirusa SARS-Cov-2 została także wykorzystana jako cel działania inhibitorów, które znajdują się w fazie badań klinicznych. Jednakże, aby zaprojektować skuteczny inhibitor, który stałby się lekiem przeciwwirusowym, musimy zrozumieć jak proteazy wirusowe katalizują reakcje w warunkach zatłoczenia komórkowego gospodarza.

Zbadamy reakcje katalizowane przez dwa enzymy kodowane przez genom wirusa HCV. Wirus ten powoduje zapalenie wątroby, które może prowadzić do poważnych uszkodzeń wątroby i raka. Obecnie nie ma skutecznej szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C, chociaż szacuje się, że prawie 200 milionów ludzi na całym świecie jest dotkniętych tym wirusem. Leczenie jest dostępne, ale brak jest diagnozy, ponieważ nowe zakażenia przebiegają bezobjawowo, a genom wirusa mutuje i staje się oporny na znane terapie.

Jeden z enzymów HCV, na którym się skupimy, nazywa się proteazą NS3/4A i jest znanym celem dla leków zatwierdzonych do użytku klinicznego w ostatniej dekadzie. Drugi to proteaza NS2, w którą nie celują jeszcze żadne leki, ale jest ona możliwym celem. Te dwie proteazy działają w błonach retikulum endoplazmatycznego komórki gospodarza. **Naszym celem jest określenie, jak środowisko błonowe i zatłoczenie makrocząsteczkowe wpływają na aktywność tych dwóch proteaz wirusa zapalenia wątroby typu C, kluczowych dla jego replikacji.** Zbadamy również, jak błona i zatłoczone otoczenie wpływają na efektywność dwóch leków wiążących się z NS3/4A. Jako mimetyki membran wykorzystamy micelle, pęcherzyki lipidowe i nanodyski, które są nanoskalowymi dwuwarstwami lipidowymi. Jako makrocząsteczki wykorzystamy syntetyczne polimery takie jak glikol polietylenowy, polisacharoza, poliglukozę oraz białka. Wydajność reakcji będziemy monitorować za pomocą różnych technik takich jak spektroskopia fluorescencyjna, elektroforeza, chromatografia i mikrokalorymetria.

Ponieważ genom HCV stale mutuje, problemem są warianty lekooporne. Nasze badania proteaz tego wirusa i zrozumienie ich działania w różnych warunkach pomogą zaproponować nowe inhibitory. Mamy nadzieję wyjaśnić dlaczego te dwie proteazy HCV funkcjonują oddziałując z błoną retikulum endoplazmatycznego. Przyczynimy się również do rozwoju metod analitycznych stosowanych do wyznaczania parametrów reakcji w warunkach tłoku komórkowego i lipidów.