

Wioletta Rut

Streszczenie pracy doktorskiej „*Zastosowanie naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w otrzymywaniu aktywnych i specyficznych markerów dla proteaz cysteinowych i treoninowych*”

Kluczową rolę w utrzymaniu białkowej, wewnątrzkomórkowej homeostazy odgrywa nielizosomalny układ ubikwityna – proteasom. Zaburzenia w prawidłowym działaniu tego układu prowadzą do szeregu patologicznych zmian w organizmie, w tym do nowotworzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych. Jedną ze stosowanych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych jest inhibicja aktywności proteasomu. Badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych skupiają się nad poszukiwaniem związków chemicznych selektywnie oddziałujących z proteasomem, co pozwoli na lepsze zrozumienie jego biologicznych funkcji.

Celem pierwszej części pracy doktorskiej było otrzymanie selektywnych związków chemicznych do monitorowania aktywności trzech podjednostek katalitycznych proteasomu 20S. W pierwszym etapie badań określono profil specyficzności substratowej podjednostek β proteasomu 20S za pomocą kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych zawierającej naturalne i nienaturalne aminokwasy (HyCoSuL). Następnie, w oparciu o uzyskane profile specyficzności substratowej, dla każdej podjednostki katalitycznej zaprojektowano i zsyntetyzowano selektywne substraty fluorogeniczne, dla których następnie wyznaczono parametry katalityczne. W ostatnim etapie badań zsyntetyzowano markery chemiczne zawierające w swej strukturze specyficzne sekwencje peptydowe, których selektywność potwierdzono w badaniach na lizatach komórkowych.

Druga część pracy doktorskiej obejmowała badania proteaz cysteinowych wykazujących aktywność deubikwitynąjącą, które stanowią alternatywny cel terapeutyczny układu ubikwityna – proteasom. Enzymy deubikwitynąjące odpowiedzialne są za specyficzne usuwanie ubikwityny z jej białkowych koniugatów. Celem tej części pracy było zaprojektowanie i synteza narzędzi chemicznych umożliwiających monitorowanie aktywności enzymów deubikwitynąjących na przykładzie proteazy SARS PLpro, która stanowi ważny cel w terapii przeciwwirusowej. Realizacja powyższego celu obejmowała syntezę kombinatorycznej biblioteki substratów zawierającej naturalne i nienaturalne aminokwasy, określenie profilu specyficzności substratowej SARS PLpro w pozycjach P4 i P3, a następnie badania kinetyczne otrzymanych substratów fluorogenicznych. Otrzymano nowe, aktywne

substraty SARS PLpro, a także specyficzne sekwencje peptydowe, które użyto w syntezie selektywnych inhibitorów SARS PLpro.

Proteasom i enzymy deubikwitynujące stanowią ważny cel terapeutyczny w leczeniu chorób wirusowych, neurodegeneracyjnych oraz nowotworów. Brakuje jednak specyficznych narzędzi do badań tej grupy enzymów. Dzięki zastosowaniu kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych zawierającej szeroką gamę nienaturalnych aminokwasów możliwe było zaprojektowanie specyficznych sekwencji peptydowych dla każdej podjednostki katalitycznej proteasomu 20S i SARS PLpro. Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej (selektywne substraty, inhibitory i markery chemiczne) stanowią dobre narzędzie do badania biologicznych funkcji proteasomu 20S i SARS PLpro, monitorowania ich aktywności

w komórce. Ich użycie może przyczynić się do lepszego zrozumienia roli tych enzymów w stanach patologicznych.