

Streszczenie

Interaction of small-molecule inhibitors with the deubiquitinating protease USP2

(Oddziaływanie małowcząsteczkowych inhibitorów z proteazą deubikwitynującą USP2)

Ubikwitynacja jest jednym z mechanizmów służących hamowaniu aktywności białek i oznaczeniu ich do zniszczenia na drodze degradacji proteasomalnej. Proces ubikwitynacji jest odwracalny i regulowany przy udziale białek z rodziny proteaz deubikwitynujących, mających zdolność do specyficznego przecinania łańcucha ubikwitynowego, a tym samym kontrolowania aktywności, miejsca docelowego czy procesu degradacji białek.

Jedną z najlepiej poznanych grup, spośród enzymów deubikwitynujących, są proteazy specyficzne dla ubikwityny – USPs, których nadmierna ekspresja została wielokrotnie powiązana z progresją chorób nowotworowych. W szczególności, nadekspresja deubikwitynazy USP2 została odkryta w komórkach raka prostaty oraz opisana jako czynnik wpływający na rozwój i oporność tej choroby. Proteaza USP2 jest również znana jako aktywator cykliny D1 – białka niezbędnego do progresji cyklu komórkowego z fazy G1 do S oraz istotnego w namnażaniu komórek nowotworowych. Regulacja aktywności enzymu USP2, przy użyciu małowcząsteczkowych inhibitorów jest, zatem, obiecującym celem terapeutycznym chorób o podłożu onkologicznym.

Celem pracy było poszukiwanie małowcząsteczkowych inhibitorów białka USP2 oraz charakterystyka ich aktywności biologicznej. Na pierwszym etapie badań przeprowadzono ekspresję białek rekombinowanych w systemie bakteryjnym *E. coli* oraz ich oczyszczanie z zastosowaniem technik chromatograficznych. Kolejnym etapem było testowanie oddziaływania oraz charakterystyka właściwości potencjalnych inhibitorów proteazy deubikwitynującej USP2, przy użyciu testów fluorescencyjnych. Wstępne wyniki potwierdzono, następnie stosując metody spektroskopii NMR oraz Thermal Shift Assay, a w celu dalszej charakterystyki wybranych związków, potencjalne inhibitory poddano testom na liniach komórkowych nowotworu jelita grubego HCT116.

Przeprowadzone badania doprowadziły do wyłonienia dwóch grup związków wykazujących umiarkowane powinowactwo do deubikwityny USP2. Wyjściowe związki były oparte na strukturze kwasu litocholowego i 5-(2-tienylo)-3-izoksazolu. Przeprowadzona następnie optymalizacja, struktur wyłonionych związków, umożliwiła otrzymanie antagonistów białka USP2 wykazujących aktywność w testach *in vitro*, charakteryzującą się stałymi wiązaniami rzędu mikromoli. Dalsze badania wykazały zdolność finalnych związków do hamowania wzrostu linii komórkowych nowotworu jelita grubego HCT116, jak również obniżenia poziomu cykliny D1 w badanych komórkach. Obserwowane efekty były znacznie większe w przypadku związków o rdzeniu sterolowym, co wskazuje na ich większy potencjał w przyszłych zastosowaniach medycznych.

W drugiej części pracy opisano podjęte próby krystalizacji białka USP2 w formie apoenzymu, jak również w kompleksie ze skróconym konstruktem ubikwityny, w celu uzyskania struktury z wolną przestrzenią kieszeni aktywnej deubikwityny. Problem z zaprojektowaniem związków, które powinny wiązać się do centrum aktywnego białka USP2, jest prawdopodobnie związany z brakiem danych o strukturze krystalicznej apoenzymu. Podjęte, w trakcie badań, próby uzyskania struktury białka w formie apoenzymu nie doprowadziły do otrzymania kryształu. Białkowe kryształy udało się uzyskać po nastawieniu krystalizacji białka USP2 w kompleksie ze skróconym mutantem ubikwityny, jednak słaba rozdzielczość danych uniemożliwiła rozwiązanie struktury.

Przedstawione badania przyczyniły się do sprecyzowania struktur związków wykazujących powinowactwo do proteazy deubikwitynującej USP2 oraz scharakteryzowania ich właściwości biologicznych. Spośród wyłonionych dwóch grup inhibitorów, pochodne kwasu litocholowego wykazały szczególnie interesującą aktywność biologiczną zarówno w testach *in vitro* jak i w badaniach na liniach komórkowych. Zastosowanie tych, opartych na naturalnym rdzeniu, inhibitorów proteazy USP2 do celów medycznych może dać początek efektywnej i selektywnej terapii chorób o podłożu onkologicznym.