

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Tytuł: Badanie specyficzności substratowej i rola deiminaz peptydyloargininowych w modulacji stanu zapalnego

Autor: mgr Ewa Bielecka

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Deiminazy peptydyloargininowe (PAD) to rodzina enzymów odpowiedzialna za jedną z post-translacyjnych modyfikacji białek – cytrulinację, czyli konwersję reszt argininy do cytruliny w łańcuchach peptydowych. W warunkach fizjologicznych pięć ludzkich deiminaz peptydyloargininowych (PAD1-4 oraz PAD6) bierze udział w procesach apoptozy, regulacji różnicowania komórek nabłonkowych, formowaniu osłonek mielinowych nerwów, NETozie czy regulacji ekspresji genów. Ostatnio wzrasta liczba doniesień dotyczących roli enzymów typu PAD w procesach patologicznych, takich jak łuszczyca, stwardnienie rozsiane, niektóre z odmian chorób nowotworowych (rak płuc, rak piersi), czy najlepiej opisanym w tym kontekście reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS). Zaangażowanie białek typu PAD w utrzymanie homeostazy w organizmie, a jednocześnie ich udział w rozwoju wspomnianych chorób skłania do wnikliwego badania tej rodziny enzymów, o których do tej pory wiadomo stosunkowo niewiele.

„Czarnymi charakterami” wśród deiminaz są izoformy PAD2 i PAD4, którym głównie przypisuje się udział w procesach patologicznych. W tym kontekście szczególnie interesujące wydaje się zbadanie potencjalnego wpływu cytrulinacji na białka związane z powstawaniem i regulacją stanu zapalnego, co wcześniej zostało już pokazane dla modulacji aktywności chemokin. Reszty argininy są kluczowe w procesach aktywacji elementów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, takich jak układ dopełniacza czy receptory typu PAR. Ich modyfikacja przez deiminazy może prowadzić do zmiany aktywności/funkcji, a tym samym wpływać na modulację stanu zapalnego. Badania cytrulinacji nie należą do łatwych z przyczyn metodologicznych, w tym ze względu na brak komercyjnie dostępnych preparatów białek PAD oraz przystępnych metod mapowania cytrulinacji w białkach. Pierwszym celem pracy stało się więc wyprodukowanie i oczyszczenie rekombinowanych PAD2 i PAD4. O ile w przypadku PAD4 okazało się to zadaniem wykonalnym, to w przypadku PAD2 udało się uzyskać tylko niewielkie ilości aktywnego enzymu, niepozwalające na przeprowadzenie wszystkich zaplanowanych doświadczeń.

Układ dopełniacza, składający się z ponad 20 komponentów, stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami. Ponadto jest również odpowiedzialny za modulację procesów zapalnych. Aktywacja dopełniacza zachodzi w sposób kaskadowy poprzez ograniczoną proteolizę jego poszczególnych składników w wyniku hydrolizy zdefiniowanych wiązań peptydowych Arg-Xaa. Z tego względu w niniejszej pracy doktorskiej zbadano wpływ PAD4 na aktywność układu dopełniacza w pełnym ludzkim serum. Równolegle poddano analizie działanie PAD4 stosując metodę CleavEX. Metoda ta, poprzez badanie podatności reszt arginin w wybranych sekwencjach aktywacyjnych poszczególnych komponentów układu dopełniacza, pozwoliła określić, które z nich mogą być wydajnie cytrulinowane przez PAD2 i PAD4. Innym elementem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, aktywowanym przez hydrolizę wiązań peptydowych Arg-Xaa, są receptory aktywowane przez proteazy (ang. *protease activated*

receptors, PAR1, -2 i -4). Stosując peptydowe substraty fluorescencyjne reprezentujące sekwencje aktywacyjne receptorów typu PAR, zbadano czy również w ich wypadku PAD2 i PAD4 mogą wydajnie cytrulinować wspomniane reszty, blokując tym samym aktywację receptorów.

Zaobserwowane różnice wydajności cytrulinacji arginin w sekwencjach aktywacyjnych układu dopełniacza i receptorów PAR przez PAD2 i PAD4 sugerują odmienną specyficzność izoform PADów. W celu dokładniejszego przebadania ich specyficzności wykorzystano kombinatoryczne peptydowe biblioteki substratowe oraz komercyjny substrat FRET-25-Xaa. Uzyskane wyniki zweryfikowane analizą dostępnych wysokorozdzielczych struktur atomowych PAD2 i PAD4 wykazały, że aminokwasy bezpośrednio sąsiadujące z cytrulinowaną arginina są odpowiedzialne za różnice w aktywności tych izoform względem arginin w substratach. Opierając się o te wyniki zaprojektowano peptydowe sondy molekularne znakowane biotyną i zbadano ich selektywność i użyteczność w detekcji białka PAD4.

Oprócz endogennych enzymów PAD w ludzkim organizmie może pojawić się jeszcze jedno źródło białek cytrulinowanych. *Porphyromonas gingivalis*, Gram-ujemna, beztlenowa bakteria będąca głównym czynnikiem etiologicznym paradontozy, produkuje unikatowy wśród mikroorganizmów enzym o charakterze deiminazy peptydyloargininowej (PPAD). Bakteryjny PPAD różni się specyficznością od ludzkich enzymów z tej rodziny i modyfikuje głównie reszty argininy znajdujące się na C-terminalnym końcu poli/oligopeptydów. Ze względu na statystyczną korelację między występowaniem paradontozy i RZS oraz podobnym charakterem tych schorzeń (występowanie przewlekłego stanu zapalnego regulowanego między innymi przez białka układu dopełniacza, niszczenie tkanek twardych, obecność białek cytrulinowanych) zasadnym było zbadanie potencjalnego wpływu PPAD na aktywność najsilniejszej ludzkiej anafilatoksyny uwalnianej w trakcie aktywacji kaskady komplementu - cząsteczki C5a. Wykazano, że PPAD cytrulinuje C-końcową resztę argininy, która jest kluczową dla aktywności C5a, przez co silnie osłabia aktywność biologiczną anafilatoksyny istotną dla mobilizacji neutrofilii.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska przedstawia wyniki badania specyficzności substratowej ludzkich izoform PAD2 i PAD4 przeprowadzone z wykorzystaniem oryginalnych, nietypowych doanalizy tego rodzaju modyfikacji potranslacyjnej metod. Użyteczność uzyskanych wyników została potwierdzona przez zaprojektowanie i syntezę pierwszej generacji sond molekularnych, które mogą posłużyć do detekcji tych enzymów w tkankach, a w dalszej perspektywie stworzenia specyficznych inhibitorów. Badania z wykorzystaniem białek, będących komponentami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, wskazują na potencjalnie większą, niż dotychczas sądzono, rolę deiminaz peptydyloargininowych (zarówno bakteryjnego, jak i ludzkich) w modulacji procesów zapalnych.

Część wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej została opublikowana w:

Bielecka E, Scavenius C, Kantyka T, Jusko M, Mizgalska D, Szmigielski B, Potempa B, Enghild JJ, Prossnitz ER, Blom AM, Potempa J. **Peptidyl arginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* abolishes anaphylatoxin C5a activity.** Journal of Biological Chemistry. 2014 Nov 21;289(47):32481-7. doi: 10.1074/jbc.C114.617142. PMID: 25324545

Bielecka Eva