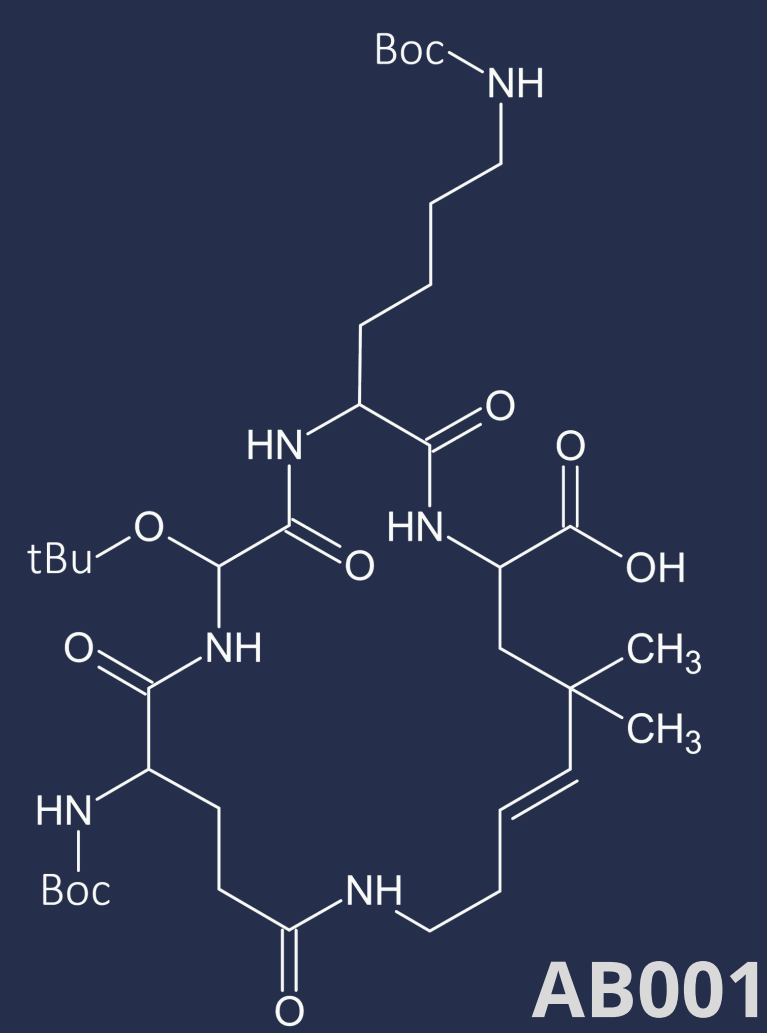




Synteza peptydu cyklicznego, analogu sekwencji PTS1.

ALEKSANDRA BIŁANT

Opiekun pracy

dr n. farm. Martyna Wróbel

Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej



WSTĘP

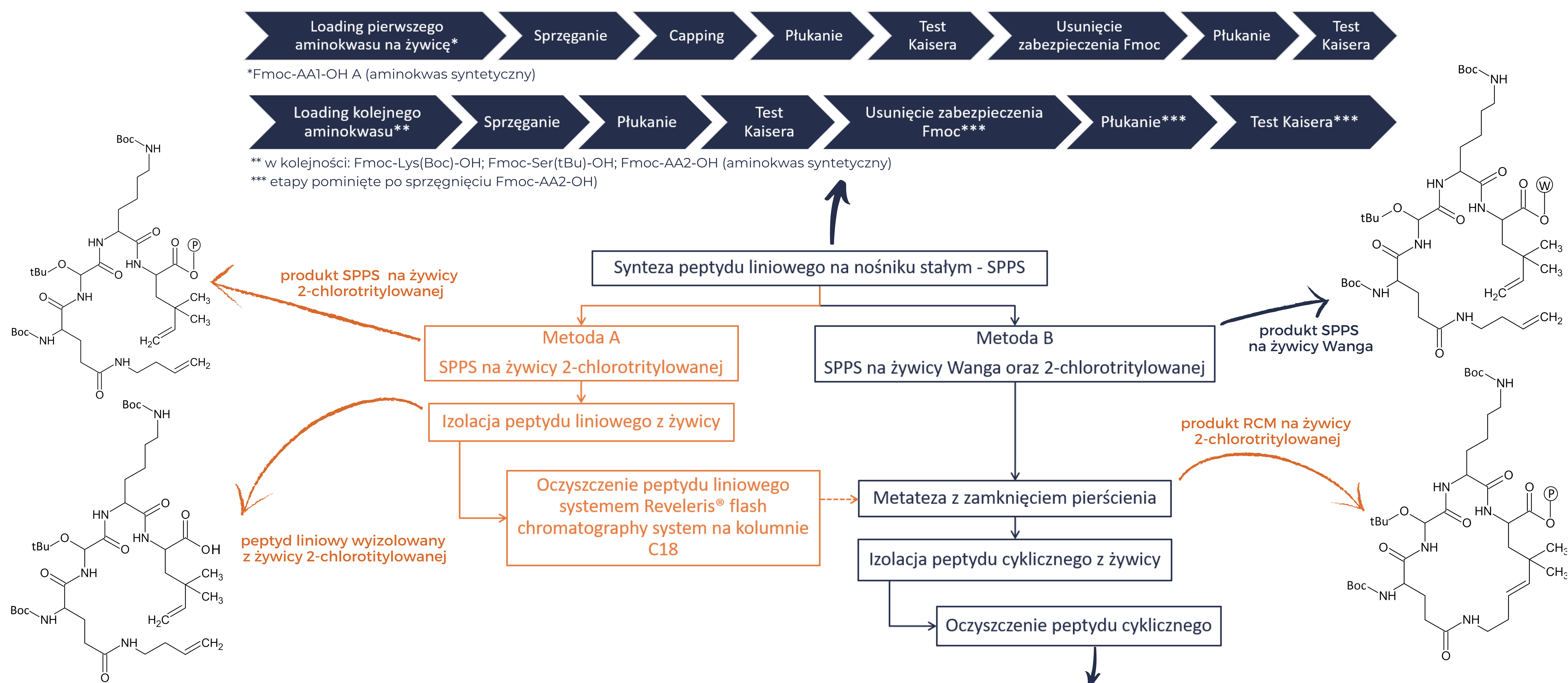
Glikoliza jest wyłącznym źródłem pozyskiwania ATP u pasożytów [1], a większa część tego procesu zachodzi w glikosomach [2]. Brak DNA w glikosomach uniemożliwia translację katalaz niezbędnych do przeprowadzenia glikolizy [1][3]. Są one syntetyzowane w cytozolu i transportowane po-translacyjnie do glikosomu przez białka rodziny peroksyn PEX [1]. Zahamowanie transportu katalaz szlakiem PEX, blokuje produkcję ATP przez świdrowce tym samym hamując inne życiowe procesy komórkowe. Prowadzi to do śmierci pasożyta [4]. Badania nad nowymi sposobami zwalczania świdrowców potwierdziły, że zablokowanie interakcji między PEX5 a PEX14 przy użyciu małych cząsteczkowych inhibitorów PEX14 prowadzi do śmierci u różnych gatunków z rodziny Trypanosoma [5]. Badanie to zapewnia grunt dla dalszego rozwoju inhibitorów PEX jako potencjalnych leków. Opis oddziaływania kompleksu PEX5/PTS1 w szlaku transportu doglikosomalnego jest słabo poznany przez brak sond molekularnych do jego obserwacji. Zablokowanie szlaku na innym poziomie - inhibicja interakcji PTS1 z PEX5 wydaje się być obiecującą strategią dla rozwoju sond molekularnych.

CEL PRACY

Opracowanie metody syntezy peptydu cyklicznego, kompetycyjnie wiążącego się z białkiem PEX5 oraz optymalizacja reakcji RCM - metatetezy zamykającej pierścień diolefin.

- blokada tworzenia kompleksu PEX5/PTS1 (blokada transportu doglikosomalnego)
- pomoc w opracowaniu potencjalnej sondy molekularnej

SCHEMAT BADAŃ I METODYKA



Metoda A - warunki i produkty reakcji RCM w roztworze

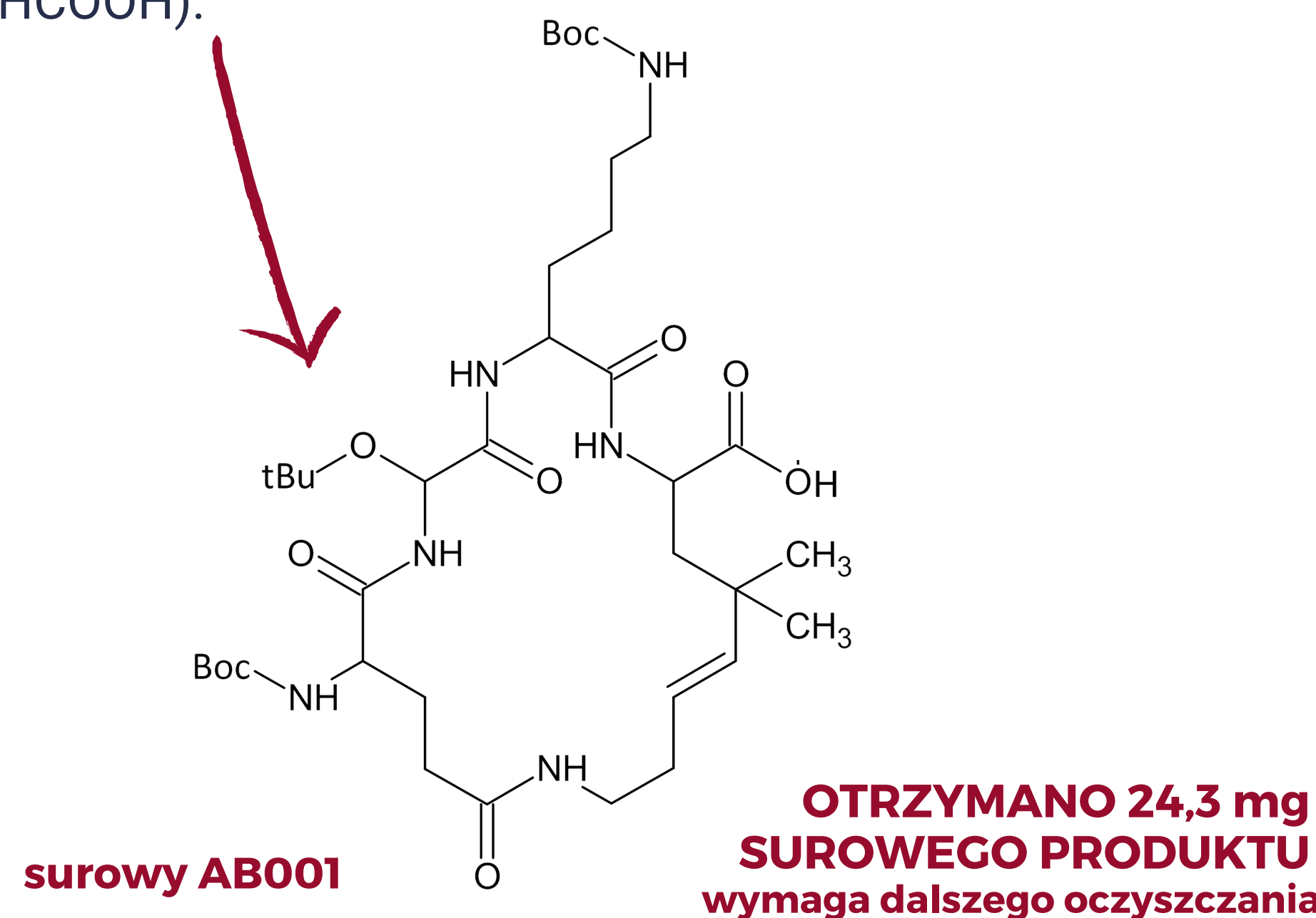
Próba	Rozpuszczalnik	Temperatura i ciśnienie	Czas	Katalizator	Wydajność/uwagi
1	DCM	3h - 40°C 72h - rT	75h	Hoveyda – Grubbsa 2 gen	Nieznaczna ilość produktu
2	DCE	3h - 40°C 48h - rT	51h	Hoveyda – Grubbsa 2 gen	Nieznaczna ilość produktu

Metoda B - warunki i produkty reakcji RCM (na żywicy 2-chlorotritylowanej)

Próba	Żywica	Rozpuszczalnik	Temperatura	Czas	Katalizator	Uwagi
1	2-chlorotritylowa	DCM	rT	24h	G-H	Otrzymano dimer peptydu liniowego
2	2-chlorotritylowa	DCM	40°C	24h	G-H	Otrzymano dimer peptydu liniowego
3	2-chlorotritylowa	DCM	40°C	4h	GII	Otrzymano oczekiwany produkt

Warunki oczyszczania peptydu cyklicznego AB001

RCM w roztworze oraz na żywicy 2-chlorotritylowanej pozwoliła otrzymać AB001 w małej ilości. Połączono mieszaniny reakcyjne, w których stwierdzono obecność AB001. Zagęszczono, oczyszczono metodą Reveleris flash chromatography system (kolumna C18, układ H2O/CH3CN gradient + 0.1% HCOOH).



surowy AB001

OTRZYMANO 24,3 mg SUROWEGO PRODUKTU wymaga dalszego oczyszczania

WYNIKI

- Opracowano skuteczną metodę syntezy peptydu liniowego na żywicy Wang.
- Otrzymano peptyd liniowy na żywicy 2-chlorotritylowanej i na żywicy Wang.
- RCM w roztworze DCM prowadziła do produktów ubocznych.
- Lepsze wyniki otrzymano dla reakcji prowadzonej w DCM niż w DCE.
- Zmiana katalizatora na katalizator Grubbsa II generacji wpłynęła znacząco na wydajność reakcji dla reakcji RCM prowadzonej na żywicy.
- Udało się opracować metodę wstępnego oczyszczania peptydu AB001 chromatografią preparatywną.

WNIOSKI

- Obie żywice pozwalają na efektywną syntezę peptydu liniowego.
- Wydajność RCM w roztworze jest niska. Reakcję należy prowadzić: przy użyciu DCM wolnego od amylenu, w temperaturze 40°C z zastosowaniem katalizatora Grubbsa II generacji.
- Istotną kwestią może być wybór żywicy do syntezy peptydu metodą SPPS, który następnie będzie substratem w reakcji RCM na żywicy.
- Reakcja RCM na żywicy Wang ma większe szanse na powodzenie.
- Otrzymany związek AB001 wymaga dalszego oczyszczenia metodą HPLC na kolumnie semipreparatywnej w układzie faz odwróconych.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Verplaetse, M. Gualdrón-López, N. Chevalier, and P. A. M. Michels, "Studies on the organization of the docking complex involved in matrix protein import into glycosomes of Trypanosoma brucei," Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 424, no. 4, pp. 781–785, 2012.
- [2] H. Acosta et al., "Proteomic analysis of glycosomes from Trypanosoma cruzi epimastigotes," Mol. Biochem. Parasitol., vol. 229, no. November 2018, pp. 62–74, 2019.
- [3] A. W. Victor Rodwell, David Bende, Kathleen Botham, Peter Kennelly, Harper's Illustrated Biochemistry, VII. PZWŁ, 2018.
- [4] M. Dawidowski et al., "Inhibitors of PEX14 disrupt protein import into glycosomes and kill Trypanosoma parasites," Science (80-.), 2017.
- [5] V. C. Kalel et al., "Inhibitors of glycosomal protein import provide new leads against trypanosomiasis," Microb. Cell, vol. 4, no. 7, pp. 229–232, Jul. 2017.