

## *„Od aminokwasów do białka – badanie wpływu fotoutleniania aminokwasów na modelowe białko”*

### STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM:

Celem pracy było zbadanie procesów beztlenowego utleniania aromatycznych reszt aminokwasowych w układach modelowych i dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) w obecności 3-karboksybenzofenonu (3CB), poprzez zbadanie mechanizmów i produktów trwałych. Zbadano wpływ utworzonych modyfikacji na aktywność GAPDH. Analiza produktów przejściowych tworzonych podczas wygaszania wzbudzonego stanu trypletowego przez aromatyczne reszty aminokwasowe wykonana została z wykorzystaniem techniki nanosekundowej fotolizy błyskowej (LFP). Określono wpływ blokady grup funkcyjnych na powstałe indywidua przejściowe. Powstałe produkty trwałe rozdzielono z wykorzystaniem HPLC i zcharakteryzowano przez MS. Wyniki z układów modelowych porównano do danych otrzymanych dla GAPDH, ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji na Trp, Tyr, His i Phe. Zbadano wpływ fotoutleniania GAPDH w obecności 3CB na jego aktywność. LFP wykazała różnice w stałych szybkości wygaszania i wydajności kwantowej tworzenia różnych przejściowych produktów. Pojawiające się trendy w Tyr, His i Trp są w dużej zgodności z literaturą, gdzie blokowanie grupy aminowej ma duży wpływ na dwa pierwsze aminokwasy (Tyr i His) i brak wpływu na ten ostatni. Eksperymenty z udziałem fenyloalaniny pokazały, że obecność innych, bardziej reaktywnych reszt aminokwasowych w peptydzie chroni ją przed utlenianiem, ze względu ich na większą reaktywność względem trypletu sensybilizatora. Zidentyfikowano produkty trwałe, które dla układów modelowych można podzielić na trzy grupy: (a) kowalencyjnie przyłączony addukt z 3CBH, (b) dimery oraz (c) pozostałe produkty, które nie przypisano do żadnej z powyższych grup, a wynikają z procesów innych niż rekombinacja rodników powstałych po przeniesieniu elektronu. Do charakterystyki produktów trwałych zastosowano spektrometrię mas. Analizując kolejne reszty aminokwasowe w układach modelowych wykazano, że głównym produktem tworzonym podczas utleniania Tyr i Trp są dimery, które w zależności od struktury związku mogą występować w różnych formach izomerycznych. Wykazano także, że im bardziej zablokowana struktura Tyr, czy też Trp, tym więcej izomerów diTyr/diTrp jest tworzone. Produkt Tyr-3CBH obserwowany był tylko dla niektórych związków, gdzie produkt Trp-3CBH był obecny wyłącznie w mieszaninie poreakcyjnej peptydu. Odmienne wyniki uzyskano dla His i Phe, gdzie odblokowana grupa aminowa prowadzi do utworzenia produktów nie przypisanych do dwóch pierwszych grup, a mianowicie produkt 1m-CH2-3CBH oraz benzyl-Phe /benzyl-3CBH. Produkty te tworzone są poprzez rekombinację rodników 3CBH z rodnikami metylo-imidazolowym lub benzylowym. Postuluje się przeniesienie energii z sensybilizatora na N-kończącą pochodną prowadzące do homolitycznego rozpadu pochodnej do odpowiedniego rodnika. Innym produktem scharakteryzowanym w trzeciej grupie związków było utworzenie wiązania podwójnego C=C na Trp lub His. Potwierdzono utworzenie kompleksu w stanie podstawowym pomiędzy GAPDH i 3CB. Elektroforeza dostarczyła informacji na temat zależności pomiędzy czasem naświetlania, a tworzeniem dimerów i wyższych polimerów, oraz pozwoliła dobrać odpowiedni czas naświetlania do analiz. Charakterystyka produktów trwałych (timsTOF) próbek trawionych w roztworze i próbek trawionych w żelu po analizie SDS 5-minutowego naświetlania roztworu GAPDH potwierdziła tworzenie części produktów zidentyfikowanych w produktach modelowych, takich jak 3CBH-aminokwas. Analiza

aminokwasowa w połączeniu z testem Ellmana wykazała, że aminokwasy zawierające siarkę są głównym źródłem uszkodzeń GAPDH, podczas gdy His i Tyr stanowią drugorzędny cel. Test aktywności wykazał, że chociaż GAPDH tworzy kompleks w stanie podstawowym z 3CB, nie wpływa to na jego aktywność, ponadto modyfikacje dostępnych dla roztworu aminokwasów nie zmieniają znacząco aktywności. Główne różnice występują, gdy GAPDH jest naświetlane przez ponad 5 minut, co skutkuje większą liczbą dimerów i kowalencyjnych polimerów.