

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Justyna Grzymska

Badanie wpływu modyfikacji potranslacyjnych
na aktywność wybranych enzymów proteolitycznych

Promotor:
prof. dr hab. Marcin Drąg

Wrocław 2024

Podziękowania

*Dziękuję mojemu promotorowi, **prof. dr. hab. Marcinowi Drągowi**,
za interesującą tematykę badawczą
oraz możliwość pracy w tak prężnym zespole badawczym.*

***dr inż. Wioletcie Rut** za wszystkie cenne rady uzyskane przez ostatnie lata
i wszechstronną pomoc w trakcie realizacji doktoratu.*

***dr inż. Sylwii Modrzyckiej-Gach i dr inż. Mikołajowi Żmudzińskiemu**
oraz pozostałym **Koleżankom i Kolegom z Zespołu**
za to, że zawsze mogłam na Was liczyć
w trakcie pracy w laboratorium i poza nim.*

***Moim Najbliższym** za wiarę we mnie, nieocenione wsparcie
i stworzenie warunków do napisania niniejszej dysertacji.*

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej w ramach projektu: „Challenges in the design of selective activity-based probes for proteolytic enzymes”, projekt TEAM nr POIR.04.04.00-00-40CE/17-00.

*Pracę dedykuję Mojemu Filipowi i Amelce,
Rodzicom oraz Dziadkom.*

To prawdziwe szczęście, że Was mam.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP TEORETYCZNY	9
1.1. Wprowadzenie.....	9
1.2. Proteazy cysteinowe.....	15
1.2.1. Kaspazy.....	19
1.2.1.1. Kaspaza-3 i -7	25
1.2.2. Katepsyny cysteinowe	27
1.2.2.1. Katepsyna S.....	29
1.3. Metody określania specyficzności substratowej proteaz	31
1.3.1. Metody chemiczne określania specyficzności substratowej proteaz.....	32
1.3.1.1. Określenie specyficzności substratowej po stronie nieprimowanej.....	33
1.3.1.2. Określenie specyficzności substratowej po stronie primowanej.....	38
1.3.2. Metody biologiczne określania specyficzności substratowej proteaz	39
1.3.3. Mikromacierze	41
1.3.4. Proteomika i degradomika.....	42
1.4. Markery chemiczne do badania enzymów	44
1.5. Modyfikacje potranslacyjne	49
2. CEL PRACY	56
3. BADANIA WŁASNE.....	58
3.1. Katepsyny.....	58
3.1.1. Analiza kinetyczna tetrapeptydowych analogów sekwencji kontrolnej (Ac-ARLR-ACC) zawierających zmodyfikowane pochodne reszt aminokwasowych w pozycji P1	58
3.1.2. Określenie profilu specyficzności substratowej w pozycjach P4-P2' ludzkich katepsyn	64
3.1.2.1. Preferencje katalityczne ludzkich katepsyn w kieszeniach S4-S2 przy wykorzystaniu kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych (HyCoSuL)	64
3.1.2.2. Określenie specyficzności substratowej katepsyn w kieszeni S1 przy wykorzystaniu zdefiniowanej biblioteki substratów fluorogenicznych	85
3.1.2.3. Badanie specyficzności substratowej kieszeni S1' oraz S2' katepsyn przy wykorzystaniu kombinatorycznej biblioteki substratów typu IQF	93
3.1.3. Zaprojektowanie, synteza oraz analiza kinetyczna tetrapeptydowych substratów dedykowanych katepsynie S.....	104

3.1.4. Zaprojektowanie, synteza i analiza kinetyczna fluorescencyjnego markera chemicznego	108
3.1.5. Podsumowanie	111
3.2. Kaspazy	112
3.2.1. Analiza kinetyczna substratów z fosforylowanymi pochodnymi w peptydach wywodzących się z białek YAP1 i VIME	113
3.2.2. Analiza kinetyczna substratów z fosforylowanymi pochodnymi aminokwasów w peptydach wywodzących się z białka PARP	119
3.2.3. Podsumowanie	124
4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	126
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	129
5.1. Synteza znacznika fluorescencyjnego – Fmoc-ACC-OH	131
5.2. Synteza i analiza substratów fluorogenicznych.....	135
5.2.1. Synteza zdefiniowanej biblioteki Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC dla katepsyn	135
5.2.2. Synteza kombinatorycznej biblioteki typu IQF dla katepsyn.....	142
5.2.3. Określenie profilu specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycjach P4-P2'	147
5.2.4. Synteza zdefiniowanych substratów tetrapeptydowych dla kaspaz oraz katepsyn.....	149
5.2.5. Synteza zdefiniowanych substratów typu IQF dla kaspaz	152
5.3. Badanie aktywności kinetycznej kaspaz oraz katepsyn wobec zdefiniowanych substratów	153
5.4. Wyznaczenie parametrów kinetycznych (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) dla zdefiniowanych substratów	154
5.5. Synteza inhibitora dedykowanego katepsynie S	154
5.6. Badanie aktywności katepsyn wobec zsyntezowanego inhibitora	161
6. STRUKTURY AMINOKWASÓW UŻYTYCH W BIBLIOTEKACH HyCoSuL ORAZ W SUBSTRATACH ZDEFINIOWANYCH	163
7. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	175
8. DOROBEK NAUKOWY	177
9. LITERATURA.....	179

1. WSTĘP TEORETYCZNY

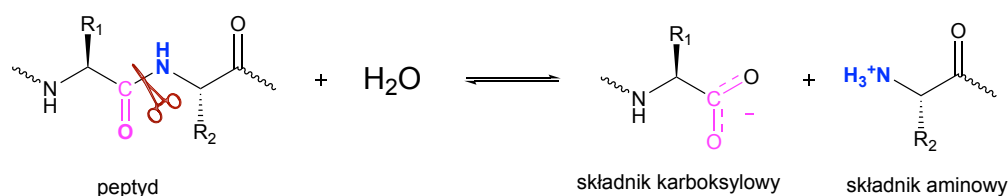
1.1. Wprowadzenie

Organizmy żywe składają się z białek, których ilość na każdym etapie życia komórki musi być ściśle kontrolowana. Uszkodzone bądź błędnie pofałdowane białka są hydrolizowane, a powstające z nich produkty (pojedyncze aminokwasy, dipeptydy lub oligopeptydy) stanowią budulec dla nowych biomolekuł. Dzięki temu białka, które spełniły swoją funkcję, mogą zostać „rozłożone” na aminokwasy, które będą ponownie wykorzystane przez komórkę [1-3]. Reakcja hydrolizy, która jest energetycznie korzystniejsza w porównaniu do syntezy aminokwasów *de novo*, ma kluczowe znaczenie we wzroście czy przebudowie tkanek i komórek. Szacuje się, że w przypadku braku katalizatora, czas hydrolizy peptydu w pH równym 7 może wynieść między dziesięć a nawet tysiąc lat [4, 5]. Dane te jednoznacznie wskazują, że obecność katalizatora jest niezbędna, by mogły zachodzić procesy w komórkach umożliwiające funkcjonowanie całego organizmu. Za reakcję hydrolizy odpowiadają enzymy proteolityczne, określane również jako peptydazy, proteazy czy proteinazy należące do klasy hydrolaz (EC 3.4) [6-8]. Reakcji tej ulegają wiązania amidowe, częściej nazywane wiązaniami peptydowymi, występujące między aminokwasami białek bądź peptydów, a których zadaniem jest połączenie grupy α -aminowej jednej reszty aminokwasowej i grupy α -karboksylowej kolejnej reszty. Enzymy proteolityczne często katalizują również hydrolizę wiązania estrowego – reakcję odmienną, ale pokrewną [4, 9] (rys. 1). Badania prowadzone w ciągu ostatnich 60 lat pokazały, że enzymy proteolityczne nie tylko odpowiadają za degradację niepotrzebnych białek, a tym samym dostarczanie aminokwasów do organizmu, ale również odgrywają kluczową rolę m.in. w procesie replikacji i transkrypcji DNA, podziałach komórkowych, procesach programowanej śmierci komórki, kaskadzie krzepnięcia krwi czy fibrynolizie [10-13].

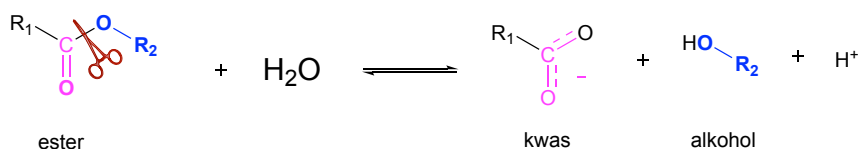
Pierwsze informacje dotyczące enzymów proteolitycznych pojawiły się na początku XX wieku i dotyczyły enzymów trawiennych jamy ustnej, śledziony czy nerek [14-16]. Dzięki nieustannym badaniom skupiającym się na tych enzymach, obecnie wiadomo, że proteazy nie hydrolizują przypadkowych substratów, a są wysoce wyspecjalizowanymi narzędziami molekularnymi kontrolującymi najważniejsze procesy życiowe. Wszelkie zaburzenia w funkcjonowaniu enzymów proteolitycznych, ich niedobór lub nadmiar prowadzą do zmian patofizjologicznych, takich jak: choroby nowotworowe, cukrzyca typu 2, nadciśnienie, choroby sercowo-naczyniowe, zaburzenia

neurologiczne czy stany zapalne [17-22]. By temu zapobiec, enzymy proteolityczne podlegają w organizmach żywych ścisłym regulacjom. Część z nich jest syntetyzowana w formie nieaktywnego prekursora, czyli tzw. zymogenu (proenzymu), który musi ulec aktywacji najczęściej przez inne enzymy proteolityczne poprzez hydrolizę określonego fragmentu białkowego. Do najlepiej poznanych zymogenów można zaliczyć enzymy układu trawiennego, takie jak chymotrypsynogen, pepsynogen czy tripsynogen [23, 24]. Inne mechanizmy kontroli aktywności enzymatycznej to m.in. oddziaływanie z jonami metali [25], oddziaływania z innymi białkami [26], czy modyfikacje potranslacyjne [27]. Podkreśla to tylko, jak istotna jest funkcja proteinaz w regulacji procesów metabolicznych.

Hydroliza wiązania peptydowego:



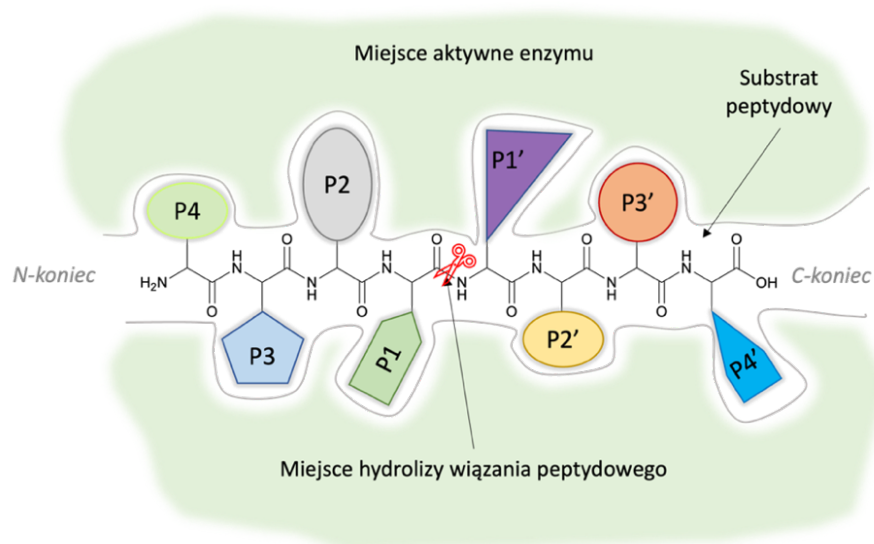
Hydroliza wiązania estrowego:



Rys. 1. Schemat reakcji hydrolizy wiązania peptydowego oraz hydrolizy wiązania estrowego katalizowanych przez enzymy proteolityczne (na podstawie [4]).

Udział enzymów proteolitycznych w tak wielu stanach chorobowych sprawił, że tematyka badawcza licznych naukowców na całym świecie skupiona jest od lat na poszukiwaniu nowych związków wpływających na aktywność tych proteaz i umożliwiających ich dokładne poznanie. Do takich związków zaliczają się najczęściej substraty, markery chemiczne i inhibitory projektowane dla konkretnych enzymów. **Największym wyzwaniem w znalezieniu nowych związków jest nakładająca się specyficzność substratowa enzymów proteolitycznych** powodująca brak selektywności otrzymanych związków chemicznych dedykowanych docelowym proteazom [28, 29]. Enzymy należące do tej samej grupy bardzo często są specyficzne

wobec podobnych sekwencji aminokwasowych, a markery chemiczne czy inhibitory projektowane na ich podstawie często hamują całą grupę enzymów, a nie jeden z nich. Jest to sporą przeszkodą w prowadzeniu badań na liniach komórkowych, gdzie aktywnych jest jednocześnie wiele enzymów z jednej grupy hydrolaz [30]. Tym samym niemożliwe jest wykorzystanie takich związków w celach terapeutycznych na dalszym etapie badań. Przykładem mogą być enzymy z grup kaspaz, np. kaspaza-3 i kaspaza-7 [31], katepsyn, np. katepsyna L i katepsyna V [32] a także niektóre enzymy deubikwytynujące [33]. W celu ułatwienia określania specyficzności substratowej, w 1967 roku Schechter i Berger wprowadzili jednolity system definiowania specyficzności substratowej poprzez wyodrębnienie tzw. kieszeni wiążących oddziałujących z łańcuchami bocznymi aminokwasów. System Schechtera i Bergera jest stosowany powszechnie do dzisiaj [34]. Zgodnie z nim reszty aminokwasowe znajdujące się na N-końcu substratu (Pn,...,P4, P3, P2, P1) wiążą się do kieszeni Sn,..., S4, S3, S2, S1, natomiast reszty od strony karboksylowej (P1', P2', P3', P4',...,Pn') wchodzi w interakcję z kieszeniami S1', S2', S3', S4',..., Sn'. Reakcja hydrolizy wiązania peptydowego zachodzi zawsze pomiędzy pozycją P1 a P1' substratu. Schemat wiązania substratu w centrum aktywnym proteaz przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Schemat wiązania substratu peptydowego w miejscu aktywnym enzymu.

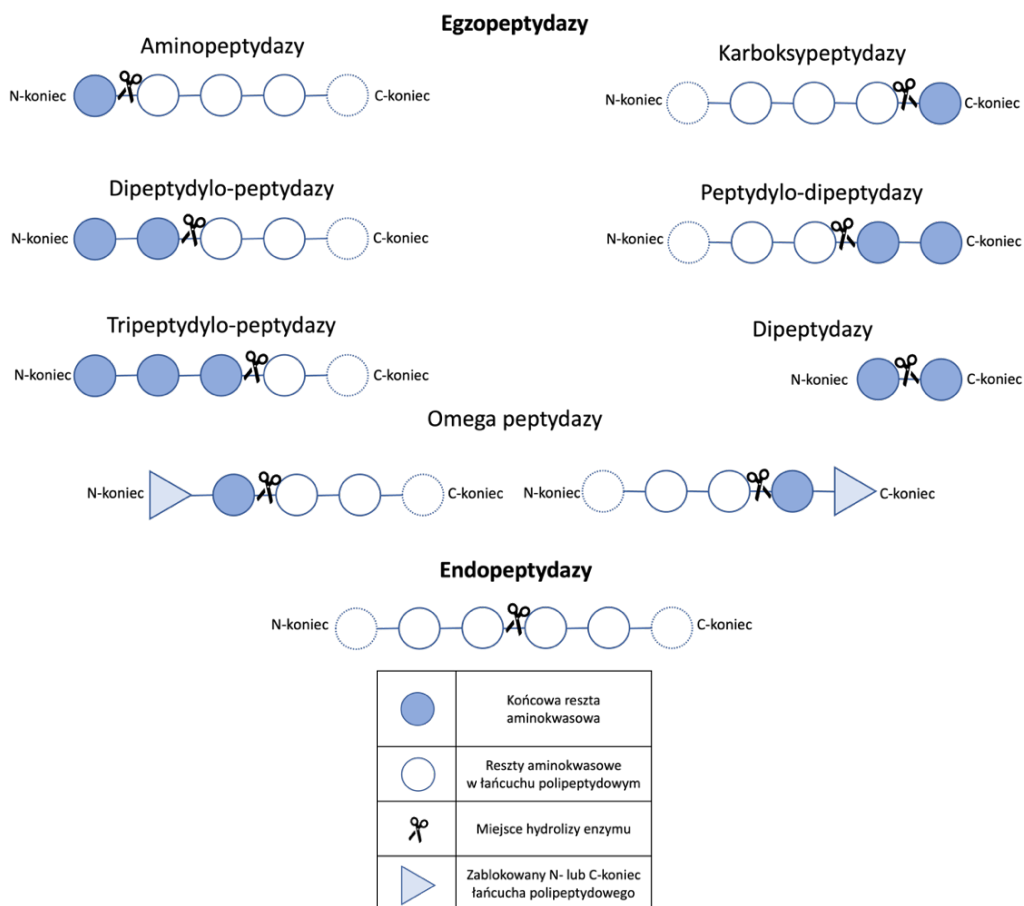
Na podstawie zsekwencjonowanego genomu ludzkiego wykazano, że enzymy proteolityczne są kodowane przez około 2% wszystkich genów, co stanowi 2-4% wszystkich białek ludzkich i odpowiada około 600 proteazom [1, 35]. Są one najbardziej

rozpowszechnioną grupą enzymów. Występują zarówno w organizmach eukariotycznych jak i prokariotycznych. Są kluczowe dla rozprzestrzeniania się bakterii i wirusów. Szczegółowe informacje zawierające mechanizmy działania, struktury, substraty i inhibitory oraz poznane funkcje biologiczne wszystkich proteaz zbierane są w międzynarodowej bazie danych MEROPS utworzonej w 1996 r. Klasyfikacja w niej zawarta oparta jest na systemie trójwarstwowym. Po pierwsze pod uwagę jest brany rodzaj katalizowanej reakcji, w dalszej kolejności struktura enzymu oraz jego indywidualne cechy. Najważniejszy poziom hierarchii w tej bazie to tzw. klan. W jego skład wchodzi proteazy pochodzące od wspólnego przodka. Wśród klanów występują rodziny, w których znajdują się enzymy będące homologami [36, 37].

Enzymy proteolityczne to szeroka grupa białek różniących się od siebie. Nic więc dziwnego, że już w latach 30-tych XX wieku zaproponowano pierwszy podział tej grupy [38]. Związany jest on z miejscem zachodzącej hydrolizy wiązania peptydowego w substracie. Wyróżnia się w nim egzopeptydazy działające na pierwsze, drugie lub trzecie wiązanie peptydowe od N-końca bądź C-końca oraz endopeptydazy, które hydrolizują dalsze niż trzecie wiązanie amidowe wewnątrz białek [38, 39]. Do egzopeptydaz obecnie zalicza się 9 podklas, jednak najliczniejszą grupą są aminopeptydazy i karboksypeptydazy katalizujące reakcję hydrolizy odpowiednio od N- lub C-końca [40]. Podział tych enzymów wyróżniono w tab. 1, a schemat ich działania na rys. 3. Spotykane są również enzymy wykazujące zarówno aktywności egzopeptydazy jak i endopeptydazy. Przykładem może być katepsyna B [41].

Tab. 1. Podklasy egzopeptydaz i endopeptydaz (na podstawie [42]).

Egzopeptydazy		Endopeptydazy	
EC 3.4.11.	aminopeptydazy	EC 3.4.21.	endopeptydazy serynowe
EC 3.4.12.	karboksypeptydazy	EC 3.4.22.	endopeptydazy cysteinowe
EC 3.4.13.	dipeptydazy	EC 3.4.23.	endopeptydazy aspartyłowe
EC 3.4.14.	dipeptydylo-peptydazy tripeptydylo-peptydazy	EC 3.4.24.	metaloendopeptydazy
EC 3.4.15.	peptydylo-dipeptydazy	EC 3.4.25.	endopeptydazy treoninowe
EC 3.4.16.	karboksypeptydazy typu serynowego	EC 3.4.99.	endopeptydazy o nieznanym mechanizmie katalizy
EC 3.4.17.	metalokarboksypeptydazy		
EC 3.4.18.	karboksypeptydazy typu cysteinowego		
EC 3.4.19.	omega-peptydazy		

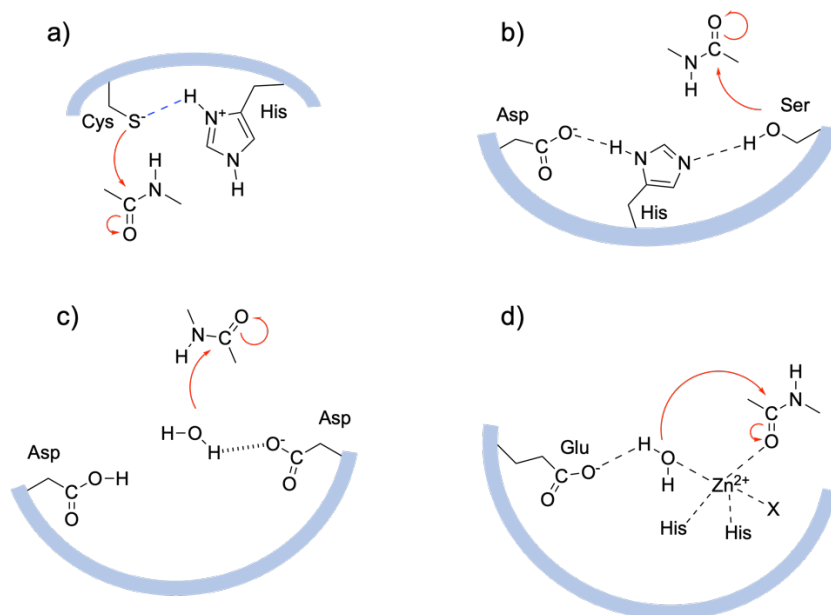


Rys. 3. Aktywności endo- i egzopeptydaz (na podstawie [3, 42]).

Kolejny podział, zaproponowany pod koniec XX wieku, uwzględnia mechanizm katalityczny hydrolizy wiązania peptydowego. W 1960 roku wyróżniono cztery grupy proteaz: proteazy serynowe (EC 3.4.21), cysteinowe (EC 3.4.22), aspartylowe (EC 3.4.23) oraz metaloproteazy (EC 3.4.24) [43] (rys. 4). W 1995 r. przedstawiono strukturę proteasomu i wyszczególniono kolejną, piątą grupę proteaz treoninowych (EC 3.4.25) [44-45], a w 2004 r. Fujinaga zaproponował szóstą grupę - proteazy glutaminowe [46]. Grupy enzymów proteolitycznych wyróżnione w tym podziale przeprowadzają reakcję hydrolizy na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest kataliza niekowalencyjna, gdzie do efektywnej proteolizy wykorzystuje się cząsteczkę wody, która zostaje aktywowana przez kwasy karboksylowe znajdujące się w łańcuchach bocznych aminokwasów centrum aktywnego (proteazy glutaminowe i aspartylowe) lub atomu metali (metaloproteazy). Aktywowana cząsteczką wody pełni rolę nukleofila w procesie hydrolizy. Druga grupa enzymów, do której należą proteazy cysteinowe, serynowe oraz treoninowe, wykorzystuje katalizę kowalencyjną. Ugrupowanie hydroksylowe (-OH) lub tiolowe (-SH), występujące w łańcuchu bocznym aminokwasu

obecnego w centrum aktywnym enzymu, pełni funkcję nukleofila. Proces hydrolizy zachodzi z utworzeniem wiązania kowalencyjnego między węglem karbonylowym substratu a nukleofilem. Enzym ulega przejściowej modyfikacji chemicznej ulegając acylacji cząsteczką substratu [4, 29, 47, 48].

W ostatnich latach wyszczególniono kolejne dwie grupy enzymów proteolitycznych – liazy asparaginowe [49] i proteazy „ukryte” (ang. *cryptic proteases*) [50]. Liazy asparaginowe przeprowadzają reakcję autoprosesowania (rozszczenie wiązania peptydowego w swojej strukturze) wykorzystując resztę asparaginy pełniącą funkcję nukleofila miejsca aktywnego. W reakcji tej następuje cyklizacja asparaginy atakującej C-końcowe wiązanie peptydowe. Utworzenie pierścienia sukcyimidowego prowadzi do uwolnienia dwóch potomnych fragmentów enzymu [49]. Proteazy ukryte są ostatnią grupą enzymów, której naturalne substraty, mechanizm proteolizy, funkcja fizjologiczna czy struktura nie zostały jeszcze poznane i opisane [50].



Rys. 4. Atak nukleofila w centrum aktywnym proteaz cysteinowych (a), proteaz serynowych (b), proteaz aspartylowych (c) oraz metaloproteaz (d). Proteazy aspartylowe, glutaminowe oraz metaloproteazy wykorzystują mechanizm katalizy niekowalencyjnej, gdzie rolę nukleofila pełni aktywowana cząsteczka wody. Proteazy serynowe, cysteinowe oraz treoninowe korzystają z mechanizmu katalizy kowalencyjnej, w którym rolę nukleofila pełni ugrupowanie hydroksylowe (proteazy serynowe oraz treoninowe) lub tiolowe (proteazy cysteinowe) (na podstawie [48]).

1.2. Proteazy cysteinowe

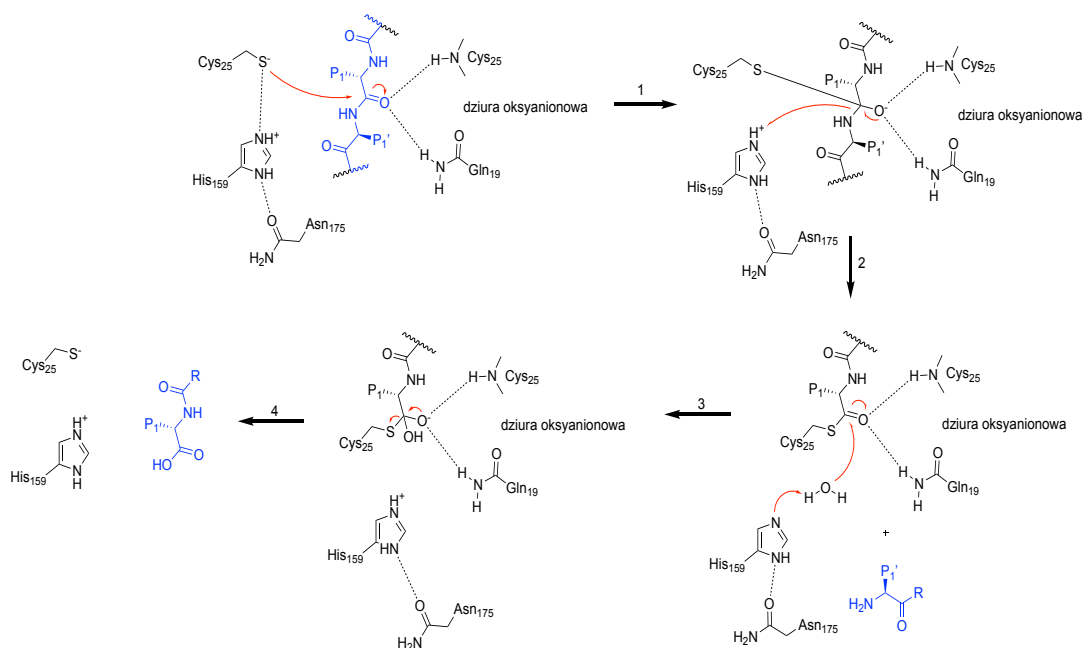
Proteazy cysteinowe (EC 3.4.22) nazywane również proteazami sulfhydrylowymi lub tiolowymi, występują we wszystkich organizmach żywych. Są białkami o masie zazwyczaj 21-30 kDa, wykazującymi największą aktywność w pH 4-6,5. Ze względu na obecność grupy tiolowej i jej skłonność do utleniania się, do ich pełnej aktywności wymagana jest obecność reduktora. W komórkach rolę taką pełni glutation, natomiast w badaniach *in vitro* wymagany jest dodatek ditiotretolu lub 2-merkaptoetanolu [51]. Oprócz przyspieszania reakcji hydrolizy wiązania amidowego w białkach, proteazy cysteinowe spełniają szereg różnych funkcji biorąc udział w procesach patologicznych oraz fizjologicznych [52]. Ich zachwiana aktywność została zaobserwowana podczas różnych stanów patologicznych, takich jak stwardnienie rozsiane, nowotwory, reumatoidalne zapalenie stawów, osteoporoza czy zaburzenia neurologiczne [19, 53].

Jak już wspomniano wcześniej, enzymy proteolityczne, które wykorzystują katalizę kowalencyjną do efektywnej hydrolizy klasyfikuje się ze względu na rodzaj nukleofilowej reszty aminokwasowej w centrum aktywnym. Proteazy treoninowe posiadają w nim resztę treoniny, proteazy serynowe – resztę seryny, a proteazy cysteinowe – resztę cysteiny. Proteazy cysteinowe rozpoczynają mechanizm reakcji hydrolizy od utworzenia pary jonowej przez resztę cysteiny oraz histydyny ($S^- \dots H^+Im$). Grupa sulfhydrylowa cysteiny jest deprotonowana i aktywowana przez pierścień imidazolowy histydyny, dzięki czemu powstaje anion tiolanowy, który przeprowadza atak nukleofilowy na elektrofilowy atom węgla znajdujący się w grupie karbonylowej wiązania peptydowego ($C=O$). Atak nukleofilowy powoduje zmianę liczby atomów związanych z atomem tego węgla z trzech na cztery, co wiąże się również ze zmianą geometrii z płaskiej trójkątnej na tetraedryczną. Powstały niestabilny tetraedryczny produkt pośredni ma zlokalizowany ładunek ujemny znajdujący się na atomie tlenu z grupy karbonylowej. Jest on stabilizowany przez ugrupowania NH szkieletu białka, co zachodzi w tzw. dziurze oksyanionowej. Proton z dodatnio naładowanej reszty histydyny jest przeniesiony na grupę aminową, przez co wiązanie peptydowe ulega rozerwaniu. Tetraedryczny produkt pośredni rozpada się i tworzony jest acyloenzym. Uwolniony zostaje N-końcowy fragment substratu. Kolejnym stadium mechanizmu jest deacylacja, która rozpoczyna się od reakcji acyloenzymu z cząsteczką wody. Grupa estrowa acyloenzymu ulega hydrolizie. Reszta histydyny usuwa proton z cząsteczki

wody, a powstały anion hydroksylowy OH^- atakuje atom węgla grupy karbonylowej z grupy acylowej, przez co tworzy się niestabilny tetraedryczny produkt pośredni, którego rozpad umożliwia powstanie produktu z grupą karboksylową. Ostatnim etapem jest uwolnienie produktu i zdeprotonowanie reszty cysteiny, dzięki czemu enzym jest gotowy do kolejnej katalizy [4, 54, 55]. Oprócz diady katalitycznej, bardzo często w miejscu aktywnym proteaz cysteinowych spotykana jest także triada katalityczna. Najczęściej funkcję trzeciego aminokwasu pełni reszta kwasu asparaginowego (Asp) lub asparaginy (Asn), która pomaga ustawić pierścień histydyny w odpowiedniej orientacji w stosunku do reszty cysteiny dzięki zdolności do tworzenia wiązań wodorowych.

Proteazy cysteinowe są enzymami aktywowanymi *a priori* - para jonowa tworzona przez resztę cysteiny oraz histydyny jest obecna w stanie podstawowym enzymu i nie jest zależna od interakcji z substratem jak ma to miejsce w przypadku proteaz serynowych [55, 56]. Klasycznym przykładem mechanizmu działania proteaz cysteinowych jest mechanizm katalizy wykorzystywany przez papainę, której reszty triady katalitycznej to Cys²⁵, His¹⁵⁹ oraz Asn¹⁷⁵, a dziura oksyanionowa tworzona jest przez Gln¹⁹ oraz Cys²⁵. Schemat mechanizmu hydrolizy peptydu przez papainę przedstawiono na rys. 5.

Papaina z *Carica papaya* była pierwszą wyizolowaną, scharakteryzowaną i opisaną proteazą cysteinową [57]. Wraz z katepsynami należy ona do najliczniejszej grupy proteaz cysteinowych. Wśród ssaczy proteaz cysteinowych główną grupę stanowią katepsyny lizosomalne. Tak jak pozostałe enzymy proteolityczne, tak proteazy cysteinowe posiadają mechanizm kontrolujący ich nadmierną aktywność. Syntezowane są w formie nieaktywnych zymogenów lub prekursorów, które w swojej strukturze zawierają prodomenę, która blokuje dostęp substratu do miejsca aktywnego enzymu [58]. Poza rolę endogennego inhibitora, prodomena może uczestniczyć również w fałdowaniu białek bądź sortowaniu wewnątrzkomórkowym [59, 60]. Aktywacja zymogenu odbywa się za pomocą cząsteczek pomocniczych, np. jonów metali z udziałem innych enzymów lub poprzez procesowania autokatalityczne, do których wymagany jest spadek pH [61, 62].



Rys. 5 Mechanizm katalizy hydrolizy wiązania peptydowego przeprowadzany przez papainę z wykorzystaniem triady katalitycznej Cys²⁵-His¹⁵⁹-Asn¹⁷⁵ oraz dziury oksyanionowej tworzonej przez Gln¹⁹ i Cys²⁵.

Proteazy cysteinowe zostały pogrupowane na klan, w których wyróżnia się jeszcze rodziny, do których przydzielane są enzymy. Klan CA to największy klan zawierający ponad 20 rodzin, a jego przedstawicielem jest wspomniana papaina [63]. Przyporządkowanie do tego klanu odbywa się poprzez wykazanie podobieństwa struktury krystalicznej danego enzymu proteolitycznego do papainy. Papaina składa się z dwóch domen połączonych miejscem aktywnym. Domena C-terminalna ma kształt β -beczułki, natomiast domena N-terminalna złożona jest z α -helisy. Nukleofilowa reszta cysteiny znajduje się na początku α -helisy, a katalityczna histydyna na początku β -beczułki. Jeśli dany enzym nie ma rozwiązanej struktury trzeciorzędowej, porównuje się wówczas sekwencję pierwszorzędową, gdyż cechą charakterystyczną białek z tego klanu jest podobny motyw aminokwasowy pojawiający się wokół katalitycznej reszty cysteiny. Ostatnim sposobem identyfikacji peptydaz w klanie CA jest podatność na inhibicję przez małowcząsteczkowy związek E-64. Tylko proteazy z klanu CA są nieodwracalnie inhibitowane przez ten związek [64]. Co prawda, cystatyny też są inhibitorami enzymów należących do tego klanu, jednak nie wykazują one selektywności, gdyż legumaina (klan CD) również jest hamowana przez te białka [65].

Drugim co do wielkości klanem jest klan CD. Należą do niego m.in. wspomniana legumaina, separaza, kaspazy czy gingipaina G. Wszystkie te proteazy,

posiadają w miejscu aktywnym diadę katalityczną złożoną z histydyny i cysteiny. Oprócz struktury pierwszorzędowej i charakterystycznego otoczenia aminokwasowego wokół reszty cysteiny czynnikiem przydzielającym do tego klanu jest struktura trzeciorzędowa. Na przykładzie kaspazy-1 pokazano, że składa się ona z charakterystycznego motywu typu α/β , co jest niespotykane w pozostałych klanach. Co więcej, wszystkie enzymy należące do tego klanu są endopeptydazami i preferują konkretną resztę aminokwasową w pozycji P1, np.: kaspazy wymagają kwasu asparaginowego, legumaina asparaginy, a separaza argininy [66]. W przeciwieństwie do enzymów z klanu CA, klan CD jest niewrażliwy na działanie inhibitora E-64.

W skład klanu CE wchodzi siedem rodzin proteaz cysteinowych, które posiadają w miejscu aktywnym cztery reszty katalityczne: histydynę, cysteinę, glutaminę, kwas asparaginowy lub asparaginę. Proteazy w klanie CL tworzą dwie rodziny składające się z peptydaz bakteryjnych hydrolizujących peptydy ściany komórkowej bakterii. Miejsce aktywne tworzone jest przez reszty w kolejności: histydyna i cysteina. Ich struktura trzeciorzędowa to β -beczułka otoczona α -helisami [67]. Pozostałe klany proteaz cysteinowych (CF, CM, CN, CO, CP, CQ i CR) składają się z jednej rodziny proteaz. Miejsce aktywne klanu CF składa się z kwasu glutaminowego, cysteiny oraz histydyny (w tej kolejności w sekwencji), co odróżnia go od pozostałych klanów. W klanie CM aktywna peptydaza jest homodimerem i jest zbudowana z N-końcowej α -helisy, C-końcowej β -harmonijki i długiego linkera. Miejsce aktywne zbudowane jest z histydyny i kwasu glutaminowego znajdującego się na N-końcu jednego monomeru oraz cysteiny znajdującej się na C-końcu drugiego. Oznacza to, że tworzy się ono między dwoma podjednostkami w dimerze. Trzeciorzędowa struktura pokazała również, że do aktywności niezbędny jest jon cynku. Klan CN zawiera wirusowe endopeptydazy poliproteinowe, których miejsce katalityczne tworzy cysteina i histydyna. Do klanu CO należą cysteinowe egzopeptydazy, m.in. bakteryjny enzym modyfikujący ścianę komórkową (dipeptydylo-peptydaza VI z bakterii *Lysinibacillus sphaericus*). Struktura trzeciorzędowa pokazała podobieństwo do papainy wykazując motyw α -helisy z nukleofilową cysteiną i β -beczułki z katalityczną resztą histydyny, jednak określono ją jako bardziej „prymitywną”. W papainie katalityczna cysteina znajduje się na C-końcu, w klanie CO występuje ona na N-końcu helisy, co oznacza, że sekwencja przebiega w odwrotnym kierunku niż w papainie. Zakłada się, że podobieństwo strukturalne wywodzi się od ewolucji zbieżnej,

a nie rozbieżnej, dlatego białka te przypisuje się do osobnego klanu. Ostatnim klanem jest klan CP. Należą do niego izopeptydazy. Diada katalityczna składa się z histydyny i cysteiny (w tej kolejności w sekwencji) i występuje w odwrotnej kolejności niż w papainie. Istotną różnicą jest również fakt, że do odpowiedniej orientacji pierścienia imidazolowego histydyny nie jest wymagana trzecia reszta w miejscu aktywnym. Katalityczna cysteina znajduje się na N-końcu α -helisy, a histydyna na β -beczułce [37, 67]. W bazie MEROPS wyróżnione są również klany CQ i CR, których reszty katalityczne występują odpowiednio w kolejności kwas glutaminowy, histydyna i cysteina (CQ) oraz histydyna i cysteina (CR) [37].

Istnieje kilka innych rodzin proteaz cysteinowych, które nie mają rozwiązanych struktur trzeciorzędowych i zbyt mało wiadomo na temat mechanizmu działania ich centrum aktywnego, by można było je przypisać do konkretnego klanu. Aktualnie nieprzeznaczonych jest 11 rodzin (C7, C8, C23, C27, C36, C42, C49, C75, C106, C116 i C118) [37].

1.2.1. Kaspazy

Kaspazy należą do wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych (EC 3.4.) z grupy proteaz cysteinowych (EC 3.4.22), które zostają aktywowane przez odpowiednie sygnały zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowe hydrolizując wiązania peptydowe i degradując tym samym białka. Zaliczane są do endoproteaz, które ściśle preferują kwas asparaginowy w pozycji P1 hydrolizując tym samym substraty po jego karboksylowej stronie, rzadziej po C-końcowej stronie kwasu glutaminowego i w rzadkich przypadkach po resztach fosfoseryny [31, 68-70]. Ich nazwa pochodzi od właściwości katalitycznych tych enzymów (ang. *caspases* – od angielskich słów *cysteiny* i *aspartate-specific proteinase*, „c” odnosi się do nukleofilowej cysteiny obecnej w miejscu aktywnym, a połączenie „asp” i „ase” odnosi się do hydrolizy wiązania peptydowego po karboksylowej stronie kwasu asparaginowego) [71]. Historia tej grupy proteaz rozpoczęła się w 1993 r., gdy odkryto i scharakteryzowano enzym konwertujący interleukinę 1 β (nazwany później kaspazą-1) [72,73]. Zapoczątkował on nową klasę proteaz cysteinowych, która ściśle wymagała obecności Asp w pozycji P1. Dodatkowo wykazano, że indukcja programowanej śmierci komórek ssaczy może być wywołana zwiększoną ekspresją tego białka [74]. Niezależnie zidentyfikowano gen CED-3 z *C. elegans* kodujący białko biorące udział w programowanej śmierci komórki.

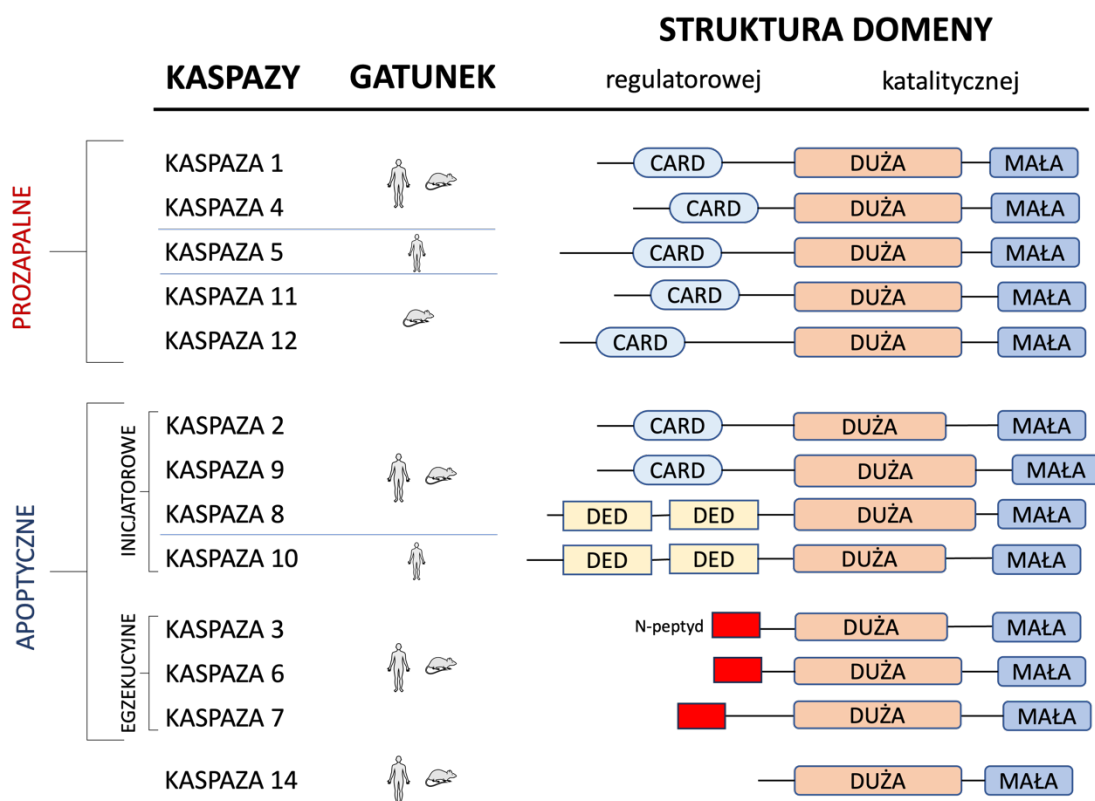
Podobieństwa funkcjonalne i strukturalne CED-3 oraz kaspazy-1 wykazały, że są one homologami [75].

Opisanie tych enzymów zapoczątkowało okres intensywnych badań. Aktualnie wyróżnia się 11 kaspaz ludzkich (kaspaza-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -14) oraz 10 kaspaz mysich (kaspaza -1, -2, -3, -6, -7, -8, -9, -11, -12, -14). Wszystkie ludzkie kaspazy są syntetyzowane jako zymogeny aktywowane w konkretnych warunkach w cytozolu. Składają się one z N-końcowej prodomeny, małej podjednostki o masie około 10 kDa nazywanej p10 i dużej podjednostki o masie około 20 kDa, p20. W wielu prokaspazach podjednostki p10 i p20 są oddzielone krótką sekwencją. W momencie aktywacji kaspaz przez inne enzymy dochodzi do oddzielania podjednostek p10 oraz p20 i usunięcia prodomeny poprzez hydrolizę proteolityczną. Miejsce aktywne odpowiedzialne za hydrolizę znajduje się w podjednostce p20 [76, 77].

Kaspazy można sklasyfikować korzystając z kilku podziałów w oparciu o preferencję substratową, położenie w szlakach sygnalizacyjnych, przypuszczalną funkcję, długość prodomen, budowę zymogenów czy pokrewieństwo genetyczne [78]. Pierwszy podział, oparty na najważniejszych funkcjach, wyróżnia kaspazy prozapalne i apoptotyczne. Kaspazy prozapalne regulują dojrzewanie cytokin w odpowiedzi na stany zapalne i należą do nich kaspaza-1, -4, -5, -11 i -12, natomiast kaspazy apoptotyczne odpowiadają za przekazywanie sygnałów w programowanej śmierci komórki (kaspaza-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10). Kaspaza-14 bierze udział w procesie keratynizacji (rogowacenia). Kaspazy pełniące funkcję w szlaku apoptotycznym dzieli się dalej na kaspazy efektorowe (wykonawcze) – kaspaza-3, kaspaza-6 oraz kaspaza-7 oraz kaspazy inicjatorowe – kaspaza-2, -8, -9, -10. Te ostatnie można jeszcze podzielić na enzymy biorące udział w szlaku wewnętrznym (kaspaza-9) oraz w szlaku zewnętrznym (kaspaza-2, -8 oraz -10).

Kolejną metodą klasyfikacji kaspaz jest ich podział na podstawie długości prodomen. Wyróżnia się kaspazy zbudowane z krótkich prodomen (kaspazy-3, -6, -7) oraz z długich (kaspaza -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12). Kaspazy efektorowe posiadają jedynie domenę katalityczną (małą i dużą) oraz N-peptyd. Ich aktywacja zachodzi na drodze specyficznej proteolizy. Kaspazy egzekucyjne są zazwyczaj aktywowane przez kaspazy inicjatorowe w miejscu łączącym dużą domenę z małą (ang. *linker domain*) [79, 80], chociaż co ciekawe, również kaspaza-3 ma zdolność do aktywacji prokaspazy-7, gdyż linker peptydowy łączący małą i dużą domenę odpowiada specyficzności substratowej kaspazy-3 [81]. Kaspazy inicjatorowe zbudowane

są z dwóch domen: katalitycznej (małej i dużej) oraz regulatorowej umożliwiającej wiązanie się z odpowiednim kompleksem. Domeny regulatorowe zawierają charakterystyczny motyw białkowy: domenę rekrutacji kaspaz CARD (ang. *caspase recruitment domain*) lub domenę śmierci DED (ang. *death effector domain*). Na rys. 6 schematycznie przedstawiono pierwszorzędowe struktury kaspaz.



Rys. 6 Schematyczne przedstawienie pierwszorzędowej struktury kaspaz (na podstawie [76, 82]).

Z procesami proliferacji i śmierci komórek spotykamy się w każdym organizmie. Zachowanie homeostazy między podziałem, różnicowaniem, dojrzewaniem i śmiercią komórek umożliwia ich prawidłowe funkcjonowanie. Śmierć komórki może zachodzić przez szereg różnych szlaków, m.in. nekroptozy, nekrozy, autofagii czy apoptozy [83]. Apoptoza jest mechanizmem programowanej śmierci komórkowej. Jest to kontrolowany genetycznie, wysoce zachowany ewolucyjnie, wieloetapowy proces wymagający wyspecjalizowanej maszynerii komórkowej. Stanowi on jeden z głównych elementów utrzymania równowagi zapewniającej prawidłowy rozwój organizmu. Jest niezbędny do zapewnienia ilościowej i jakościowej kontroli nad komórkami usuwając te niepotrzebne lub uszkodzone. Apoptoza odgrywa kluczową

rolę np. w embriogenezie, morfogenezie czy organogenezie [84]. Dokładny opis tego procesu pojawił się w 1972 r. Kerr, Wyllie i Currie zaproponowali wówczas termin „apoptoza” i przedstawili zmiany morfologiczne zachodzące w komórkach. Wykazali oni także, że procesowi temu nie podlegają tylko uszkodzone komórki, ale również te, które są zdrowe i występują w nadmiarze [85]. Było to przełomowe odkrycie, gdyż do tej pory uważano, że w organizmach zachodzi wyłącznie nekroza. W 2002 r. przyznano Nagrodę Nobla Brennerowi, Sulstonowi i Horvitzowi za identyfikację najważniejszych genów, które odpowiadają za proces apoptozy [86].

Obecnie wiadomo, że głównymi enzymami biorącymi udział w apoptozie są kaspazy. Uczestniczą one w kaskadzie reakcji biochemicznych wywoływanej bodźcami proapoptycznymi. Enzymy te przeprowadzają reakcje hydrolizy skutkującą całkowitym rozkładem białek. Proces apoptozy może być indukowany wieloma ścieżkami. Wpływa na to rodzaj komórki oraz czynniki aktywujące. Najlepiej poznane ścieżki apoptozy to szlak wewnątrzkomórkowy nazywany mitochondrialnym oraz szlak zewnątrzkomórkowy nazywany również receptorowym. Wyróżnia się także szlak sfigomielinowo-ceramidowy, pseudoreceptorowy z udziałem granzymów i perforyn oraz szlak aktywowany stresem [83, 87-89].

Szlak wewnętrzny jest uruchomiany w odpowiedzi na wewnętrzne czynniki komórkowe takie jak stres metaboliczny lub genotoksyczny. W wyniku np. wolnych rodników, wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, uszkodzenia DNA, toksyn czy zaburzonej równowagi elektrolitycznej dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej. Cytoplazmatyczne białka apoptotyczne (BID i BAX) rozpoznają sygnał inicjatorowy i tworzą pory w błonie uwalniając zawartość macierzy mitochondrialnej. Białko BAK, pochodzące z wnętrza mitochondrium, powiększa utworzone w błonie pory, co powoduje całkowite uwolnienie cytochromu C, który jest jednym z najistotniejszych czynników apoptotycznych [90, 91]. W cytoplazmie cytochrom C łączy się z C-końcem białka indukującym apoptozę – Apaf-1 (ang. *Apoptotic protease activity factor-1*), do którego przyłącza się również cząsteczka ATP lub dATP. Na N-końcu białka Apaf-1 znajduje się domena CARD, która umożliwia przyłączenie się prokaspazy-9. Powstały heptameryczny kompleks nazywany jest apoptosomem. Apoptosom wykazuje pełną dojrzałość katalityczną, wskutek czego aktywacji ulegają kaspazy efektorowe degradujące kluczowe białka w komórce prowadząc do jej śmierci [92].

W przypadku szlaku zewnątrzkomórkowego wymagana jest obecność tzw. błonowych receptorów śmierci DR (ang. *death receptor*) znajdujących się po zewnętrznej stronie błony komórkowej, które wiążą się ze swoimi ligandami będącymi zazwyczaj bodźcami apoptotycznymi. Receptory te należą do nadrodziny receptorów TNF (ang. *tumor necrosis factor*) i charakteryzują się wewnątrzkomórkową domeną śmierci DD (ang. *death domain*). Utworzenie kompleksu ligand-receptor rozpoczyna proces apoptozy. Tworzy się kompleks DISC (ang. *death inducing signaling complex*), który zawiera białka adaptorowe FADD oraz RAIDD. Do domeny FADD wiążą się domeny prokaspazy-10 oraz -8, natomiast do domeny RAIDD wiąże się prokaspaza-2. Następuje lokalne zwiększenie stężenia prokaspazy-2, -8 i -10, co skutkuje ich aktywacją. Aktywne kaspazy inicjatorowe są uwalniane do komórki i aktywują kaspazy efektorowe [81, 93, 94].

Czasami szlak zewnętrzny łączy się ze szlakiem wewnętrznym. Dzieje się to w sytuacji, gdy sygnał pochodzący z receptorów śmierci jest zbyt słaby na uruchomienie kaskady kaspaz. Aktywna kaspaza-8 hydrolizuje wówczas N-koniec białka BID, w wyniku czego powstaje postać tBID, która translokuje się do mitochondrium, co jest sygnałem na uwolnienie cytochromu C do cytoplazmy. Rozpoczyna się wewnętrzny szlak apoptozy. Powstałe białko tBID wzmacnia działanie białek BAX oraz BAK i jest stukrotnie efektywniejsze w uwalnianiu cytochromu C niż jego niehydrolizowana postać [95]. Uproszczony schemat szlaku zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowego przedstawiono na rys. 7.

Niezależnie czy dochodzi do aktywacji kaspazy-9 na drodze wewnątrzkomórkowej, czy kaspazy-2, -8, -10 na drodze zewnątrzkomórkowej, cel jest taki sam – aktywacja kaspaz egzekucyjnych (kaspazy -3, -7, -6). Należy jednak pamiętać, że na każdym etapie aktywacji poszczególnych prokaspaz występują endogenne inhibitory IAP (ang. *inhibitors of apoptosis protein*), które kontrolują szybkość inicjacji apoptozy. Białka te posiadają domeny BIR (ang. *baculoviral IAP repeat*) służące do inhibicji konkretnych kaspaz – domena BIR3 jest specyficzna względem kaspazy-9, a domena BIR2 odpowiada za inhibicję kaspazy-3 i -7 [96-100].

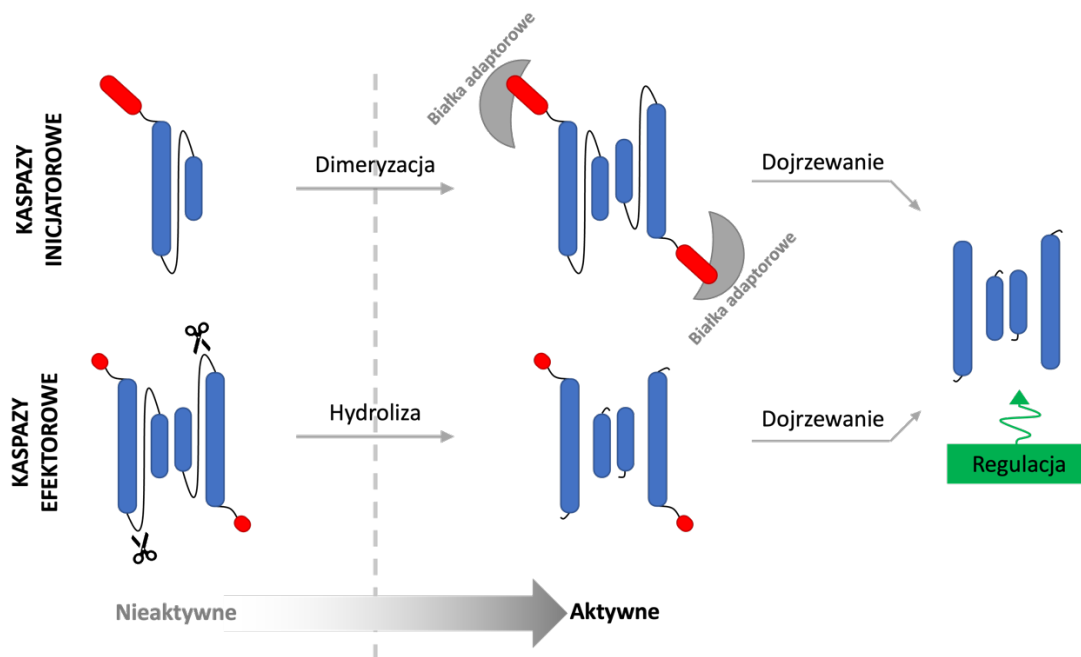
Pyroptoza, czyli programowana śmierć komórki wywołująca stan zapalny, została opisana pod koniec XX wieku. Po raz pierwszy zaobserwowano ją w makrofagach jako odpowiedź na infekcję bakteryjną [104, 105]. Jest to proces zależny od kaspaz, chociaż początkowo uważano, że jest on związany tylko z kaspazą-1. Ostatnie badania pokazały jednak, że inne kaspazy, m.in. kaspaza-3, -4, -5, -6, -8, -9, -11 mogą również pośrednio lub bezpośrednio odpowiadać za proces pyroptozy w różnych komórkach i odgrywać główną rolę we wrodzonej odporności i powstawaniu nowotworów [106]. Proces tej śmierci komórkowej uważany jest za pewnego rodzaju odpowiedź immunologiczną na ostre zakażenie wirusowe lub bakteryjne, która ma na celu usunięcie wewnątrzkomórkowych patogenów czy makrofagów obciążonych drobnoustrojami. Aktywowane kaspazy hydrolizują substraty białkowe (białka z rodziny gazdermin), które tworzą pory w błonie komórkowej. Dochodzi do napływu wody i puchnięcia komórki, które kończy się uwolnieniem wewnątrzkomórkowych cytokin prozapalnych [107]. W przeciwieństwie do apoptozy dochodzi tutaj do zaburzenia ciągłości błony komórkowej.

1.2.1.1. Kaspaza-3 i -7

Kaspazę-3 niezależnie odkryły trzy zespoły badawcze w latach 90-tych, dlatego enzym ten występuje również pod nazwami: CPP32, apopaina, Yama, SCA-1 czy LICE [108-110]. Równolegle opisana została kaspaza-7, którą można spotkać także pod nazwami: Mch3, ICE-LAP-3, CMH-1 [110, 111]. Dostyć szybko okazało się, że zarówno kaspaza-3 jak i kaspaza-7 biorą udział w programowanej śmierci komórki należąc wraz z kaspazą-6 do tzw. kaspaz efektorowych. Badania pokazały, że myszy z podwójnym nokautem kaspazy-3 i -7 nie przeżywają fazy embrionalnej, natomiast w przypadku nokautu kaspazy-3 i -6 (obecna kaspaza-7) oraz kaspazy-6 i -7 (obecna kaspaza-3) są stabilne, co wskazuje, że obecność tych proteaz jest kluczowa do prawidłowego rozwoju komórki [112].

Enzymy te są syntezowane jako nieaktywne zymogeny, a w ich strukturze wyróżnia się sekwencję N-końcową, dużą podjednostkę katalityczną (p20), łącznik między podjednostkami oraz małą podjednostkę katalityczną (p10). W przeciwieństwie do kaspaz inicjatorowych oraz prozapalnych, które zbudowane są z długiej prodomeny składającej się z od 80 do 219 reszt aminokwasowych oraz zawierających motyw domeny śmierci lub domeny rekrutacji kaspaz, kaspaza-3 oraz -7 posiadają krótką

prodomeń (odpowiednio 28 i 23 reszty aminokwasowe). Podział ze względu na długość prodomeny pokrywa się z mechanizmem aktywacji enzymów. Kaspazy o długich prodomenach aktywowane są poprzez dimeryzację (przed aktywacją występują jako monomery), natomiast te o krótkich prodomenach aktywowane są poprzez hydrolizę domeny (nieaktywne występują w formie dimerycznych zymogenów, rys. 8) [113, 114].



Rys. 8 Schemat mechanizmu aktywacji kaspaz inicjatorowych i efektorowych (na podstawie [113]).

Kaspaza-3 i -7 w formie aktywnej to dimery z dwoma małymi i dużymi podjednostkami katalitycznymi oraz dwoma równocennymi miejscami aktywnymi. Oba enzymy wykazują nakładającą się specyficzność substratową, co oznacza, że w danych pozycjach rozpoznają takie same reszty aminokwasowe. Jak pokazały badania profilu specyficzności substratowej, kaspaza-3 oraz kaspaza-7 hydrolizują wiązanie peptydowe po karboksylowej stronie kwasu asparaginowego, a w pozycji P1' preferują glicynę, serynę lub alaninę [115]. Do efektywnej hydrolizy wymagają również kwasu asparaginowego w pozycji P4. W pozycjach P2 oraz P3 nie są tak restrykcyjne, chociaż wykazano, że wiele białek hydrolizowanych podczas apoptozy zawiera w swojej sekwencji aminokwasowej motyw DEXD. Analiza biochemiczna pokazała, że kaspaza-7 jest bardziej selektywna niż kaspaza-3, co może być spowodowane odmiennym charakterem chemicznym kieszeni S5 – kaspaza-3 preferuje w pozycji P5

reszty hydrofobowe, natomiast kaspaza-7 reszty polarne [116]. Substratem referencyjnym dla obu tych enzymów jest często sekwencja DEVD, chociaż Poręba i in. wykazali, że substrat zawierający w pozycji P2 benzylowaną treoninę (nienaturalny aminokwas) cechuje ponad dwukrotnie wyższa stała specyficzności substratowej (k_{kat}/K_M) niż DEVD [117].

Kaspaza-3 oraz -7 są kluczowymi enzymami do prawidłowego przebiegu procesu apoptozy. Badania identyfikujące polimorfizm pojedynczego nukleotydu wykazały, że polimorfizm tych enzymów wiąże się ze zwiększoną podatnością różnych chorób. W przypadku kaspazy-3 są to m.in. choroba Kawasaki [118], nowotwór piersi [119], żołądka [120], płuc [121] czy pęcherza [122]. Polimorfizm kaspazy-7 związany jest z reumatoidalnym zapaleniem stawów [123], nowotworem płuc [124] czy trzonu macicy [125].

1.2.2. Katepsyny cysteinowe

Katepsyny są enzymami proteolitycznym, lizosomalnymi, a ich nazwa pochodzi od greckiego słowa „*kathesein*” oznaczającego „trawić”. Do tej pory odkryto i opisano 15 ludzkich katepsyn, które dzieli się na trzy grupy w zależności od mechanizmu hydrolizy. Wyróżnia się: katepsyny serynowe (katepsyna A, G), cysteinowe (katepsyna B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W) oraz aspartylowe (katepsyna D, E) [126]. Katepsyny cysteinowe, nazywane także lizosomalnymi proteazami cysteinowymi, zostały opisane w połowie XX wieku. Gutman i Fruton scharakteryzowali wówczas katepsynę C (dipeptydowa peptydaza I) [127]. Na początku lat 80-tych udało się poznać strukturę pierwszorzędową katepsyny B pochodzącej ze szczura [128], a parę lat później rozwiązano strukturę trzeciorzędową ludzkiej katepsyny B [129]. Od tego czasu nastąpiły intensywne badania nad tą grupą enzymów pozwalające na określenie pełnionej przez nie funkcji, ich lokalizacji czy specyficzności substratowej.

Katepsyny cysteinowe należą do rodziny papainy (klan CA) i są najlepiej scharakteryzowaną klasą katepsyn. Większość z nich pełną aktywność wykazuje w redukującym, lekko kwaśnym środowisku, które znajduje się w lizosomach. Początkowo uważano, że katepsyny cysteinowe są enzymami wewnątrzkomórkowymi, które przeprowadzają niespecyficzną, masową proteolizę degradując białka wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe w lizosomach lub endosomach [130]. Jednym ze sposobów

regulacji aktywności katepsyn jest aktywacja ich zymogenów. Mianowicie wszystkie katepsyny są syntezowane jako nieaktywne enzymy, tzw. preproenzymy, a mechanizm aktywacji rozpoczyna się od proteolitycznej hydrolizy N-końcowego fragmentu sygnałowego za pomocą innych aktywnych enzymów proteolitycznych (powstaje wtedy proenzym), a następnie autokatalizy w kwaśnym pH bądź w obecności glikozoaminoglikanów (aktywny enzym) [61, 131]. Innym sposobem kontroli tych enzymów jest ich regulacja przez endogenne inhibitory, takie jak cystatyny, serpiny czy tyropiny, które wiążą się ściśle z miejscem aktywnym enzymu zapobiegając w ten sposób hydrolizie substratu. Cystatyny niespecyficznie inhibują katepsyny kontrolując ich aktywność lizosomalną, natomiast tyropiny są związane z aktywnością nielizosomalną katepsyn i należą do bardziej specyficznych inhibitorów. Endogenne białka pozwalają na kontrolę działania tych enzymów poza lizosomem. W przypadku niektórych katepsyn, ich aktywność może być również utracona w wyniku degradacji bądź utlenienia reszty cysteiny w miejscu katalitycznym. Wraz z dojrzewaniem lizosomu maleje również wartość pH, co może powodować nieodwracalną denaturację katepsyn L, B czy S. Uważa się, że inaktywacja enzymów wywołana zmianą pH, a następnie ich degradacja proteolityczna jest procesem charakterystycznym dla wszystkich lizosomalnych proteinaz cysteinowych. Jest to więc mechanizm ogólny, który nie jest specyficzny dla danego enzymu [132-134].

Katepsyny cysteinowe występują u większości zwierząt. Ich poziom ekspresji oraz lokalizacja w komórce świadczy o tym, że niektóre z tych enzymów pełnią szczególne funkcje komórkowe. Większość z nich ulega ekspresji w różnych tkankach i komórkach, np. katepsyna B, H, L czy C, przy czym katepsyny B, H oraz L aktywują inne enzymy proteolityczne lub degradują macierz zewnątrzkomórkową rozwijając niektóre typy nowotworów, a katepsyna C aktywuje granzym B biorący udział w aktywacji kaspaz. W przeciwieństwie do nich, np. katepsyny K, O, S, V czy W znajdują się w konkretnych typach komórek. Katepsyna K ulega silnej ekspresji w osteoklastach podczas resorpcji kości, katepsyna W – w limfocytach T CD8+ i w komórkach NK (ang. *natural killer*), katepsyna S w profesjonalnych komórkach prezentujących antygen (APC, ang. *antigen-presenting cell*) takich jak komórki dendrytyczne (DC) i limfocyty B. Katepsyna V (nazywana również katepsyną L2) jest wysoce homologiczna do katepsyny L, ale w przeciwieństwie do wszechobecnej katepsyny L, jej ekspresja jest ograniczona wyłącznie do jąder i grasicy [130, 135-137].

1.2.2.1. Katepsyna S

Katepsynę S pierwszy raz oczyszczono z bydłych węzłów chłonnych, a następnie ze śledziony [138, 139]. Enzym wykazywał podobieństwo do katepsyny L, jednak pod wieloma względami różnił się, m.in. masą cząsteczkową, wrażliwością na inhibitory czy aktywnością wobec substratów. Katepsyna S należy do endopeptydaz, a jej specyficzność substratowa pokrywa się ze specyficznością katepsyny B oraz L. Badania wykazały, że w pozycjach P2 i P1' enzym ten preferuje rozgałęzione, hydrofobowe reszty aminokwasowe, a w pozycji P3' aminokwasy aromatyczne [140]. Wśród lizosomalnych proteaz cysteinowych, katepsyna S ma zdolność do degradacji białek nie tylko przy kwaśnym pH, ale także w środowisku obojętnym. Optymalne pH wynosi dla niej 6,5. Co ciekawe godzinna inkubacja katepsyny S w pH 7,5 skutkuje obniżeniem aktywności enzymu do około 60-70%, podczas gdy katepsyna B, L oraz H są w tych warunkach nieaktywne. W buforze do badań wymagany jest dodatek EDTA i ditiotritolu. Inhibitorami endogennymi katepsyny S są cystatyny oraz α_2 -makroglobuliny [141, 142].

Katepsyna S jest syntezowana jako preproenzym składający się z 331 reszt aminokwasowych o masie 37 479 Da. N-końcowa sekwencja propeptydowa ma długość 114 i 112 reszt aminokwasowych odpowiednio w enzymach ludzkich i szczurzych. Dojrzała, aktywna katepsyna S to jednołańcuchowy polipeptyd o wielkości 24 kDa, podczas gdy wielkość prokatepsyny S wynosi 37 kDa. Ludzka katepsyna S zawiera trzy wiązania disulfidowe, a triadę katalityczną tworzą Cys¹³⁹, His²⁷⁸ oraz Asn²⁹⁸ [141].

Katepsyna S wraz z innymi katepsynami jest niezbędna do przeprowadzania proteolizy w lizosomie. Jednak enzym ten odgrywa również znaczącą rolę w wielu procesach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Występuje głównie w śledzionie, leukocytach czy też węzłach chłonnych, czyli w narządach i komórkach związanych z układem immunologicznym. Podobnie jak w przypadku innych enzymów, coraz częściej odkrywa się powiązania tej proteazy z szeregiem substratów i stanów patologicznych. Katepsyna S bierze udział m.in. w prezentacji antygeny w kompleksie z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC, ang. *major histocompatibility complex*) degradując łańcuch niezmienny Ii. Podczas syntezy oraz dojrzewania białek $\alpha\beta$ MHCII w retikulum endoplazmatycznym, łańcuch ten przyłącza się do nich stabilizując kompleks i zapobiegając przedwczesnemu wiązaniu się peptydów antygenowych. Kluczowym etapem jest zatem hydroliza tego łańcucha, co pozwala

na przyłączenie się peptydów antygenowych do białek. Po takim przyłączeniu, kompleks wędruje na powierzchnię błony komórkowej prezentując antygen limfocytom T CD4+. Prezentacja antygeny, w której bierze udział katepsyna S, została stwierdzona w komórkach nabłonka jelit oraz w komórkach prezentujących antygen pochodzących ze szpiku kostnego, takich jak limfocyty B, makrofagi czy komórki dendrytyczne. Zahamowanie aktywności katepsyny S w mysich splenocytach spowodowało: nagromadzenie się produktu przejściowego hydrolizy łańcucha niezmiennego Ii, słabsze wiązanie się antygeny z glikoproteinami MHC klasy II, a tym samym zahamowanie prezentacji antygeny. Co więcej, hydroliza Ii przez katepsynę S zwiększa także ruchliwość komórek dendrytycznych [143]. Pośrednia rola katepsyny S w prezentacji antygeny może również wpływać na postęp patologii astmy. Jest to choroba zapalna dróg oddechowych charakteryzująca się dusznością, kaszlem i świszczącym oddechem. Badania pokazały, że w modelu mysiej astmy ablacja genetyczna bądź inhibicja katepsyny S jest w stanie złagodzić rozwój tej choroby [144].

Katepsyna S została zidentyfikowana jako jeden z czynników zwiększających ryzyko chorób sercowo-naczyniowych u osób z otyłością, a jej nadmierna aktywność może prowadzić do rozwoju miażdżycy [141, 145]. Enzym ten wykazuje działanie kolagenolityczne oraz elastynolityczne i razem z innymi enzymami odpowiada za przebudowę macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). Uszkodzenie to powoduje przedostanie się monocytów i limfocytów do ściany tętnicy oraz migrację komórek mięśni gładkich do błony wewnętrznej. Ludzka tkanka tłuszczowa wykazuje wysoką ekspresję genu katepsyny S, a adipocyty wydzielają dojrzałą katepsynę S, co przyczynia się do jej wzrostu u osób otyłych. Stwierdzono, że wysoki poziom omawianej proteazy silnie koreluje z wysokim wskaźnikiem masy ciała (BMI, ang. *body mass index*), przy czym w przypadku redukcji masy ciała widoczny jest jej spadek. Selektywne hamowanie katepsyny S może zmniejszyć ryzyko chorób sercowo-naczyniowych oraz poprawić stan metaboliczny osób otyłych [141, 146].

Ból przewlekły można podzielić na trzy kategorie: ból neuropatyczny, nocycyptywny oraz mieszany. Ból neuropatyczny spowodowany jest chorobą lub uszkodzeniem czuciowego układu nerwowego, ból nocycyptywny to uszkodzenie bądź choroba tkanki (takie jak reumatoidalne zapalenie stawów) a ból mieszany to połączenie bólu neuropatycznego oraz nocycyptywnego. Badania wykazały, że katepsyna S odgrywa rolę w bólu neuropatycznym pośrednicząc w hydrolizie i uwalnianiu z błony

fraktalkiny, która jest zapalną chemokina promującą przetwarzanie bólu i utrzymanie nadwrażliwości na ból w miejscu początkowego urazu. Fraktalkina występuje w formie związanej z błoną wykazując właściwości adhezyjne oraz w postaci rozpuszczalnej, która charakteryzuje się właściwościami chemotaktycznymi [142, 147]. Badania opublikowane w 2007 r. wykazały, że podpajęczynówkowe podanie myszy katepsyny S skutkowało alodynią (stan, w którym na skutek bodźca, który w warunkach kontrolnych nie jest bólowy, pojawia się reakcja bólowa), podczas gdy nadwrażliwość ta nie pojawiła u myszy pozbawionych receptorów fraktalkiny. Dalsze badania pokazały, że podpajęczynówkowe podanie nieodwracalnego inhibitora tej proteazy działa przeciwbólowo [148, 149].

Zwiększona ekspresja katepsyny S przez cytokiny nasila postęp autoimmunologicznych chorób zapalnych takich jak stwardnienie rozsiane czy choroba Sjögrena. Bierze również udział w łuszczycy ulegając ekspresji w keratynocytach oraz w chorobie Alzheimera generując białka prionowe. Podwyższenie poziomu katepsyny S obserwowane jest również w stanach nowotworowych, m.in. coraz wyższy poziom tej proteazy obserwowany jest wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania gwiżdżaka (astrocytomy), nowotworu prostaty, jelita grubego, płuc czy czerniaka błony naczyniowej oka. Pokazano również, że poziom katepsyny S może mieć wartość prognostyczną, tzn. wyższy jej poziom obserwuje się u pacjentów z gorszym rokowaniem. Pokazuje to tylko, że katepsyna S jest doskonałym celem terapeutycznym [146, 150, 151].

1.3. Metody określania specyficzności substratowej proteaz

W celu lepszego określenia profilaktyki, diagnostyki oraz celów terapeutycznych w walce z wieloma chorobami konieczne wydaje się poznanie i zrozumienie biologicznej funkcji enzymów proteolitycznych, których obecność stwierdzana jest na różnych etapach rozwoju stanu patofizjologicznego. Określenie ich funkcji jest wymagającym zadaniem, dlatego ostatnie lata w dziedzinie chemii biologicznej poświęcone są definiowaniu roli poszczególnych proteaz. Zdolność tych enzymów do selektywnego katalizowania reakcji hydrolizy wiązania peptydowego konkretnych substratów pozwala na określenie specyficzności substratowej. Jest to pierwszy etap do uzyskania narzędzi chemicznych, które umożliwiają specyficznie i selektywnie określenie aktywności tych enzymów w układach biologicznych.

Uzyskanie takich informacji pozwala zaprojektować selektywne inhibitory lub markery chemiczne, które mogą być w dalszych etapach przekształcone w skuteczne leki.

Pierwsze metody pozwalające na wyznaczenie specyficzności substratowej związane były z wykorzystaniem metody SDS-PAGE do identyfikacji produktów reakcji hydrolizy (PROTOMAP) bądź jej obserwacji w złożonych układach biologicznych [152-154]. Jak się jednak okazało, stosując te metody, nie uzyskano odpowiedzi czy za hydrolizę odpowiada tylko jeden enzym oraz nie było możliwe zlokalizowanie dokładnego miejsca zachodzenia tej reakcji. Badając enzymy blisko ze sobą spokrewnione, takie jak kaspazy, metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej czy katepsyny było to zbyt duże ograniczenie, dlatego opracowane zostały metody, które pozwalają na dokładniejsze ustalenie preferencji katalitycznych w centrum aktywnym po obu stronach hydrolizowanego wiązania (zarówno po stronie primowanej jak i nieprimowanej). Wyróżniono metody chemiczne oraz te oparte na ekspresji biologicznej.

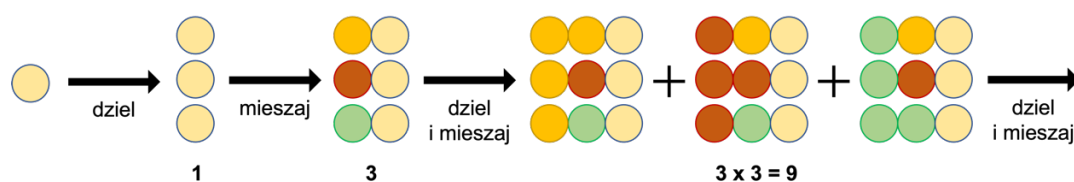
1.3.1. Metody chemiczne określania specyficzności substratowej proteaz

Dokładna znajomość specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych dostarcza ważnych informacji o ich funkcjach i pomaga zrozumieć zachodzące procesy metaboliczne w organizmach. By określić profil specyficzności substratowej niescharakteryzowanego enzymu proteolitycznego, a tym samym znaleźć selektywny i specyficzny dla niego substrat, należy sprawdzić jak największą liczbę substratów peptydowych. Pula takich substratów określana jest jako biblioteka. Jej strukturę chemiczną dostosowuje się w zależności od rodzaju badanej proteazy. Synteza peptydów na podłożu stałym (SPPS, ang. *solid phase peptide synthesis*) pierwszy raz została opisana w 1984 r. przez Merrifielda, za co otrzymał on Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [155, 156]. Swoje prace badawcze rozpoczął on już w 1959 r., a pierwszy artykuł na ten temat ukazał się 4 lata później [157]. Dzięki opracowaniu technologii syntezy na nośniku stałym, naukowcy zaczęli wykorzystywać ją do badania specyficzności substratowej proteaz i obecnie należy do najczęściej używanych metod otrzymania substratów peptydowych w laboratoriach chemicznych na całym świecie. Większość metod chemicznych polega na syntezie bibliotek wykorzystując chemię kombinatoryczną. Synteza peptydów na podłożu stałym umożliwia kowalencyjne przyłączenie reszty aminokwasowej (z grupą ochronną znajdującą się na grupie

aminowej) do nośnika, np. żywicy polimerowej. Kolejnym etapem jest usunięcie grupy blokującej (Fmoc - grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa) i przeprowadzenie reakcji kondensacji pomiędzy grupą aminową reszty aminokwasowej znajdującej się na nośniku a grupą karboksylową kolejnej reszty aminokwasowej dodawanej do żywicy. Dzięki temu, że aminokwasy dodawane są w cyklach możliwa jest automatyzacja tej syntezy. Obecnie większość metod bazuje na wykorzystaniu mieszaniny izokinetycznej bądź metody „mieszaj i dziel”.

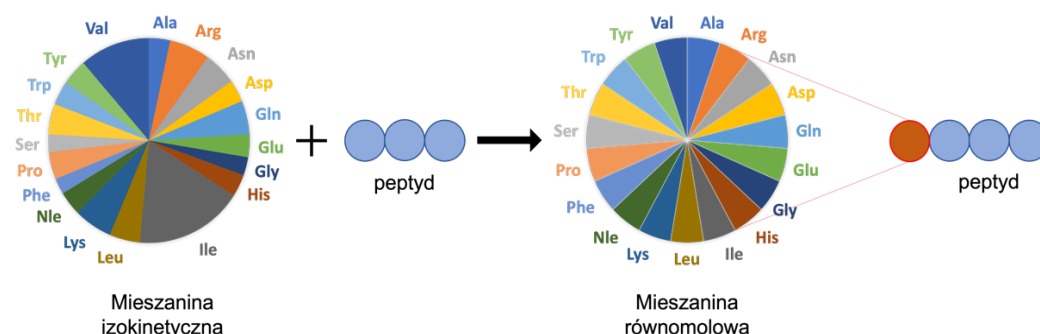
1.3.1.1. Określenie specyficzności substratowej po stronie nieprimowanej

Powinowactwo substratu do enzymu zarówno po primowanej jak i nieprimowanej stronie hydrolizowanego wiązania peptydowego określa kompleksowo specyficzność substratową danego enzymu. Jak się jednak okazało, w większości przypadków, to strona nieprimowana pełni kluczową rolę w oddziaływaniach między substratem a enzymem i to ona głównie determinuje jakie reszty aminokwasowe są niezbędne do efektywnej hydrolizy w pozycjach P4-P1. Używając technik chemii kombinatorycznej opracowano dwie główne metody, które pozwalają na szybką i skuteczną syntezę bibliotek. Pierwsza z nich to zaproponowana w 1991 r. technologia „mieszaj i dziel” (ang. *mix and split*), która pozwala na otrzymanie dużej liczby zdefiniowanych substratów [158]. Polega ona na wykonywaniu naprzemiennych cykli: mieszania, dzielenia i dołączania kolejnej reszty aminokwasowej do żywicy otrzymując ostatecznie wiele kombinacji związków. Żywica z przyłączonym pierwszym aminokwasem zostaje podzielona (ang. *split*) na kilka równych części, do których przyłącza się różne reszty aminokwasowe. W kolejnym kroku porcje żywicy miesza się (ang. *mix*) i ponownie dzieli na części, do których przyłączane są kolejne aminokwasy (rys. 9). Takie podejście umożliwia geometryczny przyrost liczby otrzymywanych substratów o różnych kombinacjach reszt aminokwasowych w sekwencji, tym samym oszczędzając czas w porównaniu do syntezy pojedynczych substratów [159].



Rys. 9 Schemat metody „dziel i mieszaj”.

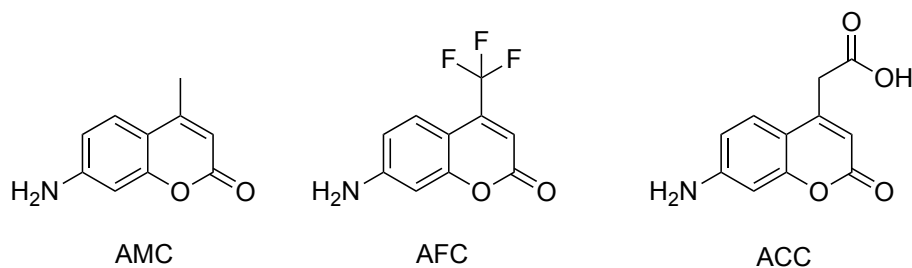
W 1994 r. Ostresh i współpracownicy opracowali procedurę wykorzystującą mieszaninę izokinetyczną aminokwasów (rys. 10), co pozwoliło na wprowadzenie do syntezowanego peptydu równomolowej mieszaniny 18 naturalnych aminokwasów oraz norleucyny (bez cysteiny i z metioniną zastąpioną bioizosterem jakim jest norleucyna, co eliminuje utlenianie się atomów siarki w łańcuchach bocznych). Skład tej mieszaniny jest dobrany w taki sposób, by szybkość reakcji zachodzącej między wolną grupą aminową na podłożu stałym, a grupą karboksylową wszystkich aminokwasów była taka sama. Skład procentowy takiej mieszaniny jest następujący (% molowe): Fmoc-L-Ala – 3,4; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH – 6,5; Fmoc-L-Asn(Trt)-OH – 5,3; Fmoc-L-Asp(O-tBu)-OH – 3,5; Fmoc-L-Glu(O-tBu)-OH – 3,6; Fmoc-L-Gln(Trt)-OH – 5,3; Fmoc-Gly-OH – 2,9; Fmoc-L-His(Trt)-OH – 3,5; Fmoc-L-Ile-OH – 17,4; Fmoc-L-Leu-OH – 4,9; Fmoc-L-Lys(Boc)-OH – 6,2; Fmoc-L-Nle-OH – 3,8; Fmoc-L-Phe-OH – 2,5; Fmoc-L-Pro-OH – 4,3; Fmoc-L-Ser(O-tBu)-OH – 2,8; Fmoc-L-Thr(O-tBu)-OH – 4,8; Fmoc-L-Trp(Boc)-OH – 3,8; Fmoc-L-Tyr(O-tBu)-OH – 4,1; Fmoc-L-Val-OH – 11,3. Na tej podstawie widać, że najwolniej przyłącza się izoleucyna ze względu na zawadę steryczną, a najszybciej fenyloalanina [160].



Rys. 10. Schematyczne przedstawienie mieszaniny izokinetycznej oraz mieszaniny równomolowej.

Mieszaninę izokinetyczną wykorzystuje się w celu syntezy bibliotek substratów peptydowych służących do ustalenia profilu specyficzności substratowych badanych proteaz za pomocą metody PS-SCL (ang. *positional scanning substrate combinatorial library*). Biblioteki tego typu zbudowane są z tzw. podbibliotek, które w określonych pozycjach mają zdefiniowane reszty aminokwasowe, a w pozostałych przyłączona jest równomolowa mieszanina naturalnych aminokwasów. Wykorzystanie w tym podejściu mieszanin izokinetycznych pozwala zbadać preferencję substratową badanego enzymu po nieprimowanej stronie wyłącznie względem konkretnej reszty aminokwasowej

w badanej pozycji. Na C-końcu, w pozycji P1', znajduje się znacznik fluorogeniczny, który jest uwalniany po zajściu reakcji hydrolizy. Uwolniony fluorofor wykazuje przyrost jednostek fluorescencji w czasie, co można mierzyć za pomocą spektrofluorymetru, dzięki czemu jest możliwy pomiar kinetyki reakcji hydrolizy wiązania peptydowego [161]. Do najczęściej stosowanych fluoroforów zalicza się pochodne kumaryny: AMC (7-amino-4-metylokumaryna), AFC (7-amino-4-trifluorometylokumaryna) oraz ACC (kwas 7-amino-4-kumarynooctowy). Długość fali emisji i wzbudzenia wynosi odpowiednio 395 nM i 490 nM dla AFC [162], 380 nM i 460 nM dla AMC oraz ACC [163]. Struktury tych związków przedstawiono na rys. 11. AMC był najwcześniej wykorzystywanym fluoroforem w syntezie bibliotek, natomiast AFC jest najczulszym fluoroforem spośród pochodnych kumaryny. Fluorofory te można jednak użyć wyłącznie w syntezie w roztworze. Dopiero zastosowanie ACC umożliwiło syntezę bibliotek na podłożu stałym. Znacznik ten w swojej strukturze zawiera dwie grupy funkcyjne – aminową, dzięki czemu może się do niej przyłączyć reszta aminokwasowa (tak samo jak w AMC oraz AFC) oraz grupę karboksylową, dzięki której fluorofor może być przyłączony do nośnika stałego, a której pozbawione są AMC oraz AFC. Po opisanu metody syntezy ACC [164] wiele proteaz zostało przebadanych przy użyciu strategii PS-SCL, m.in. bromelaina, papaina, katepsyna B, F, S, K, V i L [32].



Rys. 11. Struktury najczęściej wykorzystywanych fluoroforów w metodzie PS-SCL.

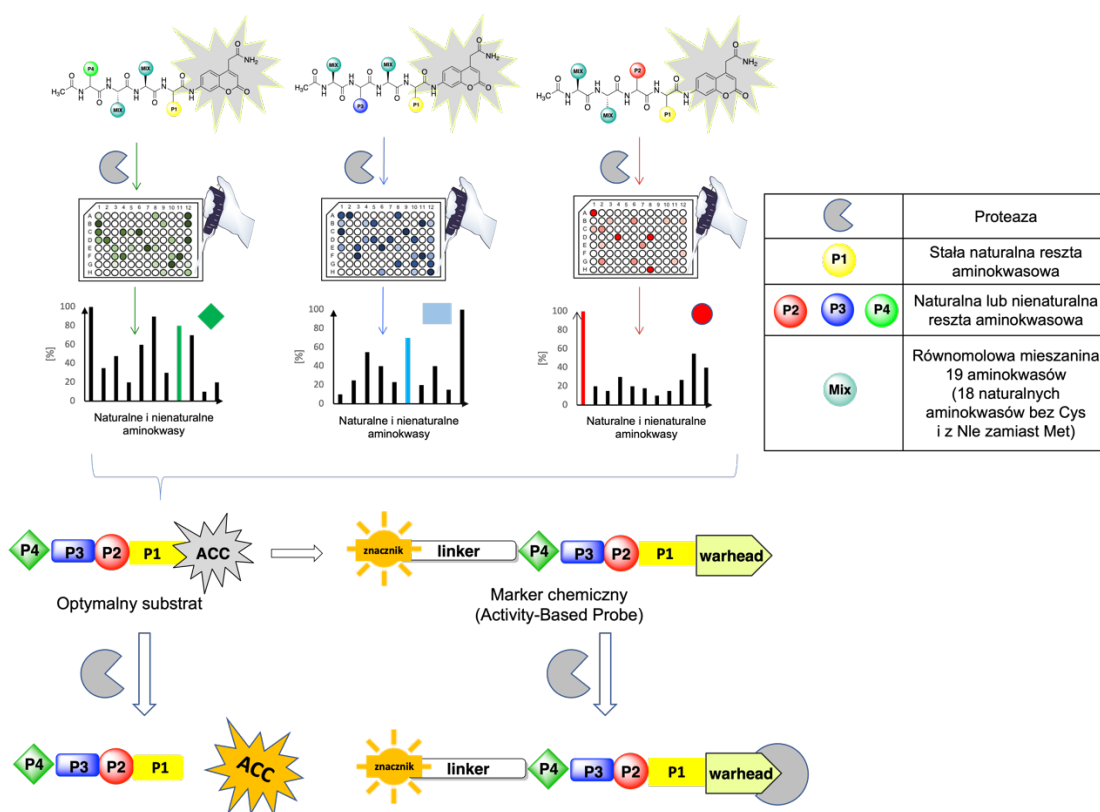
Jako grupy reporterowe oprócz fluoroforów mogą być wykorzystywane również inne związki. Wymienić można luminofory lub wskaźniki chromogeniczne [165]. Luminofory to najczulsze wskaźniki chemiczne. Do ich grupy zalicza się aminolucyferinę. Związek ten ma zdolność do emisji fal świetlnych nawet po wyłączeniu czynnika wzbudzającego. Powoduje to zaburzenia pomiaru szybkości hydrolizy i prowadzi do powstania efektów nieliniowych. Wskaźniki chromogeniczne zmieniają kolor w momencie odłączenia od sekwencji. Przykładem jest para-nitroanilid (pNa), którego barwa zmienia się z białej na żółtą w trakcie przechodzenia z postaci

związanej do wolnej. W trakcie analizy z wykorzystaniem spektrometru tworzony jest wykres zależności przyrostu sygnału w czasie. Na jego podstawie można określić powinowactwo badanego substratu względem enzymu. Jednak, aby otrzymać wystarczająco intensywny sygnał, konieczne jest użycie stosunkowo dużej ilości substratu i enzymu w porównaniu do pozostałych grup reporterowych [166].

Technologia PS-SCL pozwala na ustalenie optymalnej sekwencji, która może być później przekształcona w substrat. Alternatywą do tego podejścia okazała się metoda SAS (ang. *substrate activity screening*), która skupiała się na poszukiwaniu aktywnych substratów, które można byłoby przekształcić w inhibitor lub marker chemiczny. Jej metodologia jest nieco inna niż PS-SCL. Pierwszym etapem jest synteza biblioteki małowcząsteczkowych substratów fluorogenicznych, które składają się z fluorofora połączonego z peptydowym bądź niepeptydowym fragmentem (biblioteka pierwszej generacji). Wykorzystanie niepeptydowych związków jest jedną z głównych różnic między metodą SAS a PS-SCL, w której wykorzystywane są naturalne aminokwasy. Kolejnym krokiem jest analiza kinetyczna otrzymanych substratów wobec badanego enzymu proteolitycznego i wybór tych, które mają najlepsze parametry kinetyczne. Są one następnie wydłużane o kolejną pozycję. W ten sposób powstaje biblioteka drugiej generacji. Ponownie związki poddawane są analizie kinetycznej i znowu substraty o najlepszych parametrach są wydłużane o kolejną pozycję. Po kilku cyklach naprzemiennej syntezy i analizy kinetycznej otrzymywany jest optymalny niepeptydowy związek, który w ostatnim kroku przekształcany jest w inhibitor [167-170]. Metoda ta została opisana w 2005 r. i została wykorzystana w badaniach nad inhibitorami katepsyny S [171].

Metoda PS-SCL pozwoliła na szybkie i dokładne określanie profilu specyficzności substratowej wielu enzymów proteolitycznych. Jednak dla enzymów blisko ze sobą spokrewnionych, jak np. katepsyny czy kaspazy pojawiał się problem nakładającej się specyficzności substratowej. Oznaczało to, że uzyskiwane substraty nie były selektywne wobec jednego enzymu, co uniemożliwiało dalsze badania danych proteaz. Dopiero w 2014 r. rozwinięto metodę PS-SCL. Zespół badawczy Drąga oprócz naturalnych aminokwasów zdecydował się również na wykorzystanie ponad 100 aminokwasów nienaturalnych. Powstałe w ten sposób tzw. hybrydowe kombinatoryczne biblioteki substratów (HyCoSuL, ang. *hybrid combinatorial substrate library*) umożliwiły dokładne poznanie architektury kieszeni wiążących badanego enzymu oraz zaprojektowanie selektywnych narzędzi chemicznych jak inhibitory

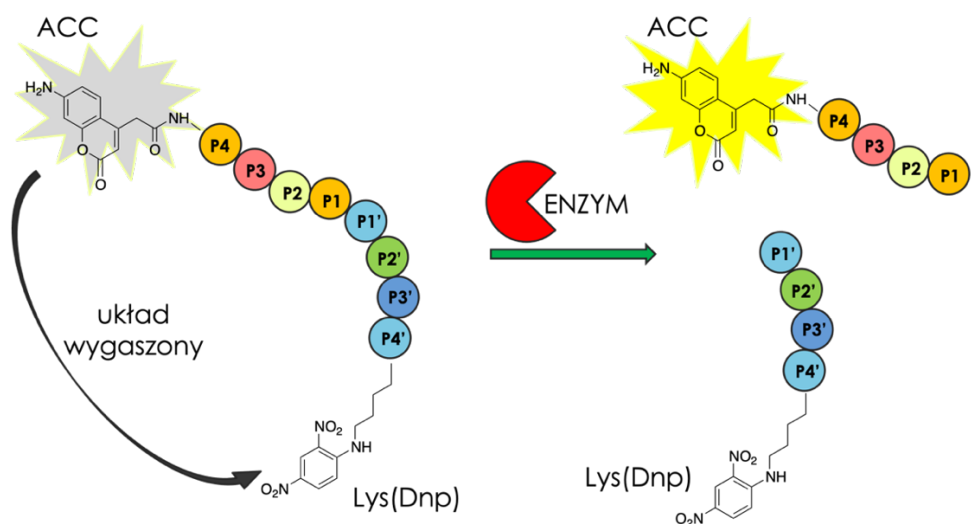
czy markery chemiczne [117, 172-174]. Kasperkiewicz i in. w badaniach nad neutrofilową elastazą (NE) zaprojektowali bibliotekę zawierającą 102 nienaturalne reszty aminokwasowe, co pozwoliło uzyskać wysoce selektywny substrat dla tego enzymu (prawie 100-krotnie lepszy względem NE niż dotychczasowy substrat składający się z naturalnych reszt aminokwasowych). Umożliwiło to syntezę biotynylowanego markera chemicznego, co pozwoliło na detekcję oraz obrazowanie aktywności tej proteazy w neutrofilach [172]. W tym samym czasie Poręba i in. wykorzystali to podejście do uzyskania substratów selektywnych względem kaspaz. Użyta biblioteka zawierała 110 aminokwasów niewystępujących naturalnie [117]. Ta sama strategia została wykorzystana z powodzeniem również w projektowaniu selektywnych substratów dla trombiny, aktywowanego białka C, czynnika Xa [175], trzech podjednostek katalitycznych proteasomu [176] czy proteazy NS2B-NS3^{pro} dla wirusa Zachodniego Nilu i dengi [177]. Schemat biblioteki HyCoSuL przedstawiono na rys. 12.



Rys. 12. Schemat metody HyCoSuL.

1.3.1.2. Określenie specyficzności substratowej po stronie primowanej

Opisane w podrozdziale 1.3.1.1 metody wykorzystujące fluorofory są często wykorzystywane w badaniach naukowych na całym świecie. Pozwalają one na otrzymanie selektywnych i aktywnych substratów dla badanych proteaz, co pozwala na lepsze poznanie specyficzności substratowych tych enzymów proteolitycznych. Jednak metody te skupiają się na poznaniu architektury kieszeni wiążących wyłącznie po stronie nieprimowanej, przez co nie uzyskujemy pełnego obrazu na temat preferencji katalitycznych badanego enzymu. Zarówno w metodzie PS-SCL, HyCoSuL jak i SAS w pozycji P1' znajduje się grupa reporterowa. W celu ustalenia specyficzności substratowej kieszeni primowanych wykorzystuje się tzw. substraty wewnątrznie wygaszane nazywane również substratami FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*) lub substratami typu IQF (ang. *internally quenched fluorescent substrate*). Zbudowane są one z donora wykazującego właściwości fluorescencyjne, akceptora nazywanego również wygaszaczem mającego zdolność do absorpcji energii donora oraz selektywnej sekwencji peptydowej, specyficznej wobec badanego enzymu łączącej ze sobą donora i akceptora. Dzięki nakładaniu się widma emisji donora oraz widma absorpcji akceptora dochodzi do wewnątrzcząsteczkowego transportu energii i wygaszenia fluorescencji. Dzieje się tak dopóki para donora i akceptora są połączone ze sobą sekwencją peptydową. W przypadku hydrolizy substratu przez proteazę następuje rozdzielenie donora od akceptora, odległość między nimi się zwiększa, co skutkuje przyrostem fluorescencji donora i umożliwia ustalenie preferencji substratowych danej proteazy (rys. 13). Substraty typu IQF można wykorzystywać zarówno do badania kieszeni wiążących po stronie primowanej jak i nieprimowanej [178, 179]. W ich syntezie można użyć mieszaninę izokinetyczną, co pozwoli na otrzymanie biblioteki kombinatorycznej typu IQF. Do najpopularniejszych par donora/akceptora należą: ABz-Tyr(NO₂) [180], Edans-Dabcyl [178], ABz-EDDnp [181], ABz-Dnp [182], ACC-Lys(Dnp) [183].



Rys. 13. Schemat działania substratów typu IQF.

1.3.2. Metody biologiczne określania specyficzności substratowej proteaz

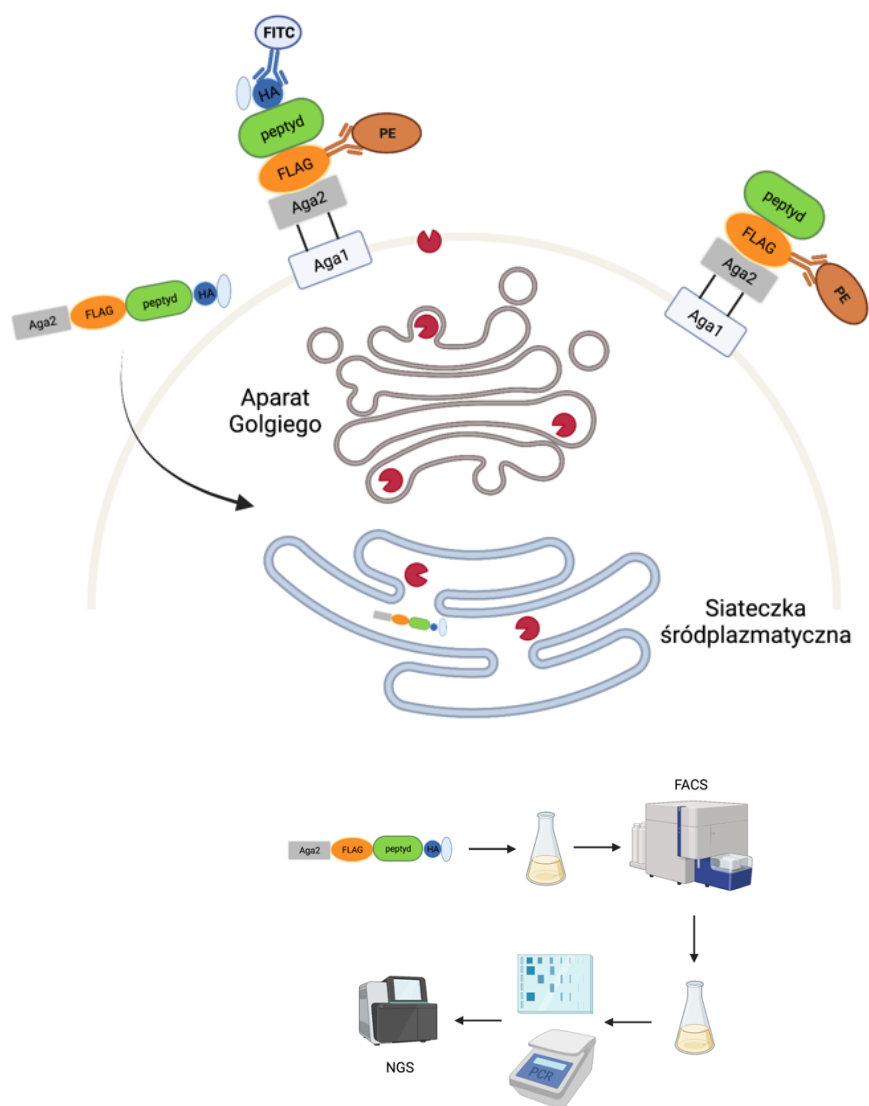
Specyficzność substratową enzymów proteolitycznych można określić również za pomocą metod biologicznych. Jedną z najważniejszych jest tzw. prezentacja fagowa (ang. *phage display*), w której do produkcji peptydów wykorzystywane są bakteriofagi. Charakteryzują się one zdolnością do szybkiej replikacji i manipulacją materiału genetycznego, dzięki czemu znajdują zastosowanie w medycynie, farmacji jak i w biologii molekularnej, umożliwiając badanie oddziaływania białko-DNA, białko-białko czy białko-peptyd. W metodach wykorzystujących prezentację fagową do genomu bakteriofaga wstawiane są randomizowane sekwencje nukleotydowe, które kodują wszystkie naturalnie występujące aminokwasy [184]. Są one wprowadzane do genów faga odpowiadających za kodowanie białka powierzchniowego gIII, dzięki czemu pula zrandomizowanych peptydów prezentowana jest na powierzchni kopii faga. Białko powierzchniowe umożliwia immobilizację fagów na podłożu stałym. Następnie do zimmobilizowanych fagów dodawany jest badany enzym proteolityczny. Hydrolizowane są białka powierzchniowe fagów, zawierające sekwencje peptydowe specyficzne dla badanej proteazy, dzięki czemu fagi zostają uwolnione. Następnie uwolnione fagi są izolowane i amplifikowane w komórkach *E. coli*, co pozwala uzyskać bibliotekę drugiej generacji. Proces powtarza się kilkakrotnie aż do uzyskania fagów zawierających wysoce specyficzne sekwencje peptydowe wobec badanej proteazy. Ostatnim etapem jest określenie sekwencji aminokwasowej najlepszych substratów

poprzez sekwencjonowanie DNA. Dzięki temu możliwe jest wyznaczenie miejsca hydrolizy, a tym samym specyficzności substratowej badanej proteazy [185, 186].

Metoda *phage display* pozwala na otrzymanie ponad miliona różnych sekwencji peptydowych i wybranie tych, które są najlepiej rozpoznawane przez badaną proteazę. Metody chemiczne, w których syntezuje się zazwyczaj krótkie sekwencje oraz metody proteomiczne, gdzie jako bibliotekę substratów wykorzystuje się proteom, nie umożliwiają przebadania tak zróżnicowanych substratów. W związku z tym, że peptydy są generowane w prezentacji fagowej, ograniczeniem jest wykorzystanie jedynie naturalnych aminokwasów w sekwencjach peptydowych przez co uzyskany profil specyficzności substratowej nie zapewnia tak szczegółowych informacji na temat architektury miejsca aktywnego, jak otrzymany np. metodą HyCoSuL [187]. Metoda ta jednak została wykorzystana do określenia specyficzności substratowej wielu enzymów m.in. HIV-1 Pr (proteazy aspartylowej) czy trombiny (proteazy serynowej) [188, 189].

Kolejną strategią biologiczną jest metoda YESS (ang. *yeast endoplasmic reticulum sequestration screening*) opisana pierwszy raz 10 lat temu [190] i udoskonalona cztery lata później wykorzystując sekwencjonowanie nowej generacji (NGS ang. *NextGen sequencing*). W tym podejściu, kombinatoryczna biblioteka substratów składa się z białka Aga2, sekwencji epitopu przeciwciała FLAG (sekwencja DYKDDDDK), domniemanej randomizowanej sekwencji substratowej, znacznika sekwencji HA (YPYDVDPYA) oraz z sekwencji sygnałowej retencji retikulum endoplazmatycznego (FEHDEL). Sekwencja Aga2 znajdująca się na N-końcu zapewnia, że po przejściu przez retikulum endoplazmatyczne drożdży następuje prezentacja biblioteki związków peptydowych na powierzchni komórki. W trakcie transportu dochodzi do hydrolizy substratów przez obecne w siateczce śródplazmatycznej enzymy proteolityczne, co powoduje uwolnienie znacznika HA znajdującego się na C-końcu. Zarówno produkty, które uległy hydrolizie, jak i te które jej nie uległy związane są w sposób kowalencyjny z zewnętrzną powierzchnią komórki. Ostatnim etapem jest jednoczesne znakowanie przeciwciałami anti-FLAG sprzężonymi z fluoroforem PE (fikoerytryna) oraz anti-HA sprzężonymi z fluoroforem FITC (izotiocyjanian fluoresceiny). Wykorzystując cytometrię przepływową (FACS, ang. *fluorescence activated cell sorting*) określany jest stosunek barwnika PE do FITC. Wysoka wartość obu sygnałów fluorescencyjnych wskazuje na brak hydrolizy, podczas gdy wysoki sygnał PE w połączeniu z niskim sygnałem FITC wskazują na zajście reakcji hydrolizy

w czasie transportu kompleksu na powierzchnię ściany komórkowej. Po izolacji substratów w oparciu o FACS hydrolizowane sekwencje są identyfikowane za pomocą sekwencjonowania NGS [191]. Schemat metody YESS przedstawiono na rys. 14

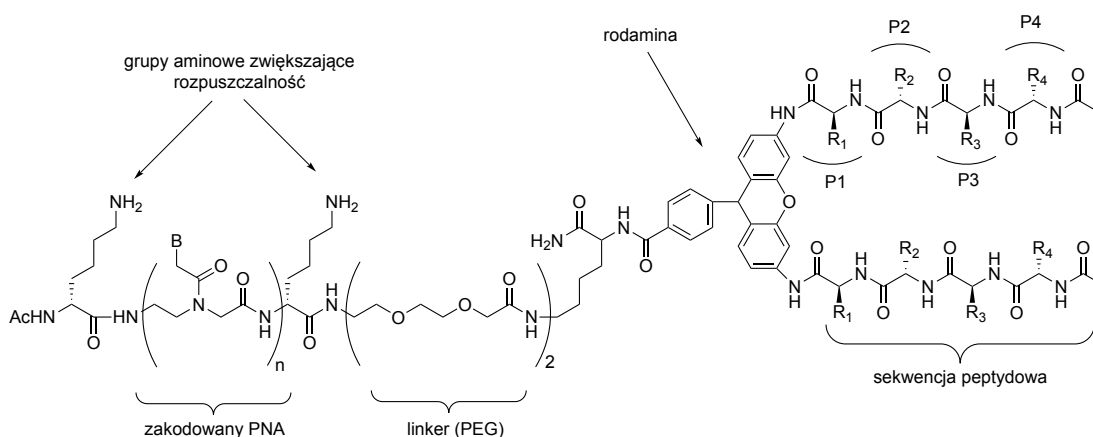


Rys. 14. Schemat metody YESS (na podstawie [191]).

1.3.3. Mikromacierze

Kolejnym podejściem jest użycie substratów fluorogenicznych, które zawierają rodaminę, a ich sekwencja aminokwasowa jest zakodowana za pomocą kwasu peptydonukleinowego (PNA, ang. *peptide nucleic acid*, rys. 15), co dzięki hybrydyzacji z chipami DNA wykorzystywane jest w procesie dekonwolucji biblioteki. W pierwszym

roku substraty są inkubowane z wybraną proteazą. Dzięki zachodzącej reakcji hydrolizy wiązania peptydowego znajdującego się na C-końcu otrzymuje się wolną grupę aminową rodamininy, co prowadzi do emisji fluorescencji. Biblioteki nanoszone są na mikromacierze pokryte DNA, dzięki czemu możliwe jest odczytanie sekwencji peptydowych zapisanych w PNA, które uległy hydrolizie [192].



Rys. 15. Schematyczne przedstawienie biblioteki substratów rodaminowych kodowanych za pomocą PNA. R1, R2, R3, R4 to reszty aminokwasowe, B – to tymina, cytozyna, adenina lub guanina (na podstawie [192]).

1.3.4. Proteomika i degradomika

Ciągła potrzeba prawidłowego określania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych powoduje nieustanny rozwój nowych metod. W porównaniu do metod biologicznych czy chemicznych, proteomika jest stosunkowo młodą gałęzią nauki. Opracowanie coraz to czulszych spektrometrów masowych i zwiększenie mocy obliczeniowej komputerów umożliwiło detekcję nowych substratów dla enzymów proteolitycznych w złożonych układach biologicznych. Proteomika zajmuje się badaniem funkcjonalnej części proteomu, czyli funkcją, strukturą i wzajemnym oddziaływaniem białek, natomiast jej węższą dziedziną jest degradomika, która skupia się na badaniu degradomów, czyli enzymów proteolitycznych, ich substratów oraz endogennych inhibitorów. Podejście to wykorzystuje substraty znajdujące się już w komórkach, tkankach czy całych organizmach, dzięki czemu nie ma potrzeby tworzenia bibliotek związków - wystarczy zanalizować te, które występują naturalnie. Dodatkowo dzięki proteomice możliwe jest badanie oddziaływań zachodzących między substratem a enzymem również na poziomie struktury trzeciorzędowej [193].

Najczęściej wykorzystywaną techniką do określenia miejsca hydrolizy substratu oraz specyficzności substratowych po obu jego stronach jest technika PICS (ang. *proteomic identification of protease cleavage site*). W metodzie tej proteomy (najczęściej lizaty komórkowe) najpierw poddawane są działaniu endopeptydaz (trypsynie, chymotrypsynie lub GluC). Dzięki temu następuje hydroliza białek i powstają oligopeptydy, w których grupy sulfhydrylowe są alkiłowane jodoacetamidem, a wszystkie wolne grupy aminowe (z łańcuchów bocznych lizyny oraz N-końcowe) są chemicznie blokowane w reakcji dimetylacji aldehydem mrówkowym i cyjanobromowodorkiem sodu, dzięki czemu aminy pierwszorzędowe przekształcane są w aminy trzeciorzędowe. Po oczyszczeniu, tak powstała biblioteka naturalnych peptydów, poddawana jest proteolizie przez badany enzym. Nowo powstała wolna grupa aminowa po stronie primowanej jest następnie biotynylowana. Po niekowalencyjnym związaniu biotyny ze streptawidyną, związki te są izolowane i sekwencjonowane przy wykorzystaniu LC-MS/MS (chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas). Fragmenty po stronie nieprimowanej są określane przez użycie narzędzi bioinformatycznych i wykorzystanie dostępnych baz danych. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie sekwencji substratów i opracowanie profilu specyficzności substratowej badanego enzymu. Metoda PICS znalazła liczne zastosowanie w określeniu ważnych medycznie proteaz serynowych, aspartylowych czy cysteinowych. Jako przykład można przytoczyć prace zespołu badawczego Overalla, który określił specyficzność m.in. kaspazy-3, katepsyny K, trombiny czy katepsyny G wykorzystując tę metodę [194].

Oprócz technologii PICS istnieje wiele innych metod, które różnią się miejscem i sposobem znakowania. W metodzie COFRADIC (ang. *combined fractional diagonal chromatography*) wolne grupy aminowe oznaczone są przez deuterioacetylację, a po hydrolizie odpowiednią proteazą do N-końcowych grup aminowych przyłączany jest kwas 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowy, który ułatwia oczyszczanie wydłużając czas retencji na kolumnie poprzez zwiększenie hydrofobowości peptydów [195]. Metoda TAILS (ang. *terminal amine isotopic labeling of substrates*), odwrotnie niż dwie powyżej wymienione techniki, wykorzystuje do dalszej analizy peptydy N-końcowe zawierające grupę aminową. W tej technologii proteom dzieli się na dwie części, gdzie jedna to grupa kontrolna, a druga poddana działaniu badanej proteazy. Następnie w obu grupach znakuje się wolne grupy aminowe izotopami i obie próbki miesza się ze sobą i poddaje się trypsynizacji. Powstają peptydy tryptyczne z grupą aminową na N-końcu, które

są usuwane poprzez dodanie do próbki rozgałęzionego polimeru poliglicerolu i aldehydu (HPG-ALD), który wykazuje reaktywność z wolnymi grupami aminowymi. Reakcja jest katalizowana przez cyjanoborowodorek sodu, a znakowane izotopowo peptydy białkowe oddzielane są za pomocą ultrafiltracji i poddane analizie LC-MS/MS. Usunięcie z próbki peptydów tryptycznych zwiększa czułość tej metody, a zastosowanie różnych izotopów do znakowania wolnych grup aminowych umożliwia analizę jednocześnie ośmiu enzymów proteolitycznych [196].

Metoda DIPPS (ang. *direct in-gel profiling of protease specificity*), w odróżnieniu od poprzednich, wykorzystuje do analizy jednocześnie N-końcowe jak i C-końcowe peptydy powstałe wskutek hydrolizy przez badany enzym. Podejście to nie wymaga znakowania chemicznego hydrolizowanych sekwencji peptydowych. Pierwszym etapem jest rozdzielenie lizatu komórkowego za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu (SDS-PAGE). Następnie wycina się z żelu paski zawierające białka i po wysuszeniu dodaje się do nich badany enzym, który przeprowadza reakcję proteolizy. Po reakcji hydrolizy w żelu, powstałe peptydy są ekstrahowane z żelu i poddane analizie z użyciem LC-MS/MS. Z powodu denaturacji proteomu, która ma miejsce w trakcie przygotowania próbek na SDS-PAGE, badana proteaza ma dostęp do większej liczby miejsc hydrolizy w przeciwieństwie do białek w stanie natywnym. Zaletą tej metody jest większa czułość niż w przypadku PICS, TAILS czy COFRADIC, jednak ograniczeniem jest masa badanego enzymu, gdyż zbyt duża proteaza może nie zostać efektywnie zaadsorbowana przez żel poliakrylamidowy, na którym znajdują się białka [197].

1.4. Markery chemiczne do badania enzymów

Enzymy proteolityczne odgrywają kluczową rolę w wielu procesach metabolicznych, dlatego ich nadmierna aktywność może doprowadzić do zbyt częstej i niebezpiecznej dla organizmów hydrolizy wiązań peptydowych w białkach. By temu zapobiec proteazy muszą podlegać ścisłej kontroli [198, 199]. Każda z klas enzymów zawiera zestaw inhibitorów naturalnie syntezowanych w organizmie, tzw. inhibitorów endogennych. Przykładem mogą być serpiny hamujące aktywność proteaz serynowych [200] czy cystatyny działające na proteazy cysteinowe [201]. Jeśli jednak ich równowaga zostanie zaburzona, może to się wiązać z wystąpieniem stanów patologicznych, takich jak choroby neurodegeneracyjne, nowotwory czy infekcje. Proteazy stanowią istotny cel

terapeutyczny, dlatego nie powinien dziwić obserwowany w ostatnich dziesięcioleciach gwałtowny rozwój badań w zakresie określenia specyficzności substratowej wielu z nich. Inhibitory enzymów proteolitycznych w dzisiejszych czasach są podstawą opracowania nowych leków, jak np. peptydomimetyczny rytonawir, który hamuje proteazy aspartylowe wirusów HIV-1 oraz HIV-2, co pokazuje jak ważne są dalsze badania nad kluczowymi enzymami proteolitycznymi i ich inhibitorami [202].

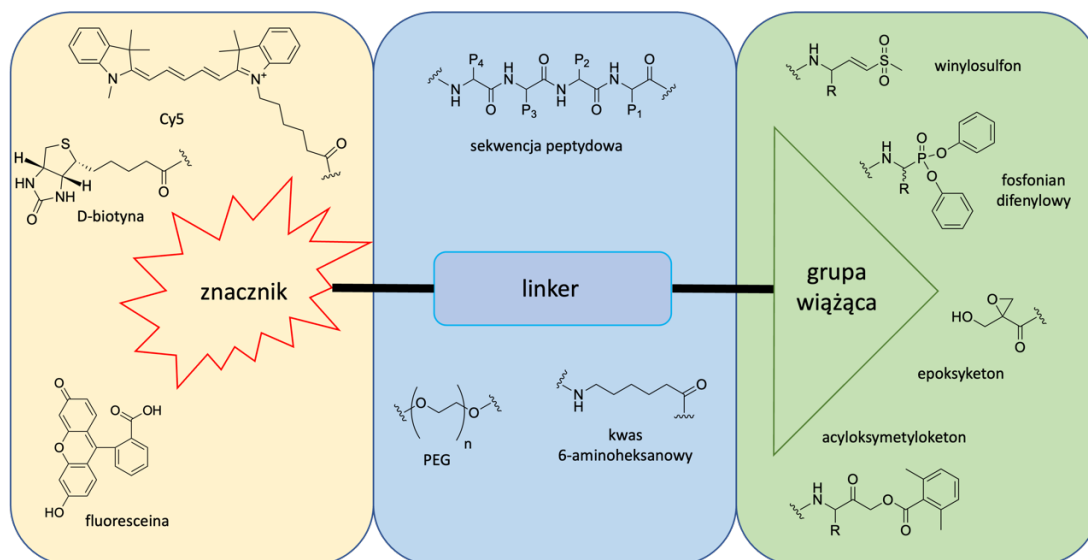
Jedną z pierwszych metod wykorzystaną do poznania najważniejszych procesów zachodzących w komórkach było sekwencjonowanie genomów organizmów zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Jednak uzyskana informacja okazała się niewystarczająca, gdyż nie odzwierciedlała całkowitych produktów ekspresji. W związku z tym naukowcy skoncentrowali się na rozwinięciu analizy proteomicznej. Również w tym przypadku okazało się, że dla proteaz nie jest to optymalna metoda. Aktywność enzymów proteolitycznych jest zależna nie tylko od endogennych inhibitorów, ale także od licznych modyfikacji potranslacyjnych, do których zalicza się m.in. metylację, acetylację, fosforylację czy ubikwitynację. Sprawia to, że ostatecznie ilościowa analiza peptydaz w proteomie nie jest równoznaczna z ich aktywnością proteolityczną [203]. Również wykorzystywane powszechnie przeciwciała w badaniach nad proteazami detektują wszystkie białka obecne w próbce, niezależnie od ich aktywności. Aktywność enzymów proteolitycznych dopełnia obraz uzyskany w badaniach proteomicznych oraz genetycznych pokazując nam prawdziwe znaczenie biologiczne danego enzymu. Nowe techniki proteomiczne, jak mikromacierze białkowe, drożdżowy system dwuhybrydowy czy wykorzystanie chromatografii ciekłej sprzężonej ze spektrometrią mas pozwoliły zrozumieć właściwości funkcjonalne enzymów *in vitro*, jednak precyzyjna ocena białek w tkankach czy komórkach wymaga bezpośredniej i dokładniejszej analizy ich aktywności. Metodą, która umożliwia takie badania jest *Activity Based Protein Profiling* (ABPP). Jest to dosyć młody dział proteomiki, który pozwala na bezpośrednie określenie aktywności enzymatycznej badanych enzymów. W metodzie tej wykorzystywane są małowczątkowe związki chemiczne, tzw. markery chemiczne (ang. *activity-based probes*, ABPs), których rolą jest kowalencyjne przyłączenie się do centrum aktywnego enzymu umożliwiając jednocześnie detekcję związanej proteazy [204]. Markery chemiczne umożliwiają analizę złożonych układów biologicznych, takich jak lizaty komórkowe, nienaruszone komórki, osocze, tkanki czy nawet całe organizmy. Wiążą się one wyłącznie z enzymami, które są aktywne, nie z zymogenami czy proteazami związanymi z innymi inhibitorami.

Jest to obecnie jedno z najpowszechniej wykorzystywanych narzędzi chemicznych pozwalających na detekcję aktywowemu, czyli aktywnych form białek [205].

Markery chemiczne pierwszej generacji, zgodnie z ogólnie przyjętą konwencją, zawierają trzy kluczowe elementy [206]:

- 1) reaktywną grupę wiążącą się do miejsca aktywnego enzymu proteolitycznego,
- 2) znacznik, który umożliwia detekcję enzymu,
- 3) linker, którego zadaniem jest uniknięcie zawady sterycznej i oddzielenie reaktywnej grupy wiążącej od grupy reporterowej.

Schemat budowy markera chemicznego przedstawiono na rys. 16.



Rys. 16. Schemat budowy markera chemicznego.

Reaktywna grupa wiążąca (ang. *warhead*), znajdująca się najczęściej na C-końcu, dzięki właściwościom elektrofilowym tworzy kompleks z grupą nukleofilową proteazy łącząc się kowalencyjnie w jej miejscu aktywnym. Większość enzymów proteolitycznych posiada dobrze poznany mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego, dzięki czemu możliwa jest synteza nieodwracalnych inhibitorów, których ugrupowania elektrofilowe wykorzystuje się w projektowaniu markera chemicznego. Reszty te są selektywne dla odpowiednich grup proteaz, dzięki czemu unika się reakcji krzyżowych z pozostałymi grupami enzymów oraz innymi nukleofilami białkowymi. Wybrane ugrupowanie elektrofilowe musi być na tyle silne by reagować z nukleofilem miejsca aktywnego i jednocześnie nie wchodzić w reakcję z innymi białkowymi resztami

nukleofilowymi, a jego aktywność nie może doprowadzić do powstania niespecyficzných modyfikacji białka [207-209]. Przykładowo powszechnie dla proteaz serynowych wykorzystuje się estry difenylowe kwasów α -aminoalkanofosfonianowych, dla proteaz cysteinowych metyloketony, dla proteaz treoninowych winylosulfony [210].

Drugim elementem strukturalnym jest grupa reporterowa odpowiadająca za detekcję i/lub oczyszczanie znakowanego białka znajdująca się na N-końcu markera chemicznego. Jako pierwszą grupę znaczników wykorzystywano radioizotopy. Przykładowo ^{125}I , który emituje promieniowanie gamma, może być wprowadzony do dowolnego inhibitora zawierającego grupę fenolową, dzięki czemu takie białko może być analizowane przy wykorzystaniu jedno- lub dwuwymiarowej elektroforezy i wizualizowane za pomocą autoradiografii. Korzystając z markerów znakowanych izotopami określono aktywność proteaz cysteinowych – katepsyn i kaspaz oraz treoninowych – proteasomu. Jednak liczne wady, do których należy ograniczona trwałość związana z czasem półtrwania izotopu, a także restrykcyjne przepisy bezpieczeństwa i wymagania laboratoryjne, spowodowały konieczność poszukiwania innych związków pełniących funkcję znaczników [206]. Przełomowym odkryciem było wykorzystanie znaczników fluorescencyjnych. Są one bezpieczne w użyciu i dostępne komercyjnie oraz cechuje je w zależności od struktury różny zakres długości fali wzbudzenia i emisji. Niedrogimi przykładami fluoroforów są barwniki ksantenowe (np. rodamina i fluoresceina). Do ich wad można zaliczyć jednak wrażliwość na światło i brak przepuszczalności przez błony komórkowe. W związku z tym nie można ich stosować w badaniach *in vivo*. Barwniki cyjaninowe (Cy3, Cy5, Cy7) i BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen) należą do fotostabilnych fluoroforów o wysokiej wydajności kwantowej, wąskim widmie emisji i charakteryzują się przepuszczalnością przez błonę komórkową. Dzięki temu mogą być stosowane w układach biologicznych [211, 212]. Wadą jest niestety wysoka cena, dlatego przy projektowaniu markerów chemicznych często wykorzystywana jest biotyna jako znacznik powinowactwa. Jej silne powinowactwo wobec awidyny i streptawidyny umożliwia oczyszczanie biotynylowanych białek, a także wychwytywanie ich z mieszanin biologicznych wykorzystując sfunkcjonalizowane ziarna agarozowe [213, 214]. Tworzący się kompleks (biotyna-awidyna lub biotyna-streptawidyna) jest stabilny oraz odporny na zmieniające się pH i umożliwia detekcję nawet bardzo małych ilości enzymu. Wadą jest czasochłonny proces wyznakowania enzymu biotynylowanym markerem chemicznym oraz słaba

przepuszczalność przez błonę komórkową, co ogranicza jej wykorzystanie jedynie do badań na lizatach komórkowych [206]. Poręba i in. w 2020 roku wskazali nowy typ markerów chemicznych wizualizowanych za pomocą cytometrii masowej. W ich strukturze zawarty jest schelatowany jon metali przejściowych, głównie z grupy lantanowców. Dzięki wykorzystaniu różnorodności dostępnych izotopów możliwa jest jednoczesna wizualizacja kilkunastu parametrów w jednej komórce [205].

Ostatnim elementem strukturalnym markerów chemicznych jest linker, którego głównym zadaniem jest separacja grupy wiążącej od znacznika zmniejszając zawadę steryczną pomiędzy tymi dwoma ugrupowaniami i jednocześnie zwiększając dostępność ABP. Najczęściej jako linkery wykorzystuje się dłuższe związki alkilowe, takie jak kwas 6-aminoheksanowy czy polietery zwiększające hydrofilowość związku chemicznego, jak glikol polietylenowy. Czasami wykorzystuje się również aminokwasy pozbawione grup bocznych jak glicyna czy β -alanina. Dodatkowo, w celu uzyskania selektywności między linkerem a reaktywną grupą wiążącą, wprowadza się fragment peptydowy naśladujący substrat dedykowany danemu enzymowi eliminując lub obniżając reaktywność krzyżową markera chemicznego z innymi proteazami. Uzyskanie takiego fragmentu jest możliwe poprzez analizę miejsc hydrolizy substratów fizjologicznych, jednak te składają się jedynie z aminokwasów naturalnie występujących w organizmach żywych, co może przekładać się na nieselektywne wiązanie markera chemicznego również przez inne enzymy. Wykorzystanie nienaturalnych aminokwasów w metodzie określenia profilu specyficzności substratowej pozwala na otrzymanie selektywnych związków dedykowanych danemu enzymowi i zapobiegają reaktywności krzyżowej [215-217].

Wewnętrznie wygaszane markery chemiczne (qABP, ang. *quenched ABP*) to szczególna grupa ABP. Łączą one cechy standardowych markerów chemicznych, takich jak nieodwracalne, kowalencyjne wiązanie się z centrum aktywnym proteazy oraz substratów wewnętrznie wygaszanych, których fluorescencja jest wygaszona przez obecność wygaszacza (ang. *quencher*). Po reakcji hydrolizy, enzym jest trwale znakowany poprzez dysocjację grupy wygaszającej i wiązanie się z donorem, czyli z tym fragmentem markera chemicznego, który zawiera znacznik fluorescencyjny [218]. Wyznakowanie enzymu można potwierdzić elektroforezą żelową. Wygaszane markery chemiczne wykorzystuje się przede wszystkim do analizy ilościowej oraz wizualizacji

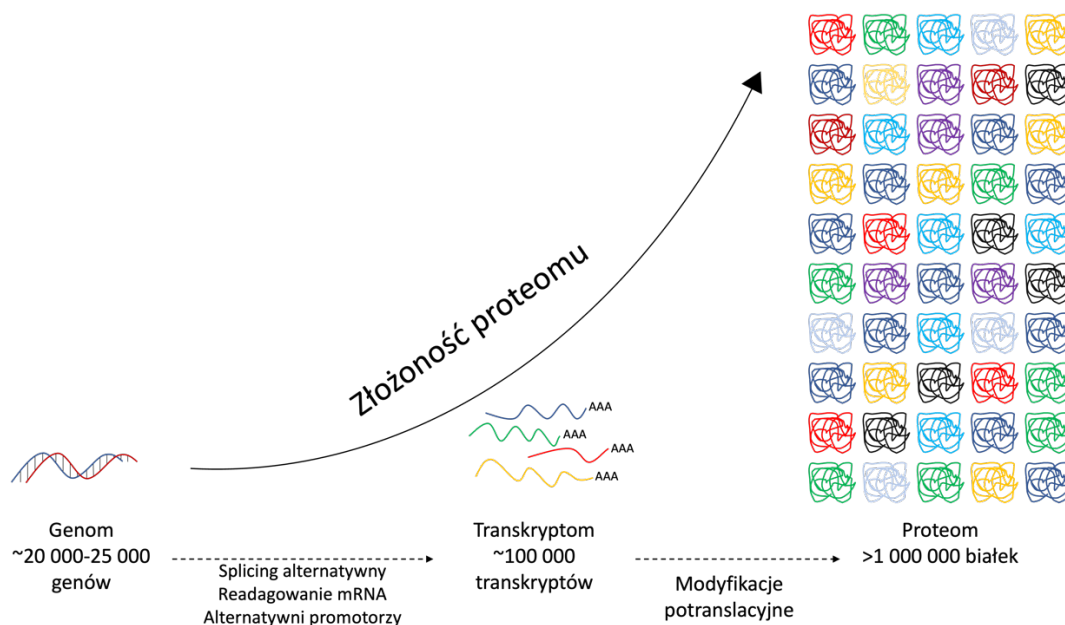
enzymów proteolitycznych w komórkach, a także w całych organizmach, gdzie wskazują miejsca zwiększonej aktywności proteolitycznej [219-222].

Markery chemiczne są wykorzystywane obecnie na wiele sposobów i w literaturze znajdziemy wiele przykładów na wykorzystanie ich do identyfikacji proteaz. Jednym z przykładów jest praca Jessani i in., gdzie markery chemiczne wskazały wzmożoną aktywność enzymów proteolitycznych w nowotworach [223]. Heal i in. podsumowali, że markery stosuje się w badaniach [224]:

- pozwalającym na przypisanie roli biologicznej nowym białkom,
- poziomu aktywności enzymatycznej,
- selektywności nowych inhibitorów zarówno odwracalnych jak i nieodwracalnych w warunkach *in vivo*,
- ilościowego oznaczania enzymów oraz ich aktywności *in vivo*,
- zdefiniowania lokalizacji enzymów wykorzystując mikroskopię i obrazowanie całych organizmów,
- strukturalnych oraz biochemicznych w celu określenia miejsca aktywnego enzymu bez konieczności stosowania mutagenezy.

1.5. Modyfikacje potranslacyjne

Synteza białek zachodzi podczas procesu zwanego translacją. Po nim jednak niektóre białka ulegają tzw. modyfikacjom potranslacyjnym, (PTM, ang. *post-translational modification*) dzięki czemu zwiększa się różnorodność funkcjonalną proteomu. Modyfikacje te polegają na kowalencyjnym przyłączeniu grup funkcyjnych, hydrolizie podjednostek regulatorowych lub degradacji białek. Mimo, że DNA naturalnie koduje „tylko” 20 aminokwasów, białka składają się z ponad 140 różnych reszt aminokwasowych. Modyfikacje potranslacyjne uważane są za jeden z dwóch mechanizmów poszerzający zdolność kodowania genomu do produkowania wysoce zróżnicowanych proteomów. Drugim mechanizmem jest dywersyfikacja białek poprzez splicing alternatywny, zachodząca na poziomie procesu translacji i polegająca na alternatywnym składaniu mRNA. W rzeczywistości proteomy są znacznie bardziej złożone niż przewidywania na podstawie analizy kodujących genomów [rys. 17].



Rys. 17. Schematyczne przedstawienie złożoności proteomu. Ludzki genom zawiera około 20 000 genów. Szacuje się, że proteom obejmuje ponad milion białek (na podstawie [225]).

Modyfikacje potranslacyjne można spotkać zarówno u organizmów eukariotycznych, jak i prokariotycznych, jednak u tych pierwszych są one znacznie bardziej powszechne. Niektóre z modyfikacji są łatwo odwracalne, dzięki antagonistycznemu działaniu określonych enzymów. Przykładowo fosforylację przeprowadzają kinazy, a defosforylację fosfatazy. Dzięki temu białka mogą szybko zmieniać swoje funkcje, nie ma potrzeby ich degradacji i syntezy *de novo*, co oszczędza czas i energię.

Modyfikacje potranslacyjne mogą wystąpić na dowolnym etapie życia białka. Niektóre białka modyfikuje się zaraz po zakończeniu procesu translacji, przed etapem fałdowania. Wczesne modyfikacje mogą wpływać na stabilność konformacyjną i wydajność fałdowania, co może decydować o lokalizacji, do której trafią białko. Inne białka mogą być modyfikowane na późniejszym etapie wpływając na ich aktywność biologiczną lub aktywując czy też dezaktywując określone funkcje katalityczne. Modyfikacje potranslacyjne są zaangażowane w wiele procesów komórkowych, wśród których można wymienić wzrost komórek, ich różnicowanie, apoptozę, oddziaływanie białko-białko lub komórka-komórka czy kontakt między środowiskiem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym [226-229].

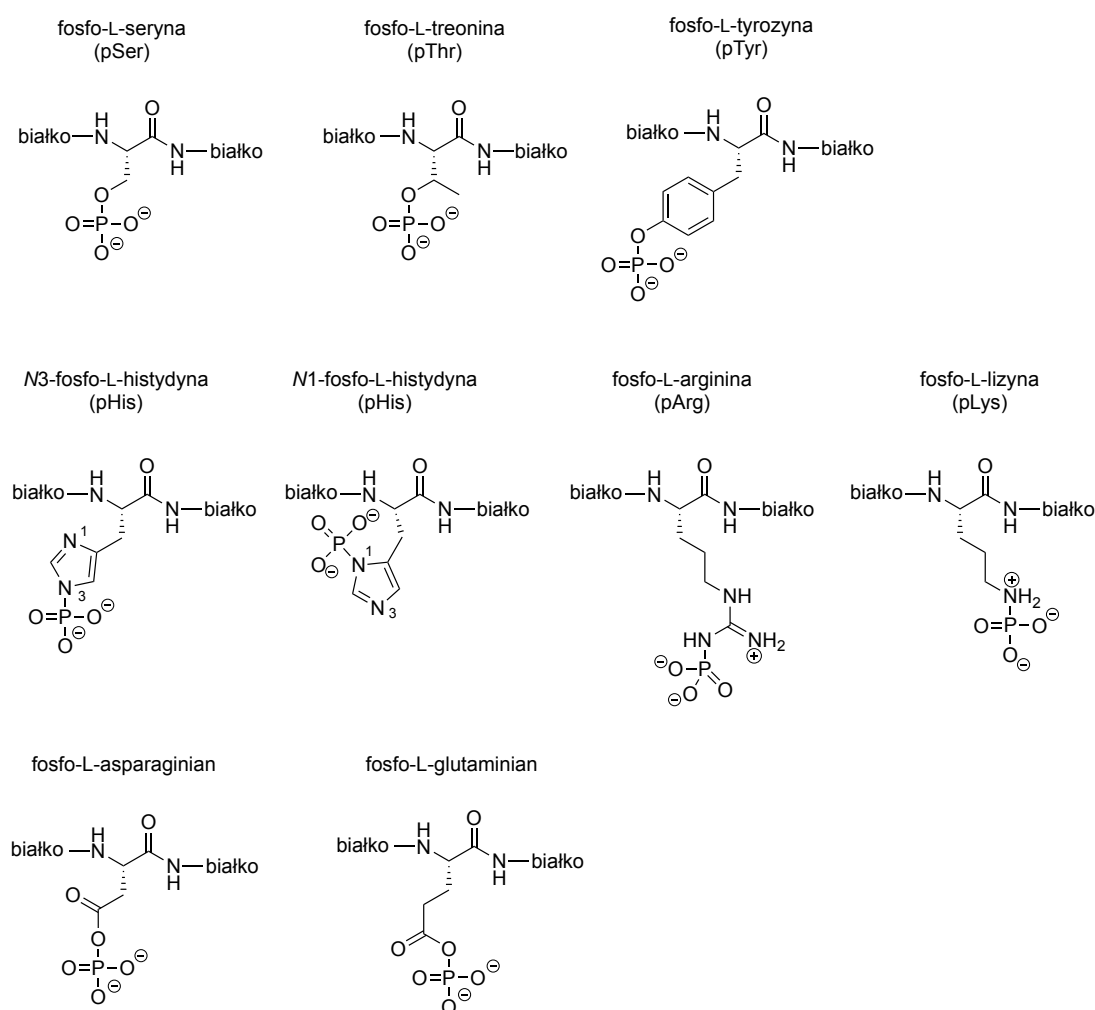
Szacuje się, że u wyższych eukariontów aż 5% genomu koduje enzymy przeprowadzające modyfikacje potranslacyjne proteomów. Wiadomo, że w sumie

fizjologicznie występuje ponad 400 takich modyfikacji. Możemy je podzielić ze względu na dołączoną grupę funkcyjną, przyłączenie innych białek lub peptydów, zmianę charakteru chemicznego reszt aminokwasowych czy hydrolizę proteolityczną. Do najpopularniejszych modyfikacji należą: tworzenie wiązań disiarczkowych, acetylacja, biotynylacja, ubikwitynacja, glikozylacja, hydroksylacja, metylacja, utlenianie czy fosforylacja. Modyfikacjom tym ulegają łańcuchy boczne aminokwasów. Najczęściej modyfikacje obserwuje się na resztach: cysteiny, metioniny, seryny, tyrozyny, treoniny, lizyny, histydyny, argininy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glutaminy, asparaginianu. Pozostałe naturalnie występujące aminokwasy, czyli prolina, glicyna, leucyna, izoleucyna, alanina, walina, fenyloalanina i tryptofan, rzadko ulegają kowalencyjnej modyfikacji ich łańcuchów bocznych. Niektóre białka ulegają więcej niż jednej modyfikacji by móc pełnić określoną funkcję. Przykładem są histony, które wymagają metylacji, acetylacji, fosforylacji, ubikwitynacji, ADP-rybozylacji i SUMOylacji na różnych etapach działania [230, 231].

Fosforylacja białek pierwszy raz została opisana w 1906 roku, jednak dopiero 20 lat później opisano pierwszą enzymatyczną fosforylację białek [232, 233]. Proces ten jest ważnym, odwracalnym mechanizmem regulacyjnym odgrywającym kluczową rolę w aktywności wielu enzymów, kanałów błonowych czy innych białek w organizmach pro- i eukariotycznych. **Jest to najszerszej badany rodzaj modyfikacji występujący u prawie jednej trzeciej białek w komórkach eukariotycznych.** Fosforylacja odgrywa istotną rolę w kluczowych procesach komórkowych, takich jak: replikacja, transkrypcja, apoptoza, odpowiedź immunologiczna czy metabolizm komórkowy [234, 235]. Wykazano, że zakłócenie szlaku fosforylacji może prowadzić do różnych chorób takich jak nowotwory, choroby serca czy choroba Parkinsona. Wiadomo, że hiperfosforylacja białka tau występującego w komórkach nerwowych odgrywa ważną rolę w etiologii zaburzeń neurodegeneracyjnych, takich jak tauopatie czy choroba Alzheimera ułatwiając tworzenie się wewnątrzkomórkowych spletków neurofibrylarnych [236]. Z drugiej strony mutacja w genie *Per2* prowadząca do braku fosforylacji białka *Per2* (ang. *Period 2*) przejawia się rodzinnym syndromem zaawansowanej fazy sennej (FASPS, ang. *familial advanced sleep-phase syndrome*). Skutkuje on przestawieniem zegara biologicznego. Dominującym zachowaniem jest wczesne zasypianie (około 19:30) związane ze wczesnym przebudzeniem (ok. 4:30) z zachowaniem jednak normalnej długości snu. Co ciekawe, pokazano, że jeśli do mysiego genu *Per2* wprowadzi się mutację powodującą zwiększoną

liczbę fosforylacji w produkowanym białku, faza snu przesunie się w drugą stronę, co spowoduje późniejsze zasypianie i późniejsze przebudzenie [237].

Fosforylacji w organizmach żywych mogą ulegać różne reszty aminokwasowe. Najczęściej badane są fosforylacje grup hydroksylowych reszt seryny, treoniny i tyrozyny, jednak oprócz nich inne reszty również są zdolne do fosforylacji. Są one tak samo ważne, jednak znacznie słabiej poznane są ich funkcje biologiczne. Zaliczamy do nich: histydynę, argininę, lizynę (fosforylacja grup aminowych) oraz kwas asparaginowy i glutaminowy (fosforylacja grupy karboksylowej) (rys. 18) [238-242].



Rys. 18. Wzory fosforylowanych reszt naturalnych aminokwasów (na podstawie [240]).

Z chemicznego punktu widzenia fosforylacja skutkuje wprowadzeniem podwójnego ładunku ujemnego, zlokalizowanego w łańcuchu bocznym zmodyfikowanej reszty. Wskazuje to na częściowe podobieństwo do naturalnie naładowanych reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego. Dodatkowo analiza porównawcza genomów

prokariotycznych i eukariotycznych pokazała, że niektóre miejsca fosforylacji wyewoluowały z aminokwasów kwaśnych, co sugeruje, że białka, które oddziałują z resztami Asp/Glu mogą także tolerować fosforylowaną serynę czy treoninę [238]. Jak już było opisane, kaspaza-3 oraz kaspaza-7 hydrolizują wiązanie peptydowe po karboksylowej stronie kwasu asparaginowego [117]. W 2003 r. przedstawiono wyniki, w których opisano wpływ fosforylacji w okolicy miejsca hydrolizy naturalnych substratów (m.in. białka PARP - polimeraza poli(ADP-rybozy), PS2 - presenilina 2) przez kaspazę-3, -7 i -8. Stwierdzono, że peptydy zawierające fosforylowaną resztę seryny w pozycji P4 i P1' są znacznie mniej podatne na proteolizę w porównaniu z substratami zawierającymi naturalną serynę, podczas gdy fosfoseryna w pozycji P3 nie ma istotnego wpływu na reakcję hydrolizy. Substraty zarówno z fosfoseryną jak i seryną w pozycji P1 nie były hydrolizowane przez te enzymy potwierdzając rygorystyczną specyficzność substratową w tej pozycji i konieczność reszty kwasu asparaginowego [239]. W 2016 r. pojawiły się jednak badania wskazujące, że wyłącznie kaspaza-3 może hydrolizować wiązanie po karboksylowej stronie fosfoseryny w substracie syntetycznym, co pozwoliłoby na rozróżnienie kaspazy-3 od kaspazy-7. Wykazano, że substrat typu IQF zawierający sekwencję DEVpS↓ jest hydrolizowany przez kaspazę-3 jedynie trzykrotnie wolniej niż substrat z sekwencją DEVD↓. Analizy kinetyczne pokazały także, że zarówno kaspaza-3 jak i -7 są zdolne do hydrolizy substratów z sekwencją DEVE↓ jedynie dwukrotnie wolniej niż DEVD↓ [69]. W 2018 r. grupa badawcza Cieplaka na podstawie analiz teoretycznych postawiła hipotezę, że fosforylacja reszt treoninowych Thr¹¹⁰ oraz Thr⁴²⁵ znajdujących się w pozycji P2 oraz P1' w naturalnym substracie kaspazy-3 YAP1 (ang. *Yes-associated protein 1*) zmniejsza szybkość hydrolizy tego substratu. Podobne wyniki otrzymano w przypadku fosforylacji Ser⁸⁷ znajdującej się w pozycji P2' peptydu pochodzącego z substratu VIME (ang. *Vimentin*), który również jest naturalnym substratem kaspazy-3 [243]. **Zebrane wyniki pokazują, że fosforylacja może zatem zapewnić mechanizm regulacyjny chroniący substraty przed degradacją za pośrednictwem kaspaz.**

W dziedzinie chemii biologicznej, naukowcy często syntetyzują nowe związki, które są specyficznym rozpoznawane (substraty) bądź mają zdolność do selektywnego wiązania konkretnego enzymu proteolitycznego (markery chemiczne lub inhibitory). Okazuje się, że w ich strukturze lepszym wyborem często są nienaturalnie występujące reszty aminokwasowe, wśród których znajdują się także reszty z modyfikacjami potranslacyjnymi. Szczególnie interesujące wydaje się

to w przypadku występowania takich modyfikacji w bliskim otoczeniu miejsca hydrolizy. Reszty aminokwasowe w pozycjach P4-P1 bardzo często mają określone wymagania co do wielkości i rodzaju akceptowanych reszt aminokwasowych, dlatego ciekawym wydaje się sprawdzenie wpływu reszt aminokwasowych z modyfikacjami potranslacyjnymi na szybkość hydrolizy enzymatycznej.

W 2014 r. Kasperkiewicz i in. opisali profil specyficzności substratowej ludzkiej elastazy neutrofilowej (NE, ang. *human neutrophil elastase*) w pozycjach P4-P1. Wykazał on, że w pozycji P3 enzym ten preferuje podwójnie utlenioną L-metioninę (L-Met(O₂), sulfon L-metioniny). L-metionina pojedynczo utleniona (L-Met(O), sulfotlenek L-metioniny) była pięciokrotnie słabiej rozpoznawana. Ostatecznie sekwencja optymalna dedykowana elastazie zawierała w pozycji P3 podwójnie utlenioną metioninę: Ac-Nle(O-Bzl)-Met(O₂)-Oic-Abu-ACC. Możliwe było również przekształcenie otrzymanego substratu w marker chemiczny – biotyna-PEG(4)-Nle(O-Bzl)-Met(O₂)-Oic-Abu-PO₃Ph, który wykazał wysoką selektywność wobec badanego enzymu [172].

W 2017 r. Rut i in. opracowali profil specyficzności P4-P1 substratowej proteazy NS2B-NS3 pochodzącej z wirusa Zika, z którego wynika, że w pozycji P1 metylowana arginina jest najlepiej rozpoznawanym aminokwasem, a arginina jest rozpoznawana w prawie takim samym stopniu jak jej metylowana pochodna. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku profilowania kieszeni S2. L-Orn (ornityna, analog argininy) okazała się znacznie lepszą resztą aminokwasową w porównaniu z najlepszymi naturalnymi aminokwasami, jakim była lizyna i arginina. Ostatecznie najlepsze parametry kinetyczne osiągnął substrat z sekwencją Ac-DArg-Lys-Orn-Arg-ACC ($k_{kat}/K_M = 1\ 100\ 000\ M^{-1}s^{-1}$), ale parametry kinetyczne dla sekwencji Ac-DArg-Lys-Orn-Arg(Me)-ACC były tylko o 18% niższe ($k_{kat}/K_M = 905\ 000\ M^{-1}s^{-1}$) [244].

Trypsyna jest najczęściej stosowanym enzymem proteolitycznym do trawienia białek na krótkie peptydy w badaniach opartych na metodach proteomicznych i degradomicznych z wykorzystaniem spektrometrii mas opisywanych w rozdziale 1.3.4. Enzym ten jest bardzo aktywny katalitycznie i rozszczepia substraty wyłącznie po karboksylowej stronie dodatnio naładowanych reszt lizyny i argininy. W 2015 r. Burke i in. pokazali, że trypsyna może hydrolizować również ubikwitynowaną lizynę [245]. Te wyniki zainspirowały Porębę i in. w 2017 r. do eksperymentalnego sprawdzenia, czy trypsyna może hydrolizować substraty po potranslacyjnie zmodyfikowanych resztach lizyny i argininy, co byłoby szczególnie istotne w przypadku

analizy proteomicznych epigenetycznych markerów chemicznych. Zsyntezowano 2 związki kontrolne z naturalną arginina oraz lizyną w pozycji P1, jeden związek z alaniną (negatywna kontrola) oraz 5 związków ze zmodyfikowanymi aminokwasami, takimi jak: arginina metylowana, symetryczna arginina podwójnie metylowana, asymetryczna arginina podwójnie metylowana, cytrulina oraz ornityna. Badania potwierdziły, że trypsyna może hydrolizować po karboksylowej stronie zmodyfikowanych reszt aminokwasowych, jednak hydroliza ta zachodzi dużo wolniej niż w przypadku naturalnej argininy (stała specyficzności była o ponad 5×10^3 niższa w przypadku pojedynczo metylowanej argininy oraz $1,5 \times 10^5$ niższa w przypadku pozostałych reszt) [183]. Wyniki te pokazały jednak, że hydroliza ta może skutkować małą liczbą peptydów, które wcześniej mogły zostać przeoczone w analizach proteomicznych.

2. CEL PRACY

Modyfikacje potranslacyjne odpowiadają za kowalencyjne modyfikacje białek zachodzące po procesie translacji. Znacząco poszerzają repertuar 20 naturalnych aminokwasów i pełnią kluczową rolę w zwiększeniu różnorodności funkcjonalnej proteomu. Wpływają na stabilność konformacyjną białek oraz aktywność biologiczną aktywując bądź dezaktywując funkcje katalityczne. Enzymy proteolityczne mogą rozpoznawać aminokwasy z modyfikacjami potranslacyjnymi i hydrolizować substraty, które w swojej strukturze zawierają takie reszty aminokwasowe.

W literaturze od dawna wiadomo, że metylacja reszt lizyny oraz argininy ma kluczowe znaczenie w procesach komórkowych, jednak jest stosunkowo mało doniesień na temat metylacji łańcuchów bocznych kwasu asparaginowego i glutaminowego [246]. Opisanie w literaturze profile specyficzności substratowej katepsyny L oraz B, które określono wykorzystując biblioteki zdefiniowane i kombinatoryczne zawierające zarówno naturalne jak i nienaturalne reszty aminokwasowe, pokazują, że enzymy te w niewielkim stopniu mają zdolność do hydrolizy metylowanych reszt aminokwasowych w pozycji P1 substratu Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC [247, 248]. W przeciwieństwie do tych enzymów, preferencje substratowe katepsyny S zostały określone wyłącznie z wykorzystaniem naturalnych reszt aminokwasowych [32, 130, 140, 249], dlatego w niniejszej dysertacji skupiono się na wykorzystaniu zestawu nienaturalnych aminokwasów i poszerzeniu wiedzy na temat preferencji kieszeni wiążących S4-S2' katepsyny S. Dodatkowo określono również pełne profile specyficzności P4-P2' dla katepsyny B, L, V oraz K.

Celem pierwszej części pracy doktorskiej było określenie wpływu modyfikacji potranlacyjnych, w szczególności metylacji oraz fosforylacji naturalnych reszt aminokwasowych w pozycji P1, na aktywność katepsyny L, B, V, S oraz K. Hipoteza badawcza zakładała, że określenie pełnej specyficzności substratowej katepsyn za pomocą bibliotek zawierających naturalne jak i nienaturalne aminokwasy, a następnie porównanie ich preferencji substratowych pozwoli na **opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych dla katepsyny S.**

Do najpowszechniejszych modyfikacji potranslacyjnych należą utlenianie, ubikwitynacja, glikozylacja, biotynylacja, metylacja oraz fosforylacja. Do najszerzej badanych rodzajów modyfikacji występujących w przypadku prawie jednej trzeciej

białek w komórkach eukariotycznych należy fosforylacja. Badania prowadzone w ostatnich latach udowodniły, że fosforylacja może stanowić mechanizm regulacyjny chroniący substraty przed hydrolizą za pośrednictwem kaspaz. Z chemicznego punktu widzenia fosforylacja prowadzi do wprowadzenia podwójnego ładunku ujemnie zlokalizowanego w łańcuchu bocznym zmodyfikowanej reszty, co wskazuje na podobieństwo do naturalnie występujących naładowanych reszt kwasu asparaginowego oraz glutaminowego. Sugeruje to, że białka, które oddziałują z tymi resztami kwasowymi mogą również tolerować fosforylowaną serynę lub treoninę. Zarówno kaspaza-3 jak i kaspaza-7 rozpoznają w pozycji P1 kwas asparaginowy, dlatego **celem drugiej części pracy doktorskiej było zbadanie wpływu fosforylacji reszt seryny i treoniny w sekwencji peptydowej substratów na aktywność kaspazy-3 oraz kaspazy-7.**

Realizacja postawionych wyżej celów badawczych obejmowała:

1. Zbadanie wpływu fosforylacji oraz metylacji aminokwasów w pozycji P1 na aktywność katepsyny L, B, V, S oraz K.
2. Określenie preferencji substratowych wybranych ludzkich katepsyn w pozycjach P4-P2' za pomocą zdefiniowanej oraz kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych.
3. Zaprojektowanie oraz syntezę tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych selektywnych względem katepsyny S.
4. Analizę kinetyczną zsyntetyzowanych tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych i wybranie sekwencji optymalnej dla katepsyny S.
5. Zaprojektowanie, syntezę i analizę biochemiczną markera chemicznego selektywnego wobec katepsyny S.
6. Zaprojektowanie, syntezę i wyznaczenie parametrów kinetycznych substratów zawierających fosforylowane reszty seryny oraz treoniny dla kaspazy-3 oraz -7.

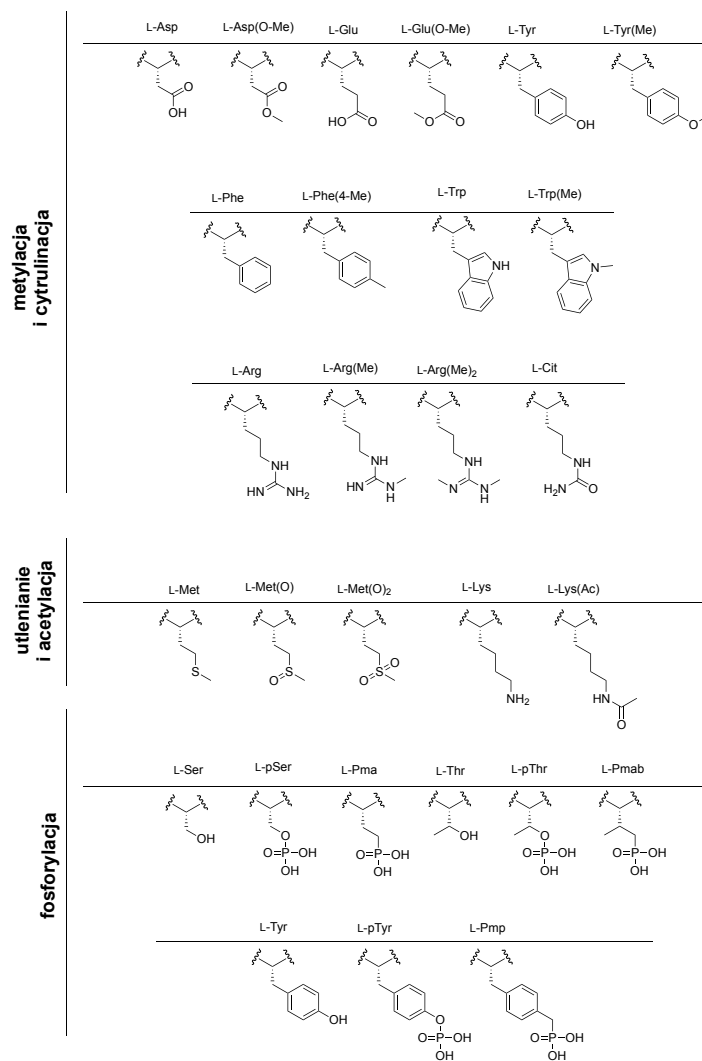
3. BADANIA WŁASNE

3.1. Katepsyny

3.1.1. Analiza kinetyczna tetrapeptydowych analogów sekwencji kontrolnej (Ac-ARLR-ACC) zawierających zmodyfikowane pochodne reszt aminokwasowych w pozycji P1

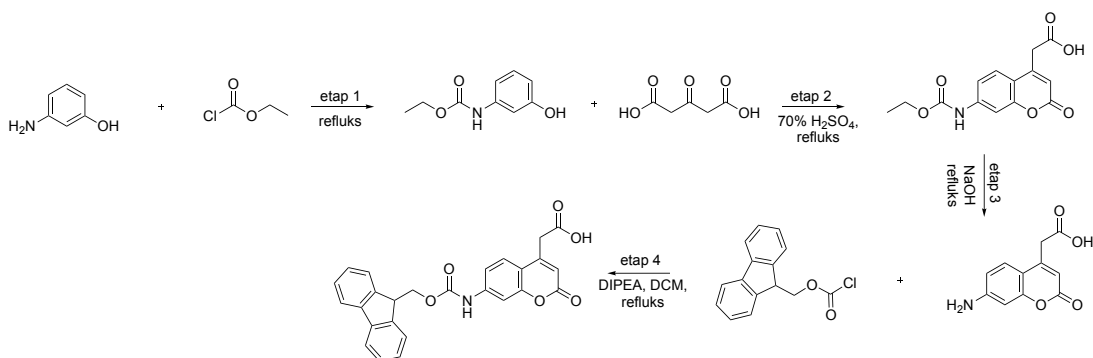
W celu sprawdzenia wpływu metylacji, acetylacji, fosforylacji oraz utlenienia reszt aminokwasowych na aktywność enzymatyczną katepsyn wykonano syntezę oraz zbadano kinetykę reakcji hydrolizy pochodnych sekwencji kontrolnej Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC wykorzystywanej przy badaniu aktywności katepsyn i hydrolizowanej przez katepsynę L, B, V, S oraz K [32, 247, 248]. Najbardziej restrykcyjną kieszenią enzymatyczną jest kieszeń S1, która bardzo często wymaga konkretnej reszty aminokwasowej w pozycji P1, by zapewnić efektywną hydrolizę. W celu sprawdzenia wpływu modyfikacji tej reszty na szybkość reakcji hydrolizy w pozycji P1 L-argininę zastąpiono innym aminokwasem naturalnym i jego odpowiednikiem ze zmodyfikowaną grupą boczną (rys. 19)

Syntezę tetrapeptydowych substratów rozpoczęto od syntezy bifunkcyjnego znacznika fluorescencyjnego Fmoc-ACC-OH, który znajdował się w zaprojektowanych związkach w pozycji P1' i pozwalał mierzyć aktywność enzymatyczną katepsyn wobec tych substratów. W porównaniu do komercyjnie stosowanego w związkach znacznika AMC (7-amino-4-metylokumaryna), ACC (kwas 7-aminokumaryno-4-octowy) zawiera w swojej strukturze grupę aminową oraz karboksylową, dzięki czemu możliwe jest kowalencyjne połączenie go do podłoża stałego. Ponadto ACC wykazuje około 3-krotnie większą wydajność kwantową fluorescencji niż AMC, dzięki czemu w badaniach kinetycznych zużywa się mniejszą ilość substratów i enzymów [164, 250]. Dodatkowo jego synteza na dużą skalę jest stosunkowo prosta i tania, co uzasadnia użycie go w syntezie substratów fluorogenicznych na podłożu stałym.



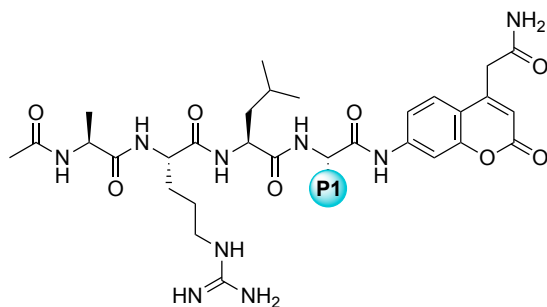
Rys. 19. Wzory reszt aminokwasowych wykorzystanych w syntezie substratów o sekwencji Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC.

Znacznik Fmoc-ACC-OH otrzymano stosując 4-etapową syntezę według protokołu Maly'ego [164], którą rozpoczęto od przeprowadzenia reakcji 3-aminofenolu z chloromrówczanem etylu w wyniku czego otrzymano (3-hydroksyfenylo)karbaminian etylu. W drugim etapie produkt ten poddano reakcji kondensacji Pechmanna z kwasem 1,3-acetonodikarboksylowym otrzymując kwas 7-*N*-(etoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowy. Następnie w wyniku reakcji hydrolizy zasadowej, usunięto z grupy aminowej grupę etoksykarbonylową. Ostatnim etapem było zabezpieczenie wolnej grupy aminowej grupą ochronną Fmoc, by znacznik ten mógł być wykorzystany w syntezie na podłożu stałym. W tym celu kwas 7-aminokumaryno-4-octowy poddano reakcji z Fmoc-Cl. Otrzymany znacznik Fmoc-ACC-OH wykorzystano do dalszych badań. Schemat ogólny reakcji otrzymania Fmoc-ACC-OH przedstawiono na rys. 20.



Rys. 20. Schemat reakcji syntezy znacznika Fmoc-ACC-OH (na podstawie [164]).

Substraty zsyntezowano korzystając z metody syntezy na podłożu stałym z użyciem żywicy amidowej typu Rink Amide AM (stopień podstawienia 0,74 mmol/g), a do wydłużania łańcucha peptydowego użyto strategii Fmoc [174]. Syntezę rozpoczęto od przyłączenia bifunkcyjnego znacznika fluorogenicznego Fmoc-ACC-OH do nośnika stałego. Grupę ochronną Fmoc za każdym razem usuwano stosując 20% roztwór piperidyny w DMF. Tak odblokowaną żywicę podzielono na 27 porcji, które przeniesiono do aparatów do półautomatycznej syntezy równoległej (ang. *48-well semiautomatic FlexChem synthesizer*). Następnie do każdej z tych porcji przyłączono jedną z 27 naturalnych lub nienaturalnych reszt aminokwasowych. W kolejnych krokach przyłączono reszty Fmoc-Leu-OH w pozycji P2, Fmoc-Arg(Pbf)-OH w pozycji P3 oraz Fmoc-Ala-OH w pozycji P4. Do aminowego N-końca dołączono grupę acetylową. Żywicę wysuszone, a substraty uwolniono z podłoża stałego wraz z grupami blokującymi łańcuchy boczne reszt aminokwasowych. Substraty oczyszczono na HPLC, a następnie ich masę oraz czystość potwierdzono na LC-MS. Czystość każdego związku wynosiła powyżej 95%. Związki zostały zliofilizowane, rozpuszczone w DMSO do stężenia końcowego 20 mM i przechowywane w temperaturze -20°C .



Rys. 21. Schemat ogólnej struktury zsyntezowanych związków Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC.

Zsyntezowane substraty o ogólnej strukturze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC przedstawionej schematycznie na rys. 21 poddano analizie kinetycznej. Stężenie enzymów wynosiło odpowiednio: 0,2 nM dla katepsyny L, 5 nM dla katepsyny B i S, 2,5 nM dla katepsyny V oraz 1,5 nM dla katepsyny K, a stężenie substratów wynosiło 10 μ M. Pomiary wykonano co najmniej dwukrotnie, a obliczone odchylenie standardowe nie przekroczyło 10%. Wyniki przedstawiono na rys. 22, wartości wyrażono w procentach względnej aktywności enzymu wobec substratu, gdzie za 100% przyjęto wartość szybkości hydrolizy wobec substratu kontrolnego Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC.

	Pozycja P1				
	Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC				
	katepsyna L	katepsyna B	katepsyna V	katepsyna S	katepsyna K
L-Arg	100%	100%	100%	100%	100%
L-Arg(Me)	52%	45%	67%	95%	63%
L-Arg(Me) ₂	39%	34%	42%	44%	43%
L-Cit	22%	43%	45%	153%	58%
L-Lys	50%	63%	48%	107%	59%
L-Lys(Ac)	11%	23%	36%	57%	31%
L-Met	21%	34%	56%	88%	29%
L-Met(O)	12%	10%	23%	38%	7%
L-Met(O ₂)	13%	11%	29%	56%	10%
L-Asp	0%	0%	0%	0%	0%
L-Asp(OMe)	2%	2%	7%	9%	0%
L-Glu	1%	3%	4%	22%	0%
L-Glu(OMe)	25%	24%	49%	95%	18%
L-Trp	8%	4%	36%	37%	5%
L-Trp(Me)	2%	3%	10%	11%	2%
L-Phe	10%	3%	39%	15%	0%
L-Phe(4-Me)	5%	3%	45%	15%	4%
L-Tyr	6%	6%	47%	31%	1%
L-Tyr(Me)	8%	3%	42%	14%	1%
L-pTyr	0%	0%	17%	16%	0%
L-Pmp	1%	0%	24%	12%	0%
L-Ser	1%	0%	1%	29%	0%
L-pSer	0%	0%	0%	0%	0%
L-Pma	0%	0%	2%	4%	0%
L-Thr	14%	16%	25%	101%	16%
L-pThr	0%	0%	0%	0%	0%
L-Pmab	0%	0%	0%	0%	0%

MIN MAX

Rys. 22. Uzyskane wyniki reakcji hydrolizy dla substratów ze zmodyfikowaną pozycją P1 dla katepsyny L, B, V, S oraz K. W tabeli przyjęto szybkość hydrolizy substratu Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC jako 100% i do niego porównywano pozostałe uzyskane wartości szybkości hydrolizy. Pomiary zostały wykonane minimum dwukrotnie, a odchylenie standardowe nie przekraczało 10%.

Uzyskane dane pokazują, że w przypadku zdefiniowanego substratu Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC (rys. 22), wprowadzenie reszty aminokwasowej z modyfikacją potranslacyjną w pozycji P1 może zarówno zwiększyć jak i zmniejszyć szybkość reakcji hydrolizy bądź też całkowicie ją zahamować w stosunku do substratu kontrolnego. Metylacja argininy – zarówno tylko jednej grupy aminowej, jak i obu skutkuje niższą szybkością reakcji hydrolizy substratów, jednak nie hamuje jej całkowicie, a w przypadku katepsyny S, wprowadzając resztę L-Arg(Me) do substratu kontrolnego uzyskano ponad 95% szybkości hydrolizy substratu kontrolnego. Często modyfikacja argininy w restrykcyjnej pozycji P1 wiąże się z całkowitym zahamowaniem aktywności enzymatycznej [175, 251]. Tolerancja reakcji metylacji w tej pozycji może być zatem elementem rozróżniającym katepsyny od innych enzymów, które obligatoryjnie wymagają L-argininy w pozycji P1.

Cytrulinacja, czyli inaczej deiminacja, polega na zamianie dodatnio naładowanej reszty argininy w obojętną resztę cytruliny. Katepsyny: L, B, V oraz K gorzej rozpoznają w pozycji P1 resztę L-Cit niż L-Arg, jednak w przypadku katepsyny S cytrulinacja powoduje lepsze dopasowanie substratu do jej miejsca aktywnego i uzyskanie większej szybkości hydrolizy niż w przypadku substratu kontrolnego (szybkość hydrolizy na poziomie 153% w porównaniu do substratu Ac-ARLR-ACC).

Reszty kwasowe w pozycji P1 nie są dobrze rozpoznawalne przez katepsyny. Wprowadzenie kwasu L-asparaginowego całkowicie zahamowało hydrolizę substratów w przypadku wszystkich katepsyn. Jego metylowana forma była rozpoznawalna przez katepsyny L, B, V oraz S, jednak szybkość reakcji hydrolizy nie przekroczyła 10% uzyskanej szybkości hydrolizy substratu kontrolnego. Kwas L-glutaminowy charakteryzujący się dłuższym łańcuchem bocznym o jedną resztę metylową w stosunku do kwasu L-asparaginowego był rozpoznawalny przez katepsynę S na poziomie 22% w porównaniu do substratu kontrolnego. W przypadku pozostałych enzymów otrzymano wartości: katepsyna L – 1%, B – 3%, V – 4%, K – brak hydrolizy. Wprowadzenie jego metylowego odpowiednika pozytywnie wpłynęło na uzyskane wartości szybkości hydrolizy: katepsyna L – 25%, katepsyna B – 24%, katepsyna V – 49%, katepsyna K – 18%. W przypadku katepsyny S osiągnięto szybkość reakcji hydrolizy substratu z metylowanym kwasem glutaminowym w pozycji P1 na poziomie reszty L-argininy, co zostało wykorzystane w dalszej części pracy do uzyskania selektywnego związku dedykowanego temu enzymowi.

Zarówno wprowadzenie naturalnych reszt aminokwasów: L-tryptofanu, L-feniloalaniny oraz L-tyrozyny jak i ich metylowanych odpowiedników obniżyło szybkość reakcji hydrolizy. Szukając związków selektywnych, warto podkreślić, że w przypadku katepsyny V metylowane reszty feniloalaniny oraz tyrozyny są rozpoznawane na podobnym poziomie, co ich naturalne odpowiedniki, co mogłoby zostać wykorzystane przy projektowaniu sekwencji selektywnej dla tego enzymu, szczególnie, że katepsyna V oraz L wykazują nakładającą się specyficzność substratową.

Wykorzystanie L-lizyny zamiast L-argininy w sekwencji kontrolnej pozwoliło uzyskać lepsze wyniki szybkości hydrolizy w przypadku katepsyny S (107%), dla pozostałych enzymów wynosiły one około 50-60% szybkości hydrolizy substratu kontrolnego. Lizyna, podobnie jak arginina, jest aminokwasem zasadowym, z ładunkiem dodatnim w warunkach fizjologicznych. Wprowadzenie grupy acetylowej na wolnej grupie aminowej L-lizyny spowodowało spowolnienie reakcji hydrolizy substratów przez katepsyny.

Badając wpływ utlenienia reszty metioniny na szybkość hydrolizy substratów przez katepsyny, ustalono, że zmniejsza ono szybkość prowadzonej reakcji, przy czym lepsze parametry otrzymano wprowadzając w pozycję P1 podwójnie utlenioną metioninę niż metioninę z pojedynczym atomem tlenu.

Ostatnią badaną modyfikacją była fosforylacja. W przypadku reszty seryny oraz treoniny obecność fosforylowanej reszty całkowicie zatrzymuje proces reakcji hydrolizy. L-seryna jest rozpoznawana przez katepsynę S na poziomie 29%, natomiast dla katepsyny L oraz V szybkość tej hydrolizy wynosi 1%. W przypadku sekwencji Ac-Ala-Arg-Leu-Thr-ACC katepsyna S rozpoznaje ją tak samo dobrze jak substrat kontrolny. Pozostałe katepsyny hydrolizują ją na poziomie około 20%. Wprowadzenie grupy fosforanowej na grupie hydroksylowej treoniny całkowicie zatrzymuje hydrolizę tego substratu. W badaniach wykorzystano również nienaturalną pochodną fosforylowanej L-seryny, która pozbawiona jest atomu tlenu pochodzącego od grupy hydroksylowej seryny w łańcuchu bocznym (L-Pma). Substrat z resztą w tej pozycji był słabo rozpoznawany przez katepsynę V (2%) oraz S (4%), a w przypadku katepsyny L, B oraz K nie zaobserwowano hydrolizy substratu.

Reszta L-tyrozyny w pozycji P1 była najlepiej tolerowana przez katepsynę V oraz S, które hydrolizowały substrat Ac-Ala-Arg-Leu-Tyr-ACC na poziomie odpowiednio 47% oraz 31% względem substratu kontrolnego. Wprowadzenie grupy fosforanowej na ugrupowanie hydroksylowe L-tyrozyny nie zatrzymało całkowicie

reakcji hydrolizy tych substratów przez katepsynę V oraz S. Reszta L-Pmp jest nienaturalną fosforanową pochodną tyrozyny, pozbawioną ugrupowania hydroksylowego. Substraty z sekwencją Ac-Ala-Arg-Leu-Pmp-ACC były rozpoznawane przez katepsynę V (24%) oraz S (12%).

Na podstawie uzyskanych wyników nie można wyciągnąć ogólnego wniosku, że modyfikacje potranslacyjne reszty aminokwasowej znajdującej się w pozycji P1 w przypadku sekwencji Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC wpływają negatywnie lub pozytywnie na szybkość reakcji enzymatycznej w przypadku katepsyny L, B, V, S oraz K. Fosforylacja reszt serynowych oraz treoninowych całkowicie hamuje reakcję hydrolizy enzymatycznej, metylacja reszt aminowych argininy spowalnia zachodzącą reakcję, natomiast metylacja reszt kwasowych przyspiesza bądź umożliwia zajście hydrolizy w porównaniu do naturalnych reszt kwasowych w P1.

W celu zaprojektowania sekwencji selektywnych wykorzystujących aminokwasy z wyżej wymienionymi modyfikacjami potranslacyjnymi zdecydowano się na określenie pełnego profilu specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K. Poręba i in. w 2018 r. opublikowali selektywne sekwencje pozwalające na wizualizację katepsyny L [247]. Rok później, w 2019 r., przedstawili substraty oraz markery chemiczne dedykowane katepsynie B [248]. W 2023 r. Janiszewski i in. przedstawili opracowane substraty tetrapeptydowe oraz markery chemiczne pozwalające na detekcję katepsyny K [135]. W związku z tym w niniejszej dysertacji skupiono się na zaprojektowaniu substratów selektywnych wobec katepsyny S z wykorzystaniem reszt z modyfikacjami potranslacyjnymi. Określenie profilu specyficzności substratowej w pozycjach P2'-P1 określono dla wszystkich enzymów: katepsyny L, B, S, V oraz K.

3.1.2. Określenie profilu specyficzności substratowej w pozycjach P4-P2' ludzkich katepsyn

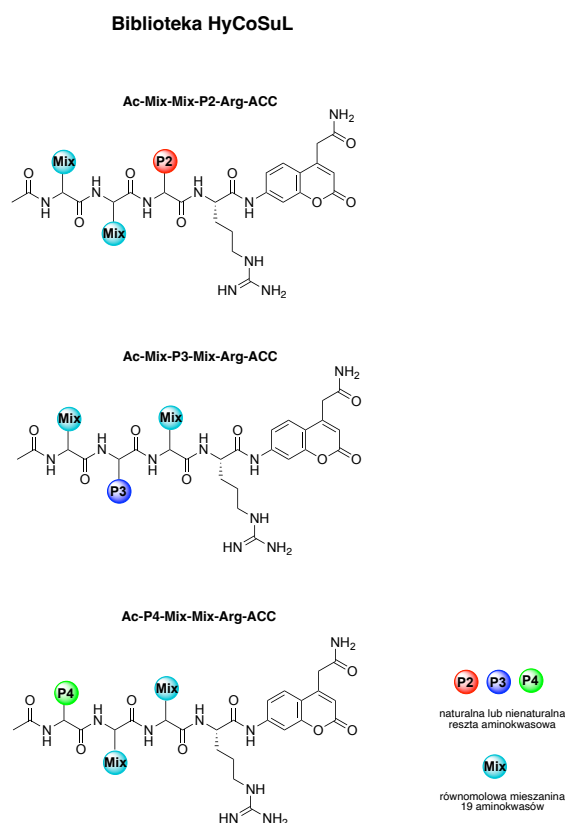
3.1.2.1. Preferencje katalityczne ludzkich katepsyn w kieszeniach S4-S2 przy wykorzystaniu kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych (HyCoSuL)

Do określenia preferencji kieszeni wiążących w miejscu aktywnym katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycjach P2, P3 i P4 wykorzystano metodę HyCoSuL opracowaną w zespole prof. dr hab. Marcina Drąga [174]. Jest to doskonałe narzędzie do określania preferencji substratowych wielu enzymów proteolitycznych. W zależności

od specyficzności danych proteaz, stosuje się bibliotekę z odpowiednią resztą aminokwasową w pozycji P1, która pasuje do pierwszej kieszeni wiążącej znajdującej się po N-końcowej stronie miejsca hydrolizy substratu (kieszka S1). Na podstawie doniesień literaturowych, badane katepsyny hydrolizują po karboksylowej stronie reszty argininy, dlatego do określenia aktywności tych enzymów została wykorzystana biblioteka zawierająca w pozycji P1 argininę (Ac-P4-P3-P2-Arg-ACC) [244]. Biblioteka ta składała się z trzech podbibliotek:

- podbiblioteka P2 o ogólnym wzorze: Ac-Mix-Mix-P2-Arg-ACC,
- podbiblioteka P3 o ogólnym wzorze: Ac-Mix-P3-Mix-Arg-ACC
- podbiblioteka P4 o ogólnym wzorze: Ac-P4-Mix-Mix-Arg-ACC,

gdzie Ac to grupa acetylowa, Mix określa równomolową mieszaninę aminokwasów naturalnych (bez cysteiny i z norleucyną zamiast metioniny), P4/P3/P2 to jeden ze 132 aminokwasów naturalnych bądź nienaturalnych, natomiast ACC to fluorofor, dzięki któremu możliwy jest pomiar postępu reakcji hydrolizy. Każda podbiblioteka składała się ze 132 pojedynczych, tetrapeptydowych substratów. Na rys. 23 przedstawiono schematyczną budowę biblioteki HyCoSuL.



Rys. 23. Schemat przedstawiający budowę biblioteki HyCoSuL użytej do badania preferencji katalitycznych ludzkiej katepsyny L, B, V, S oraz K.

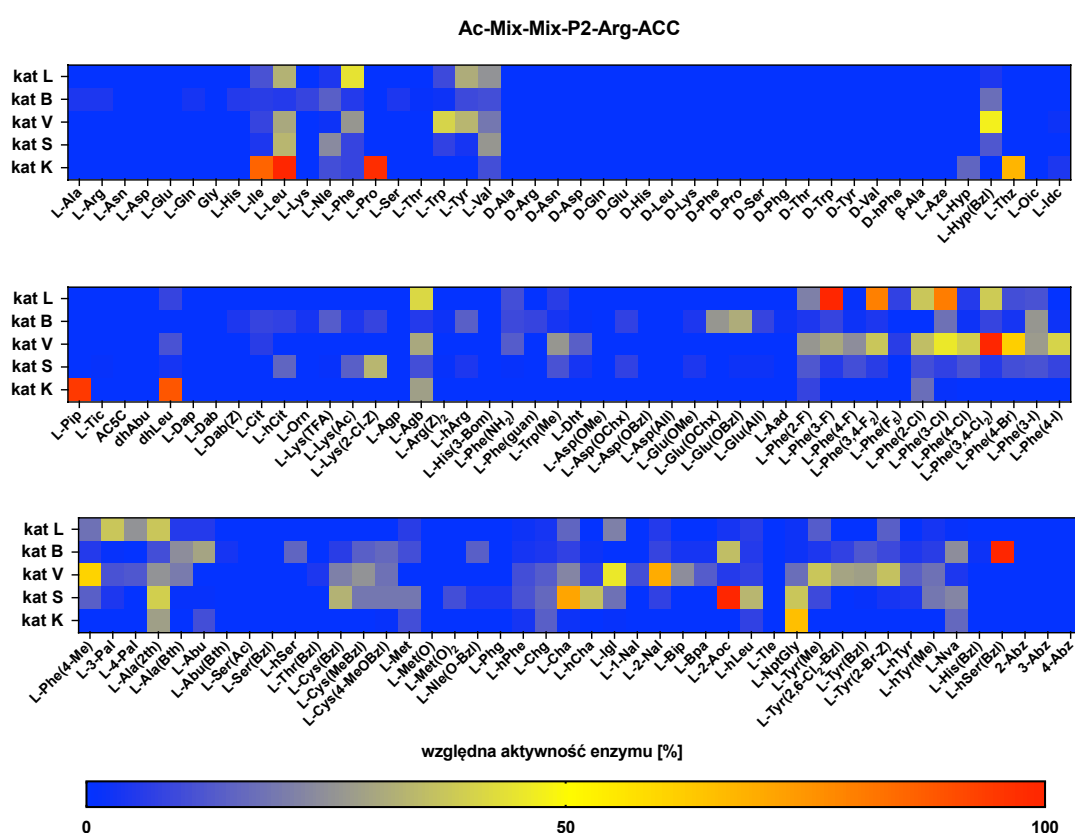
Wykorzystane aminokwasy różniły się od siebie strukturą łańcuchów bocznych obejmując reszty o różnym kształcie, rozmiarze oraz charakterze chemicznym. Takie połączenie pozwoliło otrzymać setki tysięcy kombinacji umożliwiając poznanie architektury miejsc wiążących enzymu i zbadanie ich oddziaływania z danymi resztami aminokwasowymi. Aktywność katepsyn mierzono stosując stężenie biblioteki równe 100 μM oraz stężenia katepsyn wyznaczonych eksperymentalnie wynoszących odpowiednio:

- katepsyna L: 0,5 nM dla substratów z podbiblioteki P2, 0,6 nM dla substratów z podbiblioteki P3, 0,4 nM dla substratów z podbiblioteki P4,
- katepsyna S: 2 nM dla substratów z podbiblioteki P2 oraz P3, 3 nM dla substratów z podbiblioteki P4,
- katepsyna V: 0,5 nM dla substratów z podbiblioteki P2, 0,4 nM dla substratów z podbiblioteki P3 oraz P4,
- katepsyna B: 0,25 nM dla substratów z podbiblioteki P2, 0,3 nM dla substratów z podbiblioteki P3, 0,5 nM dla substratów z podbiblioteki P4,
- katepsyna K: 4 nM dla substratów z podbiblioteki P2, P3 oraz P4.

Otrzymane wyniki pozwoliły określić profile specyficzności substratowych poszczególnych katepsyn, a preferencje katalityczne w pozycjach P2-P4 pomogły w zaprojektowaniu selektywnych sekwencji peptydowych.

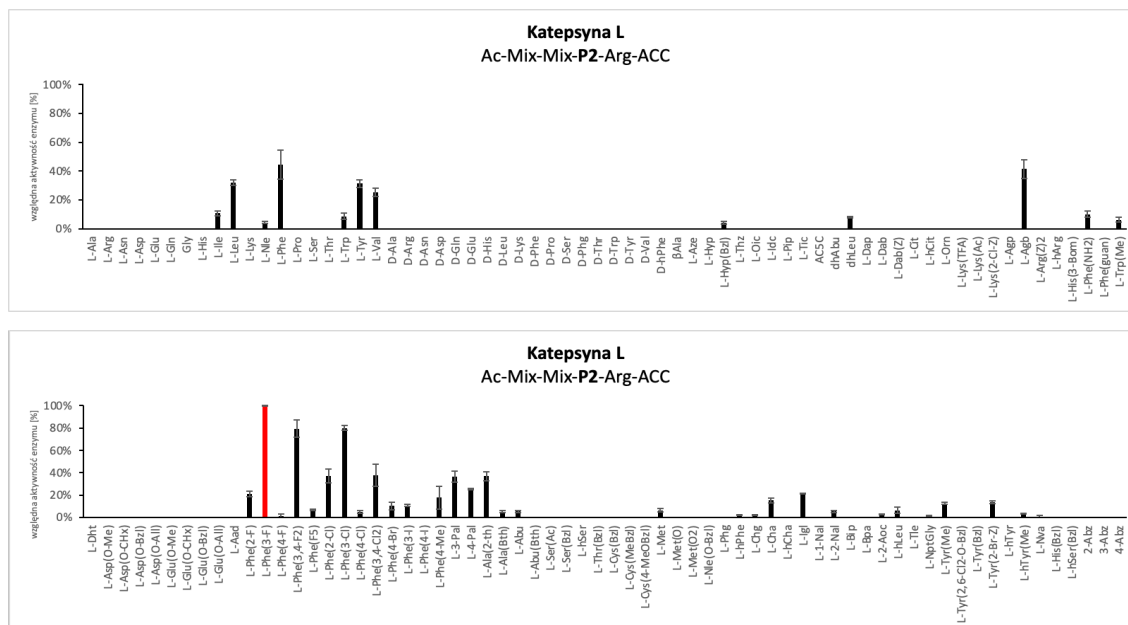
Pozycja P2.

Wszystkie badane katepsyny charakteryzowały się stosunkowo wąską specyficnością substratową w kieszeni S2 (Rys. 24). Jedynie kilka naturalnych i nienaturalnych aminokwasów było dobrze rozpoznawane, a względna aktywność enzymów wobec pozostałych reszt nie przekroczyła 30%. Reszty kwasu aminobenzoesowego (2-Abz, 3-Abc, 4-Abz) oraz D-aminokwasy były całkowicie nierozpoznawane przez dane proteazy w tej pozycji. Hydroliza wyłącznie L-aminokwasów świadczy o stereospecyficzności danej kieszeni.



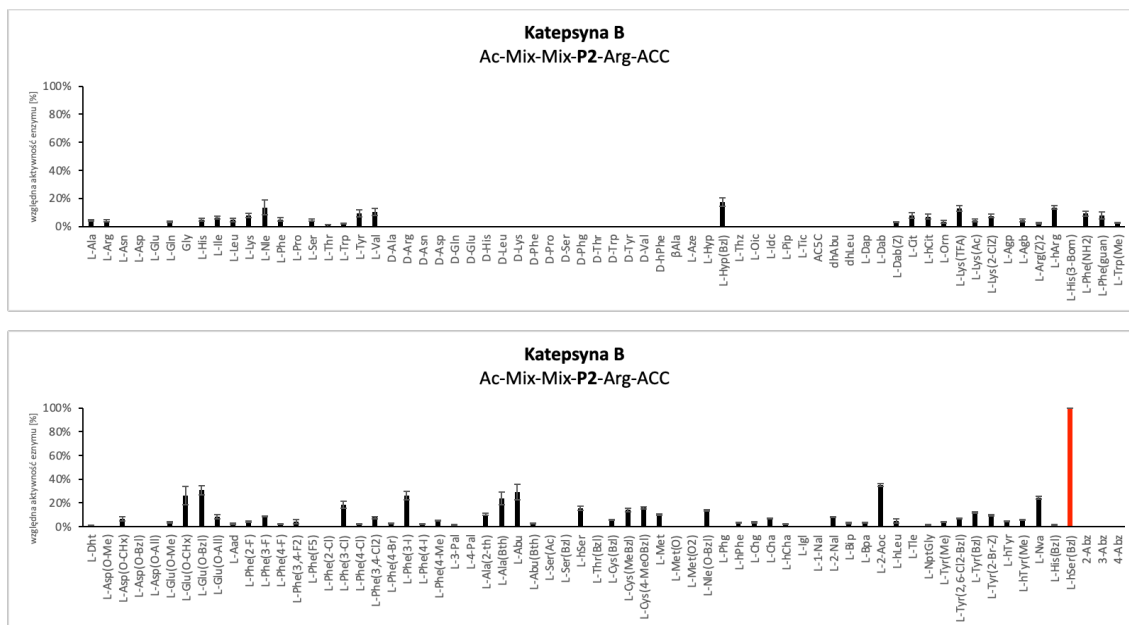
Rys. 24. Profile specyficności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycji P2 przedstawione w postaci mapy cieplnej. Reakcję hydrolizy substratów z biblioteki HyCoSuL monitorowano przez 40 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Wartości procentowe w profilach specyficności substratowej każdego enzymu to szybkości hydrolizy substratów wyrażone w stosunku do substratu, dla którego przyrost fluorescencji w czasie był najwyższy (100%). Wszystkie pomiary zostały powtórzone co najmniej 2-krotnie, a przedstawione dane są średnią wartością powtórzeń, gdzie odchylenie standardowe błędów było mniejsze niż 10%. Mapę cieplną wykonano w programie GraphPad Prism 9.0, gdzie najbardziej preferowane reszty zaznaczono kolorem czerwonym, a substraty zawierające reszty, które nie były hydrolizowane, kolorem niebieskim.

Katepsyna L w pozycji P2 z naturalnych reszt aminokwasowych najbardziej preferuje L-feniloalaninę (44%). Ze wszystkich badanych struktur to właśnie jej nienaturalne pochodne są najlepiej dopasowane do kieszeni S2 tego enzymu. Najlepsze wyniki osiągnięto dla feniloalaniny z podstawnikiem halogenkowym w pozycji meta – 3-fluoro-L-feniloalaniny (L-Phe(3-F), 100%), 3-chloro-L-feniloalaniny (L-Phe(3-Cl), 80%), a także dla 3,4-dichloro-L-feniloalaniny (L-Phe(3,4-Cl₂), 79%). Wyniki te świadczą o hydrofobowym charakterze kieszeni S2. Dłuższe łańcuchy jak L-homofeniloalanina czy L-bifeniloalanina nie zostały zhydrolizowane, co pokazuje, że wnęka ta nie jest na tyle duża, by pomieścić te związki (rys. 25).



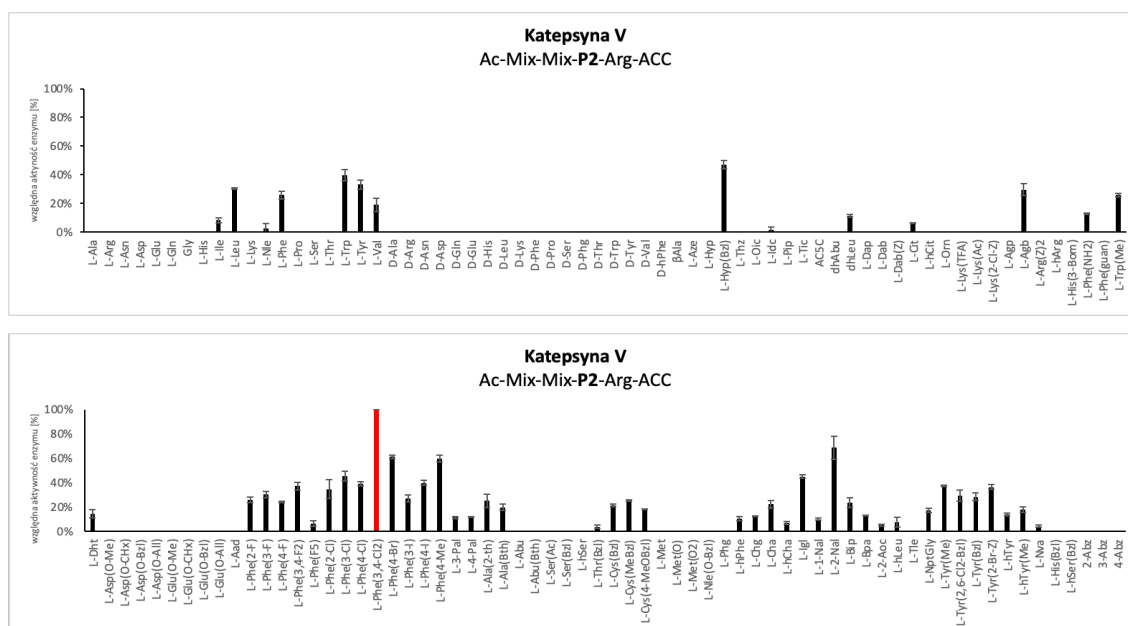
Rys. 25. Profil specyficzności substratowej katepsyny L w pozycji P2. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawią jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

W przypadku katepsyny B, najlepiej rozpoznawanym aminokwasem był ester benzylowy-L-homoseryny (L-hSer(Bzl), 100%). Dobrze hydrolizowane reszty to również ester benzylowy kwasu L-glutaminowego (L-Glu(O-Bzl), 31%), kwas L-2-amino-kaprylowy (L-2-Aoc, 35%) oraz ester cykloheksylowy kwasu L-glutaminowego (L-Glu(O-cHx), 26%). W tej pozycji rozpoznawalne są także nienaturalne pochodne fenyloalaniny, wśród których reszta 3-chloro-L-fenyloalaniny, L-Phe(3-Cl) jest rozpoznawana na poziomie 18%. Pokazuje to, że kieszeń S2 katepsyny B to również wnęka hydrofobowa, większa niż w przypadku katepsyny L (rys. 26).



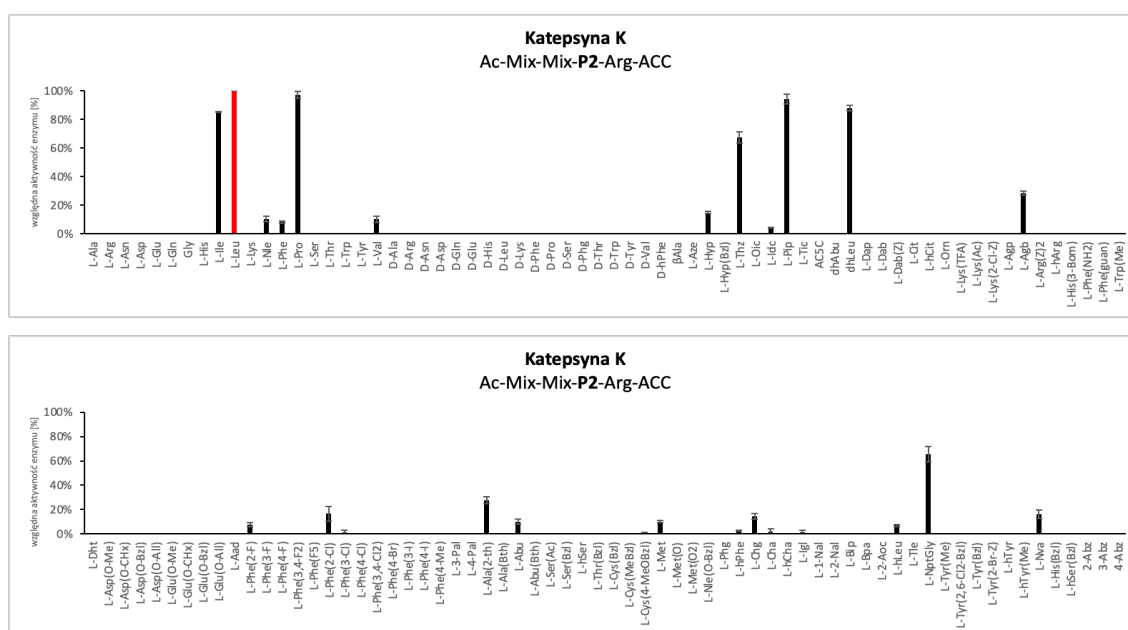
Rys. 26. Profil specyficzności substratowej katepsyny B w pozycji P2. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Katepsyna V, nazywana długo katepsyną L2, wykazuje nakładającą się specyficzność substratową z katepsyną L. W pozycji P2 rozpoznaje, tak samo jak katepsyna L, nienaturalne pochodne fenyloalaniny, w tym najlepiej 3,4-dichloro-L-fenyloalaninę (L-Phe(3,4-Cl₂), 100%), 4-bromo-L-fenyloalaninę (L-Phe(4-Br), 61%) oraz 4-metylo-L-fenyloalaninę (L-Phe(4-Me), 60%), co świadczy o hydrofobowym charakterze kieszeni wiążącej. W przeciwieństwie jednak do katepsyny L, kieszeń wiążąca S2 katepsyny V ma zdolność do rozpoznawania pochodnych alaniny – 1-naftylo-L-alaniny (L-1-Nal, 10%) oraz 2-naftylo-L-alaniny (L-2-Nal, 69%), L-bifenyloalaniny (L-Bip, 24%) czy 4-benzoilo-L-fenyloalaniny (L-Bpa, 13%), co może zostać wykorzystane przy syntezie związku selektywnego dla tego enzymu (rys. 27).



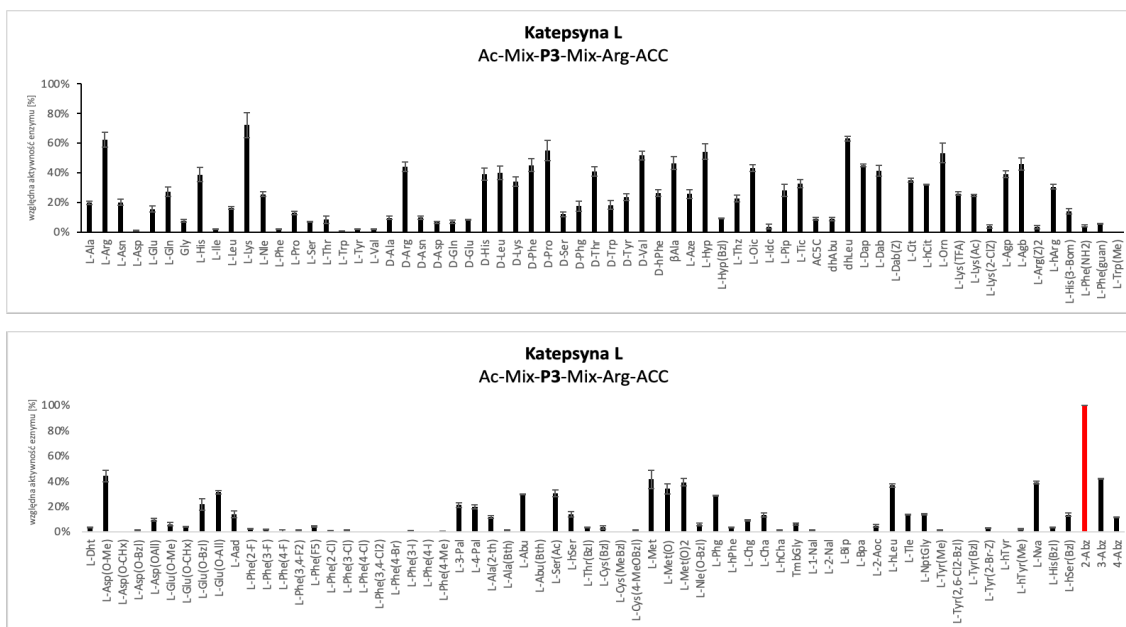
Rys. 27. Profil specyficzności substratowej katepsyny V w pozycji P2. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Profil specyficzności substratowej katepsyny K znacząco różni się od profili pozostałych katepsyn. W pozycji P2 najlepiej rozpoznawane są naturalne aminokwasy, takie jak L-leucyna (L-Leu, 100%), L-prolina (L-Pro, 97%) oraz L-izoleucyna (L-Ile, 85%). Reszta prolina nie była rozpoznawana w przypadku innych przebadanych katepsyn (rys. 24). Preferencję tę przypisuje się obecności Tyr⁶⁷ oraz Leu²⁰⁵ występujących w kieszeni S2. Wśród nienaturalnych reszt aminokwasowych, najlepiej rozpoznawalnym aminokwasem był kwas L-2-piperydynokarboksylowy (L-Pip, 94%), dehydroleucyna (dhLeu, 88%), L-tioprolina (L-Thz, 67%) oraz L-2-neopentyloglicyna (L-NptGly, 65%). Charakter chemiczny tego miejsca wiążącego wykazuje, tak jak w przypadku pozostałych katepsyn, preferencję do aminokwasów hydrofobowych (rys. 29).



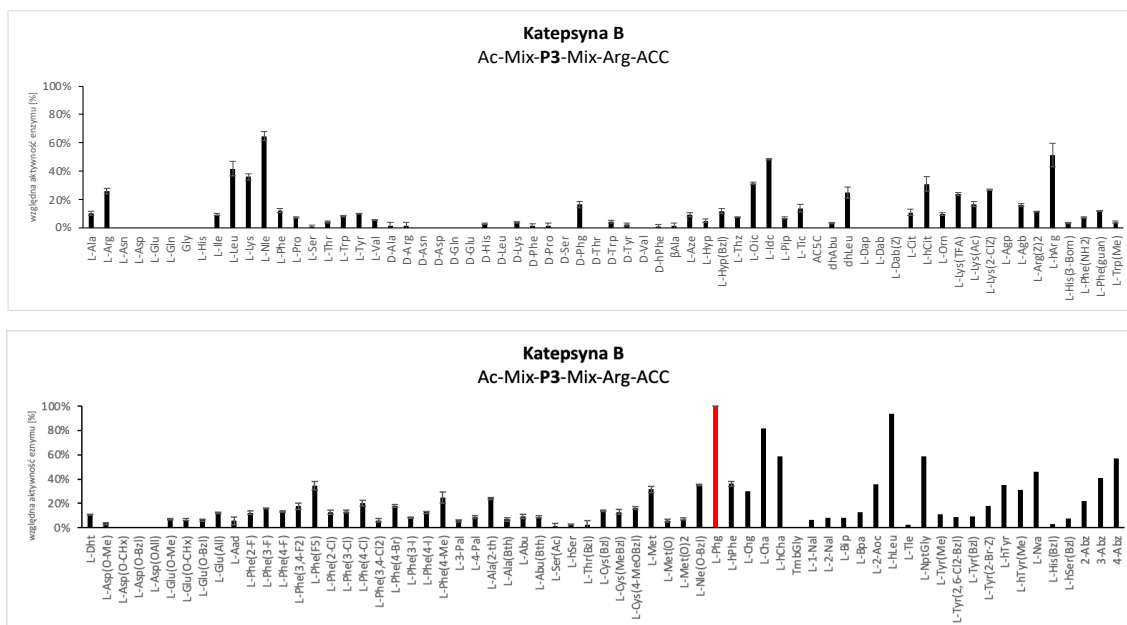
Rys. 29. Profil specyficzności substratowej katepsyny K w pozycji P2. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Kieszon wiążąca S3 katepsyny L okazała się bardziej tolerancyjna niż kieszeń S2 tego enzymu wykazując szeroką specyficzną substratową. Katepsyna L preferuje w pozycji P3 aminokwasy zasadowe, takie jak L-arginina (L-Arg, 62%), L-lizyna (L-Lys, 72%), kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-Dap, 45%), kwas L-2,4-diaminomasłowy (L-Dab, 41%), L-ornityna (L-Orn, 53%) czy guanidyno-L-homoalaninę (L-Agb, 46%), jednak najlepiej rozpoznawany jest kwas 2-aminobenzoowy (2-Abz, 100%). Co ciekawe, w tej pozycji niektóre reszty D-aminokwasowe były lepiej rozpoznawane przez katepsynę L niż ich L-enancjomery, np. D-Leu (40%), L-Leu (16%), D-Phe (55%), L-Phe (2%), D-Trp (18%), L-Trp (1%), D-Val (52%), L-Val (2%). Wskazuje to na brak specyficznosci stereochemicznej wnęki S3 (rys. 31).



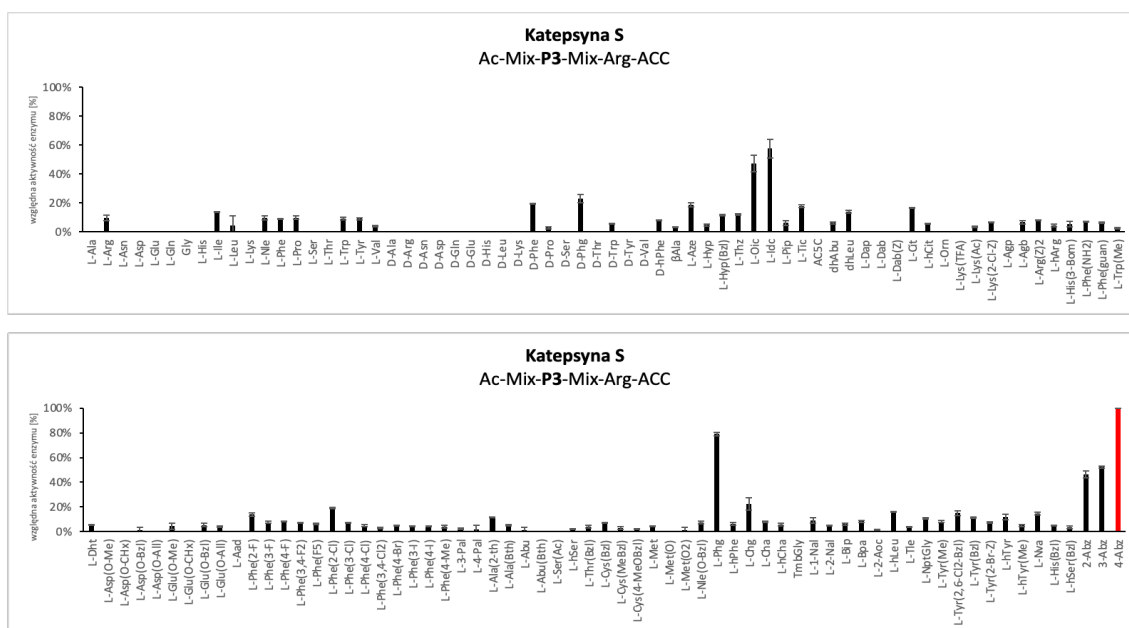
Rys. 31. Profil specyficznosci substratowej katepsyny L w pozycji P3. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Katepsyna B w pozycji P3 rozpoznaje reszty aminokwasowe zawierające ugrupowanie cykliczne. Najlepiej rozpoznawanymi związkami są L-fenyloglicyna (L-Phg, 100%), kwas L-oktahydroindolokarboksyłowy (L-Oic, 31%), kwas L-indolo-2-karboksyłowy (L-Idc, 48%), L-cykloheksyloalanina (L-Cha, 82%) czy L-homocykloheksyloalanina (L-hCha, 59%). Oprócz tego kieszeń S3 katepsyny B preferuje długie alifatyczne łańcuchy boczne, a więc reszty takie jak L-leucyna (L-Leu, 42%), L-norleucyna (L-Nle, 65%) czy L-homoleucyna (L-hLeu, 94%). Wnęka ta rozpoznaje zarówno L-aminokwasy, jak i D-aminokwasy, dlatego podobnie jak kieszeń S3 katepsyny L nie jest ona stereochemicznie selektywna (rys. 32).



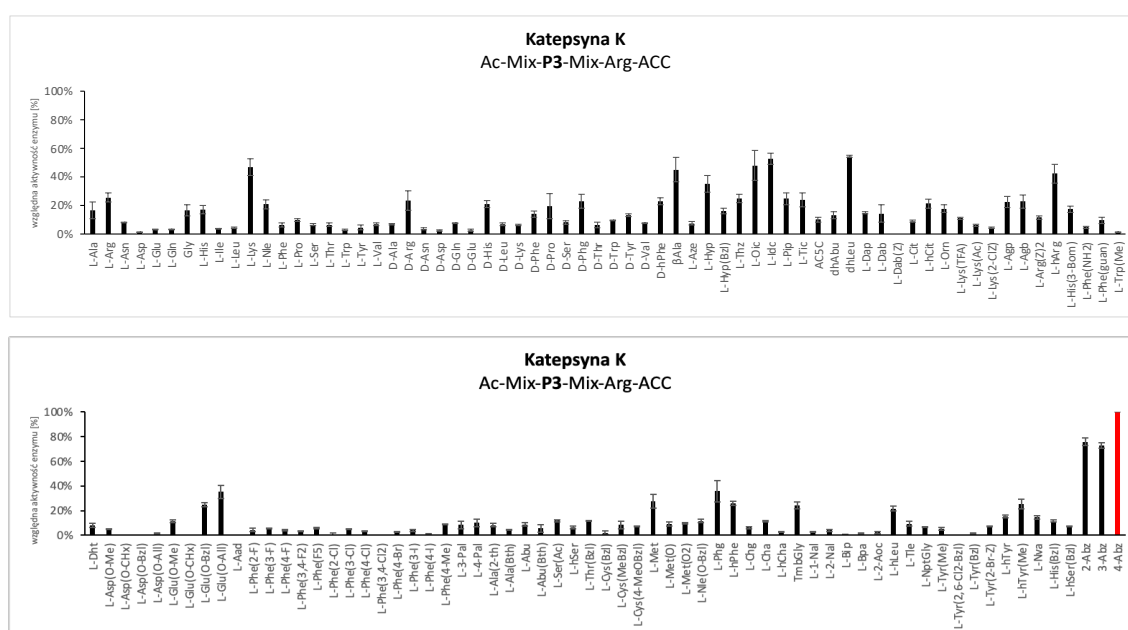
Rys. 32. Profil specyficzności substratowej katepsyny B w pozycji P3. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Kieszon wiążąca S3 katepsyny S wykazuje zbliżony profil specyficzności substratowej do uzyskanego dla katepsyny V. Wnęka ta również preferuje w pozycji P3 reszty aminokwasowe z pierścieniem alifatycznym bądź aromatycznym najlepiej rozpoznając kwas 4-aminobenzoesowy (4-Abz, 100%), kwas 3-aminobenzoesowy (3-Abz, 52%), kwas 2-aminobenzoesowy (2-Abz, 47%), pochodne proliny jak: kwas L-indolo-2-karboksylowy (L-Idc, 58%), kwas-L-oktahydroindolokarboksylowy (L-Oic, 47%) oraz L-fenyloglicynę (L-Phg, 79%).



Rys. 34. Profil specyficzności substratowej katepsyny S w pozycji P3. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

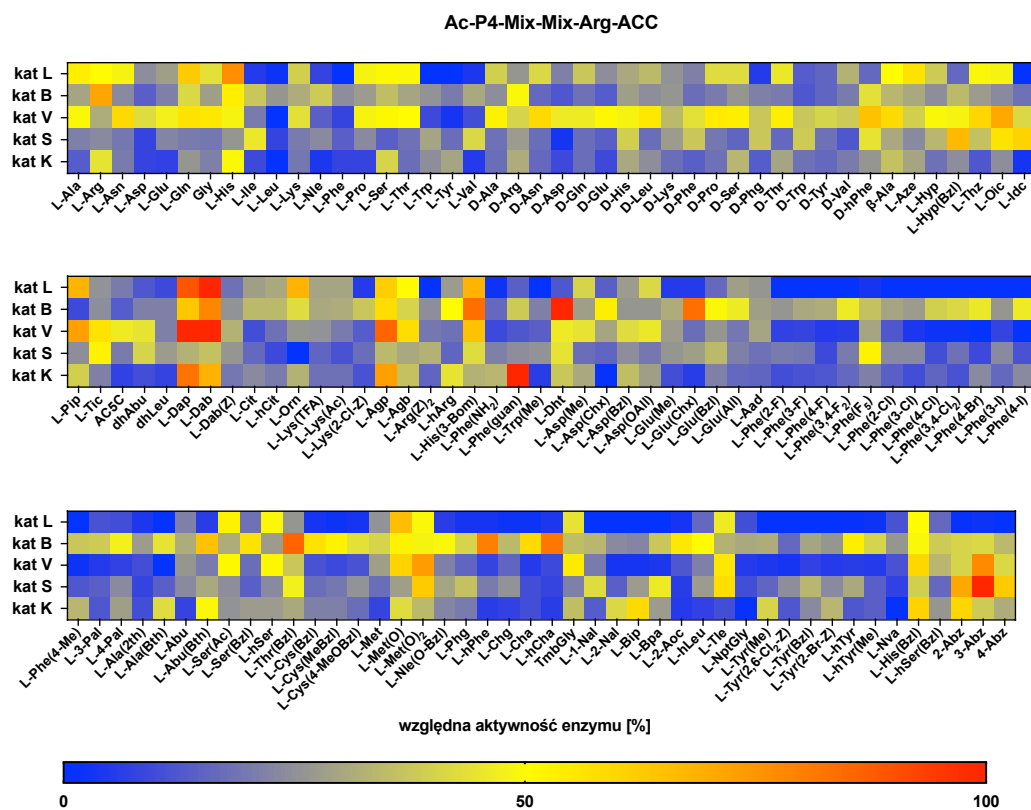
Katepsyna K, podobnie jak pozostałe katepsyny, w pozycji P3 wykazuje szeroką specyficzność substratową. Profil specyficznosci w tej pozycji jest podobny do profili uzyskanych dla pozostałych zbadanych katepsyn. Enzym ten w pozycji P3 najlepiej rozpoznaje duże, hydrofobowe aminokwasy, jak reszty kwasu aminobenzoowego (4-Abz, 100%; 3-Abz, 73%, 2-Abz, 76%), kwas L-indolo-2-karboksyowy (L-Idc, 53%), kwas-L-oktahydroindolokarboksyowy (L-Oic, 48%) czy dehydroleucynę (dhLeu, 54%). W pozycji tej, podobnie jak katepsyna L, katepsyna K rozpoznaje D-izomery wszystkich aminokwasów proteinogenicznych (rys. 35).



Rys. 35. Profil specyficznosci substratowej katepsyny K w pozycji P3. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

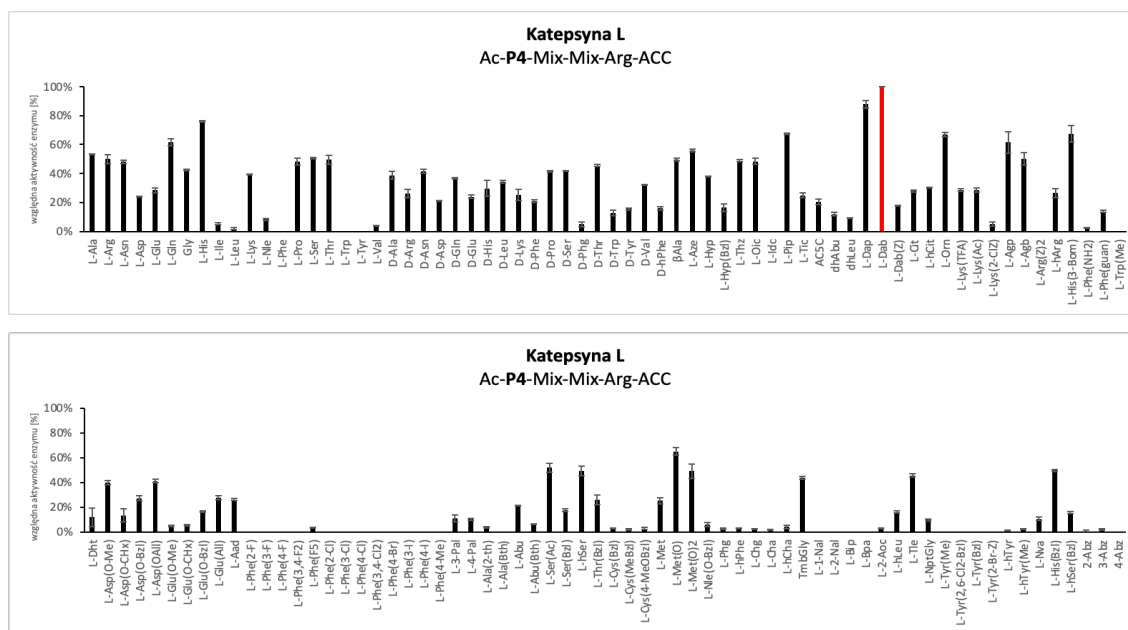
Pozycja P4.

Profil specyficzności substratowej kieszeni S4 katepsyn pokazał, że wnęka ta charakteryzuje się szeroką specyficznością bądź jej brakiem rozpoznając każdą resztą aminokwasową w pozycji P4 (rys. 36).



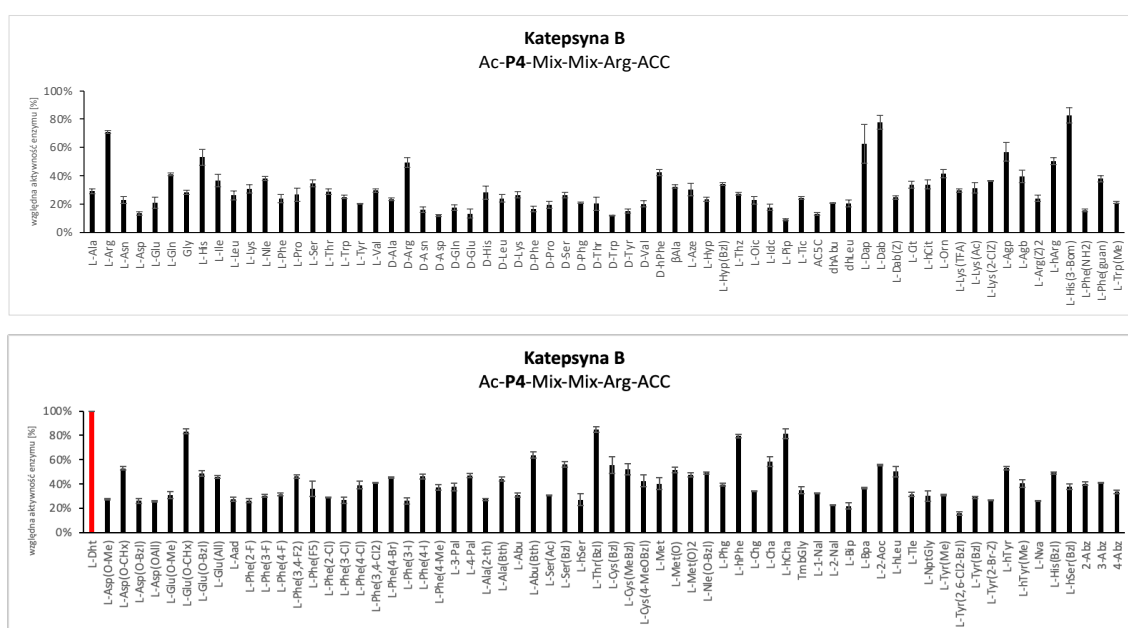
Rys. 36. Profile specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycji P4 przedstawione w postaci mapy cieplnej. Reakcję hydrolizy substratów tworzących bibliotekę HyCoSuL monitorowano przez 40 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Profile specyficzności substratowej zostały wyznaczone w sposób analogiczny jak w przypadku pozycji P2.

Kieszeń wiążąca S4 katepsyny L charakteryzuje się dosyć szeroką specyficnością substratową, jednak można zauważyć, że w przeciwieństwie do kieszeni S3 enzym ten nie rozpoznaje L-feniloalaniny oraz jej nienaturalnych pochodnych. W pozycji tej również nie są preferowane duże, hydrofobowe reszty aminokwasowe jak pochodne kwasu aminobenzoowego czy nienaturalne pochodne tyrozyny: L-Tyr(Bzl), L-hTyr, L-Tyr(2,6-Cl₂-Bzl). Najlepiej rozpoznawanymi resztami są aminokwasy zasadowe: kwas L-2,4-diaminomasłowy (L-Dab, 100%), kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-Dap, 88%), L-ornityna (L-Orn, 67%), guanidyno-L-homoalanina (L-Agb, 50%), guanidyno-L-alanina (L-Agp, 61%), L-arginina (L-Arg, 50%), L-histydyna (L-His, 76%), L-lizyna (L-Lys, 39%). Nie wykazuje również selektywności stereochemicznej rozpoznając zarówno L- jak i D-aminokwasy (rys. 37).



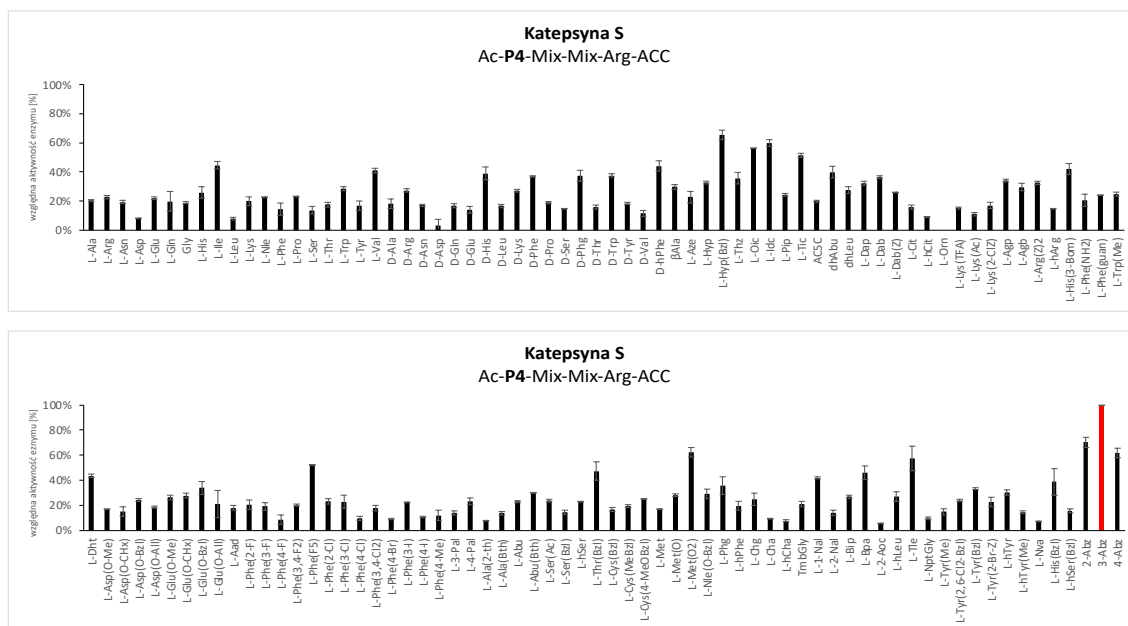
Rys. 37. Profil specyficznosci substratowej katepsyny L w pozycji P4. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

W przypadku kieszeni wiążącej S4 katepsyny B obserwujemy brak specyficzności substratowej. Rozpoznawane są wszystkie reszty aminokwasowe – zarówno L- jak i D-aminokwasy, reszty hydrofobowe, polarne, rozgałęzione, alifatyczne, z pierścieniami aromatycznymi. W tej pozycji uzyskano największy przyrost jednostek fluorescencji w czasie dla dihydro-L-tryptofanu (L-Dht, 100%), *N*-benzyloksymetylo-L-histydyny (L-His(3-Bom), 83%), estru cykloheksyloвого kwasu L-glutaminowego (L-Glu(O-cHx), 83%), estru benzylowego L-treoniny (L-Thr(Bzl), 85%), czy L-homofenyloalaniny (L-hPhe, 79%), co wskazuje, że nieznacznie lepiej rozpoznawane są w tej pozycji aminokwasy z dużymi resztami hydrofobowymi. Reszty zasadowe też są dobrze rozpoznawane w pozycji P4: kwas L-2,4-diaminomasłowy (L-Dab, 78%), kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-Dap, 63%), L-arginina (L-Arg, 71%) (rys. 38).



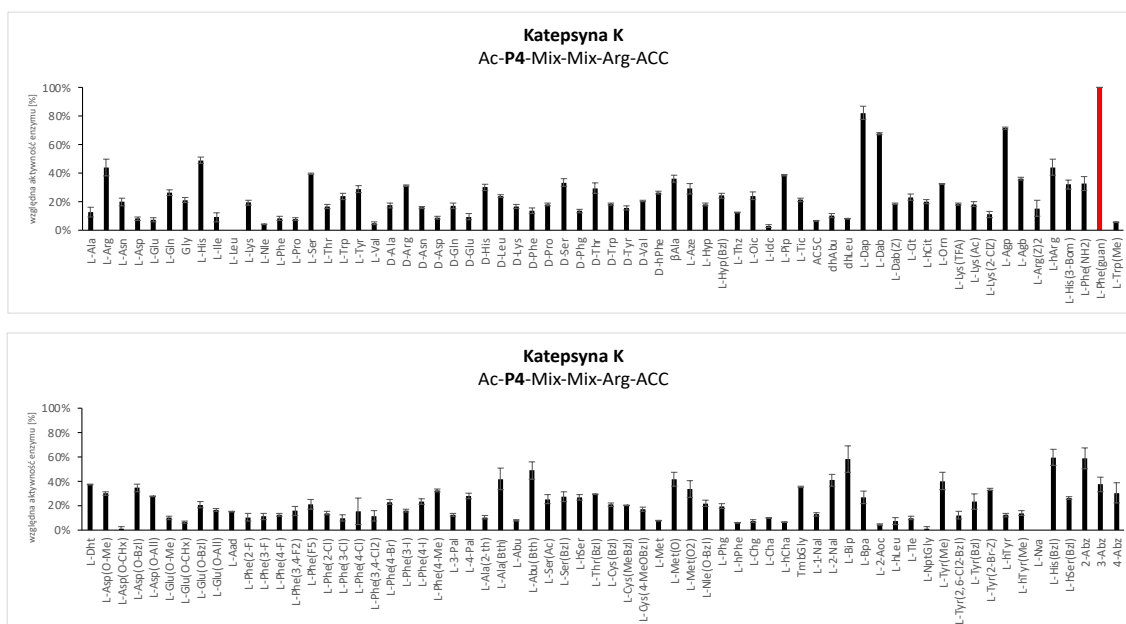
Rys. 38. Profil specyficzności substratowej katepsyny B w pozycji P4. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Katepsyna S w pozycji P4 poza resztą ornityny akceptuje wszystkie badane aminokwasy. Największą preferencję wykazuje w stosunku do izomerów reszt kwasu aminobenzoowego (3-Abz, 100%; 2-Abz, 70%; 4-Abz, 62%), estru benzylowego L-hydroksyproliny (L-Hyp(O-Bzl), 66%) i sulfonu L-metioniny (L-Met(O)₂, 62%) (rys. 40).



Rys. 40. Profil specyficzności substratowej katepsyny S w pozycji P4. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Wnęka wiążąca S4 katepsyny K, poza resztą L-leucyny (L-Leu, 0%) oraz L-norwaliny (L-Nva, 0%), rozpoznaje wszystkie pozostałe reszty aminokwasowe nie wykazując określonych preferencji substratowych. Najlepiej rozpoznawalnymi aminokwasami okazały się reszty zasadowe takie jak: 4-guanidyno-L-fenylalanina (L-Phe(guan), 100%), kwas L-2,4-diaminomasłowy (L-Dab, 68%), kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-Dap, 82%), L-arginina (L-Arg, 44%), L-histydyna (L-His, 49%), guanidyno-L-alanina (L-Agp, 72%) oraz duże reszty aminokwasowe jak: L-bifenyloalanina (L-Bip, 58%) czy benzylo-L-histydyna (L-His(Bzl), 60%) (rys. 41).



Rys. 41. Profil specyficzności substratowej katepsyny K w pozycji P4. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

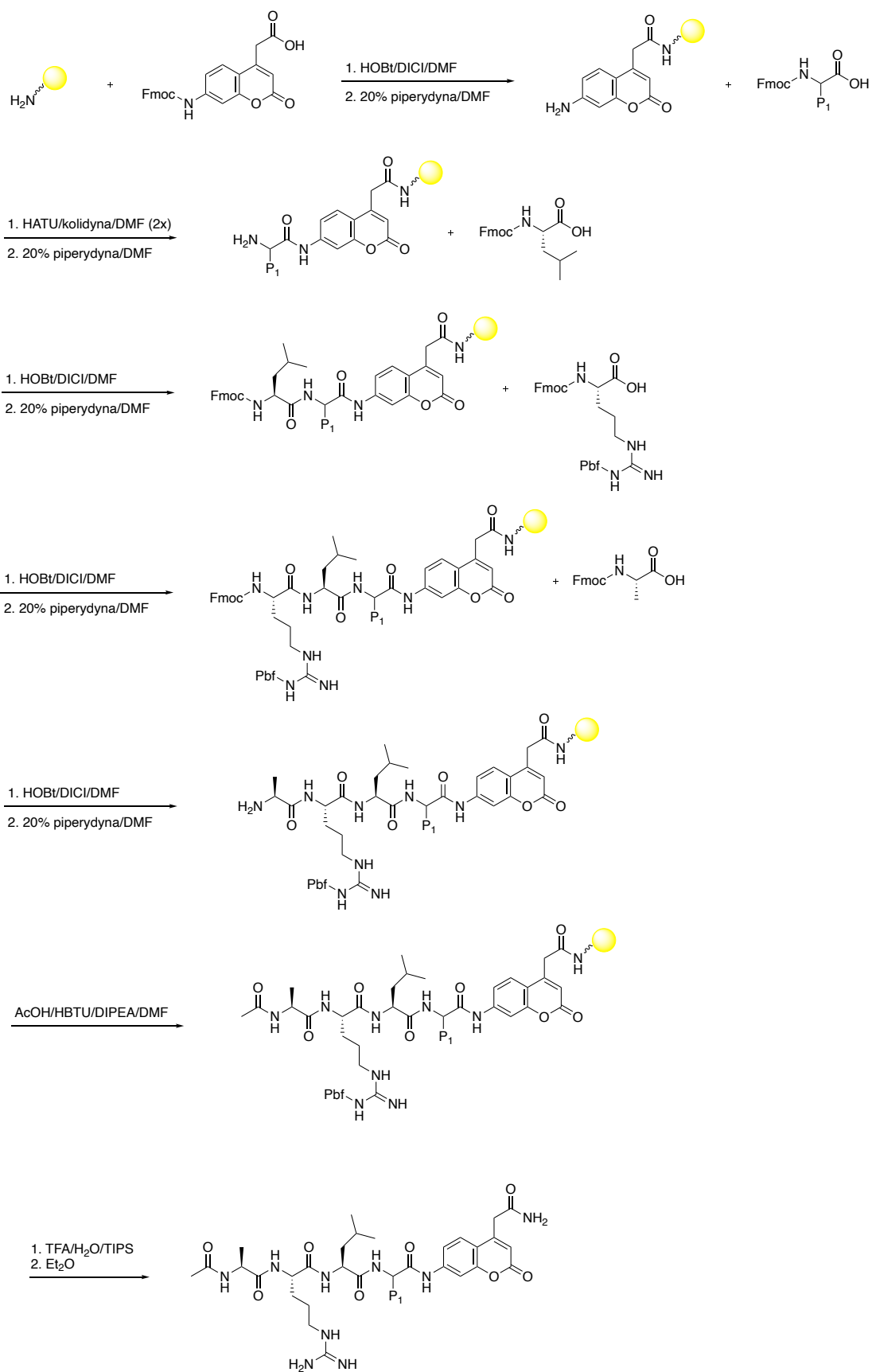
3.1.2.2. Określenie specyficzności substratowej katepsyn w kieszeni S1 przy wykorzystaniu zdefiniowanej biblioteki substratów fluorogenicznych

Badane ludzkie katepsyny L, B, S, V oraz K należą do tego samego klanu proteaz wykazując nakładające się specyficzności substratowe w określonych pozycjach. W celu określenia preferencji kieszeni S1 i uzyskania jak najszerszego obrazu charakteru chemicznego wszystkich miejsc wiążących zsyntezowano opublikowaną wcześniej bibliotekę zdefiniowaną Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC [244]. Biblioteka ta składa się ze:

- stałego motywu P4-P2 (Ala-Arg-Leu) zaprojektowanego w oparciu o uzyskane profile specyficzności substratowej [32],
- znacznika ACC na C-końcu umożliwiającego obserwację przyrostu fluorescencji w czasie trwania hydrolizy enzymatycznej,
- zmiennej pozycji P1, w której wykorzystano reszty aminokwasowe (zarówno naturalne jak i nienaturalne) charakteryzujące się różnorodną budową chemiczną. Są tu związki wykazujące charakter kwasowy i zasadowy, hydrofilowy oraz hydrofobowy, z dodatkowymi grupami chemicznymi, atomami, rozgałęzione czy alifatyczne. Wykorzystanie tak szerokiej gamy związków pozwala szczegółowo określić preferencje substratowe w danej pozycji.

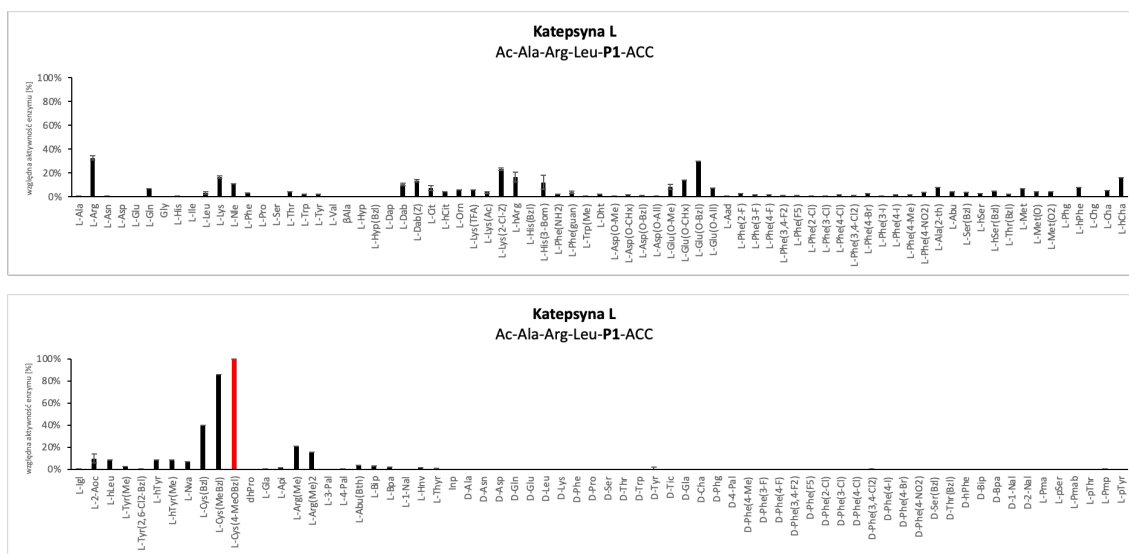
Substraty zostały zsyntezowane w sposób analogiczny jak zdefiniowane substraty w podrozdziale 3.1.1. korzystając z protokołu Poręby [174, 244]. Schemat syntezy przedstawiono na rys. 42.

Do określenia specyficzności substratowej proteaz w pozycji P1 użyto enzymów w stężeniu: katepsyna L – 0,2 nM, katepsyna B oraz S – 5 nM, katepsyna V – 2,5 nM oraz katepsyna K – 1,5 nM. Stężenie substratów wynosiło 10 μ M. Pomiar wykonano minimum dwukrotnie, a obliczone odchylenie standardowe dla uzyskanych wyników nie przekroczyło 10%. Wyniki przedstawiono w procentach względnej aktywności badanego enzymu wobec substratu, gdzie 100% to aktywność enzymu wobec najlepszego substratu.



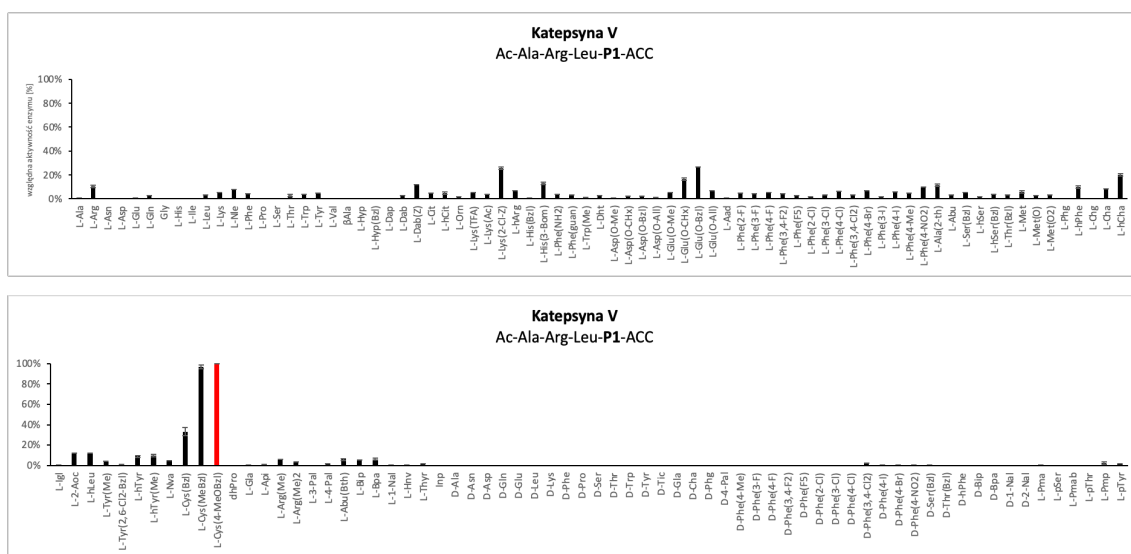
Rys. 42. Schemat syntezy biblioteki zdefiniowanej P1 o sekwencji Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC. Substraty zostały zsyntezowane na podłożu stałym z wykorzystaniem strategii Fmoc.

W przypadku kieszeni wiążącej S1 katepsyny L, analiza wyników wykazała, że niektóre nienaturalne aminokwasy są lepiej rozpoznawalne niż naturalna reszta argininy (L-Arg, 33%). W przypadku tej pozycji najlepszym aminokwasem okazała się 4-metoksy-benzylo-L-cysteina (L-Cys(4-Me-O-Bzl), 100%), 4-metylo-benzylo-L-cysteina (L-Cys(4-MeBzl), 86%), benzylo-L-cysteina (L-Cys(Bzl), 40%) czy ester benzylowy kwasu L-glutaminowego (L-Glu(O-Bzl), 30%). Co ciekawe, w tej pozycji również jest rozpoznawana metylowana oraz podwójnie metylowana arginina (L-Arg(Me), 21%, L-Arg(Me)₂, 16%). Pokazuje to, że kieszeń ta z jednej strony jest na tyle duża, że może pomieścić duże i hydrofobowe reszty aminokwasowe, a z drugiej jest ujemnie naładowana, gdyż akceptuje argininę. Wykazuje również silną stereospecyficzność nie hydrolizując związków zawierających w pozycji P1 D-aminokwasy (rys. 43).



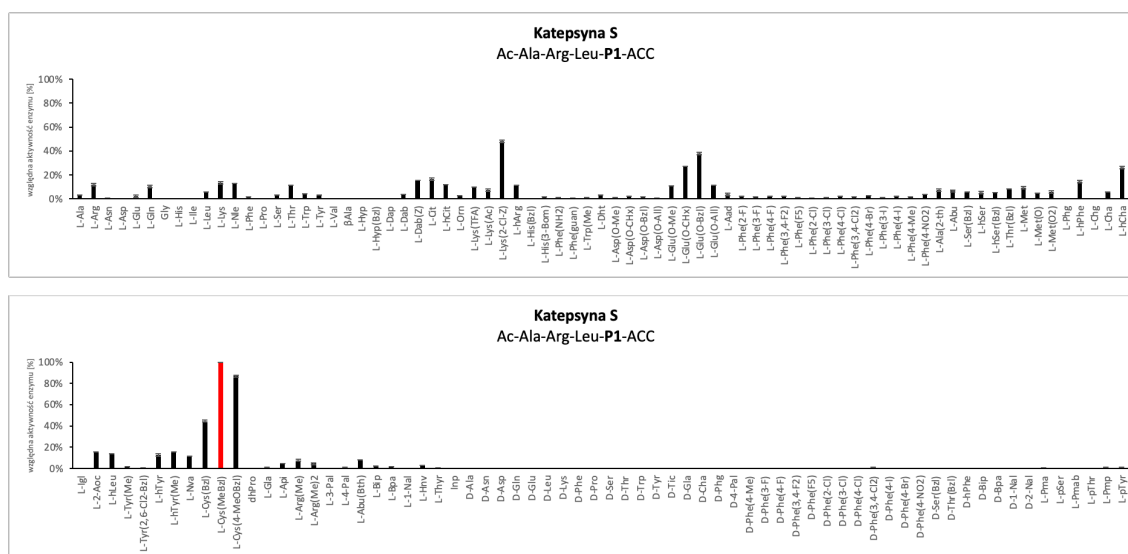
Rys. 43. Profil specyficzności substratowej katepsyny L w pozycji P1. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Profil specyficzności substratowej w pozycji P1 katepsyny V jest podobny jak w przypadku katepsyny L oraz B. W tej pozycji również najlepiej rozpoznawaną resztą jest 4-metoksy-benzylo-L-cysteina (L-Cys(4-Me-O-Bzl), 100%), 4-metylo-benzylo-L-cysteina (L-Cys(4-MeBzl), 97%), benzylo-L-cysteina (L-Cys(Bzl), 33%), ester benzylowy kwasu L-glutaminowego (L-Glu(O-Bzl), 26%) oraz *N*- ϵ -(2-chlorobenzylotykonylo)-L-lizyna (L-Lys(2-Cl-Z), 26%). Wśród aminokwasów naturalnych najlepiej pasującą resztą jest arginina (L-Arg, 10%) (rys. 45).



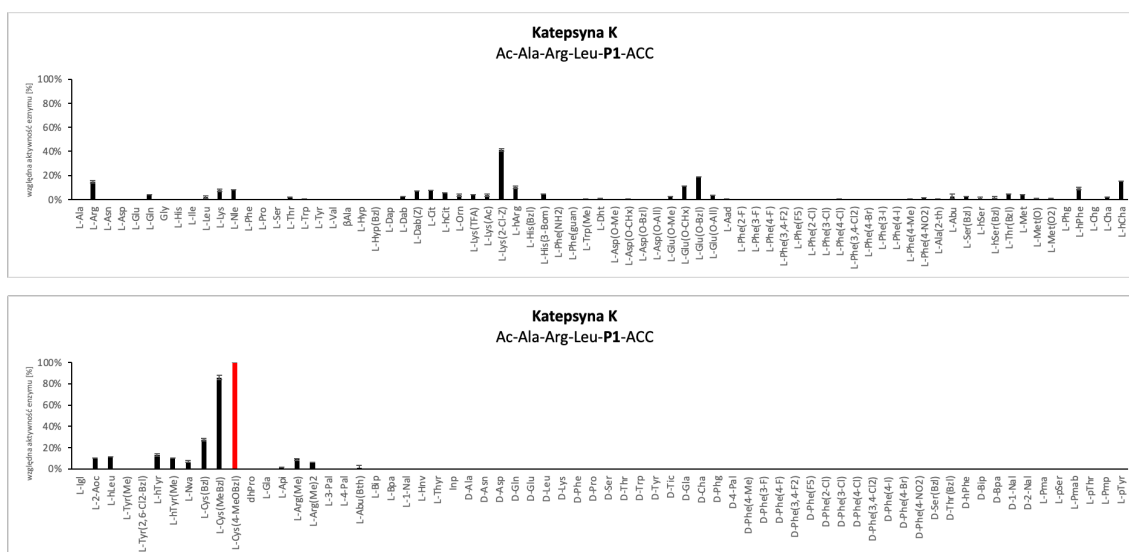
Rys. 45. Profil specyficzności substratowej katepsyny V w pozycji P1. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Kieszeń wiążąca S1 katepsyny S wykazuje preferencje do tych samych reszt aminokwasowych, co opisane powyżej katepsyny. Najlepiej rozpoznawalnymi resztami są duże, hydrofobowe pochodne cysteiny i lizyny: L-Cys(4-MeBzl), 100%, L-Cys(4-Me-O-Bzl), 87%, L-Lys(2-Cl-Z), 48%, L-Cys(Bzl), 45%. Wśród aminokwasów naturalnych najlepiej rozpoznawaną resztą jest lizyna (L-Lys, 13%) oraz arginina (L-Arg, 12%) (rys. 46).



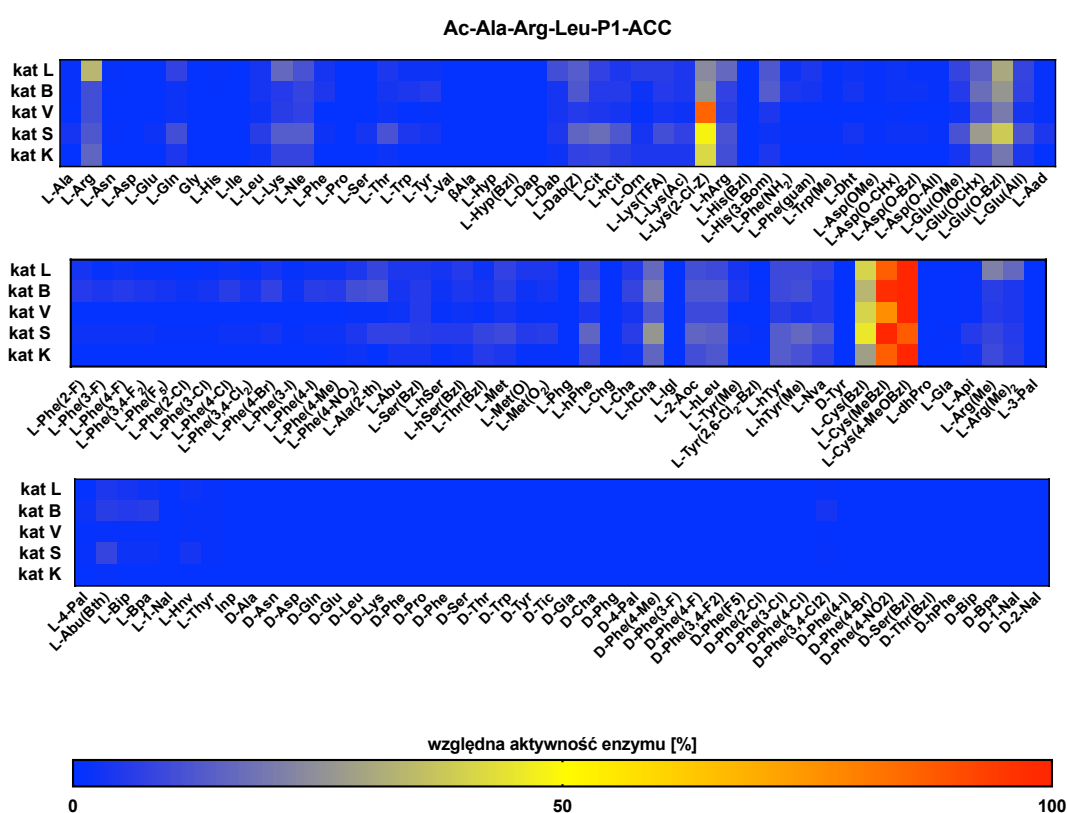
Rys. 46. Profil specyficzności substratowej katepsyny S w pozycji P1. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Profil specyficzności substratowej kieszeni S1 katepsyny K jest podobny do profili uzyskanych dla pozostałych enzymów. Najbardziej preferowanymi resztami są duże, hydrofobowe pochodne: cysteiny L-Cys(4-MeOBzl) - 100%, L-Cys(MeBzl) – 86%, L-Cys(Bzl) – 28%, lizyny L-Lys(2-Cl-Z) – 41% czy kwasu glutaminowego L-Glu(O-Bzl) – 19%. Wśród aminokwasów naturalnych najlepsze okazały się aminokwasy zasadowe jak L-arginina (15%) czy L-lizyna (8%) (rys. 47).



Rys. 47. Profil specyficzności substratowej katepsyny K w pozycji P1. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawią jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że kieszeń wiążąca S1 we wszystkich badanych katepsynach jest silnie konserwatywna. Enzymy te wykazują podobne preferencje substratowe. Kieszeń S1 nie rozpoznaje bądź hydrolizuje bardzo słabo nieliczne substraty zawierające w tej pozycji reszty D-aminokwasowe. We wszystkich przypadkach najlepiej rozpoznawanymi resztami były duże, hydrofobowe pochodne cysteiny oraz lizyny. Wśród aminokwasów naturalnych rozpoznawane były reszty zasadowe jak arginina i lizyna. Wykazano również zdolność badanych katepsyn do hydrolizy substratów zawierających w pozycji P1 metylowaną resztę argininy (rys. 48).



Rys. 48. Profile specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycji P1 przedstawione w postaci mapy cieplnej. Reakcję hydrolizy substratów tworzących bibliotekę HyCoSuL monitorowano przez 40 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Profile specyficzności substratowej zostały wyznaczone w sposób analogiczny jak w przypadku pozycji P2.

3.1.2.3. Badanie specyficzności substratowej kieszeni S1' oraz S2' katepsyn przy wykorzystaniu kombinatorycznej biblioteki substratów typu IQF

W celu dogłębnego poznania profilu specyficzności substratowej (również po stronie primowanej) zsyntezowano kombinatoryczną bibliotekę substratów typu IQF o następujących strukturach:

- ACC- β Ala-Ala-Arg-Leu-Arg-Mix-P2'-Gly-Lys(Dnp)
- ACC- β Ala-Ala-Arg-Leu-Arg-P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp), gdzie

ACC to znacznik fluorogeniczny, będący donorem fluorescencji, Lys(Dnp) jest jej wygaszaczem (akceptorem fluorescencji), P1' i P2' to odpowiednio jeden z 96 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów, a Mix to mieszanina aminokwasów naturalnych (z pominięciem cysteiny i metioniny oraz z norleucyną). Jako sekwencję P4-P1 wykorzystano sekwencję kontrolną złożoną z naturalnych aminokwasów i rozpoznawaną przez wszystkie katepsyny, obecna glicyna na pozycji P3' pełniła funkcję linkera między pozycją P2' a pochodną lizyną z grupą 2,4-dinitrofenylową. Analogicznie β -alanina w pozycji P5 oddzielała fluorofor ACC od reszty znajdującej się w pozycji P4.

Synteze substratów typu IQF wchodzących w skład biblioteki P1' przeprowadzono na podłożu stałym. Do syntezy użyto żywicy amidowej Fmoc-Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,64 mmol/g. W pierwszej kolejności do żywicy przyłączono Fmoc-Lys(Dnp)-OH za pomocą HATU oraz 2,4,6-trimetylopirydyny. W kolejnym kroku usunięto grupę ochronną Fmoc wykorzystując 20% roztwór piperydyny w DMF i przyłączono Fmoc-Gly-OH. W kolejnej pozycji (P2') przyłączono równomolową mieszaninę aminokwasów wykorzystując mieszaninę izokinetyczną, która składała się z 18 naturalnych aminokwasów i norleucyny zabezpieczonych grupą ochronną Fmoc. Mieszaninę tę przyłączono używając jako odczynników sprzęgających DICl oraz HOBt. Po usunięciu grupy ochronnej Fmoc, żywicę wysuszono i podzielono na 96 porcji, które umieszczono w aparacie do półautomatycznej syntezy równoległej. Następnie do każdej porcji przyłączono jedną z 96 naturalnych lub nienaturalnych reszt aminokwasowych. W przypadku substratów z biblioteki P2' po przyłączeniu Fmoc-Gly-OH żywicę podzielono na 96 porcji i najpierw przyłączono jeden z 96 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów, a potem do każdego substratu dołączono mieszaninę równomolową (18 naturalnych aminokwasów i norleucyna). W kolejnych etapach przyłączono w pozycji P1 Fmoc-Arg(Pbf)-OH, w pozycji P2 Fmoc-Leu-OH, w pozycji

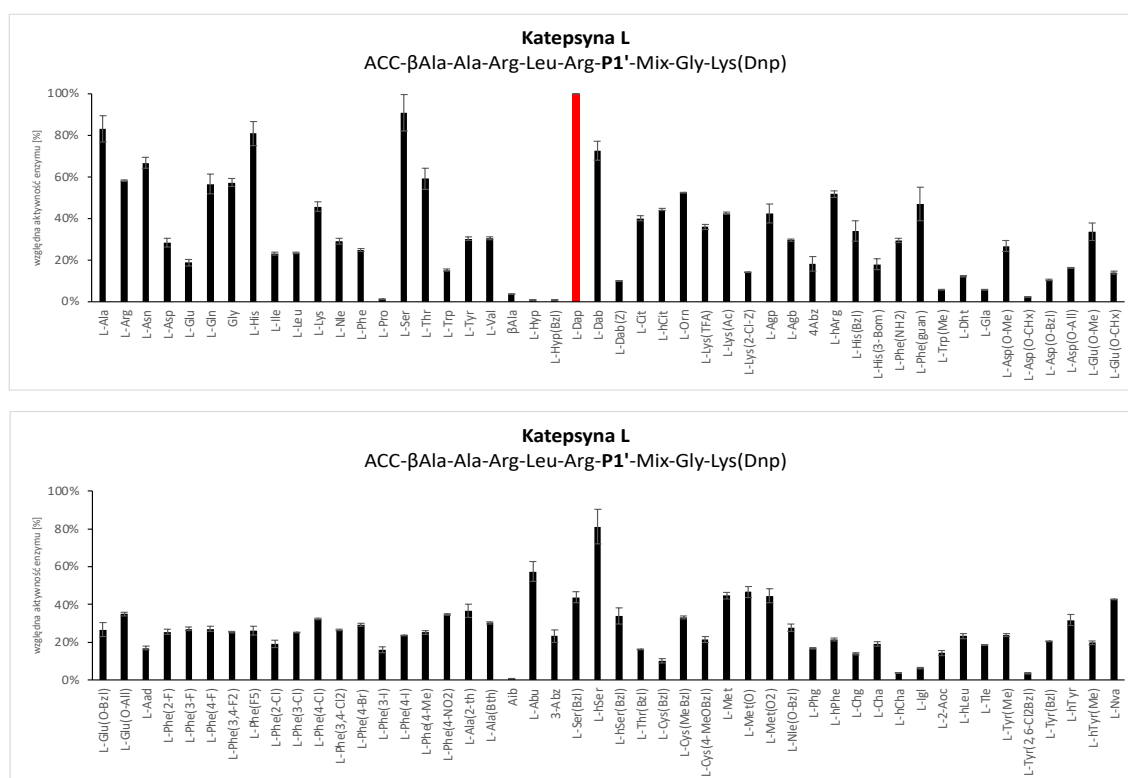
P3 Fmoc-Arg(Pbf)-OH, w pozycji P4 Fmoc-Ala-OH. Jako ostatnią przyłączono resztę Fmoc-ACC-βAla-OH. Końcowym etapem było usunięcie grupy Fmoc znajdującej się na N-końcu, wysuszenie żywicy i uwolnienie związku z nośnika stałego. Otrzymane substraty zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia 20 mM i przechowywano w temperaturze -20°C. Substraty z biblioteki P1' zostały zsyntezowane analogicznie.

Fragment zawierający fluorofor oraz linker – Fmoc-ACC-βAla-OH zsyntezowano osobno na podłożu stałym. Do tego celu wykorzystano żywicę 2-chlorotrylową, dzięki czemu po hydrolizie związku z żywicy otrzymano produkt z wolną grupą karboksylową. Pierwszą resztę Fmoc-βAla-OH przyłączono do nośnika stałego przy użyciu *N,N*-diizopropylodetyloaminy (DIPEA) w dichlorometanie. Następnie usunięto grupę Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydiny w *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF) i przyłączono fluorofor – Fmoc-ACC-OH przy użyciu odczynników sprzęgających (HATU/2,4,6-kolidyny). Po zakończeniu syntezy fragment uwolniono z nośnika stałego za pomocą mieszaniny TFA:TIPS:H₂O (95%:2,5%:2,5%, v/v/v), zliofilizowano, sprawdzono czystość, potwierdzono masę cząsteczkową na LC-MS i użyto do dalszej reakcji bez wcześniejszego oczyszczania.

Analizę kinetyczną prowadzono stosując stężenie substratów biblioteki P1' oraz P2' w wysokości 1 μM, natomiast stężenia proteaz wynosiły odpowiednio: katepsyna L – 0,02 nM, katepsyna B – 3 nM, katepsyna V – 0,1 nM, katepsyna S – 0,2 nM oraz katepsyna K – 0,4 nM.

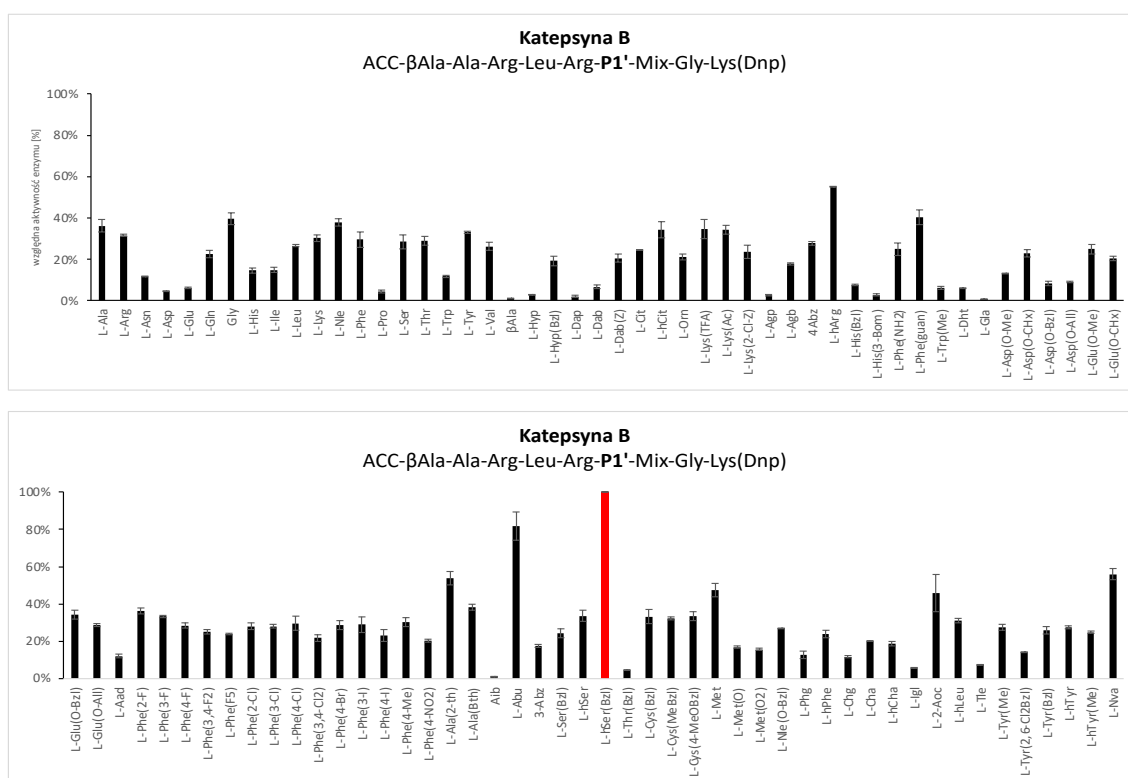
Specyficzność substratową ludzkich katepsyn L, B, V, S oraz K w pozycji P1' przedstawiono na rys. 49.

Kieszon wiążąca S1' katepsyny L wykazuje szeroką specyficzność substratową, a najlepiej rozpoznawanymi resztami są: kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-Dap, 100%), L-seryna (L-Ser, 91%), L-homoseryna (L-hSer, 81%), L-histydyna (L-His, 81%), L-alanina (L-Ala, 83%) oraz kwas L-2,4-diaminomasłowy (L-Dab, 71%). Katepsyna L nie toleruje w pozycji P1' L-proliny (L-Pro, 4%) i jej pochodnych, β -alaniny (β -Ala, 1%) oraz kwasu 2-aminoizomasłowego (L-Aib, 1%) (rys. 50).



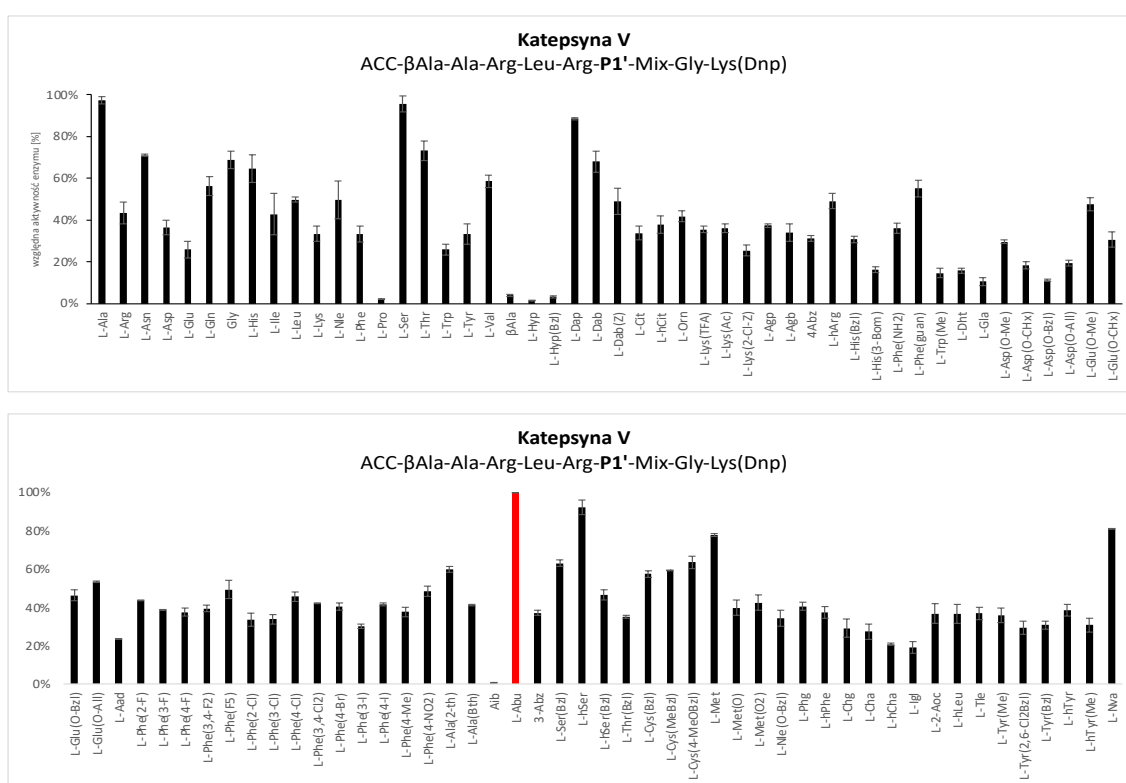
Rys. 50. Profil specyficzności substratowej katepsyny L w pozycji P1'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Kieszon wiążąca S1' katepsyny B nie wykazuje specyficzności substratowej rozpoznając wszystkie reszty aminokwasowe (rys. 51). Najlepiej w tej pozycji hydrolizowany jest ester benzylový L-homoseryny (L-hSer(Bzl), 100%), L-homoalanina (L-Abu, 82%), L-norwalina (L-Nva, 56%) oraz 2-tienylo-L-alanina (L-Ala(2-th), 54%). W przeciwieństwie do katepsyny L, małe zasadowe reszty są słabo hydrolizowane (L-Dap, 2%, L-Dab 7%).



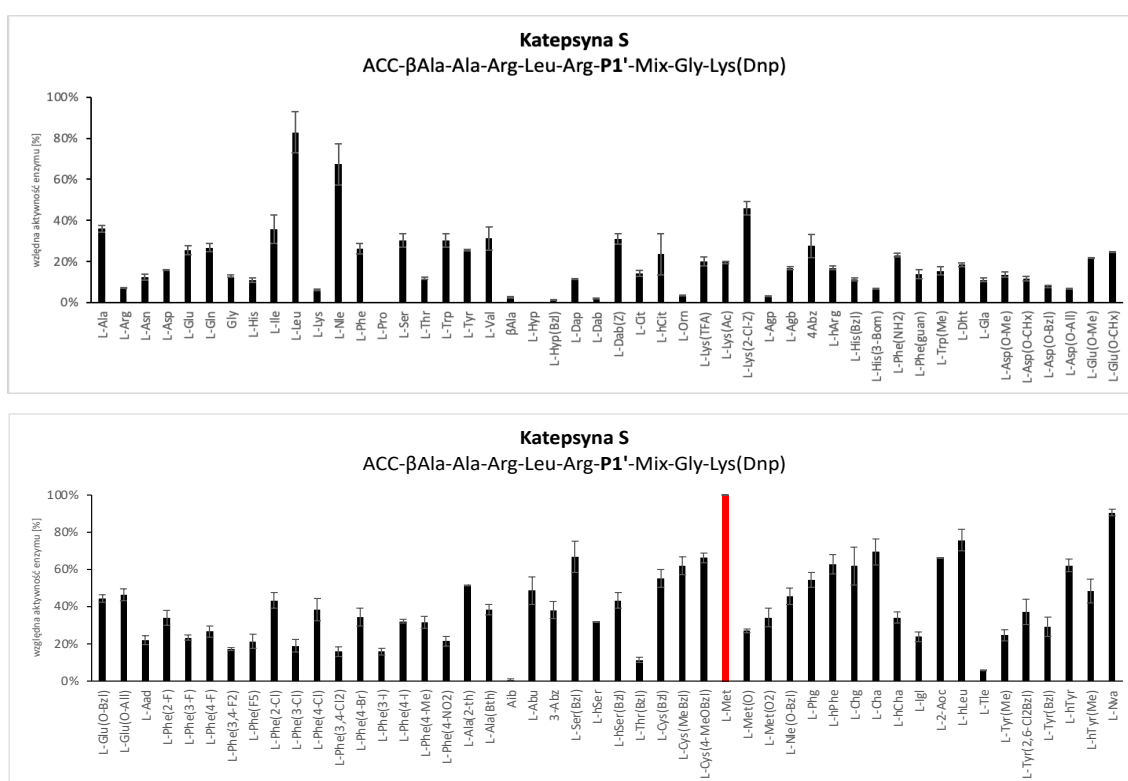
Rys. 51. Profil specyficzności substratowej katepsyny B w pozycji P1'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawią jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Profil specyficzności katepsyny V w pozycji P1' jest podobny jak w przypadku katepsyny L (rys. 52). Prolina oraz jej pochodne nie są preferowane w tej pozycji (L-Pro, 2%; L-Hyp, 1%; L-Hyp(Bzl), 3%), tak samo jak β -alanina (β Ala, 4%) i kwas 2-aminoizomasłowy (L-Aib, 1%). Najlepiej rozpoznawane są krótkie, nierozgałęzione reszty aminokwasowe jak: L-homoalanina (L-Abu, 100%), kwas L-2,3-diaminopropionowy (L-Dap, 89%), L-alanina (L-Ala, 97%), L-seryna (L-Ser, 96%), L-treonina (L-Thr, 73%), L-homoseryna (L-hSer, 92%) czy L-norwalina (L-Nva, 81%).



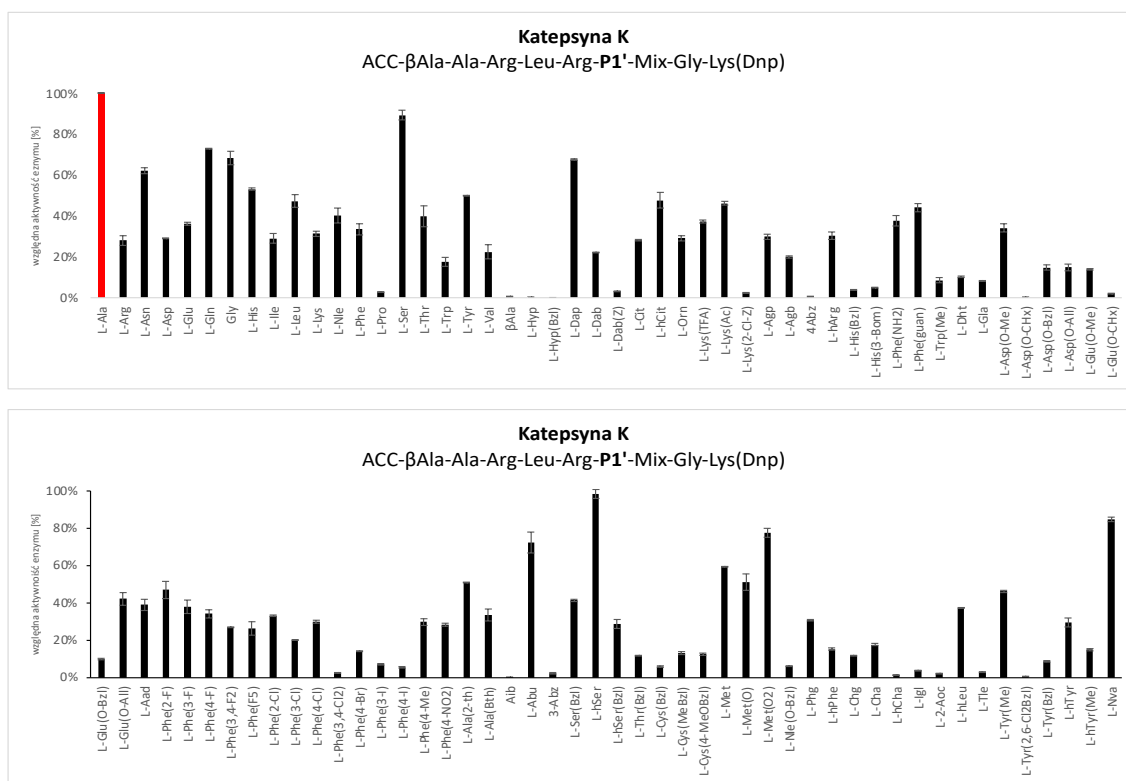
Rys. 52. Profil specyficzności substratowej katepsyny V w pozycji P1'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

W pozycji P1' katepsyna S podobnie jak katepsyna V oraz L nie rozpoznaje reszty L-proliny i jej pochodnych (L-Pro, 0%; L-Hyp, 0%; L-Hyp(Bzl), 1%) oraz β -alaniny (β -Ala, 3%). Słabo hydrolizuje również substraty z aminokwasami zasadowymi (L-Arg, 7%; L-His, 11%; L-Lys, 6%; L-Dap, 11%; L-Dab, 2%, L-Orn, 4%, L-Agp 3%, L-Agb 17%). Najlepiej rozpoznawaną resztą jest L-metionina (L-Met, 100%), L-norwalina (L-Nva, 90%), L-leucyna (L-Leu, 83%) i L-homoleucyna (L-hLeu, 76%). Cechą wspólną tych reszt jest podobny charakter chemiczny - niepolarny, alifatyczny łańcuch boczny.



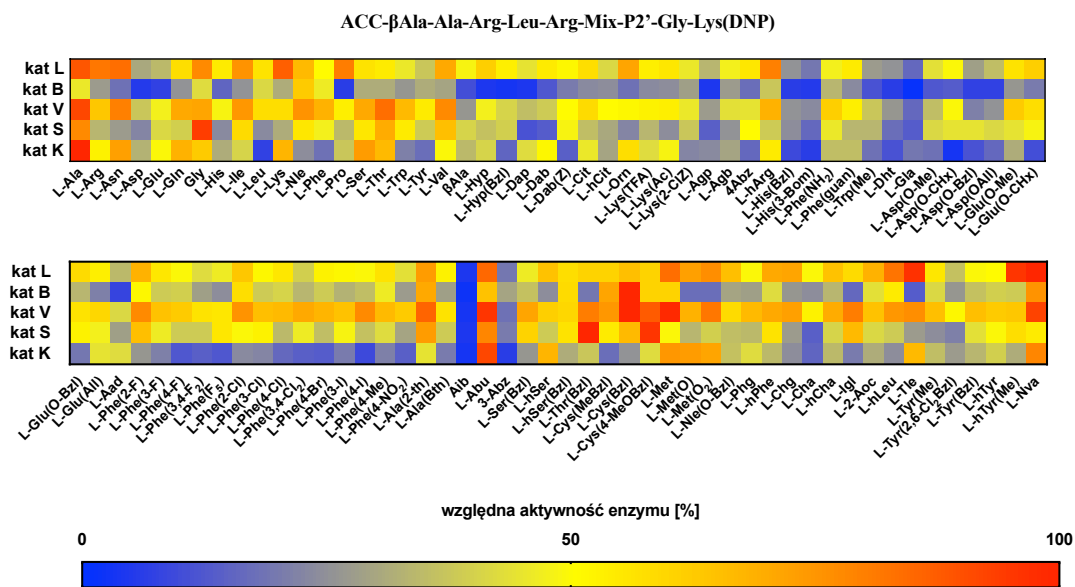
Rys. 53. Profil specyficzności substratowej katepsyny S w pozycji P1'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

W przypadku kieszeni wiążącej S1' katepsyny K widoczna jest preferencja do alifatycznych łańcuchów polarnych, takich jak L-alanina (L-Ala, 100%), L-homoseryna (L-hSer, 98%), L-norwalina (L-Nva, 95%) czy L-seryna (L-Ser, 89%). Podobnie jak pozostałe katepsyny, kieszeń S1' katepsyny K nie preferuje proliny i jej pochodnych (L-Pro, 0%; L-Hyp, 0%; L-Hyp(Bzl), 1%) (rys. 54).



Rys. 54. Profil specyficzności substratowej katepsyny K w pozycji P1'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

Pozycja P2'

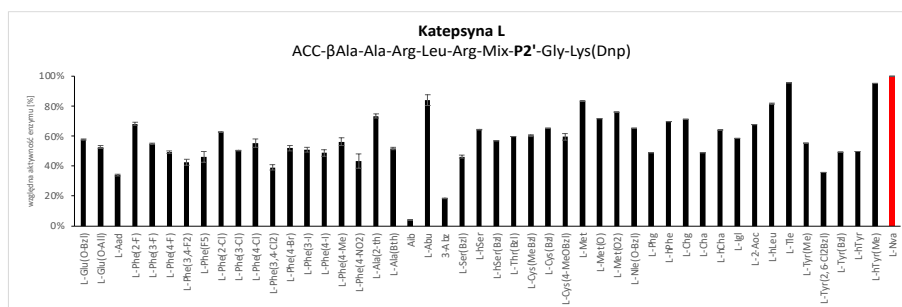
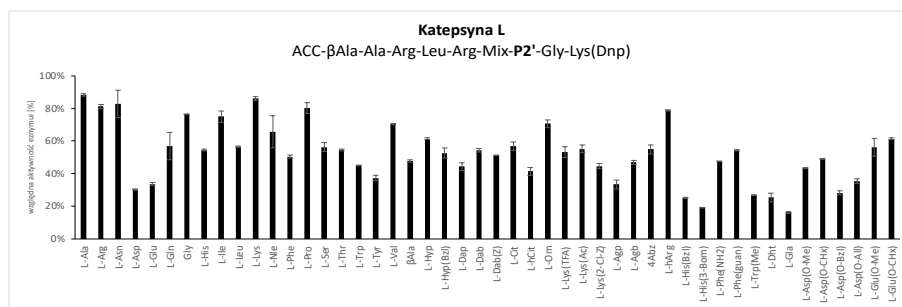


Rys. 55. Profile specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycji P2' przedstawione w postaci mapy ciepłej. Reakcję hydrolizy substratów tworzących bibliotekę HyCoSuL monitorowano przez 40 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Profile specyficzności substratowej zostały wyznaczone w sposób analogiczny jak w przypadku pozycji P2.

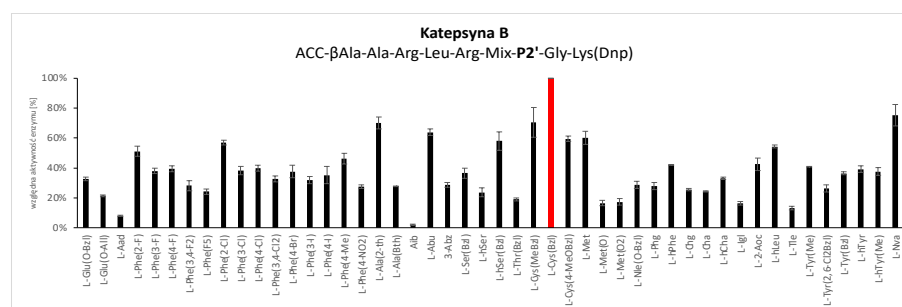
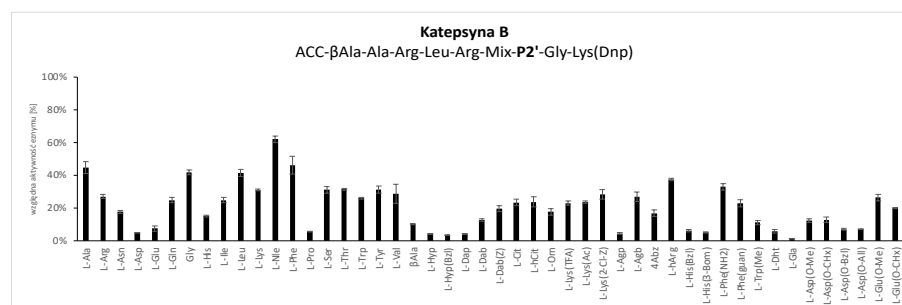
W przypadku kieszeni S2' wszystkich katepsyn nie można ustalić specyficzności substratowej (rys. 55). W pozycji P2' każda reszta aminokwasowa jest rozpoznawana w mniejszym lub większym stopniu przez te enzymy proteolityczne.

Najlepiej rozpoznawane reszty to:

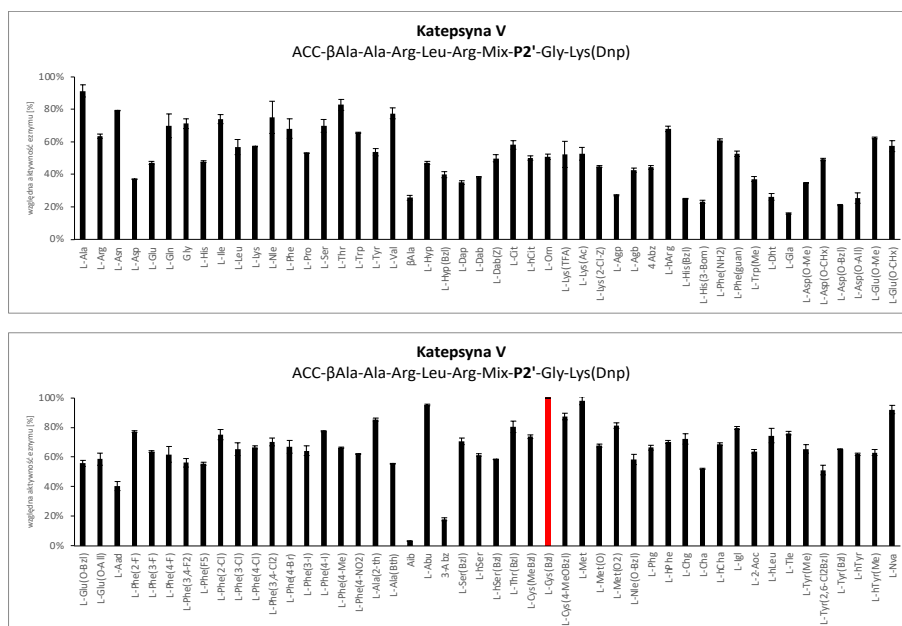
- dla katepsyny L: L-norwalina (L-Nva, 100%), L-alanina (L-Ala, 88%), L-lizyna (L-Lys, 86%), L-arginina (L-Arg, 81%) (rys. 56),
- dla katepsyny B: benzylo-L-cysteina (L-Cys(Bzl), 100%), L-norwalina (L-Nva, 75%), 4-metylobenzylo-L-cysteina (L-Cys(MeBzl), 71%) (rys. 57),
- dla katepsyny V: benzylo-L-cysteina (L-Cys(Bzl), 100%), L-metionina (L-Met, 98%), L-alanina (L-Ala, 91%), L-homoalanina (L-Abu, 95%) (rys. 58),
- dla katepsyny S: ester benzylowy L-treoniny (L-Thr(O-Bzl), 100%), glicyna (Gly, 93%), 4-metoksybenzylo-L-cysteina (L-Cys(4-MeOBzl), 95%) (rys. 59),
- dla katepsyny K: L-alanina (L-Ala, 100%), L-homoalanina (L-Abu, 91%), L-seryna (L-Ser, 73%), L-metionina (L-Met, 74%) (rys. 60).



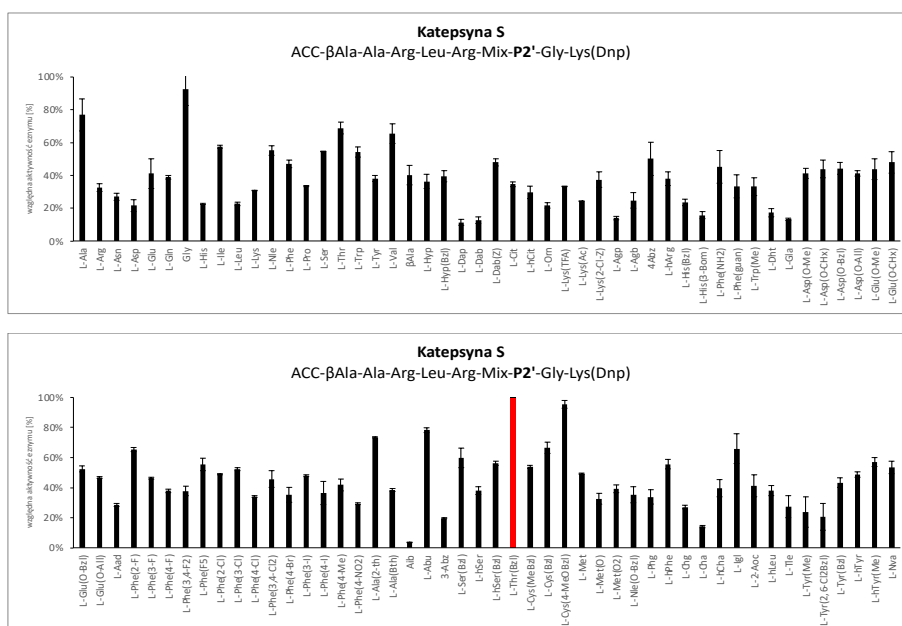
Rys. 56. Profil specyficzności substratowej katespyny L w pozycji P2'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.



Rys. 57. Profil specyficzności substratowej katespyny B w pozycji P2'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.



Rys. 58. Profil specyficzności substratowej katepsyny V w pozycji P2'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

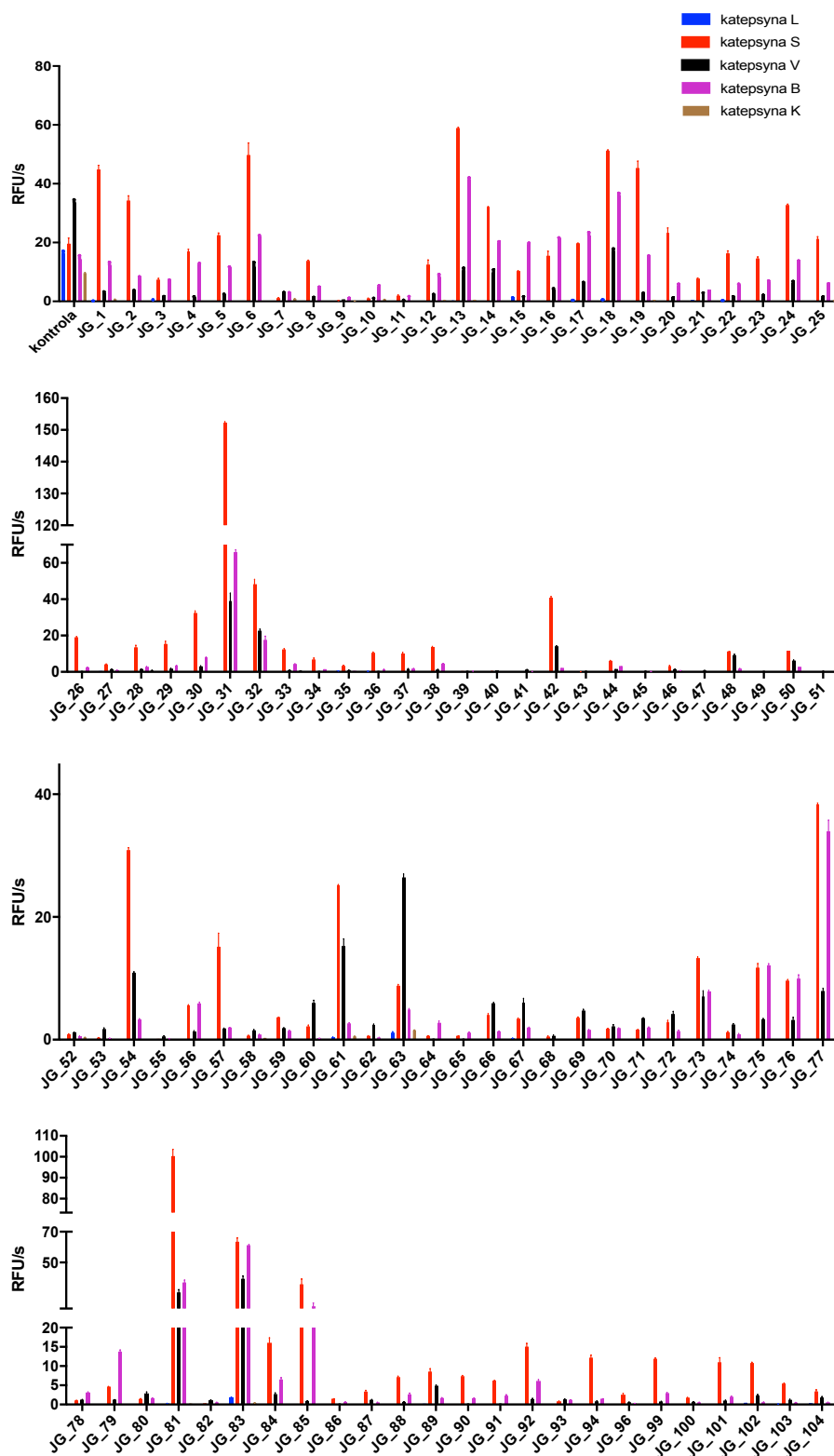


Rys. 59. Profil specyficzności substratowej katepsyny S w pozycji P2'. Na osi odciętych przedstawiono skrócone nazwy reszt aminokwasowych, na osi rzędnych względną aktywność enzymu przedstawioną jako procent aktywności enzymu względem substratu zawierającego najlepiej rozpoznawany aminokwas.

łańcucha peptydowego możliwe było dzięki wykorzystaniu komercyjnie dostępnych aminokwasów z grupą ochronną Fmoc znajdującą się na reszcie aminowej oraz innych grup chroniących łańcuchy boczne. Do żywicy typu Rink Amide AM przyłączono znacznik fluorescencyjny ACC, a następnie kolejne reszty aminokwasowe w pozycjach P4-P1. N-końcowe grupy aminowe substratów zascetylowano (z wyjątkiem substratów z L-Idc w pozycji P4), następnie uwolniono je z żywicy, wytrącono w eterze dietylowym i oczyszczono wykorzystując półpreparatywne HPLC. Masę cząsteczkową każdego związku potwierdzono za pomocą ESI-MS, a ich czystość poprzez analityczne HPLC. Związki poddano liofilizacji i rozpuszczono w DMSO do stężenia końcowego 20 mM.

W centrum aktywnym wielu enzymów proteolitycznych możemy spotkać się z tzw. efektem kooperatywności kieszeni wiążących, który polega na oddziaływaniu sąsiadujących ze sobą kieszeni, przez co obserwuje się zmianę ich specyficzności substratowej z zależności od tego, jakie reszty aminokwasowe są z nimi związane [252]. Jest to częste zjawisko wśród enzymów proteolitycznych, dlatego po otrzymaniu profili specyficzności substratowej należy dokonać walidacji wyników. W tym celu analizie kinetycznej poddano zaprojektowane substraty dedykowane katepsynie S. Stężenie substratów wynosiło 10 μ M, natomiast stężenie enzymów odpowiednio: katepsyna L - 0,2 nM, katepsyna B i S - 5 nM, katepsyna V - 2,5 nM, katepsyna K - 1,5 nM. Pomiarów wykonano minimum dwukrotnie, a odchylenie standardowe nie przekraczało 10% (rys. 61).

Projektując substraty tetrapeptydowe wybierano te reszty aminokwasowe, które były rozpoznawane przez katepsynę S, ale przede wszystkim wykazywały największy stopień selektywności wobec tego enzymu. Nie brano zatem pod uwagę wyłącznie reszt aminokwasowych zapewniających wysoką aktywność enzymu (wysoka wartość RFU/s), ale takie które były preferowane przez katepsynę S, a z drugiej strony były dużo gorzej rozpoznawane przez pozostałe enzymy. Substraty te w pozycji P1 zawierały: L-Glu(O-Me), L-Arg, L-Gln, L-Aad, L-Cys(MeBzl), L-Glu oraz L-Thr. W pozycji P2 wybrano hydrofobowe: L-Lys(2-Cl-Z), L-hLeu, L-hCha, L-2-Aoc oraz L-Met(O₂). W pozycji P3 znajdowały się reszty L-Arg, L-Cit, L-Ile, L-Glu(O-Me) oraz reszty zawierające w swojej budowie pierścienie, jak: L-Phe(2-Cl), L-Phe(2-F), L-Tic. W pozycji P4 wstawiono duże, hydrofobowe pochodne: L-Phe(F₅), L-Arg(Z2), L-Tyr(2,6-Cl₂Bzl), L-Hyp(Bzl), L-Idc, L-Trp(Me), pochodne metioniny: L-Met, L-Met(O), L-Met(O₂) oraz L-Glu, L-Abu, L-Tle.

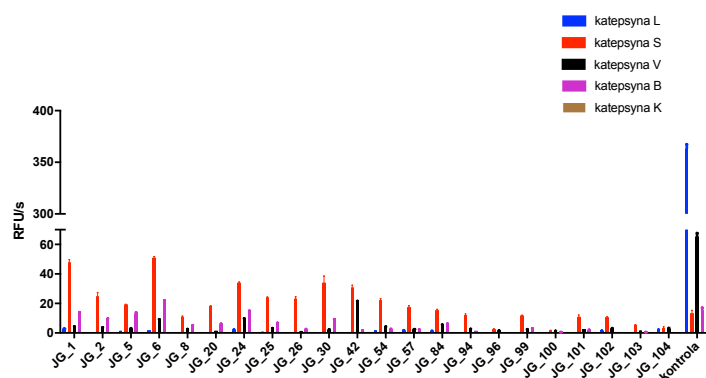


Rys. 61. Wynik przesiewowych badań kinetycznych substratów dedykowanych kathepsynie S. Szybkość hydrolizy substratów (RFU/s) mierzono przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm s.d. Stężenie substratów wynosiło $10 \mu\text{M}$, a stężenie enzymów odpowiednio: kathepsyna L – $0,2 \text{ nM}$, kathepsyna B i S – 5 nM , kathepsyna V – $2,5 \text{ nM}$, kathepsyna K – $1,5 \text{ nM}$. Sekwencje substratów przedstawiono w części eksperymentalnej (tab. 7).

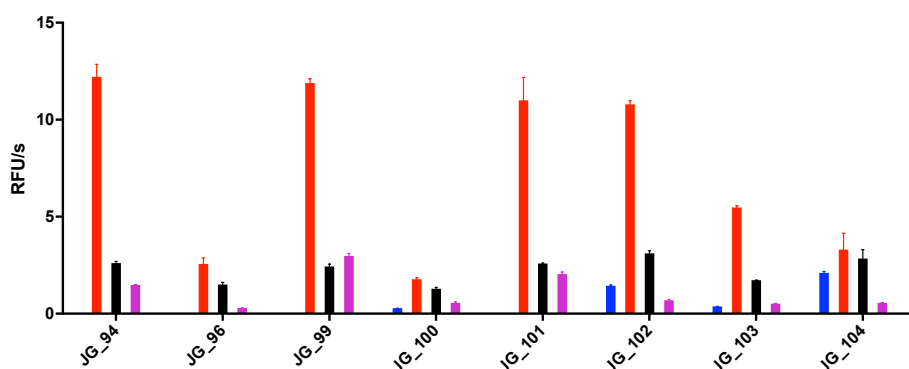
Na podstawie otrzymanych wyników do dalszej analizy wybrano 22 substraty i wykonano ponowny pomiar aktywności enzymatycznej przy stężeniach substratów wynoszących 10 μM oraz jednakowym stężeniu wszystkich katepsyn wynoszącym 5 nM (rys. 62).

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszej analizy wybrano substrat JG_103 (Ac-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC), który zawierał modyfikację potranslacyjną w pozycji P1 (metylacja kwasu glutaminowego) i w pozycji P3 (cytrulinacja argininy) oraz wykazywał wysoki stosunek selektywności wobec katepsyny S. W dalszym kroku zdecydowano o wykorzystaniu sekwencji peptydowej substratu JG_103 w syntezie markera chemicznego, by sprawdzić jego selektywność w inhibicji katepsyny S.

A)



B)

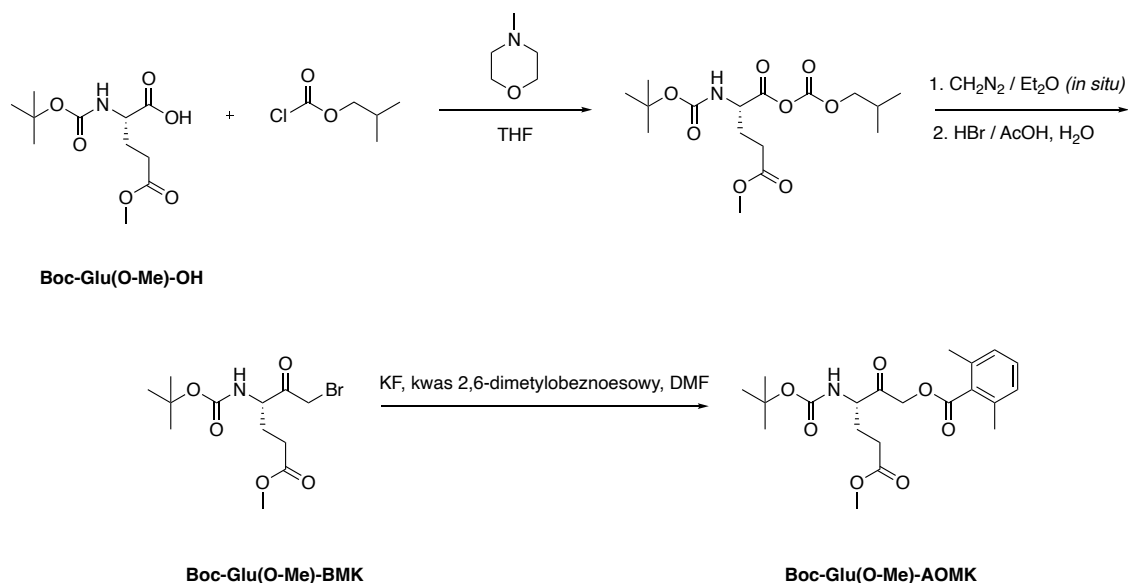


Rys. 62. A) Wynik przesiewowych badań kinetycznych wybranych 22 substratów dedykowanych katepsynie S przy stężeniu substratów 10 μM i jednakowym stężeniu katepsyn (5 nM). Szybkość hydrolizy substratów (RFU/s) mierzono przez 30 minut ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Dane przedstawiono jako wartości średnie \pm s.d. Kontrolą oznaczono substrat o sekwencji: Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC. B) Na wykresie dolnym przedstawiono porównanie 8 substratów wykazujących wysoką selektywność wobec katepsyny S.

3.1.4. Zaprojektowanie, synteza i analiza kinetyczna fluorescencyjnego markera chemicznego

Markery chemiczne zawierające znacznik fluorescencyjny są doskonałym narzędziem umożliwiającym obrazowanie aktywności enzymów proteolitycznych i procesów komórkowych w próbkach biologicznych. Związki te w swojej strukturze zawierają reaktywną grupę wiążącą miejsce aktywne, specyficzną sekwencję peptydową, linker oraz znacznik (np. fluorofor, biotynę, jon metalu). W przypadku proteaz cysteinowych, do których należą katepsyny, jako grupę wiążącą stosuje się acyloksymetyloketon (AOMK) zawierający pierścień fenylowy z dwoma grupami metylowymi w pozycjach -2 i -6. Acyloksymetyloketony wykazują wysoki poziom selektywności wiążąc katalityczną cysteinę znajdującą się w centrum aktywnym proteaz cysteinowych. Cechują się również lipofilowością, przez co przenikają przez błony komórkowe, dzięki czemu mogą być z powodzeniem stosowane w badaniach prowadzonych na modelach komórkowych [253]. Funkcję specyficjnej sekwencji peptydowej pełniła sekwencja substratu JG_103 (Ac-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC). Jako linker wykorzystano politlenek etylenu (PEG), którego zadaniem było oddalenie znacznika fluorescencyjnego od sekwencji peptydowej oraz zwiększenie rozpuszczalności markera chemicznego. Jako znacznik wykorzystano fluorescencyjny barwik cyjaninowy Cy5, który charakteryzuje się wysokim molowym współczynnikiem ekstynkcji, co umożliwia skuteczną wizualizację białek w niskich stężeniach (nawet 1 nM) [254].

Synteza fluorescencyjnego markera chemicznego obejmowała cztery etapy. W pierwszym kroku zsyntezowano grupę wiążącą (ang. *warhead*) odpowiednią dla katepsyny S. W tym celu wygenerowano diazometan, a *N*-zabezpieczony aminokwas (Boc-Glu(O-Me)-OH) przekształcono w bezwodnik w reakcji z chloromrówczanem izobutyli. Kolejno otrzymany bezwodnik dodawano do eterowego roztworu diazometanu (CH₂N₂) w celu otrzymania diazometyloketonu. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wkraplano kwas bromowodorowy w kwasie octowym, co miało na celu otrzymanie bromometyloketonu (Boc-Glu(O-Me)-BMK). Ostatnim etapem w syntezie grupy wiążącej było przekształcenie otrzymanego bromometyloketonu w acyloksymetyloketon (Boc-Glu(O-Me)-AOMK), który jest elektrofilowym ugrupowaniem selektywnie wiążącym się w miejscu aktywnym proteaz cysteinowych. Na rys. 63 przedstawiono schemat syntezy grupy wiążącej.



Rys. 63. Schemat syntezy grupy wiążącej dla proteaz cysteinowych Boc-Glu(O-Me)-AOMK. Do roztworu *N*-zabezpieczonego aminokwasu rozpuszczonego w tetrahydrofuranie (THF) dodano chloromrówczan etylu oraz *N*-metylmorfolina. Po 20 minutach, mieszany bezwodnik został dodany do wygenerowanego wcześniej eterowego roztworu diazometanu. Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym z mieszaniem przez godzinę, po czym do mieszaniny reakcyjnej wkroplono HBr/AcOH. Otrzymany bromometyloketon przekształcono w acyloksymetyloketon używając kwasu 2,6-dimetylobenzoowego.

Drugim etapem była synteza sekwencji peptydowej Boc-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-OH. Związek ten musiał mieć wolną grupę karboksylową na C-końcu, by w dalszym etapie mógł zostać przyłączony do grupy wiążącej, dlatego syntezę prowadzono na żywicy 2-chlorotrylowej. W skrócie do żywicy przyłączono resztę Fmoc-Lys(2-Cl-Z)-OH przy użyciu DIPEA w dichlorometanie. Następnie usunięto grupę ochronną Fmoc przy pomocy 20% roztworu piperydyny w DMF i przyłączono kolejną resztę aminokwasową (Fmoc-Cit-OH) stosując jako odczynniki sprzęgające HOBt/DICl. Po czterogodzinnej reakcji sprzęgania i negatywnym wyniku testu ninhydrynowego przyłączono ostatnią resztę aminokwasową, Fmoc-Phe(F₅)-OH stosując HOBt/DICl jako odczynniki sprzęgające. Po usunięciu grupy Fmoc przyłączono linker, Boc-NH-PEG(4)-COOH używając takich samych odczynników sprzęgających, po czym fragment peptydowy odłączono od żywicy za pomocą mieszaniny TFE:DCM:AcOH (1:8:1, v/v/v), zliofilizowano i użyto do dalszej reakcji bez wcześniejszego oczyszczania.

W kolejnym etapie syntezy inhibitora sprzęgnięto fragment peptydowy z grupą wiążącą, Boc-Glu(O-Me)-AOMK. W tym celu usunięto grupę ochronną Boc otrzymując H₂N-Glu(O-Me)-AOMK i połączono ją z fragmentem peptydowym Boc-PEG-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-OH za pomocą odczynników sprzęgających 2,4,6-trimetylopirydyny

i HATU w DMF wykorzystując metodę syntezy w roztworze. Reakcję sprzęgania prowadzono 4 godziny, a następnie mieszaninę reakcyjną oczyszczono na HPLC i zliofilizowano. Ostatni etap polegał na sprzęgnięciu otrzymanego produktu z fluoroforem. Syntezę rozpoczęto od usunięcia grupy ochronnej Boc wykorzystując mieszaninę TFA:TIPS:DCM (75%:5%:20%) i przyłączono fluorofor w postaci estru sukcyimidowego (Cy5-NHS). Reakcję prowadzono przez 2 godziny w DMF, stosując trzykrotny nadmiar DIPEA, po czym produkt oczyszczono na HPLC, zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w -20°C.

Końcowym etapem badań było sprawdzenie aktywności oraz selektywności otrzymanego fluorescencyjnego markera chemicznego poprzez wyznaczenie parametrów kinetycznych wobec katepsyny L, B, V, S oraz K. W tym celu w siedmiu dołkach białej płytki typu Corning® przygotowano seryjne rozcieńczenie markera chemicznego, a następnie dodano do nich substrat kontrolny Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC oraz enzym. Tym samym badano stopień hydrolizy danego substratu w zależności od użytego stężenia markera chemicznego. Równolegle, w ósmym dołku, prowadzony był pomiar kontrolny, w którym znajdował się wyłącznie substrat i enzym, dzięki czemu obserwowana była hydroliza tego substratu bez markera chemicznego. W badaniu zakres stężeń markera chemicznego wynosił od 4 nM do 25 μM w zależności od badanej katepsyny, stężenie substratu wynosiło 30 μM lub 100 μM, stężenie enzymów od 2 nM do 2,64 nM, a objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 μl.

Na podstawie uzyskanych wykresów w programie SoftMax Pro, przedstawiających przyrost jednostek fluorescencji w czasie w funkcji stężenia markera chemicznego, w programie GraphPad Prism wyznaczono pozorne stałe szybkości (k_{obs}). Wykorzystując analizę regresji nieliniowej, stałe te zostały określone oddzielnie dla każdego stężenia markera chemicznego. Następnie uzyskane wartości zestawiono z odpowiednimi dla nich stężeniami markera chemicznego i wykorzystując regresję liniową uzyskano pozorną stałą szybkość inhibicji II-rzędu ($k_{obs(app)}/I$). W celu wyznaczenia właściwości inhibicyjnych danego markera chemicznego w stosunku do poszczególnych enzymów wykorzystano wartość k_{obs}/I , którą wyliczono z równania $\frac{k_{obs}}{I} = \frac{k_{obs(app)}}{I} \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)$, gdzie [S] to stężenie substratu Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC użyte w pomiarze, a K_M to wyznaczona dla niego stała Michaelisa-Menten.

Analiza kinetyczna markera chemicznego M_JG_103 dedykowanego katepsynie S wykazała skuteczną inhibicję tego enzymu przez badany marker z wartością

k_{obs}/I wynoszącą $2\,226\,803 \pm 225\,510\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (tabela 2). Inhibicja katepsyny B przez ten marker chemiczny była ok. 1 700 razy słabsza ($k_{obs}/I = 1\,299 \pm 136\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), katepsyny L ok. 7 000 razy mniej wydajna ($k_{obs}/I = 315 \pm 3\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), katepsyny V ok. 30 000 razy gorsza ($k_{obs}/I = 74 \pm 4\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), a w przypadku katepsyny K nie wykazano aktywności krzyżowej z M_JG_103.

Tab. 2. Parametry kinetyczne (k_{obs}/I) fluorescencyjnego markera chemicznego względem ludzkiej katepsyny S, B, L, V oraz K. Dane przedstawiają wartości średnie \pm s.d. Pomiar wykonano minimum dwukrotnie, a odchylenie standardowe nie przekroczyło 11%.

Enzym	k_{obs}/I [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
	Cy5-PEG(4)-Phe(F ₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK
katepsyna S	$2\,226\,803 \pm 225\,510$
katepsyna B	$1\,299 \pm 136$
katepsyna L	315 ± 3
katepsyna V	74 ± 4
katepsyna K	NW

NW – nie wyznaczono ze względu na niską inhibicję enzymu

3.1.5. Podsumowanie

Do tej pory w literaturze można znaleźć określone profile specyficzności substratowej ludzkiej katepsyny S w pozycjach P3-P1' uwzględniające wyłącznie naturalne reszty aminokwasowe, co nie przedstawia pełnego obrazu charakteru chemicznego danych kieszeni wiążących i ich preferencji substratowych. Porównując aminokwasy naturalne, uzyskane wyniki są zgodne z tymi przedstawionymi w literaturze. W pozycji P1 najlepiej rozpoznawane reszty to arginina, glutamina oraz lizyna, natomiast w literaturze to arginina, glutamina i lizyna [32] oraz glutamina, seryna i glicyna [249]. W pozycji P2 w niniejszych badaniach wśród aminokwasów naturalnych najlepszymi okazały się leucyna, walina i metionina, a więc wyniki pokrywające się z wynikami uzyskanymi przez Choe [32] oraz podobne do wyników Lütznera [140]. W pozycji P3 najlepsze okazały się izoleucyna, arginina i prolina a w literaturze: izoleucyna, arginina i prolina [32] oraz leucyna i lizyna [249]. W pozycji P1' największą wartość przyrostu jednostek fluorescencji w czasie uzyskały substraty zawierające reszty seryny, alaniny i histydyny, podczas gdy w literaturze jest to leucyna, seryna i alanina [249] lub walina i leucyna [140]. Różnice między otrzymanymi resztami wynikać mogą ze sposobu określania specyficzności substratowej. W badaniach Choe [32] została wykorzystana metoda PS-SCL, która składała się z czterech podbibliotek: Ac-Mix-Mix-

Mix-P1-ACC, Ac-Mix-Mix-P2-Mix-ACC, Ac-Mix-P3-Mix-Mix-ACC, Ac-P4-Mix-Mix-Mix-ACC, gdzie Mix to równomolowa mieszanina 19 naturalnych aminokwasów (bez cysteiny i z norleucyną), natomiast P1/P2/P3/P4 to jeden z 19 naturalnych aminokwasów (bez cysteiny i z norleucyną). W pozostałych badaniach autorzy wykorzystali substrat typu IQF, w którym zmieniali daną resztę aminokwasową w konkretnej pozycji i na tej podstawie określali specyficzność substratową, co mogło wpłynąć na uzyskane dane, np. poprzez zjawisko kooperatywności kieszeni wiążących [140, 249]. Na tym przykładzie widać również, że otrzymane wyniki w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, w której wykorzystano kombinatoryczną bibliotekę HyCoSuL do określenia specyficzności substratowej w pozycji P4-P2 oraz zdefiniowaną bibliotekę P1 są zbieżne z tymi otrzymanymi metodą PS-SCL. Rozbudowanie biblioteki o dodatkowe substraty, zawierające nienaturalne reszty aminokwasowe pozwoliło poznać dokładniejsze preferencje kieszeni wiążących, a co najważniejsze umożliwiło zaprojektowanie oraz syntezę sekwencji selektywnych wobec katepsyny S. Wśród reszt aminokwasowych wykorzystano również reszty z modyfikacjami potranslacyjnymi (Ac-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC) – cytrulinę w pozycji P3 oraz metylowany kwas glutaminowy w pozycji P1. Wybrana sekwencja została przekształcona we fluorescencyjny marker chemiczny (Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC), dla którego wyznaczono drugorzędową stałą szybkości reakcji inhibicji (k_{obs}/I) wobec katepsyny S wynoszącą $2\,226\,803 \pm 225\,510\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Świadczy to o wysokim stopniu selektywności uzyskanego markera chemicznego. Inhibicja pozostałych enzymów jest słabsza ok. 1 700 razy w przypadku katepsyny B, 7 000 razy w przypadku katepsyny L oraz 30 000 razy w przypadku katepsyny V.

3.2. Kaspazy

Kaspazy należą do enzymów proteolitycznych, które odgrywają znaczącą rolę w apoptozie i stanach zapalnych. Ich główną funkcją jest przekazywanie sygnałów w programowanej śmierci komórkowej oraz regulacja dojrzewania cytokin w odpowiedzi na stany zapalne. Wśród kaspaz apoptotycznych wyróżnia się kaspazy inicjatorowe (kaspaza-2, -8, -9 i -10) oraz kaspazy efektorowe (kaspaza-3, -6 i -7). Kaspaza-3 oraz -7 są niezbędne do przebiegu procesu apoptozy jednocześnie zapewniając prawidłowy rozwój komórki. Oba te enzymy wykazują nakładającą się specyficzność substratową, czyli rozpoznają te same reszty aminokwasowe w danych

pozycjach, co utrudnia projektowanie związków selektywnie działających tylko na jedną proteazę [77, 115, 117].

Restrykcyjny wymóg kwasu asparaginowego w pozycji P1 sugeruje możliwość występowania fosforylacji w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca hydrolizy substratu. W literaturze pojawiają się coraz częściej badania analizujące wpływ fosforylacji substratów na aktywność enzymatyczną kaspaz. Efekt ten badano np. dla białka BID pełniącego ważną rolę w apoptozie. Jest ono hydrolizowane przez kaspazę-8 m.in. w pozycji Asp⁶⁰ (pozycja P1), a np. fosforylacja Thr⁵⁹ (pozycja P2) skutecznie zapobiega hydrolizie białka BID przez kaspazy [255]. W innym przykładzie wykazano, że fosforylacja reszty aminokwasowej zlokalizowanej w pozycji P1' białka YAP1 (Thr⁴²⁵) całkowicie wstrzymuje hydrolizę tego substratu przez kaspazę-3, a fosforylacja reszty aminokwasowej w pozycji P4' (Thr⁴²⁸) znacznie ją osłabia. [256]. Dix i in. stwierdzili, że fosforylacja w pozycji P3 zwiększa szybkość hydrolizy substratu przez kaspazę-8, ale nie ma wpływu na hydrolizę przez kaspazę-3 [257], gdzie Tozser i in. [239] oraz Turowec i in. [256] zaobserwowali, że fosforylacja P3 nie ma wpływu na hydrolizę substratów przez kaspazę-3, -7 i -8. Z drugiej strony Duncan i in. wykazali, że fosforylacja dowolnej pozycji sąsiadującej z miejscem hydrolizy (pozycja P1' oraz P2) w substratach białkowych jest wystarczająca do wstrzymania hydrolizy przez kaspazę-8 [258]. W celu oceny sprzecznych doniesień dotyczących wpływu fosforylacji na aktywność kaspaz (głównie -3 i -7) [69, 239, 243, 255-258] zostały zsyntezowane substraty kontrolne (dobrze rozpoznawane przez te kaspazy) oraz ich analogi, zbadano kinetykę reakcji hydrolizy enzymatycznej i potwierdzono miejsca hydrolizy korzystając z LC-MS.

3.2.1. Analiza kinetyczna substratów z fosforylowanymi pochodnymi w peptydach wywodzących się z białek YAP1 i VIME

Białko YAP1 to naturalnie występujący substrat kaspazy-3 z miejscem hydrolizy w obrębie sekwencji: QASTD¹¹¹↓AGTA [243, 259] oraz VDEMD⁴²⁴↓TGDTI [243, 256]. Sekwencje te są również rozpoznawane przez kaspazę-7 oraz -8, jednak hydroliza ta zachodzi mniej wydajnie. Drugim substratem wybranym do badań był peptyd, którego sekwencja pochodzi z białka VIME hydrolizowanego przez kaspazę-3 oraz -7 w obrębie motywu: QDSVD⁸⁵↓FSNHD [260]. Grupa Cieplaka w 2018 r. przeprowadziła symulację badając energię swobodną powyższych sekwencji

dekapeptydowych z kaspazą-3. Bazując na ich wynikach analiz teoretycznych postanowiono zbadać wpływ fosforylacji L-treoniny w pozycjach P2 oraz P1' dla sekwencji peptydowych pochodzących z YAP1 oraz L-seryny w pozycji P2' analogu VIME wobec kaspazy-3 [243].

By była możliwa analiza kinetyczna sekwencji peptydowych zsyntezowano sześć związków typu IQF o sekwencji:

- S1_YAP1: ACC- β AVDEMDT⁴²⁵GDTIK(Dnp)
- S2_[pT]YAP1: ACC- β AVDEMDpT⁴²⁵GDTIK(Dnp)
- S3_YAP1: ACC- β AQAST¹¹⁰DAGTAGK(Dnp)
- S4_[pT]YAP1: ACC- β AQASpT¹¹⁰DAGTAGK(Dnp)
- S5_VIME: ACC- β AQDSVDFS⁸⁷NHDK(Dnp)
- S6_[pS]VIME: ACC- β AQDSVDFpS⁸⁷NHDK(Dnp)

gdzie ACC to znacznik fluorogeniczny będący donorem fluorescencji, a K(Dnp) to akceptor fluorescencji (wygaszacz).

Syntezę prowadzono na podłożu stałym używając żywicy amidowej Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,74 mmol/g, przy użyciu HATU i 2,4,6-trimetylopirydyny jako odczynników sprzęgających. Każdorazowo do odblokowania grupy ochronnej Fmoc używano 20% roztwór piperydyny w DMF. Aminokwas w każdej pozycji przyłączano minimum 3h – pochodne fosforylowane oraz sekwencję Fmoc-ACC- β Ala-OH sprzęgane były całą dobę. Na końcu uwolniono peptyd z nośnika stałego wraz z usunięciem grup ochronnych. Produkt oczyszczono stosując preparatywnie HPLC, a czystość i masę cząsteczkową potwierdzono używając LC-MS oraz HRMS. Substraty zliofilizowano i rozpuszczono w DMSO do stężenia końcowego równego 20 mM i przechowywano w -20°C.

Resztę Fmoc-ACC- β Ala-OH zsyntezowano osobno na podłożu stałym wykorzystując żywicę 2-chlorotrylową o stopniu podstawienia 1,6 mmol/g. Syntezę rozpoczęto od przyłączenia Fmoc- β Ala-OH do żywicy. Grupę ochronną Fmoc usunięto stosując 20% roztwór piperydyny w DMF, a następnie przyłączono Fmoc-ACC-OH. Żywicę wysuszone, a związek uwolniono z żywicy i zliofilizowano. Sprawdzone masę oraz czystość na LC-MS, a następnie wykorzystano go w syntezie substratów typu IQF bez wcześniejszego oczyszczania.

Analizę kinetyczną prowadzono stosując stężenie substratów w wysokości 1 μ M i 10 μ M, natomiast stężenia enzymów wynosiły odpowiednio: 2 nM

dla kaspazy-3, 8 nM dla kaspazy-7, 20 nM dla kaspazy-8 oraz 600 nM dla kaspazy-6. Przy wyznaczaniu parametrów kinetycznych (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) końcowe stężenie kaspazy-3 wynosiło od 1,36 nM do 100 nM, natomiast zakres stężeń substratów wynosił od 4,6 μ M do 150 μ M.

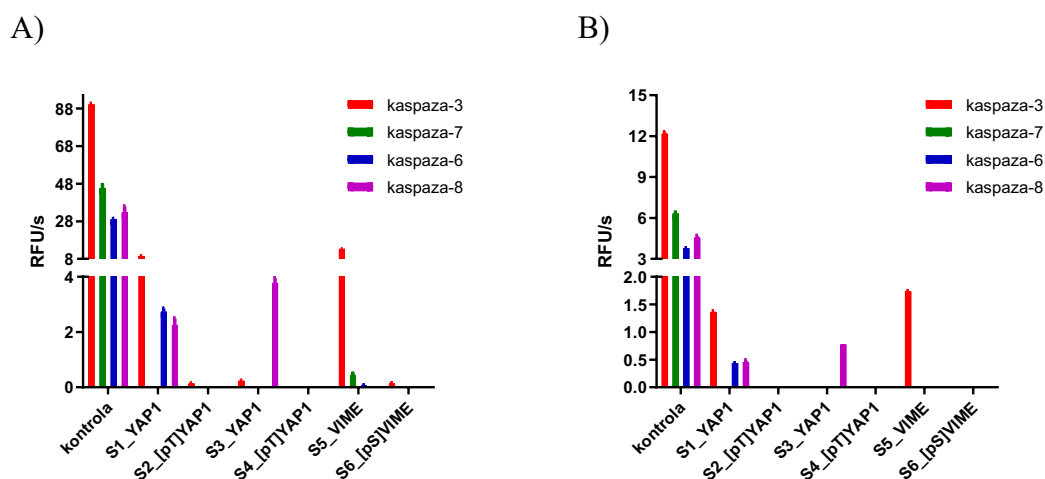
Na podstawie uzyskanych danych (tabela 3) widać, że wśród naturalnych sekwencji najniższą wartość stałej specyficzności uzyskał substrat S3_YAP1 z treoniną w pozycji P2. Wartość k_{kat}/K_M dla tego substratu wynosiła $2280 \pm 54 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, jednak w przeciwieństwie do substratu S4_YAP1 był on hydrolizowany przez kaspazę-3. Wprowadzenie fosforylowanej treoniny w pozycji P2 całkowicie zahamowało reakcję hydrolizy. Związek nie był rozpoznawany przez kaspazę-3 przy użyciu nawet wysokich stężeń tego enzymu (500 nM). Gwałtowne spowolnienie reakcji enzymatycznej widoczne jest również w przypadku substratu S2_YAP1, który ma wprowadzoną fosforylację na grupę hydroksylową treoniny w pozycji P1', czyli w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca hydrolizy. Substrat S1_YAP1 z sekwencją złożoną z naturalnych reszt aminokwasowych (L-treonina w P1') osiąga stałą specyficzności k_{kat}/K_M na poziomie $110\,000 \pm 4770 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, podczas gdy wartość k_{kat}/K_M zmodyfikowanej sekwencji wynosi $205 \pm 2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, co oznacza, że wydajność katalityczna enzymu w przypadku substratu z fosforylowaną treoniną w P1' jest ok. 500 razy niższa. Wyniki parametrów katalitycznych sekwencji pochodzącej z białka VIME wykazały, że również w tym przypadku fosforylacja seryny w pozycji P2' powoduje uzyskanie 58-krotnie niższego parametru k_{kat}/K_M ($131\,000 \pm 3140 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla substratu z naturalną seryną i $2240 \pm 150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dla substratu z fosforylowaną seryną). Analizując uzyskane wartości stałych Michaelisa substratów S1_YAP1 ($15,5 \pm 1,25 \mu\text{M}$) i S2_YAP1 ($17,6 \pm 0,64 \mu\text{M}$) oraz S5_VIME ($13,3 \pm 0,52 \mu\text{M}$) i S6_VIME ($16,4 \pm 1,30 \mu\text{M}$) widać, że są one na podobnym poziomie, co sugeruje, że kaspaza-3 ma podobne powinowactwo do tych substratów, zarówno zmodyfikowanych, jak i niezmodyfikowanych.

Tab. 3. Parametry kinetyczne (k_{kat}/K_M) sekwencji peptydowych naturalnych oraz ich analogów z fosforylowaną pochodną względem kaspazy-3 oraz całkowita energia wiązania tych sekwencji peptydowych z kaspazą-3. Dane przedstawiają wartości średnie \pm odchylenie standardowe.

Symbol i sekwencja substratu	Miejsce hydrolyzy w naturalnym substracie	Miejsce fosforylacji	Kaspaza-3		$\Delta G_{\text{wiązania}}$ [kcal/mol] [243]
			K_M [μM]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	
S1_YAP1 ACC- β AVDEMDT ⁴²⁵ GDTIK(Dnp)-NH ₂	Asp ⁴²⁴ ↓Thr ⁴²⁵ (YAP1)	-	15,5 (\pm 1,25)	110 000 (\pm 4 770)	-41,47
S2_[pT]YAP1 ACC- β AVDEMDpT ⁴²⁵ GDTIK(Dnp)-NH ₂	Asp ⁴²⁴ ↓Thr ⁴²⁵ (YAP1)	P1'	17,6 (\pm 0,64)	205 (\pm 2)	-4,14
S3_YAP1 ACC- β AQAST ¹¹⁰ DAGTAGK(Dnp)-NH ₂	Asp ¹¹¹ ↓Ala ¹¹² (YAP1)	-	16,2 (\pm 0,69)	2 280 (\pm 54)	-42,78
S4_[pT]YAP1 ACC- β AQASpT ¹¹⁰ DAGTAGK(Dnp)-NH ₂	Asp ¹¹¹ ↓Ala ¹¹² (YAP1)	P2	NH*	NH*	-25,16
S5_VIME ACC- β AQDSVDFS ⁸⁷ NHDK(Dnp)-NH ₂	Asp ⁸⁵ ↓Phe ⁸⁶ (VIME)	-	13,3 (\pm 0,52)	131 000 (\pm 3 140)	-40,33
S6_[pS]VIME ACC- β AQDSVDFpS ⁸⁷ NHDK(Dnp)-NH ₂	Asp ⁸⁵ ↓Phe ⁸⁶ (VIME)	p2'	16,4 (\pm 1,30)	2 240 (\pm 150)	2,35

*substrat nie był hydrolyzowany nawet przy wysokich stężeniach kaspazy-3

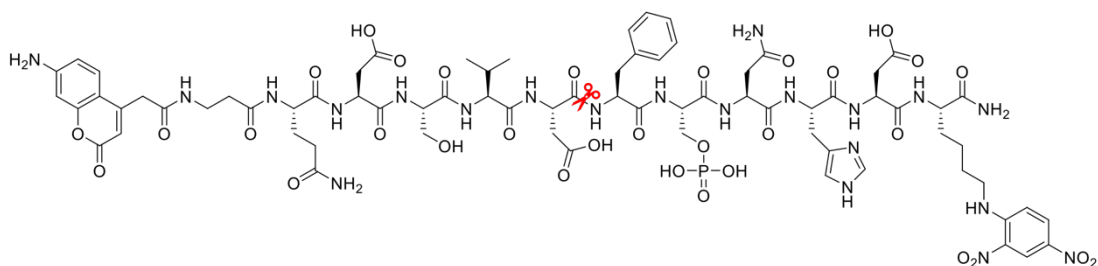
Poza kaspazą-3 sprawdzono również jak wyżej wymienione substraty są rozpoznawane przez kaspazę-6, -7 oraz -8. Z uzyskanych wyników widać, że enzymy te nie hydrolyzują żadnego z nowo zsyntezowanych związków (S2_[pT]YAP1, S4_[pT]YAP1, S6_[pS]VIME), co sugeruje, że substrat S6_[pS]VIME może być nieznacznie, ale selektywnie hydrolyzowany przez kaspazę-3.



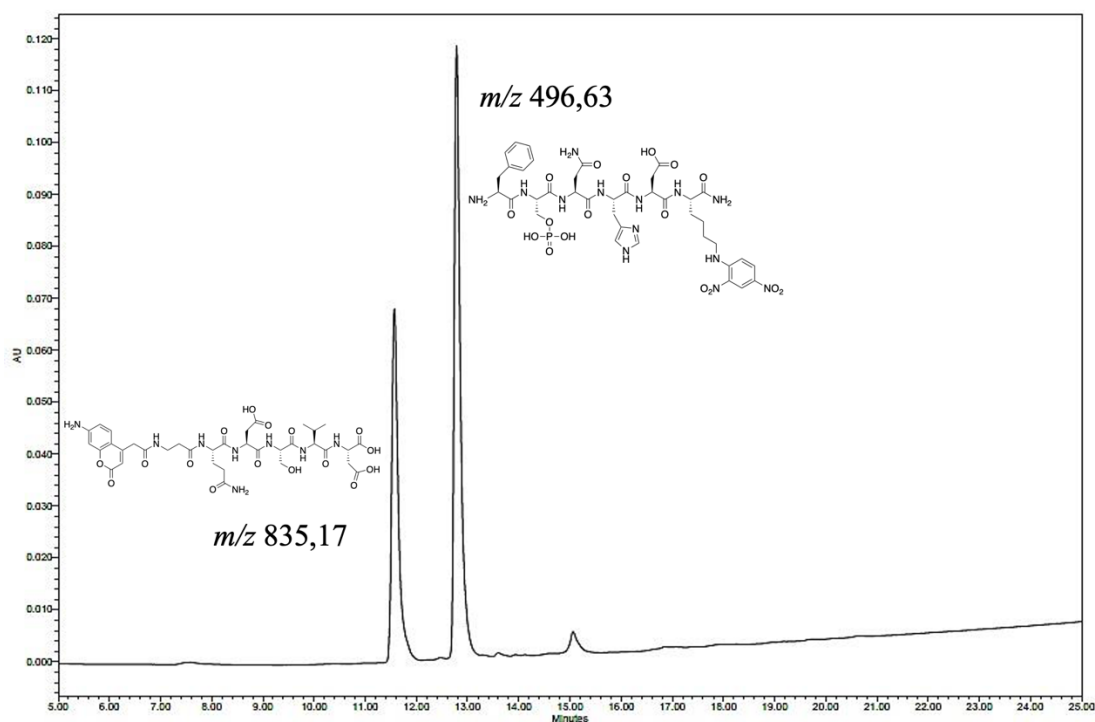
Rys. 64. Szybkości hydrolyzy substratów przez kaspazy. Stężenie enzymów wynosiło: 2 nM dla kaspazy-3, 8 nM dla kaspazy-7, 20 nM dla kaspazy-8 i 600 nM dla kaspazy-6; stężenie substratów wynosiło: 10 μM (A) i 1 μM (B). Pełna sekwencja substratów umieszczona jest w tab. 3. Jako kontrolę opisano sekwencję Ac-DEVD-ACC. Oś rzędnych prezentuje szybkość reakcji hydrolyzy przedstawionej jako przyrost jednostek fluorescencji w czasie (RFU/s). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym.

By potwierdzić miejsce hydrolizy substratu S6_[pSer]VIME o sekwencji ACC- β AQDSVDFpS⁸⁷NHDK(Dnp) przez kaspazę-3 wykorzystano chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas. Substrat z fosforylowaną pochodną o masie 1808,62 Da po dwupółgodzinnej inkubacji z kaspazą-3 uległ hydrolizie dając produkty o wartości m/z wynoszącej 835,17 i 496,63 odpowiadającej pojedynczo naładowanemu jonowi ACC β AQDSVD i podwójnie naładowanemu jonowi FpS⁸⁷NHDK(Dnp)-NH₂ (rys. 65). Potwierdzono miejsce hydrolizy: ACC- β AQDSVD↓FpS⁸⁷NHDK(Dnp)-NH₂ i wykazano, że kaspaza-3 jest zdolna do hydrolizy peptydu zawierającego fosfo-L-serynę w pozycji P2', co nie było wcześniej pokazane w literaturze.

A)



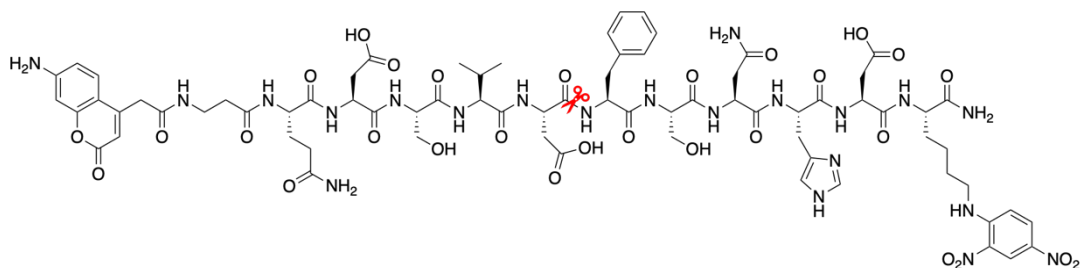
B)



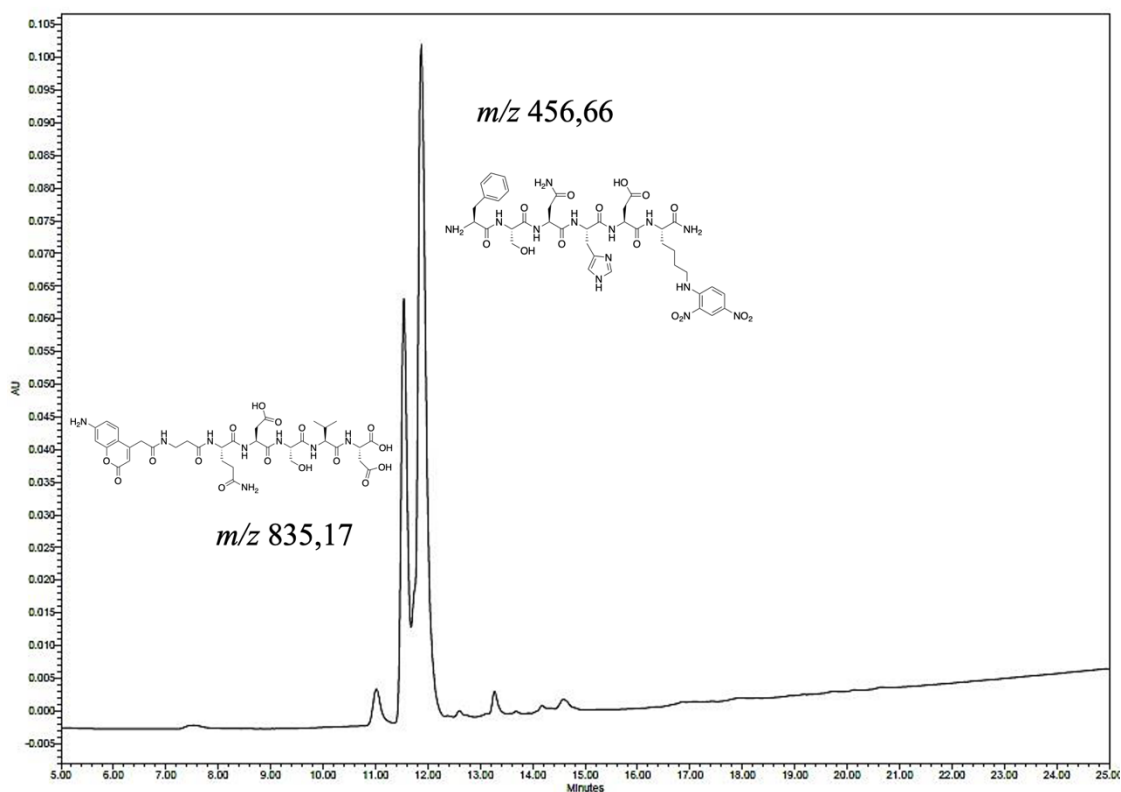
Rys. 65. Struktura chemiczna substratu S6_[pS]VIME z zaznaczonym miejscem hydrolizy (A) i chromatogram przedstawiający produkty hydrolizy substratu S6_[pS]VIME przez kaspazę-3 (B).

Równolegle sprawdzono miejsce hydrolizy substratu kontrolnego z naturalną L-seryną w pozycji P2' (S5_VIME). Po dwugodzinnej inkubacji substratu z kaspazą-3 wynik eksperymentu potwierdził miejsce hydrolizy znajdujące się po karboksylowej stronie Asp⁸⁵ (rys. 66)

A)



B)



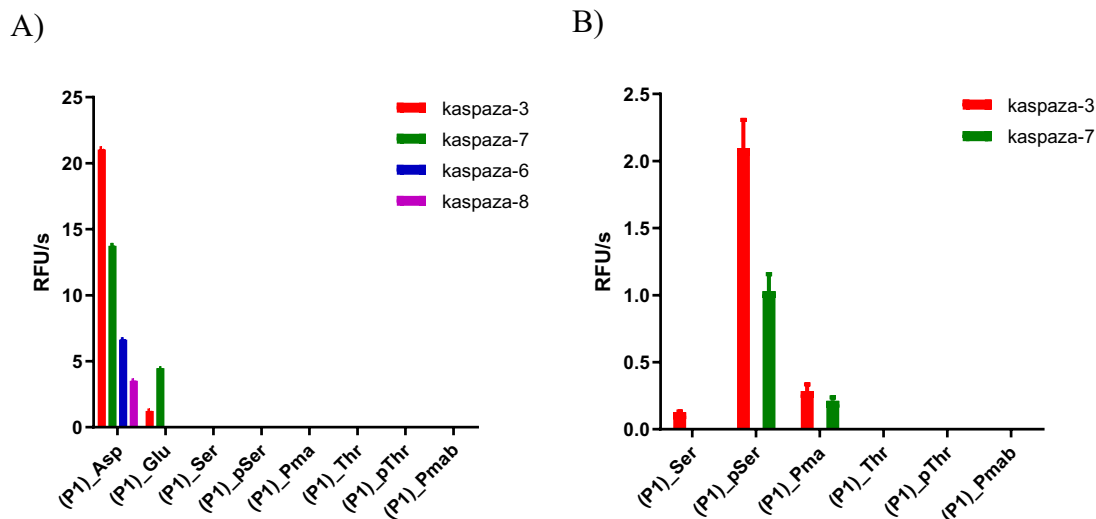
Rys. 66. Struktura chemiczna substratu S5_VIME z zaznaczonym miejscem hydrolizy (A) i chromatogram przedstawiający produkty hydrolizy substratu S5_VIME przez kaspazę-3 (B).

3.2.2. Analiza kinetyczna substratów z fosforylowanymi pochodnymi aminokwasów w peptydach wywodzących się z białka PARP

Polimeraza-1 poli(ADP-rybozy), białko PARP1 (ang. *poly ADS-ribose polymerase 1*) to enzym jądrowy zdolny do naprawy DNA i regulujący proces transkrypcji. W trakcie apoptozy następuje jego proteolityczne rozszczepienie. Kaspazy, a w szczególności kaspaza-3 oraz kaspaza-7, hydrolizują wiązanie pomiędzy Asp²¹⁴ a Gly²¹⁵. Sekwencja białka PARP zawierająca miejsce hydrolizy to GDEVD²¹⁴↓GVDEV [115, 261]. W celu oceny wpływu fosforylacji na efektywność hydrolizy substratów przez kaspazę-3 oraz -7 zsyntezowano serię substratów peptydowych w oparciu o opisaną sekwencję ACCβADEVD↓GVK(Dnp)D zawierającą motyw pochodzący z białka PARP [183]. Związki z Asp oraz Glu w pozycji P1 zastosowano jako substraty kontrolne, natomiast peptydy zawierające Ser, pSer, Thr, pThr a także analogi seryny i treoniny, czyli Pma i Pmab wykorzystano do zbadania wpływu fosforylacji pozycji P1. W badaniach pominięto Tyr i pTyr ze względu na jej prawdopodobną zawadę steryczną w interakcji z miejscem aktywnym [69].

Substraty zostały zsyntezowane w taki sam sposób jak omawiane pochodne białek VIME i YAP1. Analizę kinetyczną prowadzono stosując stężenie substratów w wysokości 10 μM, natomiast stężenia enzymów wynosiły odpowiednio: 0,4 nM i 200 nM dla kaspazy-3, 5 nM i 200 nM dla kaspazy-7, 5 nM dla kaspazy-8 oraz 100 nM dla kaspazy-6. Przy wyznaczaniu parametrów kinetycznych (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) końcowe stężenie kaspazy-3 wynosiło od 1 nM do 150 nM, końcowe stężenie kaspazy-7 od 5 nM do 500 nM, a zakres stężeń substratów od 1,46 μM do 70 μM.

Substraty kontrolne zawierające kwas L-asparaginowy były rozpoznawane przez wszystkie kaspazy, przy czym stężenie kaspazy-6 wynosiło aż 100 nM (rys. 67). Zastąpienie kwasu asparaginowego, kwasem glutaminowym, czyli wydłużenie go o jedną grupę metylenową zahamowało hydrolizę substratu przez kaspazę-6 oraz -8. Kaspaza-3 oraz -7 nadal rozpoznawały ten substrat, jednak hydroliza przebiegała w sposób mniej efektywny. Wprowadzenie L-seryny i L-treoniny zamiast reszt kwasowych całkowicie uniemożliwiło zajście proteolizy. Podobny efekt stwierdzono w przypadku fosforylowanej treoniny i jej analogu Pmab, co potwierdza sugestię, że reszty te są prawdopodobnie zbyt duże, by efektywnie oddziaływać z centrum aktywnym kaspazy-3 oraz -7.



Rys. 67. Wykres szybkości hydrolizy substratów przez kaspazy (stężenie enzymów wynosiło: 0,4 nM dla kaspazy-3, 5 nM dla kaspazy-7, 5 nM dla kaspazy-8, 100 nM dla kaspazy-6 (A) i 200 nM dla kaspazy-3 i -7 (B), użyte stężenie substratów to 10 μ M. Na osi odciętych umieszczono symbole substratów typu IQF. Pełna sekwencja substratów umieszczona jest w tab. 9. Oś rzędnych prezentuje szybkość reakcji hydrolizy przedstawionej jako przyrost jednostek fluorescencji w czasie (RFU/s). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym.

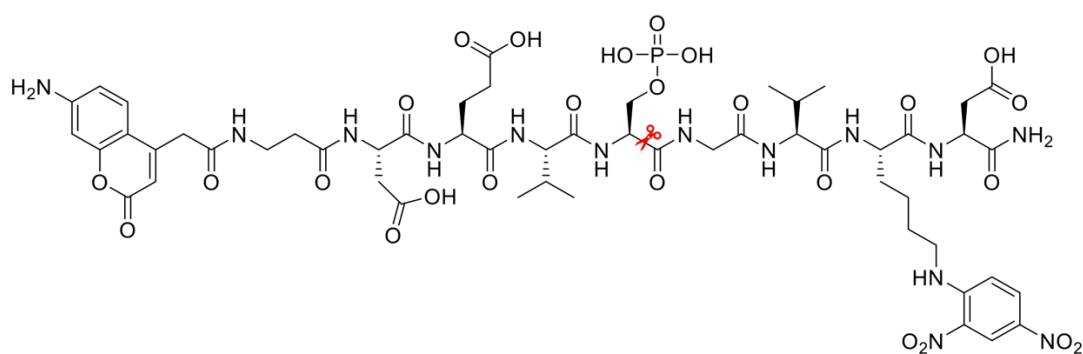
Najbardziej interesujące dane uzyskano dla substratu z fosforylowaną L-seryną w pozycji P1 (tab. 4). Substrat ten był hydrolizowany przez oba enzymy, jednak kaspaza-7 wykazywała 2,3-krotnie niższą wydajność katalityczną, o czym świadczą uzyskane średnie wartości k_{kat}/K_M ($99 \pm 1,25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i $223 \pm 13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ odpowiednio dla kaspazy-7 i -3). Wartość stałej Michaelisa była dla obu kaspaz najniższa dla substratu kontrolnego z kwasem asparaginowym w pozycji P1 i wynosiła $6,01 \pm 0,29 \mu\text{M}$ dla kaspazy-3 oraz $6,05 \pm 0,4 \mu\text{M}$ dla kaspazy-7. Co ciekawe, substrat z fosforylowaną seryną miał tylko 1,45-krotnie gorszą wartość K_M w przypadku kaspazy-3 ($8,76 \pm 0,09 \mu\text{M}$) niż substrat kontrolny z kwasem L-asparaginowym w P1 i zarazem 1,45-krotnie niższą wartość niż substrat z kwasem L-glutaminowym w P1, co wskazuje na podobne powinowactwo substratowe. Wyniki w przypadku kaspazy-7 są analogiczne – stała Michaelisa dla substratu z fosforylowaną L-seryną jest 2-krotnie gorsza w porównaniu z substratem kontrolnym z L-Asp w P1 i 1,29-krotnie lepsza niż dla substratu z kwasem L-glutaminowym.

Tab. 4. Parametry kinetyczne (k_{kat}/K_M) substratów typu IQF zawierających w P1 kwas L-asparaginowy oraz L-glutaminowy (kontrola) oraz fosforylowaną L-serynę wobec kaspazy-3 oraz kaspazy-7.

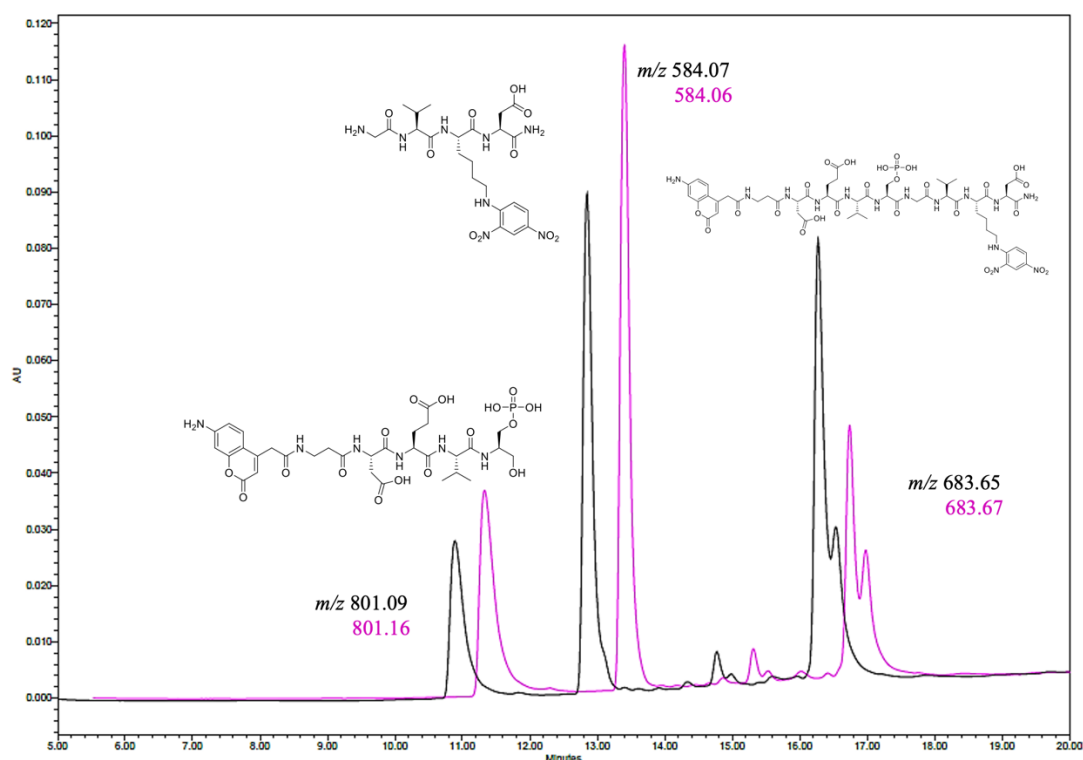
Symbol i sekwencja substratu	Kaspaza-3		Kaspaza-7	
	K_M [μM]	k_{kat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	K_M [μM]	k_{kat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
(P1)_Asp H ₂ N-ACC- β ADEV D GVK(Dnp)D-NH ₂	6,01 (\pm 0,29)	987 000 (\pm 74 200)	6,05 (\pm 0,40)	86 500 (\pm 4 060)
(P1)_Glu H ₂ N-ACC- β ADEVE G GVK(Dnp)D-NH ₂	12,8 (\pm 1,27)	23 400 (\pm 2 000)	15,7 (\pm 1,46)	13 400 (\pm 1 120)
(P1)_pSer H ₂ N-ACC- β ADEV p SGVK(Dnp)D-NH ₂	8,76 (\pm 0,09)	225 (\pm 13)	12,2 (\pm 0,28)	99 (\pm 6)

By eksperymentalnie potwierdzić przewidywane miejsce hydrolizy substratu (P1)_pSer w sekwencji ACC- β ADEV**p**SGVK(Dnp)D przez kaspazę-3 oraz -7 wykorzystano chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas. Po pięciogodzinnej inkubacji substratu z kaspazą-3 zaobserwowano na widmie masowym trzy piki o wartościach m/z wynoszących 801,09, 584,07 i 683,65. Pierwszy z nich odpowiada pojedynczo naładowanemu jonowi fragmentu peptydowego ACC- β ADEV**p**S, a drugi potwierdził obecność fragmentu GVK(Dnp)D. Trzeci sygnał pochodził od podwójnie naładowanego jonu niezhydrolizowanego substratu (ACC- β ADEV**p**SGVK(Dnp)D). Jego obecność w próbce po pięciogodzinnej inkubacji, połączona z wysokim stężeniem enzymu (1 μM) potwierdza niską specyficzność enzymu wobec tego substratu. Podobne efekty otrzymano przy analizie kaspazy-7. Jednoznacznie to potwierdza możliwość zajścia proteolizy substratów z fosfo-L-seryną w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca hydrolizy zarówno przez kaspazę-3 jak i przez kaspazę-7.

A)



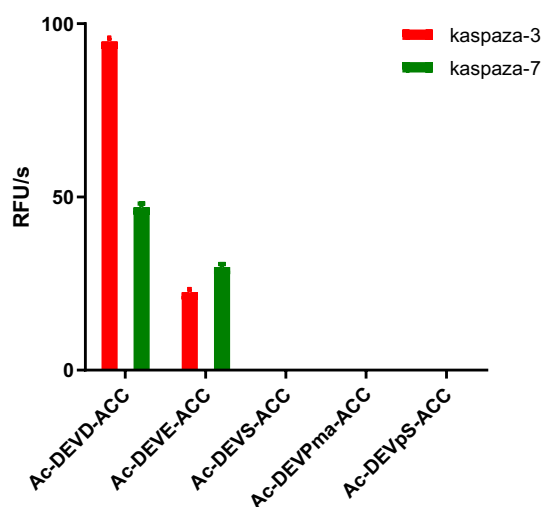
B)



Rys. 68. Struktura chemiczna substratu (P1)_pSer z zaznaczonym miejscem hydrolizy (A) i chromatogram przedstawiający produkty hydrolizy substratu (P1)_pSer przez kaspazę-3 (na czarno) i kaspazę-7 (na różowo) (B).

Wiedząc, że fosforylowana seryna jest rozpoznawana w substracie typu IQF o sekwencji ACC- β ADEVpSGVK(Dnp)D zarówno przez kaspazę-3 jak i -7 zdecydowano się sprawdzić jak rozpoznawane są krótsze sekwencje tetrapeptydowe. Zsyntezowano analogi dobrze znanego i przebadanego substratu rozpoznawanego przez kaspazę-3 oraz -7 [77, 115, 117], Ac-DEVD-ACC wstawiając w pozycji P1 reszty: Glu oraz Ser jako substraty kontrolne a także pSer oraz Pma. Substraty zostały zsyntezowane na podłożu stałym taką samą procedurą jak w przypadku biblioteki zdefiniowanej z arginina

w pozycji P1. Peptydy poddano analizie kinetycznej w celu pomiaru hydrolizy substratów przez kaspazę-3 oraz -7. Stężenie substratów wynosiło 10 μM , a stężenie kaspazy-3 i -7 odpowiednio 2 nM i 5 nM. Substraty zawierające Asp oraz Glu w P1 były efektywnie hydrolizowane przez obie proteazy, natomiast nie wykazano hydrolizy w przypadku pozostałych substratów (rys. 69). Pomiar sprawdzono także przy 200 nM enzymów, jednak nawet przy tak wysokich stężeniach enzymów, substraty nie były rozpoznawane.



Rys. 69. Wykres szybkości hydrolizy substratów przez kaspazy (stężenie enzymów wynosiło: 2 nM dla kaspazy-3, 8 nM dla kaspazy-7, użyte stężenie substratów to 10 μM). Na osi odciętych umieszczono sekwencje substratów fluorogenicznych. Oś rzędnych prezentuje szybkość reakcji hydrolizy przedstawionej jako przyrost jednostek fluorescencji w czasie (RFU/s). Wyniki przedstawiono jako średnią wartość wraz z odchyleniem standardowym.

Uzyskane wyniki są przeciwieństwem wyników otrzymanych w przypadku fosforylowanej seryny w pozycji P1 w substracie IQF (P1)_[pSer]VIME. Jest to najprawdopodobniej spowodowane krótszą sekwencją peptydową, a co za tym idzie słabszymi oddziaływaniami z miejscem aktywnym kaspaz. Brak reszty aminokwasowej w pozycji P1' może uniemożliwiać odpowiednie ułożenie sekwencji peptydowej w obrębie miejsca wiązania substratu w miejscu aktywnym.

3.2.3. Podsumowanie

W przypadku większości enzymów proteolitycznych spotykamy się z tzw. efektem kooperatywności kieszeni wiążących, który polega na oddziaływaniu ze sobą sąsiednich kieszeni oraz zmianie ich specyficzności substratowej w zależności od charakteru chemicznego związków w nich reszt aminokwasowych [252]. W celu poznania pełnego profilu specyficzności substratowej, coraz częściej w badaniach wykorzystuje się substraty typu IQF, które pomagają poznać preferencje enzymu zarówno po stronie nieprimowanej jak i primowanej oraz sprawdzić wzajemne oddziaływanie poszczególnych aminokwasów w wybranych pozycjach. Wykorzystując w badaniach zróżnicowaną budowę chemiczną aminokwasów z modyfikacjami potranslacyjnymi, jak również nienaturalne pochodne można zauważyć niewielkie różnice w specyficzności substratowej proteaz wykazujących podobne preferencje do określonych reszt aminokwasowych w konkretnych pozycjach.

Wyniki opublikowane dotychczas w literaturze sugerują, że reszta fosfo-L-seryny w pozycji P1 całkowicie hamuje hydrolizę substratu przez kaspazę-7, ale nie przez kaspazę-3, co może stanowić podstawę rozróżnienia obu tych enzymów od siebie [69]. Z drugiej strony inne doniesienia literaturowe wskazują, że fosforylowana L-seryna w pozycji P1 nie jest rozpoznawana przez kaspazę-3 i wstrzymuje reakcję hydrolizy [239].

Badania przedstawione w niniejszej dysertacji pokazały, że zarówno kaspaza-3 jak i kaspaza-7 są zdolne do hydrolizy peptydu zawierającego fosfo-L-serynę w pozycji P1 (ACC- β ADEVpS↓GVK(Dnp)D), ale nie wykazują aktywności enzymatycznej wobec krótkiej sekwencji tetrapeptydowej (Ac-DEVpS-ACC). Na tej podstawie można wnioskować, że na reakcję proteolizy wpływa długość sekwencji i rodzaj reszt aminokwasowych w otoczeniu miejsca hydrolizy (tab. 5). Wyznaczona wartość stałej Michaelisa sugeruje, że wiązanie peptydu (P1)_{pSer} przez kaspazę-3 jest tylko 1,4-krotnie silniejsze niż przez kaspazę-7, a stała wydajności katalitycznej 2,3-krotnie większa dla kaspazy-3. Potwierdza to nakładającą się specyficzność substratową obu tych enzymów, czyli rozpoznawanie tych samych reszt aminokwasowych w danych pozycjach, co znacząco utrudnia projektowanie związków selektywnych względem jednej proteazy. Co ciekawe, reakcji hydrolizy badanego substratu nie obserwuje się, gdy fosfo-L-serynę zastąpi się L-seryną lub Pma - jej analogiem zawierającym grupę metylenową zamiast atomu tlenu pochodzącego z łańcucha bocznego seryny. Dodatkowo

substraty zawierające w tej sekwencji w pozycji P1 reszty fosforylowanej treoniny i jej analogu – Pmab również nie były rozpoznawane przez żaden z badanych enzymów. Analizując sekwencje pochodzące z YAP1 widać, że fosforylowana treonina w pozycji P1', a więc w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca hydrolizy, znacząco osłabia proteolizę, ale nie wstrzymuje jej całkowicie. Jednak fosforylacja treoniny w pozycji P2 substratu YAP1 hamuje reakcję hydrolizy nawet przy znacznie wyższych stężeniach kaspazy-3 (500 nM).

Tab. 5. Porównanie parametrów kinetycznych wyznaczonych wobec kaspazy-3 i -7 dla substratów pochodzących z białka PARP zawierających fosforylowaną serynę w pozycji P1.

	GDEV p SGVDEV [239]	biotyna-WDEV p SGVDEK(Dnp) [69]	ACC- β ADEV p SGVK(Dnp)D
	Kaspaza-3		
K_M [μ M]	-	9,95	8,76 (\pm 0,09)
k_{kat}/K_M [$M^{-1}s^{-1}$]	brak hydrolizy	1700	225 (\pm 13)
	Kaspaza-7		
K_M [μ M]	-	-	12,2 (\pm 0,28)
k_{kat}/K_M [$M^{-1}s^{-1}$]	brak hydrolizy	brak hydrolizy	99 (\pm 6)

Kieszka S1 kaspaz jest wysoce zasadowa ze względu na łańcuchy boczne reszt Arg¹⁷⁹ i Arg³⁴¹, które ją budują. Podobne interakcje prowadzące do powstania mostka solnego mogą zachodzić z łańcuchem bocznym fosforylowanych reszt aminokwasowych zawierających ujemnie naładowaną grupę fosforanową. Jednak opisane efekty powinny być analogiczne zarówno dla reszt pSer oraz Pma i pThr oraz Pmab zlokalizowanych w pozycji P1. Wyniki uzyskane w tym badaniu nie potwierdzają tej hipotezy, dlatego można spekulować, że reszta fosfo-L-seryny nie jest bezpośrednio rozpoznawana przez kaspazę-3 i kaspazę-7, ale może zapewnić prawidłowe ułożenie łańcucha peptydowego substratu w kieszeniach enzymu.

4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Modyfikacje potranslacyjne to jeden z mechanizmów prowadzących do zwiększenia różnorodności funkcjonalnej proteomu. Wpływają one na funkcje białek poprzez zmianę ich właściwości fizycznych i chemicznych, a także aktywności czy stabilności. Pozwalają na wzbogacenie zestawu podstawowych 20 aminokwasów o nowe cechy poprzez np. przyłączenie nowej grupy funkcyjnej do łańcucha bocznego aminokwasów. W przedstawionej rozprawie doktorskiej opisano wpływ aminokwasów zawierających powszechnie modyfikacje potranslacyjne (fosforylację oraz metylację) na aktywność proteolityczną katepsyn (L, B, V, S oraz K) oraz kaspaz (-3 i -7).

W pierwszej części pracy doktorskiej skupiono się na określeniu preferencji substratowych katepsyn: L, B, S, V oraz K. Do tej pory w literaturze przedstawiono profile specyficzności substratowej katepsyny L, B oraz K, jednak nie opublikowano tak szczegółowych badań dla katepsyny V oraz S. Porównanie otrzymanych wyników pozwoliło na zaprojektowanie tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych selektywnych względem katepsyny S. Zaprojektowane substraty zawierały w swojej sekwencji różne aminokwasy – naturalne, nienaturalne oraz takie, które mogą ulegać modyfikacjom potranslacyjnym lub je zawierają. Na podstawie analizy szybkości hydrolizy zaprojektowanych substratów przez wszystkie badane katepsyny, wybrano substrat, który wskazywał największą selektywność wobec katepsyny S. W sekwencji peptydowej zawierał on dwa aminokwasy z modyfikacjami potranslacyjnymi – cytrulinę oraz metylowany kwas glutaminowy (Ac-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC). Wykorzystując sekwencję aminokwasową z najlepszego substratu zsyntezowano marker chemiczny (Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK), dla którego wyznaczono parametry kinetyczne. Wyznaczona drugorzędowa stała szybkości reakcji inhibicji k_{obs}/I wykazała, że marker chemiczny hamuje aktywność katepsyny S 1700 razy silniej od pozostałych enzymów. Uzyskane wyniki pokazały, że wykorzystanie reszt aminokwasowych z modyfikacjami potranslacyjnymi jest obiecującym podejściem pozwalającym na otrzymanie selektywnej sekwencji peptydowej wobec wybranego enzymu.

W drugiej części pracy doktorskiej potwierdzono, że zastąpienie kwasu L-asparaginowego fosforylowaną pochodną L-seryny w pozycji P1 substratu typu IQF, zaprojektowanego na podstawie fragmentu sekwencji PARP, nie hamuje jego hydrolizy

przez kaspazę-3. Ponadto w pracy wykazano, że kaspaza-7 również jest w stanie przeprowadzić reakcję hydrolizy tego substratu po karboksylowej stronie fosfo-L-seryny w P1, co potwierdza nakładającą się specyficzność substratową kaspazy-3 oraz kaspazy-7 opisaną w literaturze. Jest to sprzeczne z wcześniej opublikowanymi wynikami (tab. 5), w których wykazano, że kaspaza-7 nie rozpoznaje takich substratów. Wprowadzenie fosforylowanej reszty treoniny oraz jej pochodnej (Pmab) w pozycji P1 tego substratu prowadzi do zahamowania reakcji hydrolizy przez kaspazy. Warto zauważyć, że analiza kinetyczna substratu zawierającego fragment sekwencji białka YAP1, w którym fosforylowana treonina znajduje się w pozycji P1', a więc również w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca hydrolizy, znacząco osłabia proteolizę, jednak nie hamuje jej całkowicie. Wprowadzenie jednak takiej modyfikacji w pozycji P2 całkowicie hamuje proteolizę. W przypadku fosforylowanej seryny w pozycji P2' sekwencji pochodzącej z fragmentu VIME nadal zachodzi reakcja hydrolizy, lecz przebiega znacznie wolniej. Krótkie tetrapeptydowe substraty z pSer w pozycji P1 nie są rozpoznawane przez kaspazę-3 i kaspazę-7, co wskazuje na konieczność wykorzystania dłuższych łańcuchów peptydowych zapewniających zwiększone interakcje z aminokwasami w kieszeniach wiążących w miejscu aktywnym kaspaz.

Przedstawione wyniki sugerują, że szczegółowe interakcje zachodzące pomiędzy kieszeniami wiążącymi w centrum aktywnym kaspazy-3 oraz kaspazy-7 a substratami zawierającymi fosforylowane reszty aminokwasowe oraz wyjaśnienie dokładnego wpływu fosforylowanych reszt aminokwasowych w pozycji P1 substratów na regulację aktywności kaspaz pozostaje trudne do przewidzenia. Nie można jednoznacznie określić, że fosforylacja reszt aminokwasowych w sekwencji peptydowej substratów kaspaz jest modyfikacją powodującą całkowite zahamowanie proteolizy. Do tej pory w literaturze pojawiały się sprzeczne doniesienia dotyczące aktywności kaspazy-3 i -7 względem substratów z fosforylowanymi pochodnymi resztami aminokwasowymi. W ramach niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano, że obie kaspazy mają zdolność hydrolizy peptydowego substratu, którego sekwencja pochodzi z białka PARP zawierającego fosforylowaną serynę w pozycji P1. Oprócz badań kinetycznych w pracy przedstawiono także wyniki z analizy miejsca hydrolizy substratów, które potwierdziły, że obie kaspazy hydrolizują substrat po karboksylowej stronie fosfo-L-seryny, co wcześniej nie zostało opublikowane.

Analiza preferencji substratowych enzymów proteolitycznych za pomocą bibliotek substratów zawierających reszty aminokwasowe z modyfikacjami

potranslacyjnymi może poszerzyć naszą wiedzę na temat biologicznych funkcji enzymów. Może stanowić dodatkowe źródło informacji o mechanizmach regulacyjnych, jakie zachodzą w komórkach. Zdolność do hydrolizy substratów z modyfikacjami potranslacyjnymi może pozwolić na określenie nowych funkcji proteaz, a z drugiej strony zahamowanie reakcji hydrolizy może świadczyć o zależnych od fosforylacji mechanizmach stabilizacji danych substratów w komórkach.

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Badania opisane w niniejszej dysertacji zostały wykonane w laboratorium prof. dr. hab. Marcina Dąga, w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Badania były finansowane w ramach grantu TEAM (2017-4/32) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Opisane wyniki zawarte w dysertacji dotyczące analiz substratów z modyfikacjami potranslacyjnymi dla kaspaz powstały we współpracy z dr Izabelą Małuch, natomiast synteza substratów i fluorescencyjnego markera chemicznego dedykowanego katepsynie S powstała we współpracy z mgr Oliwią Malon.

Wszystkie odczynniki wykorzystane do syntezy substratów oraz inhibitora zostały zakupione u dostawców komercyjnych i użyte bez dalszego oczyszczania, m.in. żywica amidowa typu Rink Amide AM (rozmiar ziaren 100-200 mesh, stopień podstawienia 0,74 mmol/g), żywica amidowa typu Rink Amide AM (rozmiar ziaren 100-200 mesh, stopień podstawienia 0,64 mmol/g) żywica 2-chlorotrytylowa (rozmiar ziaren 100-200 mesh, stopień podstawienia 1,6 mmol/g), piperydyna (PIP, czystość do syntezy peptydów), kwas trifluoroctowy (TFA, czystość do syntezy peptydów), *N,N*-diizopropylouetyloamina (DIPEA, czystość do syntezy peptydów), zostały zakupione z firmy Iris Biotech GmbH (Niemcy); *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy heksafluorofosforan (HATU, czystość do syntezy peptydów) i *O*-benzotriazol-(*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy) heksafluorofosforan (HBTU, czystość do syntezy peptydów) zakupiono z firmy P3 BioSystems (USA); *N*-hydroksybenzotriazol (HOBt, czystość > 98%) zakupiono z firmy APEX BIO (USA); 2,4,6-trimetylopirydyna (2,4,6-kolidyna, czystość do syntezy peptydów), triizopropylsilan (TIPS, czystość 99%), *N,N'*-diizopropylkarbodiimid (DICl, czystość do syntezy peptydów), dimetylosulfotlenek (DMSO, czystość \geq 99,7%), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Niemcy), dichlorometan (DCM, czystość do analizy), *N,N*-dimetyloformamid (DMF, czystość do syntezy peptydów), metanol (MeOH, czysty do analizy), acetonitryl (ACN, czystość do HPLC), eter dietylowy (Et₂O, czystość do analizy), kwas octowy (AcOH, czystość > 98%), pentatlenek difosforu (P₂O₅, czystość 98%) zakupione w firmie Avantor (Polska). Aminokwasy blokowane grupą Fmoc (czystość > 98%) zostały zakupione od różnych dostawców: Iris Biotech GmbH (Niemcy), Bachem (USA), Combi-Blocks (USA), Creosalus (USA), P3 BioSystems (USA) oraz Bachem (USA).

Znacznik fluorescencyjny Cy5-NHS został zakupiony z firmy Lumiprobe GmbH (Niemcy).

Zsyntezowane indywidualne substraty oraz marker chemiczny zostały oczyszczone za pomocą systemu HPLC (pompa Water M600, detektor UV-Vis Waters 2489) wyposażonego w kolumnę C8 (porowatość 300 Å, średni rozmiar cząstki złoża 10 µm, wymiary kolumny: 250 x 21,2 mm) w układzie rozpuszczalników: faza A – 0,1% wodny roztwór TFA, faza B – 0,1% roztwór TFA w ACN, gradient od 95% A do 5% A w przypadku substratów tetrapeptydowych oraz od 80% A do 20% A w przypadku substratów typu IQF w czasie 30 lub 40 min.

Analizy LC-MS zsyntezowanych związków wykonano z użyciem spektrometru masowego Acquity QDa (system Waters Alliance e2695, detektor UV-Vis 2489) wyposażonego w kolumnę analityczną Phenomenex Jupiter C4 (porowatość 300 Å, wymiary 250 x 4,6 mm, średni rozmiar cząstki złoża 10 µm). Rozdział prowadzony był w układzie faz odwróconych, A – 0,1% wodny roztwór HCOOH, B – 0,1% roztwór HCOOH w ACN. Gradient liniowy 5%-95% B w A przez 20 minut, przepływ 1 ml/min.

Wysokorozdzielcze widma masowe otrzymanych związków zostały przygotowane w Laboratorium Wysokorozdzielczej Spektrometrii Masowej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej przez dr inż. Gabrielę Maciejewską. Analizy wykonano wykorzystując system WATERS LCT Premier XE wyposażony w źródło jonizacji ESI (ang. *electrospray ionization*) oraz analizator czasu przelotu TOF (ang. *time of flight*).

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H zostały wykonane na spektrometrze Bruker Avance DRX 300 przez mgr. inż. Pawła Dąbrowskiego w Laboratorium Magnetycznym Rezonansu Jądrowego na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

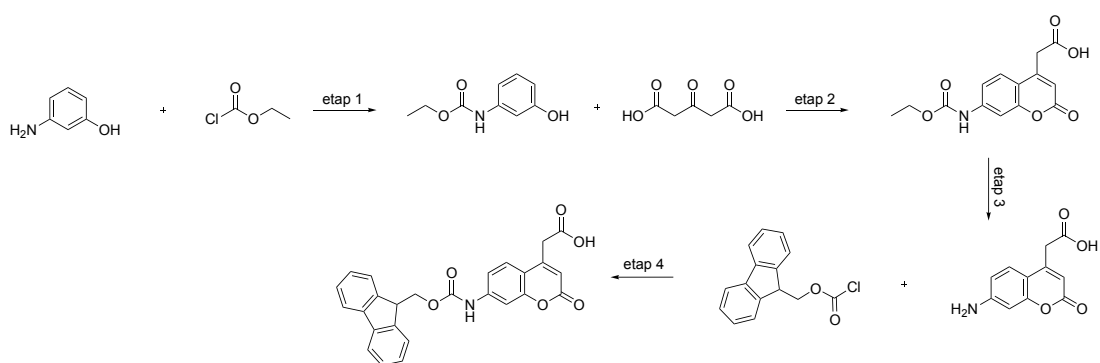
Ludzkie kaspazy-3, -6, -7 oraz -8 zostały wyekspresjonowane, oczyszczone oraz zmiareczkowane zgodnie z opisaną procedurą przez dr. Scotta Snipasa (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute w La Jolla, CA, Stany Zjednoczone) [262]. Ludzkie katepsyny B, L, V, S oraz K zostały wyekspresjonowane, oczyszczone oraz zmiareczkowane w grupie prof. Borisa Turka (Instytut Jožefa Stefana, Lublana, Słowenia) zgodnie z opisaną procedurą [263, 264].

Badania kinetyki reakcji enzymatycznych przeprowadzono na spektrofluorymtrze typu Molecular Devices Spectramax Gemini XPS wykorzystując 96-dołkowe płytki typu Corning® (białe, płaskie dno). Składniki buforów do badań

enzymatycznych zostały przygotowane z odczynników o wysokiej czystości. Woda wchodząca w ich skład była dejonizowana przy użyciu dejonizatora firmy Hydrolab. Do przygotowania buforów wykorzystano: kwas piperazyno-*N,N'*-bis(2-etylosulfonowy) (PIPES), chlorek sodu (NaCl, czystość $\geq 99,5\%$), kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, czystość $\geq 99\%$), DL-ditiotreitol (DTT) z Sigma-Aldrich, sacharozę z VWR International (Polska), cytrynian sodu z firmy Avantor, octan sodu z Eurochem BGD.

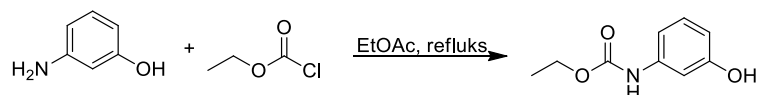
5.1. Synteza znacznika fluorescencyjnego – Fmoc-ACC-OH

Znacznik bifunkcyjny 7-amino-4-karbamoilometylokumarynę z grupą ochronną 9-fluorenylometylokarbonylową (Fmoc-ACC-OH) zsyntezowano według zmodyfikowanego protokołu opisanego w literaturze przez Maly'ego i in. [164]. Ogólny schemat czteroetapowej syntezy przedstawiono na rys. 70. Realizując badania do niniejszej dysertacji, synteza tego znacznika została powtórzona kilkakrotnie.



Rys. 70. Schemat IV-etapowej reakcji syntezy znacznika fluorescencyjnego Fmoc-ACC-OH (na podstawie [164]).

Etap I: synteza 3-*N*-(karboetoksy)aminofenolu



Rys. 71. Schemat reakcji syntezy 3-*N*-(karboetoksy)aminofenolu.

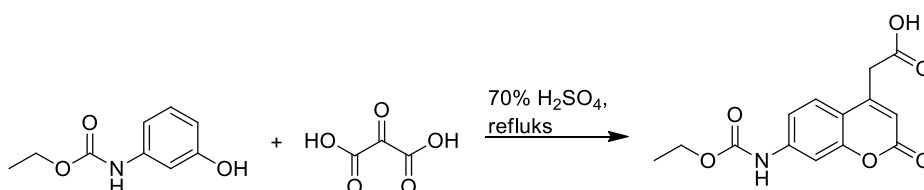
Do 2 litrowej, trójszyjnej kolby okrągłodennej zaopatrzonej w kamyczki wrzenne dodano 3-aminofenol (152 g, 1,39 mola) i rozpuszczono go w octanie etylu (750 ml). Kolbę podłączono do chłodnicy zwrotnej, a całą mieszaninę podgrzewano w koszu grzejnym przez 30 min w temperaturze wrzenia octanu etylu (do całkowitego

rozpuszczenia 3-aminofenolu). Następnie przez 30 min wkraplano chloromrówczan etylu (66,4 ml, 0,695 mola). W trakcie wkraplania w kolbie wytrącał się produkt uboczny (chlorowodorek 3-aminofenolu) w postaci białego osadu, a właściwy produkt rozpuścił się w octanie etylu. Po wkropleniu chloromrówczanu etylu mieszaninę ogrzewano jeszcze przez 30 min, po czym grzanie wyłączono i doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej. Następnie na drodze filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem rozdzielono roztwór octanu od białego osadu. Osad przemyto trzykrotnie octanem etylu (3 x 300 ml), przesącze połączono i zagęszczono je na wyparce. W chwili, gdy roztwór w kolbie uzyskał gęstą postać przypominającą syrop i pojawił się pierwszy załazek krystalizacji, przelano go do krystalizatora. W celu przyspieszenia krystalizacji, całość mieszano szklaną bagietką. Otrzymany produkt reakcji w postaci białych kryształów odsączono na lejku Schotta i suszono na powietrzu otrzymując 118 g 3-*N*-(karboetoksy)aminofenolu (wydajność 94%). Otrzymany produkt wykorzystywano bezpośrednio w etapie drugim (bez oczyszczania).

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C): δ 1,19 (t, 3H, $J = 7,1$), 4,06 (q, 2H, $J = 7,1$), 6,30- 6,38 (m, 1H), 6,75-6,82 (m, 1H), 6,95-6,99 (m, 2H), 9,29 (br s, 1H), 9,44 (s, 1H).

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (obliczone) = 182,0812, $[\text{M}+\text{H}]^+$ (zmierzone) = 182,0825

Etap II: synteza kwasu 7-*N*-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowego



Rys. 72. Schemat reakcji syntezy kwasu 7-*N*-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowego.

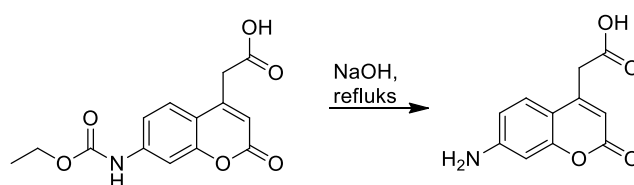
Do trzylitrowej kolby trójszyjnej, okrągłodennej zaopatrzonej w dipol magnetyczny dodano 70% kwas siarkowy (VI) w wodzie (1,5 l) i schłodzono go w łaźni lodowej przez godzinę. Następnie w ciągu kolejnej godziny dodawano małymi porcjami produkt I etapu - 3-*N*-(karboetoksy)aminofenol (52 g, 0,287 mola). Mieszanina była ciągle chłodzona i intensywnie mieszana. Kolejno, w ciągu godziny, dodawano porcjami kwas 1,3-acetonodikarboksylowy (46 g, 0,315 mola). Łaźnie lodową usunięto i mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej. Reakcja była prowadzona ok. 10 godzin w ciemności i z wyłączonym mieszaniem. Po tym czasie

zawartość kolby została przelana do dwóch dwulitrowych zlewek wypełnionych po brzegi lodem. Całość intensywnie mieszano ceramiczną łopatką przez 30 minut. Po całkowitym rozpuszczeniu lodu, powstały biały osad wylano się na lejek Schotta i sączono pod zmniejszonym ciśnieniem przemywając całość eterem dietylowym (8 x 1 l) aż do pozbycia się kwasu siarkowego (VI) o żółtym zabarwieniu. Następnie osad przeniesiono do kolby Erlenmeyera i rozpuszczono we wrzącym acetonitrylu (200 ml) mieszając szklaną bagietką przez ok. 30 minut. Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej. Acetonitryl odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem na lejku ze spiekem, przeniesiono do krystalizatora i zostawiono do całkowitego wysuszenia na powietrzu. Otrzymano kwas 7-*N*-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowy w postaci białego proszku (62,13 g, wydajność 74%).

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C): δ 1,21 (t, 3H, $J = 7,1$), 3,81 (s, 2H), 4,11 (q, 2H, $J = 7,1$), 6,28 (s, 1H), 7,31-7,35 (m, 1H), 7,52-7,58 (m, 2H), 10,12 (s, 1H).

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (obliczone) = 292,0821, $[\text{M}+\text{H}]^+$ (zmierzone) = 292,0821

Etap III: synteza kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego (ACC)



Rys. 73. Schemat reakcji syntezy kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego.

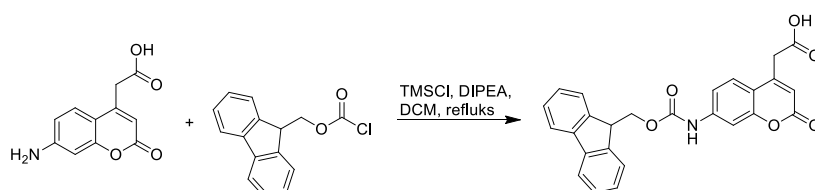
W trzylitrowej kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w kamyczki wrzenne rozpuszczono wodorotlenek sodu (157,93 g, 3,95 mol) w wodzie destylowanej (1,027 l). Po uzyskaniu klarownego roztworu dodawano porcjami kwas 7-*N*-(karboetoksy)aminokumaryno-4-octowy (115,17 g, 0,395 mol). Reakcję hydrolizy prowadzono pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Następnie mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i przelano do pięciolitrowej zlewki z mieszadłem magnetycznym. Mieszaninę w zlewce ochłodzono w łaźni lodowej przez ok. 30 minut. Kolejno, niewielkimi porcjami, dodawano stężony kwas siarkowy (VI). Mieszaninę zakwaszono aż do momentu uzyskania pH równego 2,3. Z roztworu wytrącał się zarówno produkt właściwy, czyli kwas 7-aminokumaryno-4-octowy w postaci żółtego osadu oraz produkt uboczny - siarczan (VI) sodu jako biały osad. Osady

oddzielono od roztworu poprzez filtrację pod zmniejszonym ciśnieniem i wysuszono w eksykatorze nad P₂O₅. W celu oddzielenia produktu ubocznego (Na₂SO₄) do litrowej kolby gruszkowej dodano ok. 20 g mieszaniny produktów oraz ok. 250 ml acetonu o czystości cz.d.a. i mieszano przez 20 minut w 60°C. Produkt właściwy rozpuszczał się w acetonie, natomiast Na₂SO₄ pozostawał w formie osadu. Mieszaninę sączono na gorąco na lejku Schotta. Biały osad produktu ubocznego pozostał na spieku, natomiast żółty przesącz odparowywano do sucha na wyparce próżniowej. Produkt zostawiono na powietrzu do całkowitego wysuszenia. Otrzymano 55,32 g produktu (wydajność 64%).

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C): δ3,73 (s, 2H), 5,97 (s, 1H), 6,16 (br s, 2H), 6,41 (d, 1H, *J* = 7,1), 6,54 (dd, 1H, *J* = 8,36, 2,1), 7,33 (d, 1H, *J* = 0,7), 12,65 (s, 1H).

HRMS: [M+H]⁺ (obliczone) = 220,0610, [M+H]⁺ (zmierzone) = 220,0624

Etap IV: synteza kwasu 7-*N*-(fluorenylmetoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego (Fmoc-ACC-OH)



Rys. 74. Schemat reakcji syntezy kwasu 7-*N*-(fluorenylmetoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego.

Do litrowej kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (20 g, 0,091 mol), dichlorometan (150 ml) oraz DIPEA (35 ml, 0,200 mol). Powstałą mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej przez 10 minut, a następnie dodano bezwodny TMSCl (25,5 ml, 0,200 mol). Łażnię lodową zastąpiono łaźnią wodną, a mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia dichlorometanu przez 3 godziny. Po tym czasie mieszaninę ponownie ochłodzono w łaźni lodowej do temperatury 5°C i porcjami dodawano Fmoc-Cl (26 g, 0,100 mol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 11 godzin na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie usunięto mieszadło magnetyczne z kolby, dodano metanol (500 ml) i wytrząsano przez 30 min. Powstały biały osad przefiltrowano na lejku Schotta, przemyto trzykrotnie metanolem

(3 x 200 ml), trzykrotnie heksanem (3 x 200 ml) i trzykrotnie eterem dietylowym (3 x 200 ml). Wysuszony produkt przeniesiono do krystalizatora. Otrzymano 35 g (wydajność 87%) kwasu 7-*N*-(fluorenylometoksykarbonylo)amino kumaryno-4-octowego (Fmoc-ACC-OH). Czystość otrzymanego związku potwierdzono za pomocą analitycznego HPLC (powyżej 90%).

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ 3,86 (s, 2H), 4,33 (t, 1H, $J = 6,2$), 4,55 (d, 2H, $J = 6,2$), 6,34 (s, 1H), 7,33-7,44 (m, 5H), 7,56 (s, 1H), 7,61 (d, 1H, $J = 8,6$), 7,76 (d, 2H, $J = 7,3$), 7,91 (d, 2H, $J = 7,4$), 10,23 (s, 1H), 12,84 (s, 1H).

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (obliczone) = 442,1291, $[\text{M}+\text{H}]^+$ (zmierzone) = 442,1292

5.2. Synteza i analiza substratów fluorogenicznych

5.2.1. Synteza zdefiniowanej biblioteki Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC dla katepsyn

Biblioteka kombinatoryczna HyCoSuL z L-Arg w pozycji P1 wykorzystana do badań zawartych w niniejszej pracy została zsyntezowana wcześniej przez dr inż. Wioletę Rut w laboratorium prof. Marcina Dąga w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania zgodnie z protokołem [265].

Zdefiniowana biblioteka o sekwencji Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC została zsyntezowana według opracowanego protokołu [244]. Syntezę ze zdefiniowaną resztą aminokwasową w pozycji P1 rozpoczęto od przygotowania żywicy do sprzęgnięcia ze znacznikiem fluorogenicznym. W tym celu odważono 8 gramów żywicy amidowej (Fmoc-Rink Amide AM Resin, stopień podstawienia 0,74 mmol/g) do szklanego reaktora do syntezy peptydów i spulchniono w dichlorometanie (DCM). Po 30 minutach odsączono DCM pod zmniejszonym ciśnieniem, a żywicę przemyto trzykrotnie *N,N*-dimetyloformamidem (DMF). W celu usunięcia grupy ochronnej fluorenylo-9-metoksykarbonylowej (Fmoc), dodano 20% roztwór piperydyny w DMF (20% PIP/DMF) i prowadzono reakcję z mieszaniem przez 5 minut. Po tym czasie piperydynę odsączono, żywicę przemyto DMF i dodano świeżą porcję 20% piperydyny w DMF. Reaktor umieszczono na kołyszce na 20 minut, a następnie dokładnie przemyto żywicę 6-krotnie DMF. Procedurę usunięcia grupy ochronnej Fmoc każdorazowo potwierdzano wykonaniem testu ninhydrynowego. Do probówki pobierano kilka ziaren żywicy i zalewano je roztworem ninhydryny w 96% etanolu skażonym eterem dietylowym. Probówkę następnie inkubowano przez 5 min w termobloku w 95°C.

Granatowa barwa ziarenek po tym czasie potwierdzała wolne grupy aminowe, dając pozytywny wynik testu. Następnie do probówki 50 ml typu Falcon odważono Fmoc-ACC-OH (6,53 g, 14,8 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz hydroksybenzotriazol (HOBT, 2,27 g, 14,8 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Całość rozpuszczono w DMF, dodano *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DICI, 2,3 ml, 14,8 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i aktywowano mieszając przez 2 minuty. Mieszaninę dodano do żywicy w reaktorze, który dodatkowo owinięto folią. Reakcję sprzęgania prowadzono 24 godziny całość delikatnie mieszając na kołyszce w temperaturze pokojowej. Po tym czasie odsączono roztwór, żywicę przemyto trzykrotnie DMF i przeprowadzono ponowne sprzęganie Fmoc-ACC-OH (3,92 g, 8,88 mmol, 1,5 równoważnika molowego), HOBT (1,36 g, 8,88 mmol, 1,5 równoważnika molowego), DICI (1,16 ml, 8,88 mmol, 1,5 równoważnika molowego). Po kolejnych 24 godzinach żywicę przemyto trzykrotnie DMF, przeprowadzono test ninhydrynowy, który dał wynik negatywny wskazując na brak wolnych grup aminowych. W celu zablokowania ewentualnie nieprzereagowanych grup aminowych, przeprowadzona została acetylacja zgodnie z protokołem opisanym w literaturze [164]. Do 50 ml probówki typu Falcon odważono 3-nitro-1,2,4-triazol (6,75 g, 59,2 mmol, 10 równoważników molowych), który rozpuszczono w DMF i dodano do niego kwas octowy (3,37 ml, 59,2 mmol, 10 równoważników molowych) oraz DICI (9,24 ml, 59,2 mmol, 10 równoważników molowych). Zawartość probówki typu Falcon aktywowano przez 2 minuty i dodano do żywicy bez jej wcześniejszego odblokowania. Reakcję pozostawiono na 24 godziny. Po tym czasie dodano DIPEA (2,05 ml, 11,8 mmol, 2 równoważniki molowe) na 3 godziny mieszania. Całość przemyto trzykrotnie DMF i odblokowano grupę ochronną Fmoc przy wykorzystaniu 20% piperydyny w DMF (cykl 5 minut, 20 minut). Na tym etapie nie wykonywano testu ninhydrynowego, gdyż wolna grupa aminowa przyłączona do pierścienia aromatycznego w ACC nie daje zmiany zabarwienia w kontakcie z roztworem ninhydryny. Otrzymano H₂N-ACC-żywica. Odblokowaną żywicę przemyto sześciokrotnie DMF, trzykrotnie DCM oraz trzykrotnie metanolem (MeOH). Następnie wysuszono ją w eksykatorze nad P₂O₅ (24 godziny). Cały proces powtórzono i tak przygotowane obie porcje żywicy połączono i wykorzystano do syntezy zdefiniowanej biblioteki Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC.

Wysuszoną żywicę z przyłączonym i odblokowanym ACC podzielono następnie na 143 porcje (każda po 100 mg, 0,074 mmol) i umieszczono ją w trzech 48-dołkowych półautomatycznych reaktorach do syntezy równoległej (ang. *48-well semiautomatic*

FlexChem synthesizer). Żywicę aktywowano poprzez spulchnienie jej w dichlorometanie przez 30 min. Następnie odsączono dichlorometan i przemyto trzykrotnie DMF. Do 2 ml probówek typu Eppendorf odważono po 2,5 równoważnika molowego (0,185 mmol) jednego ze 143 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów zgodnie z tab. 6. W probówce typu Falcon przygotowano roztwór HATU (w sumie na 143 dołków: 10,06 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego) w DMF. Do każdej probówki typu Eppendorf z naważonym aminokwasem dodano po 0,9 ml tego roztworu i 2,4,6-trimetylopirydyny (2,4,6-kolidyna, 24,5 μ L, 0,185 mmol, 2,5 równoważnika molowego), po czym ich zawartość przelano do dołków zawierających H₂N-ACC-żywica. Reakcję prowadzono przez 24 godziny delikatnie mieszając. Po tym czasie mieszaninę odsączono, żywicę przemyto trzykrotnie DMF i powtórzono sprzężanie stosując dwukrotny nadmiar każdego odczynnika w analogiczny sposób: 143 Fmoc-aminokwasów (0,148 mmol, 2 równoważniki molowe), HATU (8,05 g, 21,16 mmol, 2 równoważniki molowe), 2,4,6-kolidyna (19,5 μ l, 0,148 mmol, 2 równoważniki molowe). Reakcję prowadzono przez kolejną dobę w tych samych warunkach. Następnie mieszaninę odsączono i przemyto trzykrotnie DMF. Grupę ochronną Fmoc, znajdującą się na przyłączonej pierwszej reszcie aminokwasowej, usunięto stosując 20% roztwór piperydyny w DMF (cykl 5 minut, 20 minut), po czym 6-krotnie przemyto żywicę DMF. Pozytywny wynik testu ninhydrynowego świadczył o otrzymaniu H₂N-P1-ACC-żywica. W pozycji P2 biblioteki we wszystkich 143 dołkach przyłączono leucynę (Fmoc-L-Leu-OH). W tym celu w probówkach typu Falcon odważono Fmoc-L-Leu-OH (w sumie na 143 dołki: 9,35 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (w sumie na 143 dołki: 4,05 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość rozpuszczono w DMF i dodano DICI (w sumie na 143 dołki: 4,12 ml, 25,53 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Mieszaninę dodano do każdego dołka w reaktorze i reakcję prowadzono przez 24 godziny. Negatywny wynik testu ninhydrynowego świadczył o otrzymaniu Fmoc-L-Leu-P1-ACC-żywica. Żywicę przemyto trzykrotnie DMF, usunięto grupę ochronną Fmoc w 20% roztworze piperydyny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut) po czym żywicę w dołkach przemyto sześciokrotnie DMF. Następnie przygotowano mieszaninę: Fmoc-Arg(Pbf)-OH (17,16 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego), HOBt (4,05 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i DICI (4,12 ml, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego) w DMF, którą dodano do każdego dołka z żywicą i reakcję prowadzono kolejne 24 godziny. Przemyto żywicę trzykrotnie DMF, wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny), usunięto

grupę ochronną Fmoc stosując 20% roztwór piperydyny w DMF (cykl: 5 min, 20 min) i przemyto sześciokrotnie DMF. W ostatniej pozycji (P4) znajdowała się alanina, dlatego do probówki typu Falcon naważono Fmoc-Ala-OH (8,24 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (4,05 g, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego), które rozpuszczono w DMF. Następnie dodano DICl (4,12 ml, 26,45 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i całość przeniesiono do dołków z żywicą. Reakcję sprzężania prowadzono 24 godziny, delikatnie mieszając, po czym zawartość odsączono, całość przemyto trzykrotnie DMF i ściągnięto grupę ochronną Fmoc przy użyciu 20% piperydyny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut). Ostatnim etapem syntezy było przyłączenie do N-końcowej grupy aminowej grupy acetylowej. Przygotowano mieszaninę DMF z HBTU (20,05 g, 52,91 mmol, 5 równoważników molowych), kwasem octowym (3,01 ml, 52,91 mmol, 5 równoważników molowych) i DIPEA (9,15 ml, 52,91 mmol, 5 równoważników molowych), którą dodano do dołków z żywicą i mieszano przez godzinę na kołysce laboratoryjnej. Po tym czasie wykonano test ninhydrynowy, który potwierdził brak wolnych grup aminowych (wynik negatywny). Żywicę przemyto trzykrotnie DMF, trzykrotnie DCM, trzykrotnie MeOH i wysuszono w eksykatorku nad P₂O₅ (24 godziny). Do uwolnienia biblioteki z żywicy przygotowano mieszaninę składającą się z: 95% TFA, 2,5% TIPS, 2,5% H₂O (v/v/v), którą schłodzono do temperatury ok. 4°C. Do każdego dołka dodano 1,5 ml takiej mieszaniny, a reakcję prowadzono przez 2,5 godziny mieszając energicznie co jakiś czas reaktor. Po tym czasie przesącz znad żywicy przeniesiono do 15 ml probówek wirówkowych typu Falcon, strącono je w zimnym eterze dietylowym (widoczny biały produkt) i inkubowano w -20°C przez 30 minut. Następnie zawartość Falconów została zwirowana (4400 rpm, 4°C, 3 min) i zdekantowano roztwór nad osadem. W celu przemycia osadu, ponownie dodano do niego zimny Et₂O i inkubowano w -20°C przez 20 minut. Po tym czasie probówki zwirowano w tych samych warunkach, zdekantowano roztwór nad osadu i probówki z substratami zostawiono do wysuszenia na powietrzu przez 24 godziny. Otrzymano substraty o sekwencji ogólnej: Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC, gdzie P1 to jeden ze 143 aminokwasów naturalnych lub nienaturalnych (tab. 6). Następnie każdy substrat został oczyszczony przy pomocy HPLC. Czystość związków (powyżej 90%) oraz masę cząsteczkową każdego z otrzymanych substratów potwierdzono za pomocą systemu LC-MS. Bibliotekę zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO do stężenia końcowego 20 mM i przechowywano w -80°C. W tabeli 6 przedstawiono sekwencję substratów oraz wyniki analizy LC-MS.

Tab. 6. Wyniki analizy LC-MS tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych tworzących zdefiniowaną bibliotekę P1, $[M+H]^+$ zmierzono za pomocą detektora masowego Waters Acquity QDa. Czystość wszystkich związków była powyżej 90%.

Substrat:	Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$
		obliczone	zmierzone
P1/1	L-Ala	672,34	672,38
P1/2	L-Arg	757,40	757,48
P1/3	L-Asn	715,34	715,39
P1/4	L-Asp	716,33	716,37
P1/5	L-Glu	730,35	730,41
P1/6	L-Gln	729,36	729,45
P1/7	Gly	658,32	658,37
P1/8	L-His	738,36	738,44
P1/9	L-Ile	714,39	714,46
P1/10	L-Leu	714,39	714,44
P1/11	L-Lys	729,40	729,46
P1/12	L-Nle	714,39	714,46
P1/13	L-Phe	748,37	748,43
P1/14	L-Pro	698,36	698,39
P1/15	L-Ser	688,34	688,38
P1/16	L-Thr	702,35	702,42
P1/17	L-Trp	787,38	787,43
P1/18	L-Tyr	764,37	764,45
P1/19	L-Val	700,37	700,37
P1/20	β -Ala	672,34	672,35
P1/21	L-Hyp	714,35	714,41
P1/22	L-Hyp(Bzl)	804,40	804,46
P1/23	L-Dap	687,35	687,39
P1/24	L-Dab	701,37	701,41
P1/25	L-Dab(Z)	835,40	835,44
P1/26	L-Cit	758,39	758,44
P1/27	L-hCit	772,41	772,46
P1/28	L-Orn	715,38	715,41
P1/29	L-Lys(TFA)	825,38	825,42
P1/30	L-Lys(Ac)	771,41	771,47
P1/31	L-Lys(2-Cl-Z)	897,40	897,47
P1/32	L-hArg	771,42	771,51
P1/33	L-His(Bzl)	828,41	828,47
P1/34	L-His(3-Bom)	858,42	858,44
P1/35	L-Phe(4-NH ₂)	763,38	763,46
P1/36	L-Phe(guan)	805,41	805,47
P1/37	L-Trp(Me)	801,40	801,44

P1/38	L-Dht	789,40	789,40
P1/39	L-Asp(O-Me)	730,35	730,40
P1/40	L-Asp(O-CHx)	798,41	798,47
P1/41	L-Asp(O-Bzl)	806,38	806,44
P1/42	L-Asp(O-All)	756,36	756,45
P1/43	L-Glu(O-Me)	744,36	744,41
P1/44	L-Glu(O-CHx)	812,43	812,48
P1/45	L-Glu(O-Bzl)	820,39	820,45
P1/46	L-Glu(O-All)	770,38	770,41
P1/47	L-Aad	744,36	744,42
P1/48	L-Phe(2-F)	766,36	766,41
P1/49	L-Phe(3-F)	766,36	766,39
P1/50	L-Phe(4-F)	766,36	766,43
P1/51	L-Phe(3,4-F ₂)	784,35	784,45
P1/52	L-Phe(F ₅)	838,33	838,39
P1/53	L-Phe(2-Cl)	782,33	782,39
P1/54	L-Phe(3-Cl)	782,33	782,40
P1/55	L-Phe(4-Cl)	782,33	782,40
P1/56	L-Phe(3,4-Cl ₂)	816,30	816,36
P1/57	L-Phe(4-Br)	826,28	826,39
P1/58	L-Phe(3-I)	874,27	874,30
P1/59	L-Phe(4-I)	874,27	874,35
P1/60	L-Phe(4-Me)	762,39	762,45
P1/61	L-Phe(4-NO ₂)	793,36	793,41
P1/62	L-Ala(2-th)	754,33	754,35
P1/63	L-Abu	686,36	686,38
P1/64	L-Ser(Bzl)	778,38	778,45
P1/65	L-hSer	702,35	702,40
P1/66	L-hSer(Bzl)	792,40	792,41
P1/67	L-Thr(Bzl)	792,40	792,43
P1/68	L-Met	732,35	732,41
P1/69	L-Met(O)	748,34	748,39
P1/70	L-Met(O ₂)	764,34	764,37
P1/71	L-Phg	734,36	734,36
P1/72	L-hPhe	762,39	762,39
P1/73	L-Chg	740,40	740,41
P1/74	L-Cha	754,42	754,43
P1/75	L-hCha	768,44	768,44
P1/76	L-Igl	774,39	774,39
P1/77	L-2-Aoc	742,42	742,42
P1/78	L-hLeu	728,40	728,40
P1/79	L-Tyr(Me)	778,38	778,44

P1/80	L-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)	922,33	922,33
P1/81	L-hTyr	778,38	778,44
P1/82	L-hTyr(Me)	792,40	792,40
P1/83	L-Nva	700,37	700,37
P1/84	L-Cys(Bzl)	794,36	794,36
P1/85	L-Cys(MeBzl)	808,37	808,37
P1/86	L-Cys(4-MeOBzl)	823,37	823,37
P1/87	L-dhPro	696,34	696,39
P1/88	L-Gla	774,34	774,34
P1/89	L-Api	758,38	758,38
P1/90	L-Arg(Me)	771,42	771,42
P1/91	L-Arg(Me) ₂	785,44	785,44
P1/92	L-3-Pal	749,37	749,37
P1/93	L-4-Pal	749,37	749,37
P1/94	L-Abu(Bth)	819,36	819,36
P1/95	L-Bip	824,40	824,41
P1/96	L-Bpa	852,40	852,40
P1/97	L-1-Nal	798,39	798,38
P1/98	L-Hnv	716,37	716,37
P1/99	L-Thyr	856,39	856,39
P1/100	Inp	712,37	712,37
P1/101	D-Ala	672,34	672,34
P1/102	D-Asn	715,35	715,35
P1/103	D-Asp	716,33	716,33
P1/104	D-Gln	729,36	729,36
P1/105	D-Glu	730,35	730,35
P1/106	D-Leu	714,39	714,39
P1/107	D-Lys	729,40	729,40
P1/108	D-Phe	748,37	748,37
P1/109	D-Pro	698,36	698,36
P1/110	D-Ser	688,34	688,34
P1/111	D-Thr	702,35	702,35
P1/112	D-Trp	787,38	787,38
P1/113	D-Tyr	764,37	764,37
P1/114	D-Tic	760,37	760,37
P1/115	D-Gla	774,34	774,34
P1/116	D-Cha	754,42	754,42
P1/117	D-Phg	734,36	734,36
P1/118	D-4-Pal	749,37	749,37
P1/119	D-Phe(4-Me)	762,39	762,39
P1/120	D-Phe(3-F)	766,36	766,36
P1/121	D-Phe(4-F)	766,36	766,36

P1/122	D-Phe(3,4-F ₂)	784,35	784,40
P1/123	D-Phe(F ₅)	838,33	838,33
P1/124	D-Phe(2-Cl)	782,33	782,34
P1/125	D-Phe(3-Cl)	782,33	782,33
P1/126	D-Phe(4-Cl)	782,33	782,33
P1/127	D-Phe(3,4-Cl ₂)	816,30	816,30
P1/128	D-Phe(4-I)	874,27	874,27
P1/129	D-Phe(4-Br)	826,28	828,29
P1/130	D-Phe(4-NO ₂)	793,36	793,36
P1/131	D-Ser(Bzl)	778,38	778,38
P1/132	D-Thr(Bzl)	792,40	792,40
P1/133	D-hPhe	762,39	762,39
P1/134	D-Bip	824,40	824,41
P1/135	D-Bpa	852,40	852,40
P1/136	D-1-Nal	798,39	798,38
P1/137	D-2-Nal	798,39	798,39
P1/138	L-Pma	766,32	766,36
P1/139	L-pSer	768,30	768,35
P1/140	L-Pmab	780,34	780,39
P1/141	L-pThr	782,32	782,35
P1/142	L-Pmp	842,35	842,39
P1/143	L-pTyr	844,33	844,39

5.2.2. Synteza kombinatorycznej biblioteki typu IQF dla Katepsyn

W celu opracowania profilu specyficzności substratowej ludzkich Katepsyn B, L, V, S oraz K w kieszeni wiążącej S1' oraz S2' zsyntezowano kombinatoryczną bibliotekę substratów typu IQF, która składała się z podbibliotek P1' oraz P2' o sekwencji:

- ACC-Ala-Arg-Leu-Arg-P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp),
- ACC-Ala-Arg-Leu-Arg-Mix-P2'-Gly-Lys(Dnp),

gdzie: P1'/P2' to jeden z 96 naturalnych lub nienaturalnych reszt aminokwasowych, natomiast Mix to równomolowa mieszanina aminokwasów naturalnych (z pominięciem cysteiny i metioniny oraz z norleucyną). Poniżej opisano syntezę biblioteki na przykładzie podbiblioteki P1'.

Syntezę substratów typu IQF wchodzących w skład biblioteki P1' przeprowadzono na podłożu stałym wykorzystując żywicę amidową Fmoc-Rink Amide AM Resin o stopniu podstawienia 0,64 mmol/g. W tym celu odważono 11 g żywicy,

umieszczono ją w szklanym reaktorze do syntezy peptydów i spulchniono w DCM. Po 30 minutach odsączono DCM pod zmniejszonym ciśnieniem, a żywicę przemyto trzykrotnie DMF. Kolejno usunięto grupę ochronną Fmoc dodając do reaktora 20% roztwór piperydyny w DMF. Po 5 minutach żywicę przemyto DMF i dodano kolejną porcję 20% roztworu piperydyny w DMF. Reaktor odstawiono na kołyskę na 20 minut. Po tym czasie żywicę przemyto sześciokrotnie DMF. Tak jak w przypadku biblioteki zdefiniowanej z substratami tetrapeptydowymi, usunięcie grupy ochronnej Fmoc każdorazowo potwierdzano wykonaniem testu ninhydrynowego – do próbówki pobierano kilka ziaren żywicy, zalewano je roztworem ninhydryny w 96% etanolu skażonym eterem dietylowym i umieszczano w termobloku (95°C, 5 minut). Pozytywny wynik testu, czyli uzyskanie ziarenek o granatowym zabarwieniu, świadczył o wolnych grupach aminowych. Następnie do próbówki typu Falcon (50 ml) odważono Fmoc-Lys(Dnp)-OH (9,41 g, 17,6 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (2,69 g, 17,6 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Całość rozpuszczono w DMF, dodano DICl (2,75 ml, 17,6 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i przeniesiono na żywicę. Reakcję prowadzono 4 godziny w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając. Wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny), odblokowano grupę Fmoc (20% PIP/DMF, cykl: 5 minut i 20 minut), ponownie wykonano test ninhydrynowy (wynik pozytywny) i w kolejnym kroku przyłączono Fmoc-Gly-OH (5,23 g, 17,6 mmol, 2,5 równoważnika molowego), a jako odczynniki sprzęgające zastosowano HOBt (2,69 g, 17,6 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz DICl (2,75 ml, 17,6 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Po 4 godzinach wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny), żywicę z przyłączonymi dwoma resztami aminokwasowymi odblokowano (20% PIP/DMF, 5 minut, 20 minut), ponownie wykonano test ninhydrynowy (wynik pozytywny) i kolejnym krokiem było przyłączenie mieszaniny izokinetycznej (Mix) w pozycji P2'. Do próbówki typu Falcon (50 ml) odważono każdy z 18 naturalnych aminokwasów (bez cysteiny i metioniny) oraz norleucynę w odpowiednich proporcjach molowych zgodnie z protokołem podanym w literaturze (Fmoc-L-Ala – 3,4%; Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH – 6,5%; Fmoc-L-Asn(Trt)-OH – 5,3%; Fmoc-L-Asp(O-tBu)-OH – 3,5%; Fmoc-L-Glu(O-tBu)-OH – 3,6%; Fmoc-L-Gln(Trt)-OH – 5,3%; Fmoc-Gly-OH – 2,9%; Fmoc-L-His(Trt)-OH – 3,5%; Fmoc-L-Ile-OH – 17,4%; Fmoc-L-Leu-OH – 4,9%; Fmoc-L-Lys(Boc)-OH – 6,2%; Fmoc-L-Nle-OH – 3,8%; Fmoc-L-Phe-OH – 2,5%; Fmoc-L-Pro-OH – 4,3%; Fmoc-L-Ser(O-tBu)-OH – 2,8%; Fmoc-L-Thr(O-tBu)-OH – 4,8%; Fmoc-L-Trp(Boc)-OH – 3,8%; Fmoc-L-Tyr(O-tBu)-OH – 4,1%; Fmoc-L-Val-OH – 11,3%)

[160]. Liczność całej mieszaniny izokinetycznej wynosiła 35,2 mmol, 5 równoważników molowych. Do mieszaniny izokinetycznej dodano HOBt (5,39 g, 35,2 mmol, 5 równoważników molowych). Całość rozpuszczono w DMF, dodano DICl (5,49 ml, 35,2 mmol, 5 równoważników molowych), a następnie przelano na żywicę. Reakcję prowadzono 5 godzin. Po tym czasie mieszaninę odsączono, a żywicę przemyto 3-krotnie DMF. Otrzymano Fmoc-Mix-Gly-Lys(Dnp)-żywica (negatywny wynik testu ninhydrynowego). Po usunięciu grupy Fmoc 20% roztworem piperydiny w DMF (pozytywny wynik testu ninhydrynowego), żywicę przemyto DCM oraz MeOH i wysuszono w eksykatorze nad P₂O₅ (24 godziny). Otrzymano H₂N-Mix-Gly-Lys(Dnp)-żywica. Następnie tak wysuszoną żywicę podzielono na 96 porcji (każda po 100 mg) i umieszczono ją w dwóch 48-dółkowych półautomatycznych reaktorach do syntezy równoległej. Żywicę spulchniono za pomocą DCM. Po 30 minutach dichlorometan odsączono, żywicę przemyto trzykrotnie DMF i przyłączono jedną z 96 reszt aminokwasowych w pozycji P1'. W tym celu do 2 ml probówek typu Eppendorf odważono Fmoc-aminokwasy (0,16 mmol, 2,5 równoważnika molowego). W probówce 50 ml typu Falcon przygotowano roztwór HOBt (w sumie na 96 dołków: 2,35 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego) w DMF. Do każdej probówki typu Eppendorf z naważoną resztą Fmoc-aminokwasową dodano po 0,9 ml tego roztworu i 25 µl DICl (0,16 mmol, 2,5 równoważnika molowego), po czym ich zawartość przelano do dołków z żywicą. Reakcję prowadzono przez 24 godziny delikatnie mieszając reaktor. Po tym czasie odsączono mieszaninę, przemyto każdy dołek trzykrotnie DMF, wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny) i odblokowano grupę Fmoc stosując 20% roztwór piperydiny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut), po czym sześciokrotnie przemyto żywicę DMF i wykonano test ninhydrynowy (pozytywny wynik). W pozycji P1 biblioteki we wszystkich 96 dołkach przyłączono argininę. W tym celu w 50 ml probówkach typu Falcon odważono Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (na 96 dołków: 9,97 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (na 96 dołków: 2,35 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość rozpuszczono w DMF i dodano DICl (na 96 dołków: 2,4 ml, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Mieszaninę dodano do każdego dołka w reaktorze i reakcję prowadzono przez 12 godzin. Po tym czasie przemyto dołki trzykrotnie DMF, a negatywny wynik testu ninhydrynowego świadczył o otrzymaniu: Fmoc-Arg(Pbf)-P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp)-żywica. Odblokowano grupę ochronną Fmoc (20% PIP/DMF, cykl: 5 minut, 20 minut), co potwierdził pozytywny wynik testu ninhydrynowego. Kolejno w probówce 50 ml typu Falcon odważono Fmoc-

L-Leu-OH (na 96 dołków: 5,43 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (na 96 dołków: 2,35 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Całość rozpuszczono w DMF i dodano DICl (na 96 dołków: 2,4 ml, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Do każdego dołka dodano 0,9 ml mieszaniny i reakcję prowadzono 4 godziny. Przyłączenie reszty aminokwasowej w pozycji P2 potwierdził negatywny wynik testu ninhydrynowego. Żywicę przemyto trzykrotnie DMF, odblokowano grupę Fmoc wykorzystując 20% roztwór piperydyny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut), co potwierdzono pozytywnym wynikiem testu ninhydrynowego. W pozycji P3 nastawiono Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH. W tym celu do 50 ml probówki typu Falcon odważono tę resztę aminokwasową (na 96 dołków: 9,97 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (na 96 dołków: 2,35 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość rozpuszczono w DMF i dodano DICl (na 96 dołków: 2,4 ml, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Do każdego dołka przeniesiono 0,9 ml mieszaniny i reakcję prowadzono do uzyskania negatywnego wyniku testu ninhydrynowego. Po 4 godzinach żywicę przemyto trzykrotnie DMF, odblokowano grupę Fmoc (20% PIP/DMF, cykl: 5 minut, 20 minut), co potwierdzono pozytywnym wynikiem testu ninhydrynowego. W pozycji P4 znajdowała się alanina, dlatego do probówki 50 ml typu Falcon naważono Fmoc-L-Ala-OH (na 96 dołków: 4,78 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego) oraz HOBt (na 96 dołków: 2,35 g, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość rozpuszczono w DMF, po czym dodano DICl (na 96 dołków: 2,4 ml, 15,36 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Do każdego dołka przeniesiono 0,9 ml mieszaniny. Reakcję prowadzono 4 godziny uzyskując negatywny wynik testu ninhydrynowego. Mieszaninę reakcyjną odsączono, żywicę przemyto trzykrotnie DMF, a grupę Fmoc odblokowano używając 20% roztworu piperydyny w DMF, co potwierdzono pozytywnym wynikiem testu ninhydrynowego. Ostatnim etapem było przyłączenie fragmentu fluoroforu z linkerem: Fmoc-ACC-βAla-OH. Do probówki 50 ml typu Falcon naważono Fmoc-ACC-βAla-OH (na 96 dołków: 6,3 g, 12,29 mmol, 2 równoważniki molowe) oraz HOBt (na 96 dołków: 1,88 g, 12,29 mmol, 2 równoważniki molowe). Całość rozpuszczono w DMF, dodano DICl (na 96 dołków: 1,92 ml, 12,29 mmol, 2 równoważniki molowe) i do każdego dołka przeniesiono 0,9 ml mieszaniny. Reakcję prowadzono przez 24 godziny. Po tym czasie wykonano test ninhydrynowy, który dał rezultat pozytywny (niepełna acylacja i obecność wolnych grup aminowych), w związku z czym mieszaninę reakcyjną odsączono, przemyto jednokrotnie DMF i ponownie sprzęgnięto Fmoc-ACC-βAla-OH

(na 96 dołków: 4,73 g, 9,22 mmol, 1,5 równoważnika molowego) wraz z HOBt (na 96 dołków: 1,41 g, 9,22 mmol, 1,5 równoważnika molowego) i DICl (na 96 dołków: 1,44 ml, 9,22 mmol, 1,5 równoważnika molowego) w DMF. Reakcję prowadzono kolejne 24 godziny. Po tym czasie otrzymano negatywny wynik testu ninhydrynowego. Mieszaninę nieprzereagowanych reagentów odsączone, żywicę przemyto trzykrotnie DMF i usunięto grupę ochronną Fmoc (20% PIP/DMF, cykl: 5 minut, 20 minut). W tym przypadku nie wykonywano testu ninhydrynowego, gdyż wolna aromatyczna grupa aminowa ACC nie daje zmiany zabarwienia w kontakcie z ninhydryną. Następnie żywicę przemyto trzykrotnie dichlorometanem, trzykrotnie metanolem i suszono w eksykatorze nad P₂O₅ przez 24 godziny. Ostatnim etapem syntezy była deprotekcja i uwolnienie substratów z żywicy. W tym celu do żywicy w dołkach dodano po 1,5 ml roztworu zawierającego schłodzoną mieszaninę 95% TFA, 2,5% TIPS i 2,5% H₂O (v/v/v). Reakcję hydrolizy prowadzono 2,5 godziny, mieszając energicznie aparat do syntezy co 15 minut. Następnie przesącze z produktami przeniesiono do 15 ml probówek wirówkowych typu Falcon, produkty strącono w zimnym eterze dietylowym (widoczny wytrącający się żółty produkt) i inkubowano w -20°C przez 30 minut. Następnie zwirowano probówki (4400 rpm, 4°C, 3 min) i zdekantowano roztwór z nad osadu. W celu przemycia osadu, ponownie dodano do niego zimny eter dietylowy i inkubowano w takich samych warunkach, po czym zwirowano i zlano cieś z nad osadu. Substraty zostawiono do wysuszenia na powietrzu przez 24 godziny. Otrzymano H₂N-ACC-βAla-Ala-Arg-Leu-Arg-P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp)-NH₂, gdzie P1' to jedna z 96 naturalnych lub nienaturalnych reszt aminokwasowych, a Mix to równomolowa mieszanina aminokwasów naturalnych (z pominięciem cysteiny i metioniny oraz z norleucyną). Otrzymane produkty w probówkach typu Falcon rozpuszczono w mieszaninie acetonitryl:woda w stosunku objętościowym 3:1, po czym poddano je liofilizacji, rozpuszczono w DMSO do końcowego stężenia 20 mM i przechowywano w -80°C.

Fragment zawierający fluorofor oraz linker – Fmoc-ACC-βAla-OH zsyntezowano na podłożu stałym – żywicy 2-chlorotrytylowej o stopniu podstawienia 1,6 mmol/g. Do szklanego reaktora naważono 3 g żywicy i dodano bezwodnego dichlorometanu w celu jej spulchnienia. Po 30 minutach żywicę przemyto trzykrotnie DCM. Do 50 ml probówki typu Falcon odważono Fmoc-βAla-OH (2,99 g, 9,6 mmol, 2 równoważniki molowe), a następnie dodano DCM oraz DIPEA (1,6 ml, 9,6 mmol, 2 równoważniki molowe). Następnie mieszaninę przelano do reaktora z żywicą. Reakcję prowadzono 3 godziny, po tym czasie żywicę przemyto trzykrotnie DCM, trzykrotnie

DMF i usunięto grupę ochronną Fmoc stosując 20% roztwór piperydyny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut). Żywicę przemyto sześciokrotnie DMF, a usunięcie grupy Fmoc potwierdzono pozytywnym wynikiem testu ninhydrynowego. Następnie do 50 ml probówki typu Falcon odważono Fmoc-ACC-OH (4,24 g, 9,6 mmol, 2 równoważniki molowe), HATU (3,65 g, 9,6 mmol, 2 równoważniki molowe), rozpuszczono w DMF i dodano 2,4,6-kolidynę (1,27 ml, 9,6 mmol, 2 równoważniki molowe). Mieszaninę przelano do reaktora. Po upływie 24 godzin, powtórzono reakcję sprzęgania Fmoc-ACC-OH (3,12 g, 7,2 mmol, 1,5 równoważnika molowego), HATU (2,74 g, 7,2 mmol, 1,5 równoważnika molowego), 2,4,6-kolidyny (0,95 ml, 7,2 mmol, 1,5 równoważnika molowego) w DMF. Mieszaninę reakcyjną dodano do żywicy i prowadzono reakcję 24 godziny. Po tym czasie żywicę przemyto trzykrotnie DMF, trzykrotnie DCM, trzykrotnie MeOH i pozostawiono w eksykatorze nad P₂O₅ przez 24 godziny (bez odblokowania grupy Fmoc). W celu ściągnięcia zsyntezowanego substratu z żywicy przygotowano mieszaninę: TFA/TIPS/H₂O (95%:2,5%:2,5%, v/v/v), którą schłodzono w 4°C i dodano do żywicy. Reakcję hydrolizy prowadzono 2 godziny mieszając energicznie reaktor z żywicą co 15 minut. Po tym czasie roztwór nad żywicą przesączono do 50 ml probówki typu Falcon, zalano zimnym eterem (widoczny wytrącający się w dużych ilościach biały produkt) i inkubowano w -20°C przez 30 minut. Następnie probówkę zwirowano (4400 rpm, 4°C, 3 min) i zdekantowano roztwór nad osadu. Do osadu dodano ponownie zimny eter dietylowy i inkubowano przez 30 minut w -20°C, zwirowano i zdekantowano roztwór nad osadem. Osad zostawiono do wysuszenia na powietrzu przez 24 godziny. Następnego dnia osad rozpuszczono w mieszaninie acetonitryl:woda (w stosunku objętościowym 3:1), umieszczono w -80°C i poddano liofilizacji. Sprawdzono czystość i potwierdzono masę cząsteczkową Fmoc-ACC-βAla-OH wykorzystując LC-MS. Produkt użyto do dalszej syntezy bez etapu oczyszczania.

5.2.3. Określenie profilu specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycjach P4-P2'

Wszystkie badania kinetyki enzymatycznej ludzkich katepsyn L, B, V, S oraz K wykonano za pomocą spektrofotometru (Molecular Devices Spectramax Gemini XPS) w 96 dołkowych płytkach (Corning®, płaskie, białe dno) w buforze do pomiaru aktywności enzymatycznej (0,1 M octan sodu, 0,1 M chlorek sodu, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 5,5) w temperaturze 37°C [246, 247].

W celu określenia profili specyficzności substratowej ludzkiej katepsyny L, B, V, S oraz K w kieszeniach wiążących S2-S4 przeprowadzono analizę kinetyki reakcji hydrolizy substratów fluorogenicznych wchodzących w skład biblioteki HyCoSuL z L-Arg w pozycji P1 zawierającej ponad 100 naturalnych i nienaturalnych reszt aminokwasowych w każdej z trzech podbibliotek (P2, P3 i P4) [246, 247]. Kinetykę reakcji enzymatycznej mierzono następująco: do każdego dołka nałożono 1 µl substratu w DMSO oraz 99 µl enzymu w buforze bez wcześniejszej inkubacji. Końcowe stężenie biblioteki substratów wynosiło 100 µM, a końcowe stężenie enzymów było następujące:

- katepsyna L: 0,5 nM dla substratów z podbiblioteki P2, 0,6 nM dla substratów z podbiblioteki P3, 0,4 nM dla substratów z podbiblioteki P4,
- katepsyna S: 2 nM dla substratów z podbiblioteki P2 oraz P3, 3 nM dla substratów z podbiblioteki P4,
- katepsyna V: 0,5 nM dla substratów z podbiblioteki P2, 0,4 nM dla substratów z podbiblioteki P3 oraz P4,
- katepsyna B: 0,25 nM dla substratów z podbiblioteki P2, 0,3 nM dla substratów z podbiblioteki P3, 0,5 nM dla substratów z podbiblioteki P4,
- katepsyna K: 4 nM dla substratów z podbiblioteki P2, P3 oraz P4.

Do określenia specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycji P1 wykorzystano zdefiniowaną bibliotekę o strukturze ogólnej: Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC składającą się ze 143 indywidualnych substratów fluorogenicznych. Analizę kinetyczną przeprowadzono umieszczając po 1 µl substratów w DMSO na płytce i dodając 99 µl enzymu w buforze bez wcześniejszej inkubacji. Końcowe stężenie zdefiniowanych substratów wynosiło 10 µM, a końcowe stężenie enzymów: 0,2 nM dla katepsyny L, 5 nM dla katepsyny S oraz katepsyny B, 2,5 nM dla katepsyny V oraz 1,5 nM dla katepsyny K.

W celu określenia specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w kieszeniach wiążących S1' oraz S2' wykorzystano kombinatoryczną bibliotekę wewnątrznie wygaszanych substratów typu IQF. Analizę kinetyczną przeprowadzono nakładając po 1 µl substratów rozpuszczonych w DMSO na płytkę i dodając 99 µl enzymu w buforze bez wcześniejszej inkubacji. Końcowe stężenie biblioteki P1' oraz P2' wynosiło 1 µM, a końcowe stężenie enzymów: 0,02 nM dla katepsyny L, 3 nM

dla katepsyny B, 0,1 nM dla katepsyny V, 0,2 nM dla katepsyny S oraz 0,4 nM dla katepsyny K.

Reakcję hydrolizy substratów prowadzono 30 minut przy długościach fali wzbudzenia 355 nm oraz fali emisji 460 nm. Do analizy postępu reakcji wybierano wyłącznie liniowy odcinek przyrostu fluorescencji w czasie i odczytywano jego wartość RFU/s (ang. *relative fluorescence unit per second*, jednostka względnej fluorescencji w czasie). Każdy pomiar został wykonany minimum dwukrotnie, a wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. Wyniki w profilach specyficzności substratowej katepsyny L, B, V, S oraz K w pozycjach P4, P3, P2, P1, P1' oraz P2' zostały wyrażone w procentach, gdzie wartość RFU/s otrzymaną dla najlepszego substratu przyjęto za 100% aktywności enzymu. Wartości procentowe dla pozostałych reszt aminokwasowych przedstawiono jako szybkość hydrolizy substratów wyrażoną w stosunku do najlepszego substratu w danej pozycji. Wykresy szybkości hydrolizy otrzymano przy użyciu oprogramowania SoftMax Molecular Devices, a ich analizę wykonano w Microsoft Excel oraz GraphPad Prism.

5.2.4. Synteza zdefiniowanych substratów tetrapeptydowych dla kaspaz oraz katepsyn

Syntezę zdefiniowanych substratów tetrapeptydowych zarówno dla katepsyn (tab. 7) jak i kaspaz (tab. 8) przeprowadzono na podłożu stałym wykorzystując taką samą procedurę jak w przypadku syntezy biblioteki P1 ze zdefiniowanymi substratami Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC. Po hydrolizie substratów z żywicy zostały one oczyszczone na HPLC, zliofilizowane i rozpuszczone w DMSO do końcowego stężenia 20 mM. Każdy z substratów miał czystość powyżej 92%.

Tab. 7. Wyniki analizy LC-MS zdefiniowanych tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych zaprojektowanych dla katepsyny S, $[M+H]^+$ zmierzono za pomocą detektora masowego Waters Acquity QDa. Czystość wszystkich związków była powyżej 93%.

	Sekwencja	$[M+H]^{+2+}$ obliczone	$[M+H]^{+2+}$ zmierzone
kontrola	Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC	757,40	757,48
JG_1	H ₂ N-Idc-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	959,37	959,44
JG_2	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	985,37	985,44
JG_3	Ac-Trp(Me)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	1056,43	1056,49
JG_4	Ac-Abu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	941,38	941,38
JG_5	Ac-Tle-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	969,42	969,48

JG_6	Ac-Met-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	1019,36	1019,43
JG_7	H ₂ N-Idc-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	916,36	916,41
JG_8	Ac-Glu-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	942,36	942,39
JG_9	Ac-Trp(Me)-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	1013,41	1013,46
JG_10	Ac-Abu-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	898,37	898,43
JG_11	Ac-Tle-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	926,40	926,46
JG_12	Ac-Met-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	976,35	976,39
JG_13	H ₂ N-Idc-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	972,42	972,45
JG_14	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	998,42	998,46
JG_15	Ac-Trp(Me)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1069,47	1069,51
JG_16	Ac-Abu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	954,43	954,45
JG_17	Ac-Tle-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	982,46	982,48
JG_18	Ac-Met-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1032,41	1032,43
JG_19	H ₂ N-Idc-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Gln-ACC	944,37	944,42
JG_20	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Gln-ACC	970,39	970,41
JG_21	Ac-Trp(Me)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Gln-ACC	1041,43	1041,47
JG_22	Ac-Abu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Gln-ACC	926,38	926,43
JG_23	Ac-Tle-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Gln-ACC	954,42	954,45
JG_24	Ac-Met-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Gln-ACC	1004,36	1004,38
JG_25	H ₂ N-Idc-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	959,37	959,41
JG_26	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	985,37	985,43
JG_27	Ac-Trp(Me)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	1056,43	1056,43
JG_28	Ac-Abu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	941,38	941,40
JG_29	Ac-Tle-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	969,42	969,43
JG_30	Ac-Met-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	1019,36	1019,40
JG_31	Ac-Tle-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Cys(4-MeBzl)-ACC	1033,43	1033,44
JG_32	Ac-Met-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Cys(4-MeBzl)-ACC	1083,38	1083,40
JG_33	H ₂ N-Idc-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	945,36	945,36
JG_34	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	971,36	971,36
JG_35	Ac-Trp(Me)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	1042,41	1042,41
JG_36	Ac-Abu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	927,37	927,38
JG_37	Ac-Tle-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	955,40	955,41
JG_38	Ac-Met-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	1005,35	1005,35
JG_39	Ac-Arg(Z) ₂ -Phe(2-Cl)-hCha-Arg-ACC	595,26	595,48
JG_40	Ac-Val-Phe(2-Cl)-hCha-Arg-ACC	864,41	864,55
JG_41	Ac-Phe(F ₅)-Phe(2-Cl)-hCha-Arg-ACC	1002,36	1002,46
JG_42	H ₂ N-Idc-Phe(2-Cl)-hCha-Arg-ACC	868,38	868,42
JG_43	H ₂ N-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)-Phe(2-Cl)-hCha-Arg-ACC	1086,37	1086,49
JG_44	Ac-Hyp(Bzl)-Phe(2-Cl)-hCha-Arg-ACC	968,44	968,56
JG_45	Ac-Arg(Z) ₂ -Ile-hCha-Arg-ACC	1121,57	1121,73
JG_46	Ac-Val-Ile-hCha-Arg-ACC	796,46	796,61
JG_47	Ac-Phe(F ₅)-Ile-hCha-Arg-ACC	934,42	934,51
JG_48	H ₂ N-Idc-Ile-hCha-Arg-ACC	800,44	800,55
JG_49	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -O-Bzl)-Ile-hCha-Arg-ACC	1018,43	1018,55
JG_50	Ac-Hyp(Bzl)-Ile-hCha-Arg-ACC	900,49	900,61
JG_51	Ac-Arg(Z) ₂ -Phe(2-F)-hCha-Arg-ACC	587,27	587,53

JG_52	Ac-Val-Phe(2-F)-hCha-Arg-ACC	848,44	848,56
JG_53	Ac-Phe(F ₅)-Phe(2-F)-hCha-Arg-ACC	986,39	986,51
JG_54	H ₂ N-Idc-Phe(2-F)-hCha-Arg-ACC	852,41	852,53
JG_55	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)-Phe(2-F)-hCha-Arg-ACC	1070,40	1070,51
JG_56	Ac-Hyp(Bzl)-Phe(2-F)-hCha-Arg-ACC	952,47	952,57
JG_57	Ac-Phe(F ₅)-Cit-hCha-Arg-ACC	978,42	978,52
JG_58	Ac-Arg(Z) ₂ -Phe(2-Cl)-hLeu-Arg-ACC	1149,48	1149,63
JG_59	Ac-Val-Phe(2-Cl)-hLeu-Arg-ACC	824,38	824,48
JG_60	Ac-Phe(F ₅)-Phe(2-Cl)-hLeu-Arg-ACC	962,33	962,43
JG_61	H ₂ N-Idc-Phe(2-Cl)-hLeu-Arg-ACC	828,35	828,38
JG_62	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)-Phe(2-Cl)-hLeu-Arg-ACC	1046,34	1046,45
JG_63	Ac-Hyp(Bzl)-Phe(2-Cl)-hLeu-Arg-ACC	928,40	928,40
JG_64	Ac-Arg(Z) ₂ -Phe(2-Cl)-Met(O ₂)-Arg-ACC	1185,42	1185,59
JG_65	Ac-Val-Phe(2-Cl)-Met(O ₂)-Arg-ACC	860,31	860,44
JG_66	Ac-Phe(F ₅)-Phe(2-Cl)-Met(O ₂)-Arg-ACC	998,26	998,32
JG_67	H ₂ N-Idc-Phe(2-Cl)-Met(O ₂)-Arg-ACC	864,28	864,38
JG_68	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)-Phe(2-Cl)-Met(O ₂)-Arg-ACC	1084,27	1084,35
JG_69	Ac-Hyp(Bzl)-Phe(2-Cl)-Met(O ₂)-Arg-ACC	964,34	964,44
JG_70	Ac-Arg(Z) ₂ -Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1318,48	1318,52
JG_71	Ac-Val-Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	993,37	993,49
JG_72	Ac-Phe(F ₅)-Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1131,32	1131,45
JG_73	H ₂ N-Idc-Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	997,35	997,43
JG_74	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -O-Bzl)-Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	609,17	609,41
JG_75	Ac-Hyp(Bzl)-Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1097,40	1097,51
JG_76	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	1190,41	1190,45
JG_77	Ac-Phe(F ₅)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Arg-ACC	553,70	553,98
JG_78	Ac-Arg(Z) ₂ -Phe(2-Cl)-2-Aoc-Arg-ACC	582,25	582,54
JG_79	Ac-Val-Phe(2-Cl)-2Aoc-Arg-ACC	838,39	838,54
JG_80	Ac-Phe(F ₅)-Phe(2-Cl)-2Aoc-Arg-ACC	975,36	975,40
JG_81	H ₂ N-Idc-Phe(2-Cl)-2Aoc-Arg-ACC	841,37	841,40
JG_82	Ac-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)-Phe(2-Cl)-2-Aoc-Arg-ACC	1061,36	1061,39
JG_83	H ₂ N-Idc-Tic-2-Aoc-Arg-ACC	820,41	820,55
JG_84	Ac-Phe(F ₅)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	1093,34	1093,42
JG_85	Ac-Phe(F ₅)-Arg-2-Aoc-Glu(O-Me)-ACC	938,38	938,48
JG_86	Ac-Glu-Arg-hCha-Glu-ACC	842,40	842,48
JG_87	Ac-Glu-Phe(2-Cl)-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	996,29	996,35
JG_88	Ac-Glu-Arg-hCha-Aad-ACC	842,40	842,48
JG_89	Ac-Phe(F ₅)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Aad-ACC	1093,35	1093,43
JG_90	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Ser-ACC	929,35	929,41
JG_91	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Ala-ACC	913,35	913,42
JG_92	Ac-Glu-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Thr-ACC	943,36	943,41
JG_93	Ac-Phe(F ₅)-Glu(O-Me)-hCha-Arg-ACC	964,39	964,40
JG_94	Ac-Glu-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	942,34	942,35
JG_96	Ac-Glu(O-Me)-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(Me)-ACC	956,36	956,40
JG_99	Ac-Met(O)-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	960,33	960,39
JG_100	Ac-Met-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	944,34	944,35

JG_101	Ac-Met(O ₂)-Ile-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	962,31	962,30
JG_102	Ac-Phe(F ₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	1080,31	1080,37
JG_103	Ac-Phe(F ₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-ACC	1094,32	1094,96
JG_104	Ac-Phe(F ₅)-Arg-Lys(2-Cl-Z)-Glu-ACC	1079,32	1079,45

Tab. 8. Wyniki analizy LC-MS zdefiniowanych tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych zaprojektowanych dla kaspazy-3 oraz -7, [M+H]⁺ zmierzono za pomocą detektora masowego Waters Acquity QDa. Czystość wszystkich związków była powyżej 92%.

	Sekwencja	[M+H] ⁺ /[M+Na] ⁺ obliczone	[M+H] ⁺ /[M+Na] ⁺ zmierzone
JG_C_1.1	Ac-Asp-Glu-Val-Glu-ACC	733,26	733,29
JG_C_1.3 (kontrola)	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-ACC	719,25	719,17
JG_C_1.6	Ac-Asp-Glu-Val-Pma-ACC	769,24	769,24
JG_C_1.15	Ac-Asp-Glu-Val-Ser-ACC	691,25	691,17
JG_C_1.16	Ac-Asp-Glu-Val-pSer-ACC	793,20	793,20

5.2.5. Synteza zdefiniowanych substratów typu IQF dla kaspaz

Syntezę substratów wewnętrznie wygaszanych zaprojektowanych dla kaspaz (tab. 9) przeprowadzono na podłożu stałym wykorzystując taką samą procedurę jak w przypadku opisanej syntezy biblioteki P1' oraz P2'. Po hydrolizie substratów z żywicy zostały one oczyszczone na HPLC i rozpuszczone w DMSO do końcowego stężenia 10 mM. Ich czystość potwierdzono używając HPLC analitycznego, a masa cząsteczkowa została potwierdzona przy użyciu HRMS.

Tab. 9. Wyniki analizy LC-MS zdefiniowanych tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych zaprojektowanych dla kaspazy-3 oraz -7, [M+H]⁺ zmierzono za pomocą detektora masowego Waters Acquity QDa. Czystość wszystkich związków była powyżej 95%.

	Sekwencja	[M+H] ⁺ obliczone	[M+H] ⁺ zmierzone
S1_YAP1	ACC-βAVDEMDTGDTIK(Dnp)	1660,6432	1660,6429
S2_[pT]YAP1	ACC-βAVDEMDpTGDTIK(Dnp)	1740,6095	1740,6108
S3_YAP1	ACC-βAQASTDAGTAGK(Dnp)	1443,5771	1443,5758
S4_[pT]YAP1	ACC-βAQASpTDAGTAGK(Dnp)	1523,5435	1523,5432
S5_VIME	ACC-βAQDSVDFSNHDK(Dnp)	1728,6521	1728,6544
S6_[pS]VIME	ACC-βAQDSVDFpSNHDK(Dnp)	1808,6184	1808,6173
(P1)_Asp	ACC-βADEVDGVK(Dnp)D	1313,4917	1313,4905
(P1)_Glu	ACC-βADEVEGVK(Dnp)D	1327,5074	1327,5089
(P1)_Ser	ACC-βADEVSGVK(Dnp)D	1285,4968	1285,4982
(P1)_pSer	ACC-βADEVpSGVK(Dnp)D	1365,4631	1365,4628
(P1)_Pma	ACC-βADEVPmaGVK(Dnp)D	1363,4838	1363,4834

(P1)_Thr	ACC- β ADEVTVGVK(Dnp)D	1299,5124	1299,5137
(P1)_pThr	ACC- β ADEVpTGVK(Dnp)D	1379,47871	1379,4788
(P1)_Pmab	ACC- β ADEVpPmabGVK(Dnp)D	1399,4814	1399,4783

5.3. Badanie aktywności kinetycznej kaspaz oraz katepsyn wobec zdefiniowanych substratów

Badania kinetyki enzymatycznej ludzkich katepsyn: L, B, V, S oraz K prowadzono w buforze do pomiaru aktywności enzymatycznej (0,1 M octan sodu, 0,1 M chlorek sodu, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 5,5) w temperaturze 37°C bez wcześniejszej inkubacji enzymów. Stężenie substratów zdefiniowanych wynosiło 10 μ M, natomiast stężenie enzymów: 0,2 nM dla katepsyny L, 5 nM dla katepsyny B, 2,5 nM dla katepsyny V, 5 nM dla katepsyny S oraz 1,5 nM dla katepsyny K. W przypadku analizy kinetycznej substratów przy jednakowym stężeniu wszystkich katepsyn, stężenie substratów wynosiło 10 μ M, natomiast stężenie katepsyn 5 nM.

Analizę kinetyki reakcji enzymatycznej kaspazy -3, -6, -7 oraz -8 prowadzono w 37°C. Przed każdym pomiarem kaspaza-3, -6 oraz -7 były inkubowane w buforze do pomiaru aktywności enzymatycznej: 10% sacharozy (w/v), 20 mM PIPES, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, zakres pH od 7,2 do 7,4 przez 10 min w 37°C [117]. Bufor dla kaspazy -8 był dodatkowo wzbogacony o 1,0 M roztwór cytrynianu sodu (sól kosmotropowa), a kaspaza-8 była preinkubowana 20 min w 37°C. Stężenie substratów wynosiło 1 μ M i 10 μ M, a zakres stężeń enzymów wynosił: dla kaspazy-3 od 0,4 nM do 200 nM, dla kaspazy-6 od 100 nM do 600 nM, dla kaspazy -7 od 8 nM do 200 nM, dla kaspazy-8 od 5 nM do 20 nM.

Reakcję hydrolizy substratów prowadzono 30 minut i mierzono przyrost fluorescencji przy długościach fali wzbudzenia 355 nm oraz fali emisji 460 nm. Do analizy postępu reakcji wybierano wyłącznie liniowy odcinek przyrostu fluorescencji w czasie i odczytywano jego wartość RFU/s (ang. *relative fluorescence unit per second*, jednostka względnej fluorescencji w czasie). Każdy pomiar został wykonany minimum dwukrotnie, a wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie z odchyleniem standardowym.

5.4. Wyznaczenie parametrów kinetycznych (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) dla zdefiniowanych substratów

Parametry kinetyczne (k_{kat} , K_M , k_{kat}/K_M) wybranych substratów wewnętrznie wygaszanych typu IQF zaprojektowanych dla kaspaz wyznaczono wykorzystując metodę regresji liniowej Michaelisa-Menten zgodnie z protokołem dostępnym w literaturze [266]. Preinkubowana 10 minut w buforze (10% w/v sacharozy, 20 mM PIPES, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, zakres pH od 7,2 do 7,4) w 37°C kaspaza-3 oraz kaspaza-7 została dodana do seryjnie rozcieńczonych substratów w dołkach w zakresie stężeń od 1,46 μ M do 150 μ M w zależności od użytego substratu. Końcowy zakres stężeń enzymów wynosił: od 1 nM do 500 nM, a całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 μ l. Hydrolizę substratów mierzono przez 30 minut przy długościach fali wzbudzenia 355 nm oraz fali emisji 460 nm, w temperaturze 37°C. Do dalszej analizy wybierano wyłącznie liniowy odcinek przyrostu fluorescencji w czasie, który wykorzystano do wyznaczenia parametrów kinetycznych korzystając z nieliniowej regresji Michaelisa-Menten w GraphPad Prism. Pomiarów dla każdego substratu wykonano trzykrotnie, a podane dane są przedstawione jako średnia arytmetyczna wraz z odchyleniem standardowym.

Parametry kinetyczne dla substratu kontrolnego Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC dla katepsyn niezbędne do określenia stałej k_{obs}/I zostały wyznaczone w sposób analogiczny. Katepsyny nie były jednak preinkubowane w buforze (0,1 M octan sodu, 0,1 M chlorek sodu, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 5,5) przed pomiarem, a zakres stężeń substratu wynosił od 12 μ M do 500 μ M w zależności od enzymu, zakres stężeń katepsyn wynosił od 0,16 nM do 1,5 nM przy całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej 100 μ l.

5.5. Synteza inhibitora dedykowanego katepsynie S

Synteza inhibitora dedykowanego katepsynie S obejmowała cztery etapy:

- 1) syntezę grupy wiążącej Boc-Glu(O-Me)-AOMK
- 2) syntezę fragmentu peptydowego
- 3) połączenie fragmentu peptydowego z grupą wiążącą
- 4) dołączenie znacznika fluorogenicznego do N-końca produktu otrzymanego w etapie III

Synteza bromometyloketonu Boc-Glu(O-Me)-BMK

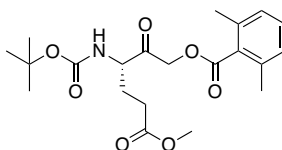
Syntezę inhibitora dedykowanego katepsynie S rozpoczęto od wygenerowania diazometanu zgodnie z protokołem wydanym przez firmę Sigmę-Aldrich (Aldrich Technical Bulletin Protocol AL-180). W szklanym reaktorze chemicznym zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z wodorotlenku potasu (KOH, 2,5 g) rozpuszczonego w dejonizowanej wodzie (4 ml), eteru dietylowego (8 ml) oraz 2(2-etoksyetoksy)etanolu (14 ml). Tak przygotowany reaktor zawierający mieszaninę reakcyjną zanurzono w łaźni olejowej umieszczonej na mieszadle magnetycznym z funkcją grzania utrzymując stałą temperaturę 65°C. Drugą część reaktora stanowił tzw. zimny palec zawierający mieszaninę 2-propanolu i suchego lodu zapewniając temperaturę ok. -70°C. Dodatkowo zaopatrzonego on był w 50 ml kolbę okrągłodenną umieszczoną w łaźni chłodzącej o temperaturze ok. -10°C (mieszanina lodu i acetonu) oraz pułapkę eterową wypełnioną eterem dietylowym zanurzoną również w łaźni lodowej. Po ok. 15 minutach, potrzebnych do ustalenia odpowiedniej temperatury, rozpoczęto wkraplanie przygotowanego wcześniej roztworu diazaldu (5 g) w eterze dietylowym (45 ml) używając bezszlifowego wkraplacza. Po 5 minutach zaobserwowano tworzenie się diazometanu, który skraplał się wraz z eterem dietylowym do ochłodzonej kolby w postaci żółtego roztworu. Generowanie diazometanu trwało 45 minut, po czym wkroplono dwukrotnie świeżą porcję eteru dietylowego (ok. 10 ml), by mieć pewność przereagowania wszystkich składników. Cała reakcja trwała około godziny. W czasie generowania diazometanu przygotowano bezwodnik N-zabezpieczonego aminokwasu Boc-Glu(O-Me)-OH. W tym celu do okrągłodennej kolby zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne naważono Boc-Glu(O-Me)-OH (1,83 g, 7 mmol), który rozpuszczono w bezwodnym tetrahydrofuranie (20 ml) w atmosferze argonu. Kolba została zabezpieczona septą i umieszczona w łaźni lodowej (mieszanina acetonu i lodu, -10°C) na mieszadle magnetycznym na 10 minut. Po tym czasie przez septę dodano: chloromrówczan izobutyli (1044 µl, 7,805 mmol, 1,15 równoważnika molowego) oraz 4-metylmorfolinę (962 µl, 8,75 mmol, 1,25 równoważnika molowego). Zaobserwowano wytrącenie białego osadu, które wskazywało na udane wytworzenie bezwodnika aminokwasu. Reakcję prowadzono przez 20 minut. Do kolby, w której skroplił się diazometan, włożono dipol magnetyczny i wkroplono do niej mieszaninę bezwodnika aminokwasu. Mieszaninę reakcyjną zostawiono na 30 minut z mieszaniem w kolbie, a po tym czasie usunięto łaźnię lodową i sprawdzono postęp reakcji

na LC-MS. Kolejno do uzyskanej pochodnej diazowej aminokwasu powoli wkroplono mieszaninę wody (10 ml) z 30% kwasem bromowodorowym w kwasie octowym (5 ml). Obserwowano pojawiające się bąbelki azotu i delikatne odbarwienie mieszaniny. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez ok. 40 minut i monitorowano przy użyciu LC-MS. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano octanu etylu (50 ml) i całość poddano ekstrakcji 5% roztworem wodorowęglanu sodu (dodany trzykrotnie, 50 ml), wodą dejonizowaną (dodana dwukrotnie, 50 ml) oraz nasyconym roztworem NaCl (dodana dwukrotnie, 50 ml). Faza organiczna została wysuszona nad bezwodnym siarczanem magnezu ($MgSO_4$), a pozostały rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem używając wyparki rotacyjnej. Produkt suszono w eksykatorze nad P_2O_5 przez 24 godziny. Uzyskany bromometyloketon (Boc-Glu(O-Me)-BMK) został wykorzystany do dalszej reakcji bez etapu oczyszczania.

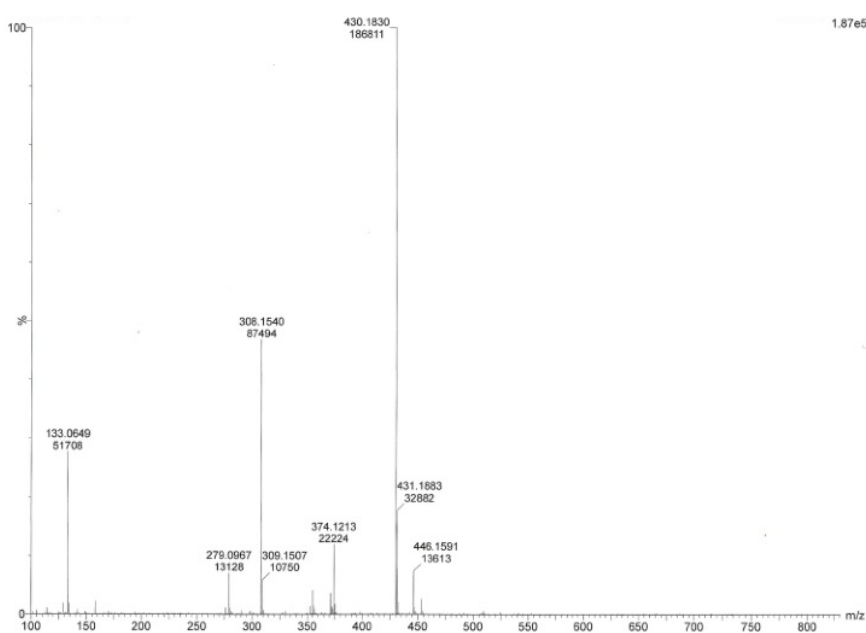
Synteza Boc-Glu(O-Me)-AOMK

Drugi etap syntezy polegał na przekształceniu otrzymanego bromometyloketonu (BMK) do acyloksymetyloketonu (AOMK). Do 50 ml kolby okrągłodennej zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne naważono Boc-Glu(O-Me)-BMK (3 g, 8,52 mmol) i rozpuszczono w DMF (8 ml) w atmosferze argonu. Kolejno do mieszaniny dodano fluorek potasu (KF, 1,49 g, 25,56 mmol, 3 równoważniki molowe) w atmosferze argonu i po dwóch minutach aktywacji dodano kwas 2,6-dimetylobenzoowy (1,53 g, 10,22 mmol, 1,2 równoważniki molowe). Reakcję prowadzono przez godzinę na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej monitorując postęp reakcji przy pomocy LC-MS. Po zakończeniu dodano octan etylu (50 ml) i mieszaninę ekstrahowano w rozdzielaczu używając wody dejonizowanej (1 x 50 ml), 5% wodorowęglanu sodu (3 x 50 ml) oraz solanki (3 x 50 ml). Faza organiczna została wysuszona nad bezwodnym siarczanem magnezu, a rozpuszczalnik został odparowany pod zmniejszonym ciśnieniem korzystając z wyparki rotacyjnej. Produkty zostały wysuszone nad P_2O_5 w eksykatorze. Uzyskany produkt w postaci białego proszku był przechowywany w $-20^\circ C$ do momentu użycia. Za pomocą HPLC analitycznego potwierdzono czystość otrzymanego produktu, a na HRMS potwierdzono masę cząsteczkową (rys.75).

A)



B)



$[M+Na]^+$ (obliczone) = 430,1837, $[M+Na]^+$ (zmierzone) = 430,1830

Rys. 75. Struktura chemiczna (A) oraz analiza HRMS (B) grupy wiążącej Boc-Glu(O-Me)-AOMK

Synteza fragmentu peptydowego inhibitora

Syntezę fragmentu peptydowego inhibitora wykonano na podłożu stałym. Do szklanego reaktora nważono 0,3 g żywicy 2-chlorotrytylowej o stopniu podstawienia 1,6 mmol/g i spulchniono ją za pomocą bezwodnego dichlorometanu. Po 30 minutach żywicę przemyto trzykrotnie bezwodnym DCM i przyłączono pierwszą resztę aminokwasową. W tym celu do 15 ml probówki typu Falcon odważono Fmoc-Lys(2-Cl-Z)-OH (0,644 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), dodano bezwodny DCM i DIPEA (209 μ l, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Mieszaninę dodano do żywicy w reaktorze. Reakcję prowadzono 4 godziny. Po tym czasie żywicę przemyto trzykrotnie DCM i usunięto grupę ochronną Fmoc. W tym celu dodano 20% roztwór piperydyny w DMF i reaktor odłożono na 5 minut na kołyskę. Następnie żywicę przemyto DMF i ponownie dodano świeżą porcję 20% piperydyny w DMF. Reaktor

odłożono na kołyskę na 20 minut. Następnie żywicę przemyto sześciokrotnie DMF. Powyższą procedurę usunięcia grupy ochronnej Fmoc prowadzono za każdym razem przed sprzęganiem kolejnych reszt aminokwasowych w trakcie syntezy fragmentu peptydowego. Po usunięciu grupy Fmoc wykonano test ninhydrynowy. Do szklanej probówki pobrano kilka ziarenek żywicy, dodano roztwór ninhydryny w technicznym alkoholu etylowym i umieszczono w termobloku w temperaturze 95°C. Po 5 minutach zaobserwowano zmianę koloru ziaren z żółtej na ciemnoniebieską, co świadczyło o pozytywnym wyniku testu ninhydrynowego i obecności wolnych grup aminowych, a tym samym przyłączeniu pierwszej reszty aminokwasowej do żywicy. Następnie, do 15 ml probówki typu Falcon naważono Fmoc-Cit-OH (0,477 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), HOBT (0,18 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i całość rozpuszczono w DMF. Następnie dodano DICl (156 µl, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i całość dodano do żywicy w reaktorze. Po trzech godzinach wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny), mieszaninę reakcyjną odsączono, usunięto grupę ochronną Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut) i żywicę przemyto sześciokrotnie DMF. Potwierdzono usunięcie grupy Fmoc testem ninhydrynowym (wynik pozytywny) i kolejno do 15 ml probówki typu Falcon odważono Fmoc-Phe(F₅)-OH (0,573 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), HOBT (0,18 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i rozpuszczono w DMF. Dodano DICl (156 µl, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i całość przelano do reaktora. Reakcję prowadzono 3 godziny. Po tym czasie wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny), mieszaninę reakcyjną odsączono, usunięto grupę ochronną Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF (cykl: 5 minut, 20 minut) i przemyto sześciokrotnie DMF. W celu przyłączenia linkera w 15 ml probówce typu Falcon naważono Boc-NH-PEG(4)-OH (0,439 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), HOBT (0,18 g, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i rozpuszczono w DMF. Dodano DICl (156 µl, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i mieszaninę dodano do żywicy w reaktorze. Reakcję prowadzono 4 godziny na kołysce. Po negatywnym wyniku testu ninhydrynowego żywicę przemyto trzykrotnie DMF, trzykrotnie DCM, trzykrotnie metanolem i suszono w eksykatorze nad P₂O₅ przez 24 godziny. Ostatni etap polegał na uwolnieniu produktu z żywicy z zachowaniem grup ochronnych na łańcuchach bocznych reszt aminokwasowych. W tym celu do wysuszonej żywicy w reaktorze dodano roztwór zawierający 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), kwas octowy oraz dichlorometan (TFE/CH₃COOH/DCM 1:1:8, v/v/v). Reakcję prowadzono

przez godzinę, po czym mieszaninę przesączono do 100 ml kolby, dodano do niej heksan (20 ml) i odparowano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt rozpuszczono w niewielkiej ilości DCM i ponownie dodano heksanu (20 ml, widoczny wytrącający się biały produkt). Mieszaninę odparowano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt Boc-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-OH rozpuszczono w mieszaninie acetonitryl : woda (3:1) i zliofilizowano. Produkt użyto do dalszej syntezy bez etapu oczyszczania (czystość powyżej 90%).

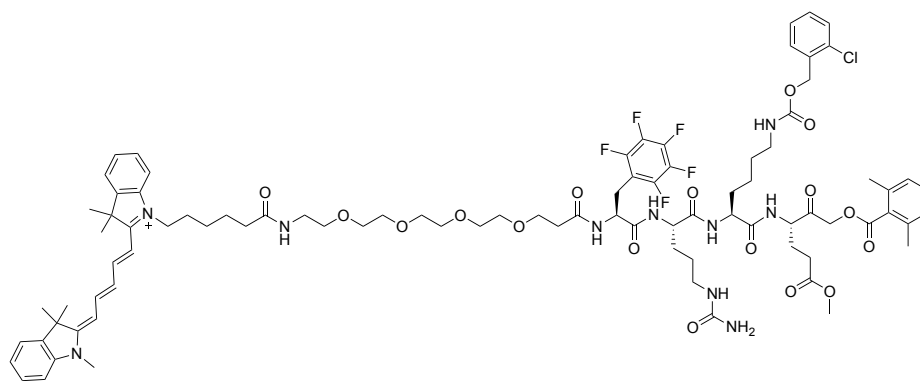
Połączenie fragmentu peptydowego inhibitora z grupą wiążącą

W celu przyłączenia fragmentu peptydowego markera chemicznego Boc-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-OH z grupą wiążącą Boc-Glu(O-Me)-AOMK zastosowano metodę syntezy w roztworze. W pierwszej kolejności usunięto grupę ochronną Boc znajdującą się na N-końcu reaktywnej grupy wiążącej. Do 10 ml kolby sercowej zaopatrzonej w mieszadełko magnetyczne naważono Boc-Glu(O-Me)-AOMK (50 mg, 0,12 mmol) i dodano mieszaninę TFA:DCM:TIPS (7,5 : 2 : 0,5, v/v/v). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 30 minut. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano DCM i całość odparowano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Ponownie otrzymany produkt rozpuszczono w DCM i odparowano na wyparce w celu całkowitego pozbycia się kwasu trifluorooctowego. Do 10 ml kolby sercowej zaopatrzonej w mieszadełko magnetyczne naważono Boc-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-OH (127 mg, 0,12 mmol) oraz HATU (46 mg, 0,12 mmol) i składniki rozpuszczono w DMF (1,6 ml). Odblokowaną wcześniej grupę wiążącą H₂N-Glu(O-Me)-AOMK rozpuszczono w DMF (0,8 ml) i dodano do niej 2,4,6-kolidynę (64 µl, 0,48 mmol, 4 równoważniki molowe). Całość przeniesiono do kolby zawierającej mieszaninę fragmentu peptydowego z HATU w DMF. Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym przez cztery godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną rozpuszczono w octanie etylu i przeprowadzono ekstrakcję używając kolejno: 5% kwasu cytrynowego, 5% wodorowęglanu sodu oraz nasyconego roztworu chlorku sodu (solanki). Fazę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, a rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono na HPLC, zliofilizowano i otrzymany biały proszek wykorzystano do dalszej reakcji.

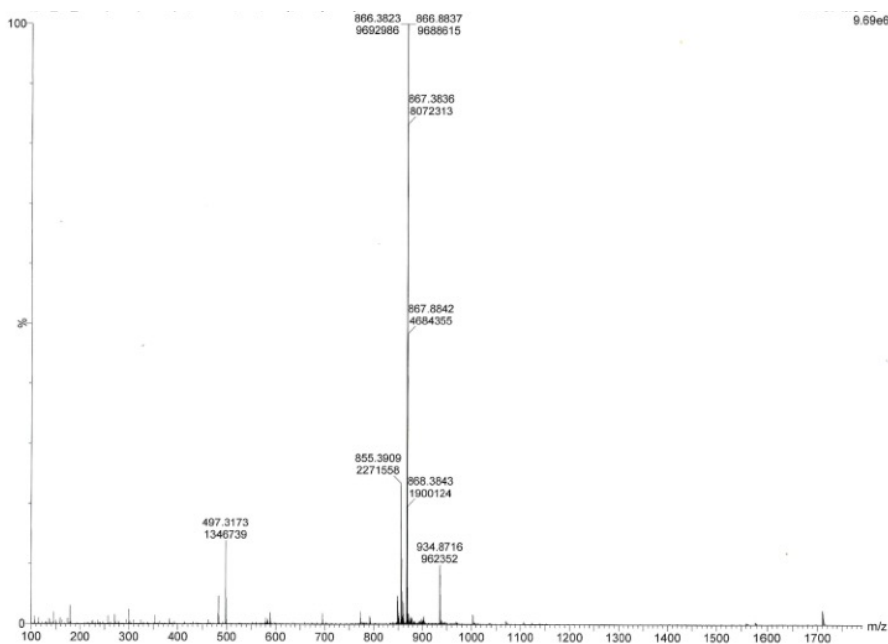
Połączenie Boc-PEG-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK ze znacznikiem fluorogenicznym

Reakcję rozpoczęto od usunięcia grupy ochronnej Boc znajdującej się na N-końcu (Boc-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK, 10 mg, 0,007 mmol) za pomocą mieszaniny TFA:DCM:TIPS (7,5:2:1,5, v/v/v). Reakcję prowadzono przez 30 minut w kolbie sercowej o pojemności 10 ml, w temperaturze pokojowej, z mieszaniem na mieszadle magnetycznym. Następnie dodano DCM i całość odparowano na wyparce rotacyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem. Ponownie otrzymany produkt rozpuszczono w DCM i odparowano na wyparce w celu dokładnego pozbycia się kwasu trifluorooctowego. Następnie produkt rozpuszczono w DMF (2 ml), dodano ester sukcyimidowy Cy5 (4,3 mg, 0,007 mmol) i DIPEA (3,7 µl, 0,021 mmol). Reakcję prowadzono przez dwie godziny z mieszaniem. Po tym czasie marker chemiczny oczyszczono przy pomocy HPLC i zliofilizowano. Otrzymano Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK. Niebieski proszek rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w -20°C do momentu badań. Masę cząsteczkową potwierdzono za pomocą HRMS (rys. 76).

A)



B)



$[M+Na]^{2+}$ obliczone = 866,3812, $[M+Na]^{2+}$ zmierzone = 866,3823

Rys. 76. A) Struktura chemiczna oraz B) analiza HRMS fluorescencyjnego markera chemicznego Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK

5.6. Badanie aktywności katepsyn wobec zsyntezowanego inhibitora

Ostatnim etapem badań było sprawdzenie selektywności otrzymanego inhibitora o sekwencji Cy5-PEG(4)-Phe(F₅)-Cit-Lys(2-Cl-Z)-Glu(O-Me)-AOMK i wyznaczenie parametrów kinetycznych względem badanych katepsyn. W tym celu na 96-dółkowej płytce (Corning[®], płaskie dno, białe) przygotowano serię rozcieńczeń inhibitora (20 μL), a następnie dodano do niego substrat kontrolny Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC (20 μL), dla którego badano stopień hydrolizy przez dodany enzym (60 μL). Do badania użyto następujących stężeń enzymów:

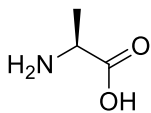
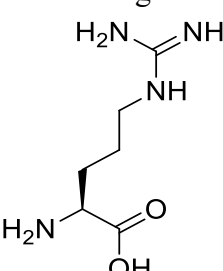
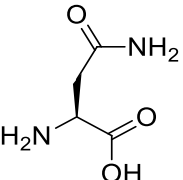
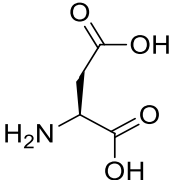
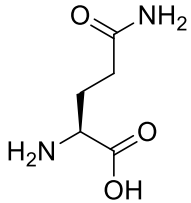
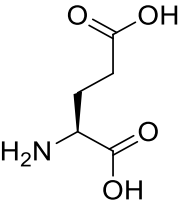
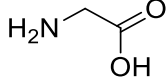
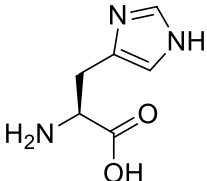
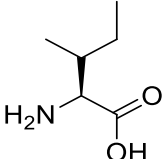
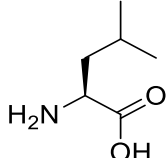
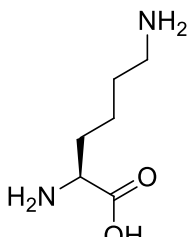
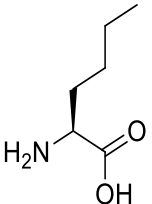
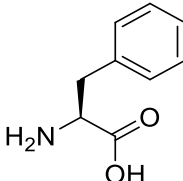
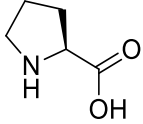
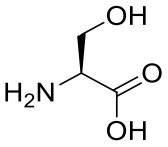
- katepsyna L – 0,21 nM
- katepsyna S – 2,64 nM
- katepsyna B – 2,5 nM

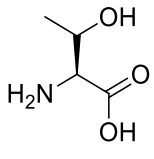
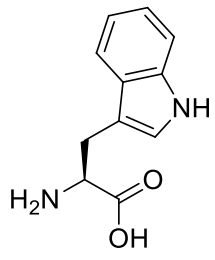
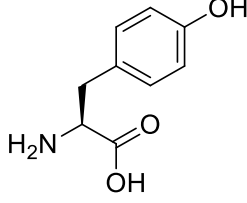
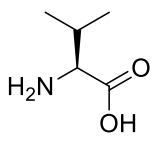
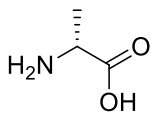
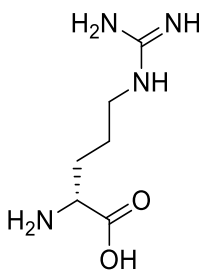
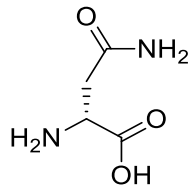
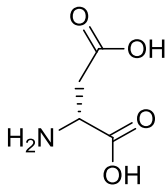
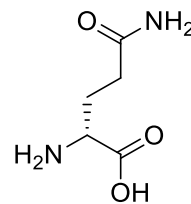
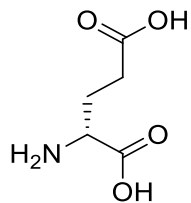
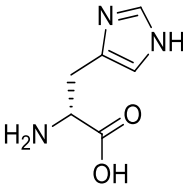
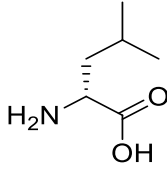
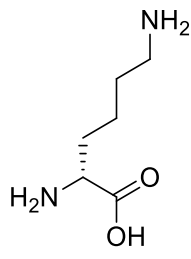
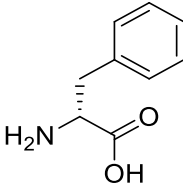
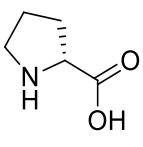
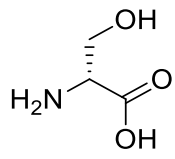
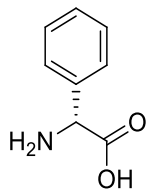
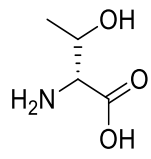
- katepsyna V – 2 nM
- katepsyna K – 2 nM

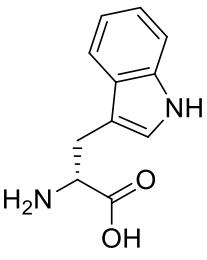
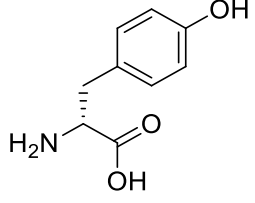
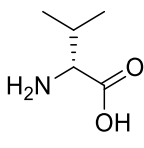
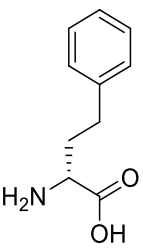
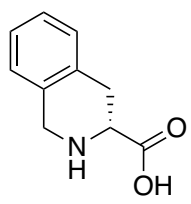
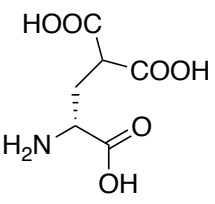
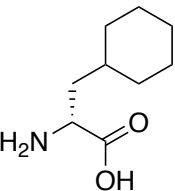
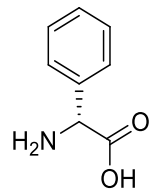
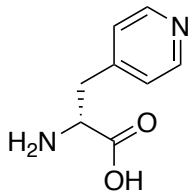
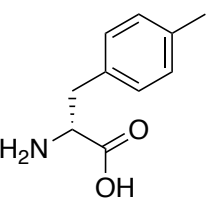
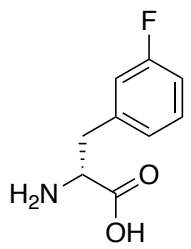
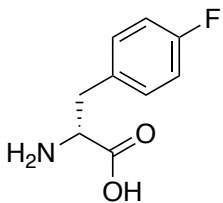
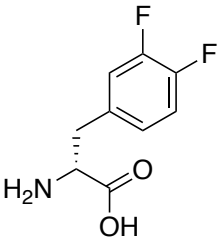
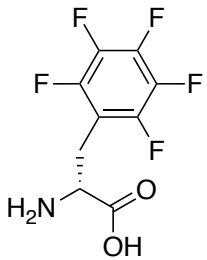
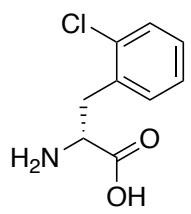
Zakres stężeń inhibitora wynosił od 3 nM do 25 μ M w zależności od badanego enzymu. Stężenie substratu kontrolnego (Ac-Ala-Arg-Leu-Arg-ACC) w przypadku katepsyny S wynosiło 100 μ M, dla pozostałych katepsynach 30 μ M, a całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej 100 μ L. Równolegle prowadzono również pomiar kontrolny, gdzie monitorowano hydrolizę substratu kontrolnego przez katepsyny potwierdzając aktywność enzymów.

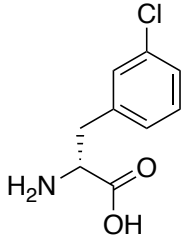
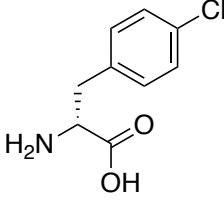
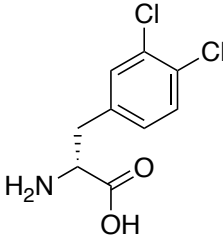
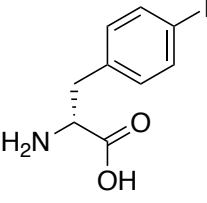
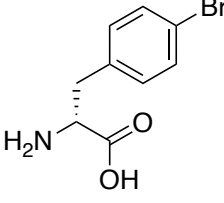
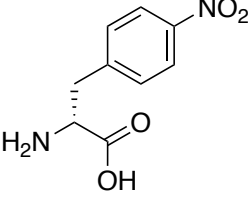
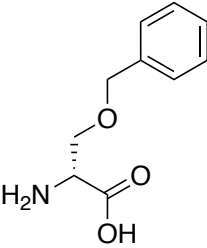
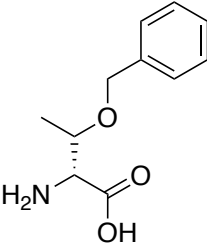
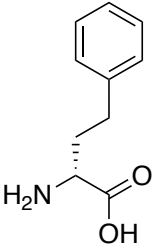
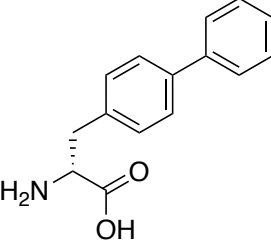
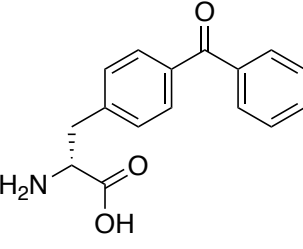
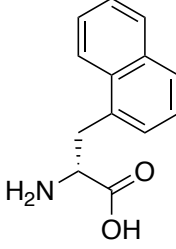
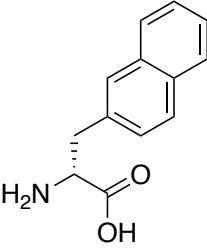
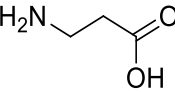
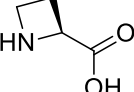
Do wyznaczenia pozornych stałych szybkości (k_{obs}) użyto programu GraphPad Prism wykorzystując wykres zależności stężenia inhibitora od przyrostu jednostek fluorescencji w czasie, który uzyskano w programie SoftMax Pro. Korzystając z analizy regresji liniowej uzyskano wartość pozornej stałej szybkości inhibicji II-rzędu ($k_{\text{obs(app)}/I}$). W kolejnym kroku liczbę tę pomnożono przez współczynnik $(1 + \frac{[S]}{K_M})$, gdzie K_M to stała Michaelisa-Menten wyznaczona dla substratu kontrolnego, a $[S]$ to użyte stężenie tego substratu w trakcie pomiaru. Otrzymana wartość to parametr $k_{\text{obs}/I}$. Każdy pomiar dla danego enzymu powtórzono przynajmniej dwukrotnie, wyznaczono średnią wartość i policzono odchylenie standardowe.

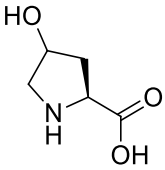
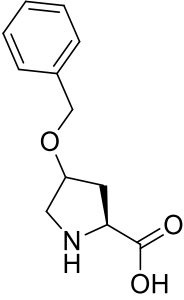
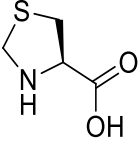
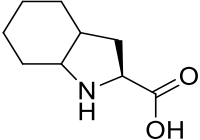
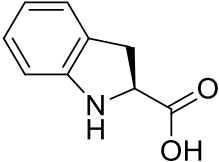
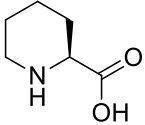
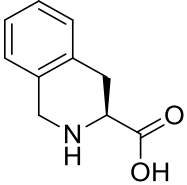
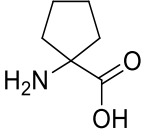
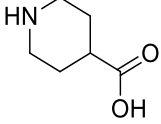
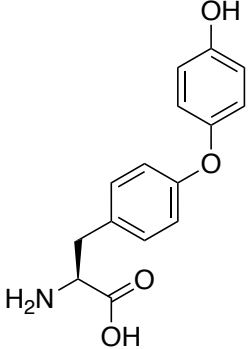
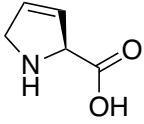
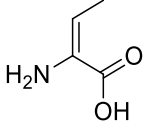
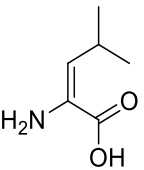
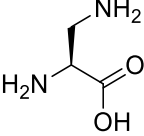
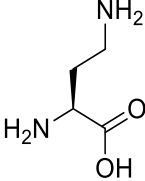
**6. STRUKTURY AMINOKWASÓW UŻYTYCH W BIBLIOTEKACH
HyCoSuL ORAZ W SUBSTRATACH ZDEFINIOWANYCH**

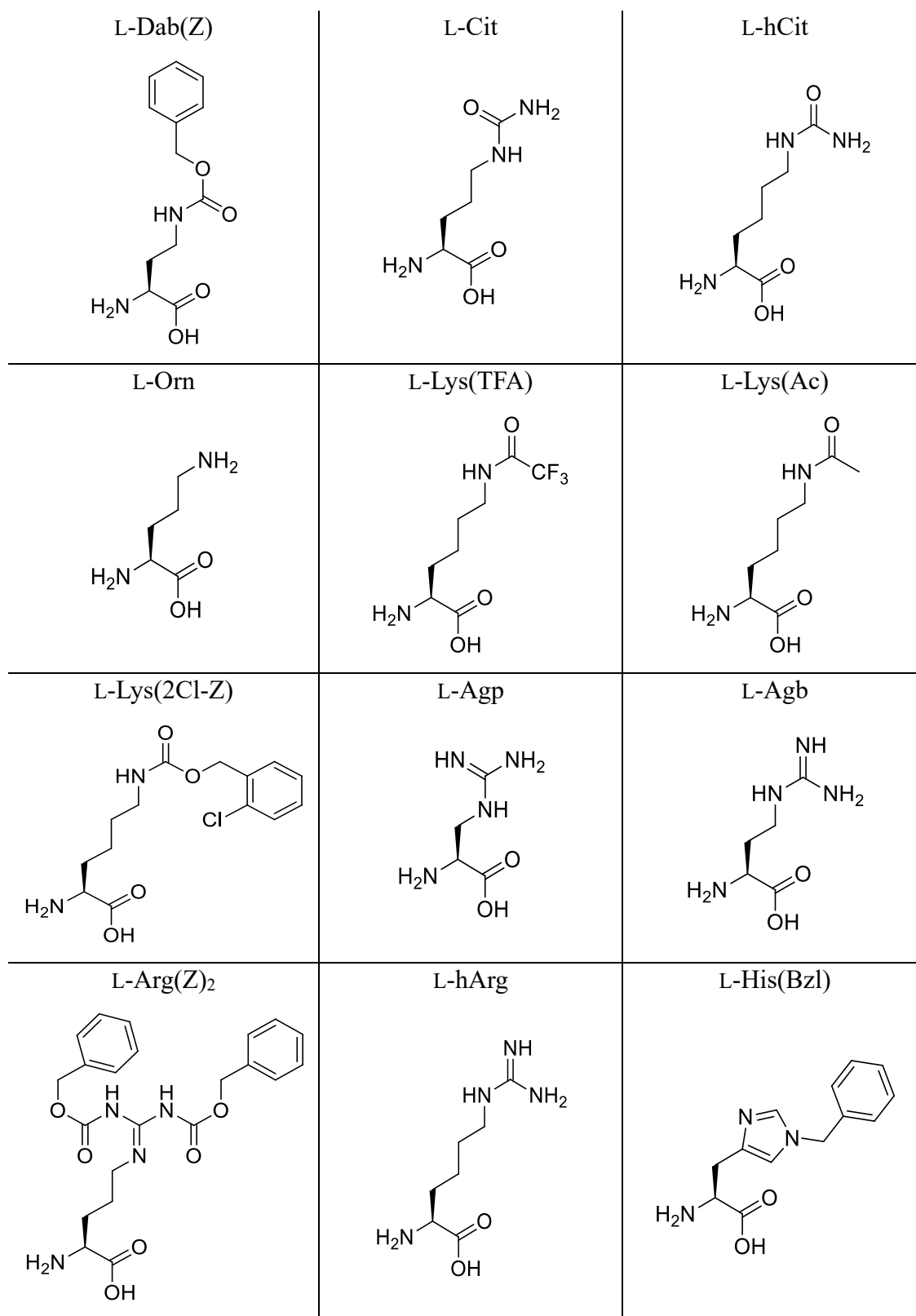
<p>L-Ala</p> 	<p>L-Arg</p> 	<p>L-Asn</p> 
<p>L-Asp</p> 	<p>L-Gln</p> 	<p>L-Glu</p> 
<p>Gly</p> 	<p>L-His</p> 	<p>L-Ile</p> 
<p>L-Leu</p> 	<p>L-Lys</p> 	<p>L-Nle</p> 
<p>L-Phe</p> 	<p>L-Pro</p> 	<p>L-Ser</p> 

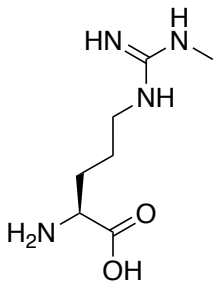
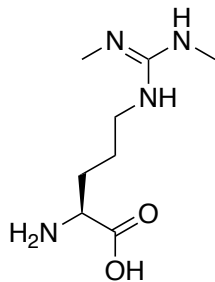
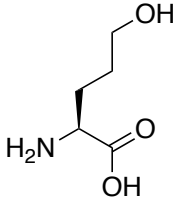
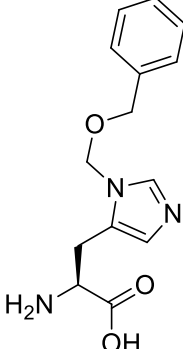
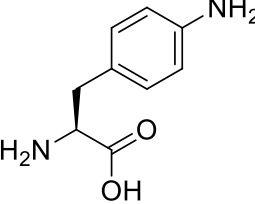
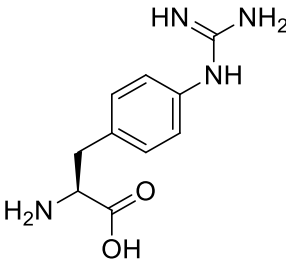
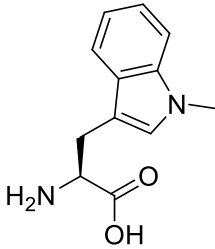
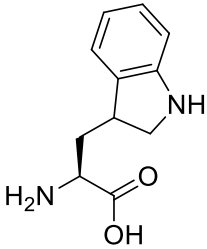
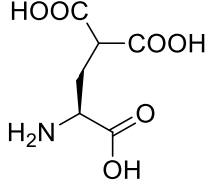
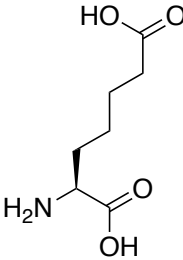
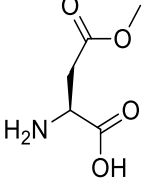
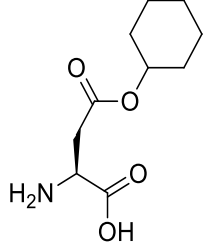
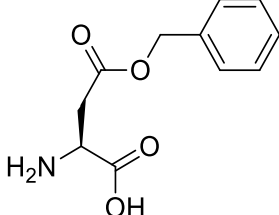
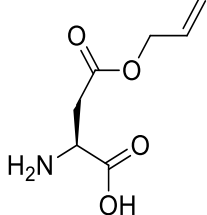
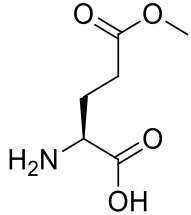
<p>L-Thr</p> 	<p>L-Trp</p> 	<p>L-Tyr</p> 
<p>L-Val</p> 	<p>D-Ala</p> 	<p>D-Arg</p> 
<p>D-Asn</p> 	<p>D-Asp</p> 	<p>D-Gln</p> 
<p>D-Glu</p> 	<p>D-His</p> 	<p>D-Leu</p> 
<p>D-Lys</p> 	<p>D-Phe</p> 	<p>D-Pro</p> 
<p>D-Ser</p> 	<p>D-Phe</p> 	<p>D-Thr</p> 

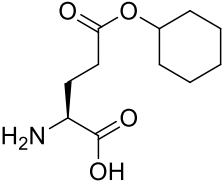
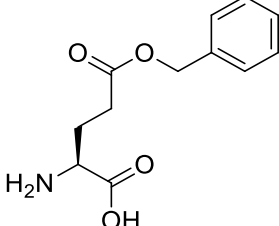
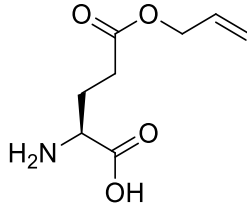
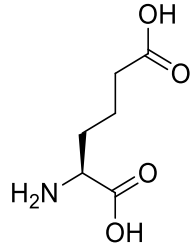
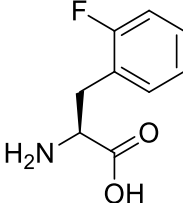
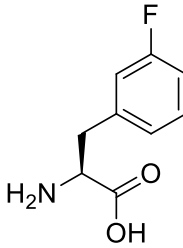
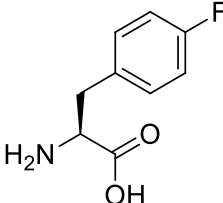
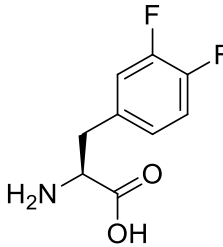
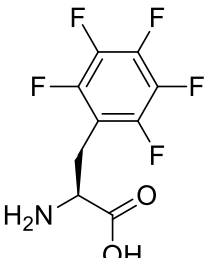
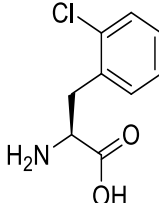
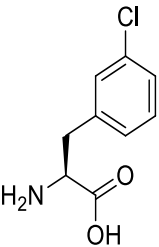
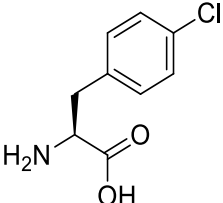
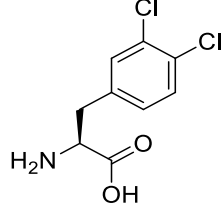
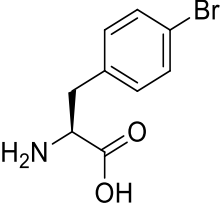
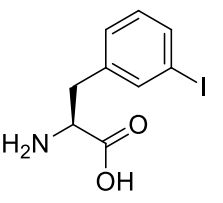
<p>D-Trp</p> 	<p>D-Tyr</p> 	<p>D-Val</p> 
<p>D-hPhe</p> 	<p>D-Tic</p> 	<p>D-Gla</p> 
<p>D-Cha</p> 	<p>D-Phg</p> 	<p>D-4-Pal</p> 
<p>D-Phe(4-Me)</p> 	<p>D-Phe(3-F)</p> 	<p>D-Phe(4-F)</p> 
<p>D-Phe(3,4-F2)</p> 	<p>D-Phe(F5)</p> 	<p>D-Phe(2-Cl)</p> 

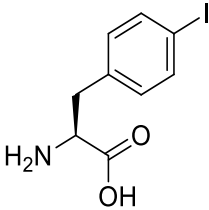
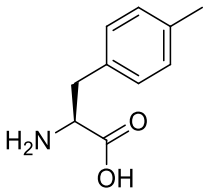
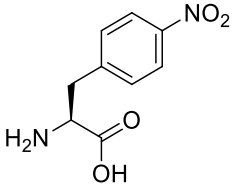
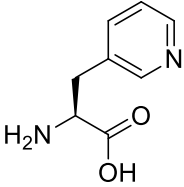
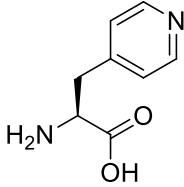
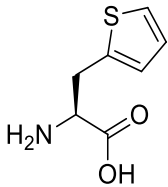
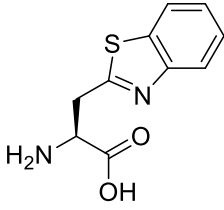
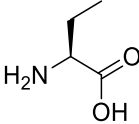
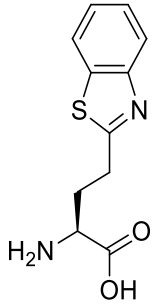
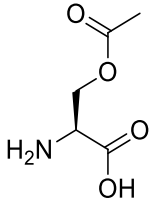
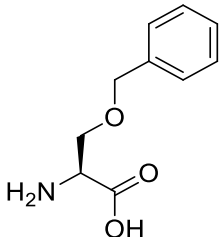
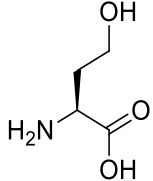
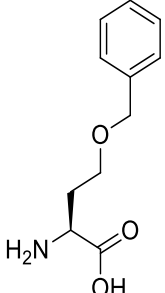
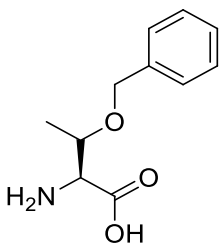
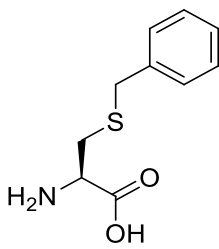
<p>D-Phe(3-Cl)</p> 	<p>D-Phe(4-Cl)</p> 	<p>D-Phe(3,4-Cl₂)</p> 
<p>D-Phe(4-I)</p> 	<p>D-Phe(4-Br)</p> 	<p>D-Phe(4-NO₂)</p> 
<p>D-Ser(Bzl)</p> 	<p>D-Thr(Bzl)</p> 	<p>D-hPhe</p> 
<p>D-Bip</p> 	<p>D-Bpa</p> 	<p>D-1-Nal</p> 
<p>D-2-Nal</p> 	<p>β-Ala</p> 	<p>L-Aze</p> 

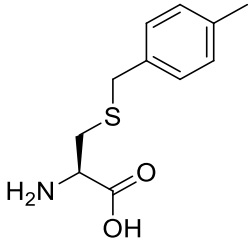
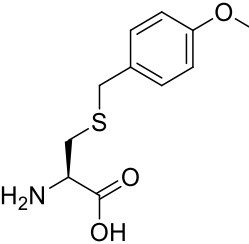
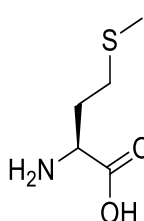
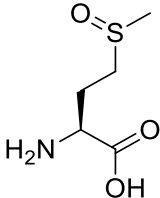
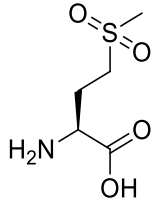
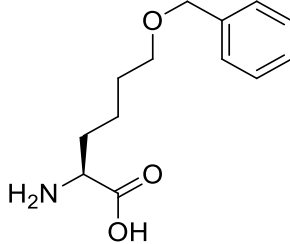
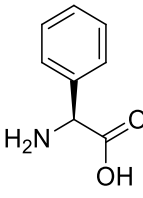
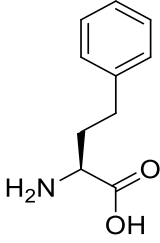
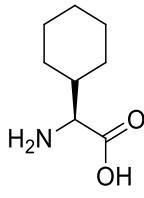
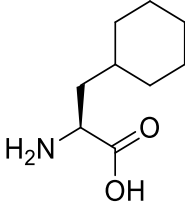
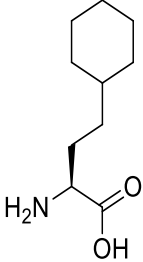
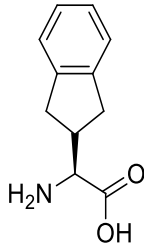
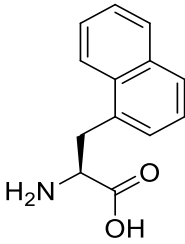
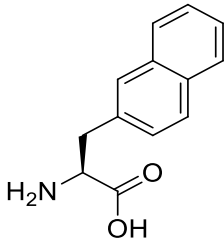
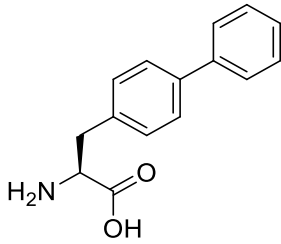
<p>L-Hyp</p> 	<p>L-Hyp(Bzl)</p> 	<p>L-Thz</p> 
<p>L-Oic</p> 	<p>L-Idc</p> 	<p>L-Pip</p> 
<p>L-Tic</p> 	<p>AC5C</p> 	<p>Inp</p> 
<p>L-Thyr</p> 	<p>L-dhPro</p> 	<p>dhAbu</p> 
<p>dhLeu</p> 	<p>L-Dap</p> 	<p>L-Dab</p> 

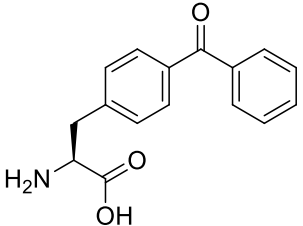
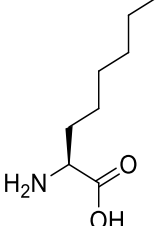
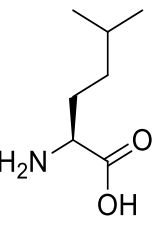
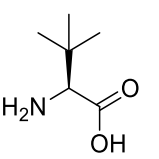
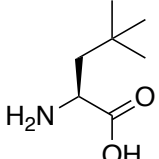
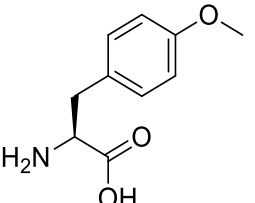
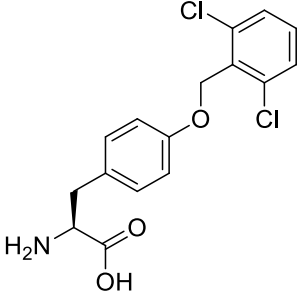
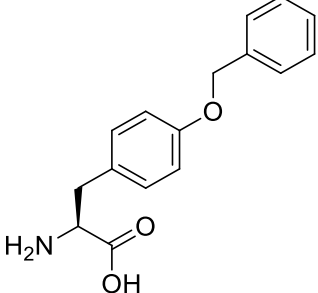
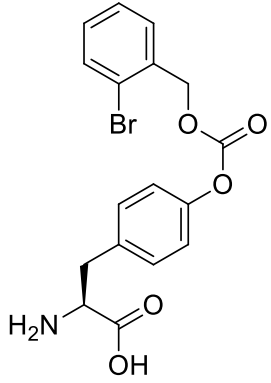
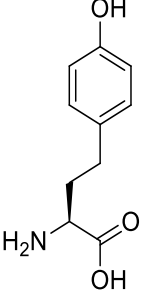
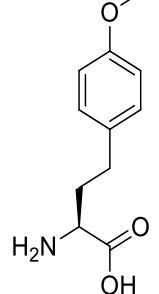
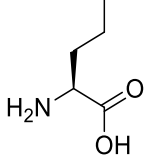
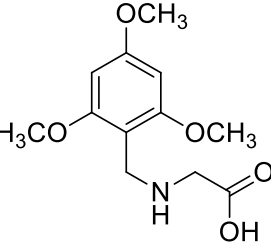
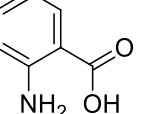
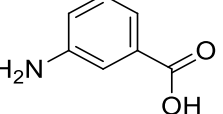


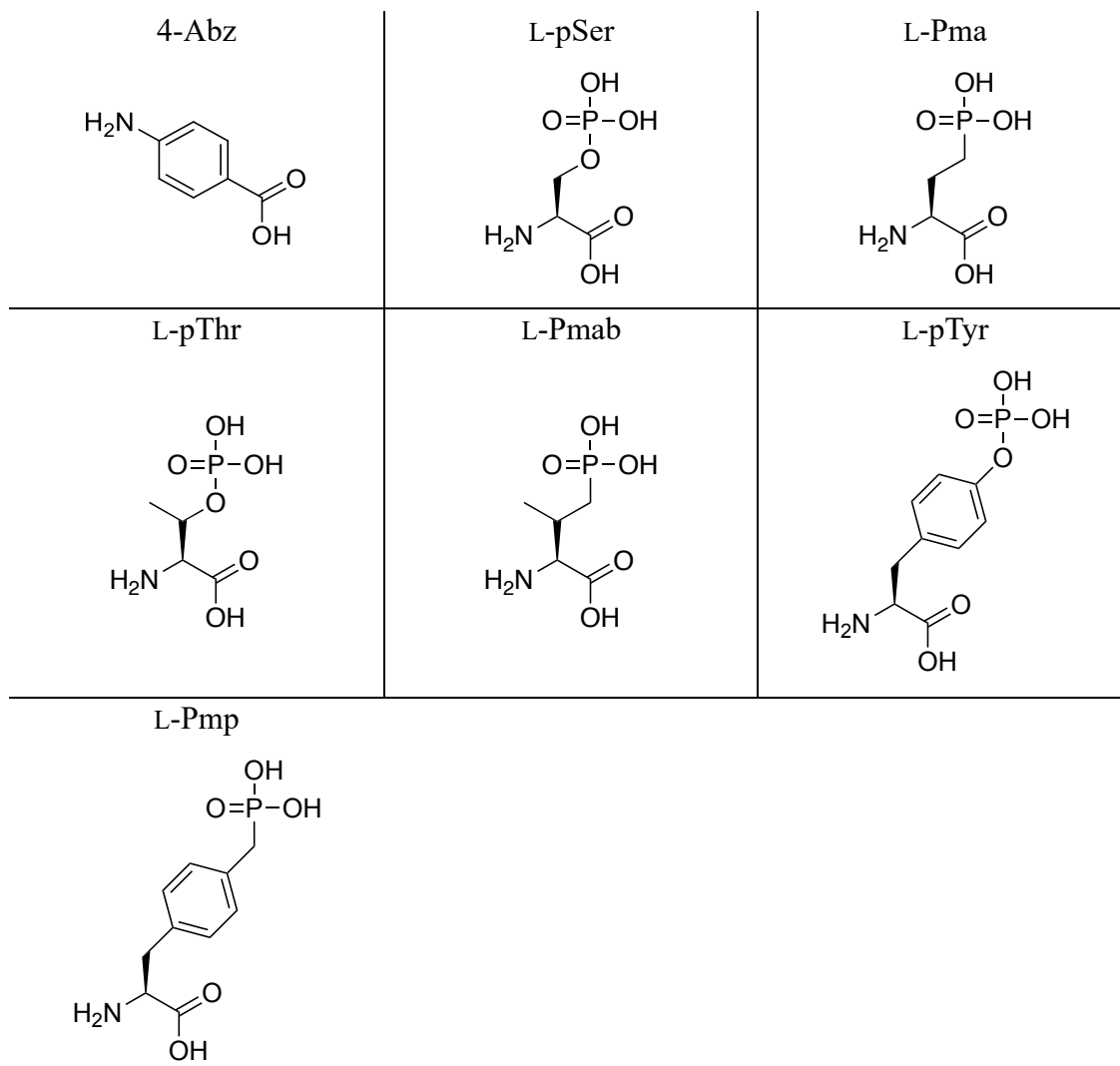
<p>L-Arg(Me)</p> 	<p>L-Arg(Me)₂</p> 	<p>L-Hnv</p> 
<p>L-His(3-Bom)</p> 	<p>L-Phe(4-NH₂)</p> 	<p>L-Phe(4-guan)</p> 
<p>L-Trp(Me)</p> 	<p>L-Dht</p> 	<p>L-Gla</p> 
<p>L-Api</p> 	<p>L-Asp(O-Me)</p> 	<p>L-Asp(O-cHx)</p> 
<p>L-Asp(O-Bzl)</p> 	<p>L-Asp(O-All)</p> 	<p>L-Glu(O-Me)</p> 

<p>L-Glu(O-cHx)</p> 	<p>L-Glu(O-Bzl)</p> 	<p>L-Glu(O-All)</p> 
<p>L-Aad</p> 	<p>L-Phe(2-F)</p> 	<p>L-Phe(3-F)</p> 
<p>L-Phe(4-F)</p> 	<p>L-Phe(3,4-F₂)</p> 	<p>L-Phe(F₅)</p> 
<p>L-Phe(2-Cl)</p> 	<p>L-Phe(3-Cl)</p> 	<p>L-Phe(4-Cl)</p> 
<p>L-Phe(3,4-Cl₂)</p> 	<p>L-Phe(4-Br)</p> 	<p>L-Phe(3-I)</p> 

<p>L-Phe(4-I)</p> 	<p>L-Phe(4-Me)</p> 	<p>L-Phe(4-NO₂)</p> 
<p>L-3-Pal</p> 	<p>L-4-Pal</p> 	<p>L-Ala(2-th)</p> 
<p>L-Ala(Bth)</p> 	<p>L-Abu</p> 	<p>L-Abu(Bth)</p> 
<p>L-Ser(Ac)</p> 	<p>L-Ser(Bzl)</p> 	<p>L-hSer</p> 
<p>L-hSer(Bzl)</p> 	<p>L-Thr(Bzl)</p> 	<p>L-Cys(Bzl)</p> 

<p>L-Cys(MeBzl)</p> 	<p>L-Cys(4-MeOBzl)</p> 	<p>L-Met</p> 
<p>L-Met(O)</p> 	<p>L-Met(O₂)</p> 	<p>L-Nle(6-OBzl)</p> 
<p>L-Phg</p> 	<p>L-hPhe</p> 	<p>L-Chg</p> 
<p>L-Cha</p> 	<p>L-hCha</p> 	<p>L-Igl</p> 
<p>L-1-Nal</p> 	<p>L-2-Nal</p> 	<p>L-Bip</p> 

<p>L-Bpa</p> 	<p>L-2-Aoc</p> 	<p>L-hLeu</p> 
<p>L-Tle</p> 	<p>L-NptGly</p> 	<p>L-Tyr(Me)</p> 
<p>L-Tyr(2,6-Cl₂-Bzl)</p> 	<p>L-Tyr(Bzl)</p> 	<p>L-Tyr(2-Br-Z)</p> 
<p>L-hTyr</p> 	<p>L-hTyr(Me)</p> 	<p>L-Nva</p> 
<p>TmbGly</p> 	<p>2-Abz</p> 	<p>3-Abz</p> 



7. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABP	-	marker chemiczny
Ac	-	grupa acetylowa
ACC	-	kwasy 7-amino-4-kumarynooctowe
ACN	-	acetonitryl
AcOH	-	kwasy octowe
AFC	-	7-amino-4-trifluorometylokumaryna
AMC	-	7-amino-4-metylokumaryna
Boc	-	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
DCM	-	dichlorometan
DICI	-	<i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DIPEA	-	<i>N,N</i> -diizopropyletyloamina
DMF	-	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	-	dimetylosulfotlenek
DTT	-	D,L-ditiotreitol
EDTA	-	sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
ESI-MS	-	spektrometria mas z elektrorozpyleniem
Et ₂ O	-	eter dietylowy
Fmoc	-	grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
HATU	-	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy heksafluorofosforan
HBTU	-	<i>O</i> -benzotriazol-(<i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy) heksafluorofosforan
HOBt	-	<i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HPLC	-	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HRMS	-	wysokorozdzielcza spektrometria mas
HyCoSuL	-	hybrydowa, kombinatoryczna biblioteka substratów
k_{kat}	-	liczba obrotów enzymu w jednostce czasu, wyrażona w s ⁻¹
k_{kat}/K_M	-	wydajność katalityczna enzymu względem substratu, wyrażona w M ⁻¹ s ⁻¹
K_M	-	stała Michaelisa-Menten, wyrażona w M
k_{obs}/I	-	drugorzędowa stała szybkości reakcji inhibicji w warunkach reakcji pseudopierwszorzędowej wyrażona w M ⁻¹ s ⁻¹
LC-MS	-	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
MeOH	-	metanol
MgSO ₄	-	siarczan magnezu

NaCl	-	chlorek sodu
NMR	-	jądrowy rezonans magnetyczny
P ₂ O ₅	-	pentatlenek difosforu
PIP	-	piperydyna
PS-SCL	-	skanowanie pozycyjne kombinatorycznych bibliotek substratów
RFU/s	-	jednostki względnego przyrostu fluorescencji na sekundę
TFA	-	kwasy trifluorooctowe
TFE	-	2,2,2-trifluoroetanol
TIPS	-	triizopropylsilan
Tris	-	tris(hydroksymetylo)aminometan

8. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. Wioletta Rut, Nis Valentin Nielsen, **Justyna Czarna**, Marcin Poręba, Sandip Kanse, Marcin Dąg, *Fluorescent activity-based probe for the selective detection of Factor VII activating protease (FSAP) in human plasma*. Thrombosis Research, 2019, 182, s. 124-132. IF(2019): 2,869,
2. Izabela Małuch, **Justyna Czarna**, Marcin Dąg, *Applications of unnatural amino acids in protease probes*. Chemistry-An Asian Journal, 2019, 14, s. 4103-4113, IF(2019): 4,056
3. Izabela Małuch, **Justyna Grzyska**, Scott J. Snipas, Guy S. Salvesen, Marcin Dąg, *Evaluation of the effects of phosphorylation of synthetic peptide substrates on their cleavage by caspase-3 and -7*, Biochemical Journal, 2021, 478, s. 2233-2245, IF(2021): 3,766
4. Robin Kryšťufek, Pavel Šácha, Jana Starková, Jiří Brynda, Martin Hradílek, Eva Tloušťová, **Justyna Grzyska**, Wioletta Rut, Michael J. Boucher, Marcin Dąg, Pavel Majer, Miroslav Hájek, Pavlína Řezáčová, Hiten D. Madhani, Charles S. Craik, Jan Konvalinka, *Re-emerging aspartic protease targets: Examining Cryptococcus neoformans Major Aspartyl Peptidase 1 as a target for antifungal drug discovery*, Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 64, s. 6706-6719, IF(2021): 8,039
5. Katarzyna M. Groborz, Małgorzata Kalinka, **Justyna Grzyska**, Sonia Kołt, Scott J. Snipas, Marcin Poręba, *Selective chemical reagents to investigate the role of caspase 6 in apoptosis in acute leukemia T cells*, Chemical Science, 2023, 14, s. 2289-2302, IF(2022): 8,4

Wystąpienia konferencyjne

1. **Justyna Czarna**, Wioletta Rut, Nis Valentin Nielsen, Marcin Poręba, Sandip Kanse, *Design of activity based probe for FSAP*. XII Copernican International Young Scientists Conference, 2018, Toruń, Polska – wystąpienie ustne
2. **Justyna Czarna**, Wioletta Rut, Nis Valentin Nielsen, Marcin Poręba, Sandip Kanse, Marcin Dąg, *Determination of extended substrate specificity of the FSAP*

using HyCoSuL approach. 36th Winter School on Proteases and Their Inhibitors, 2019, Tiers am Rosengarten, Włochy – wystąpienie ustne

3. **Justyna Czarna**, *Projektowanie markerów chemicznych do detekcji aktywności enzymów proteolitycznych*, IX Ogólnokrajowa Konferencja Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, 2019, Wrocław, Polska – wystąpienie ustne
4. **Justyna Czarna**, Wioletta Rut, Nis Valentin Nielsen, Marcin Poręba, Sandip Kanse, Marcin Drąg, *Development of Activity-Based Probe for FSAP*. XVII Ogólnopolskie Seminarium „Na pograniczu chemii i biologii”, 2019, Jastrzębia Góra, Polska – wystąpienie ustne

Nagrody, wyróżnienia i granty

1. Stypendium naukowe Rektora dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej (2017, 2020)
2. Stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych (2017, 2020)
3. Wyróżnienie dla najlepszego referatu wygłoszonego na konferencji „XII Copernican International Young Scientists Conference”, 2018, Toruń
4. I miejsce za najlepsze prezentacje ustne na konferencji XVII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii” 2019, Jastrzębia Góra
5. Grant TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2017-4/32) – realizacja projektu badawczego „Challenges in the design of selective activity-based probes for proteolytic enzymes” – wykonawca projektu (01.04.2018 – 31.09.2022)

9. LITERATURA

1. Barrett, A.J., *Proteases*, Current Protocols in Protein Science (2000), 21.1.1.-21.1.12
2. Rani K., R. Rana & S. Datt, *Review on latest overview of proteases*, International Journal of Current Life Sciences (2012), **2**(1): str. 12-18.
3. Moffitt, K.L., S.L. Martin & B. Walker, *Proteases implicated in apoptosis: old and new*. Journal of Pharmacy and Pharmacology (2010), **62**(5): str. 563-576.
4. Berg J.M., J.L. Tymoczko & L. Stryer, *Biochemia* (2009), str. 205-275
5. Radzicka, A. & R. Wolfenden, *Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases*. Journal of the American Chemical Society (1996), **118**(26): str. 6105-6109.
6. Moss G.P., *Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse*. 19.12.2022 [dostęp dnia: 30.03.2023]; Dostęp online: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>.
7. Lopez-Otin, C. & J.S. Bond, *Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease*. Journal of Biological Chemistry (2008), **283**(45): str. 30433-30437.
8. Mótyán, J.A., F. Toth & J. Tozser, *Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology*. Biomolecules (2013), **3**(4): str. 923-942.
9. Stauffer C.E. & E. Zeffren, *Concerning the mechanism of ester hydrolysis by proteases*. The Journal of Biological Chemistry (1970), **245**(13): str. 3282-3284
10. Drag, M. & G.S. Salvesen, *Emerging principles in protease-based drug discovery*. Nature Reviews Drug Discovery (2010), **9**(9): str. 690-701.
11. Walsh, P.N. & S.S. Ahmad, *Proteases in blood clotting*. Essays in Biochemistry, 2002. **38**: str. 95-111
12. Porter, A.G. & R.U. Janicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death and Differentiation (1999), **6**(2): str. 99-104.
13. Boffa, M.B., i in., *Roles of thermal instability and proteolytic cleavage in regulation of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor*. Journal of Biological Chemistry (2000), **275**(17): str. 12868-12878.

14. Jobling, J.W., W. Petersen, & A.A. Eggstein, *The Effect of Protein Split Products on the Serum Ferments and Antiferment: Studies on Ferment Action. XXVI.* Journal of Experimental Medicine (1915), **22**(5): str. 597-602.
15. Leathes, J.B., *On the products of the proteolytic action of an enzyme contained in the cells of the spleen.* Journal of Physiology (1902), **28**(5): str. 360-365.
16. Dakin, H.D., *The products of the proteolytic action of an enzyme contained in the cells of the kidney.* Journal of Physiology, 1903. **30**(1): str. 84-96.
17. Lutgens S.P.M., i in., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease.* The FASEB Journal (2007), **21**(12): str. 3029-3041
18. Parrish, A.B., C.D. Freel & S. Kornbluth, *Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function.* Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (2013), **5**(6): str. a008672
19. Lecaille F., J. Kaleta & D. Brömme, *Human and Parasitic Papin-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design.* Chemical Reviews, 102(12), str. 4459-4488.
20. Joyce J.A. & D. Hanahan, *Multiple Roles for Cysteine Cathepsins in Cancer,* Cell Cycle 3(12): str. 1516-1519.
21. Eatemadi, A., i in., *Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment.* Biomedicine & Pharmacotherapy (2017), **86**: str. 221-231.
22. Singh, R.B., i in., *Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease.* Molecular and Cellular Biochemistry (2004), **263**(1): str. 241-256.
23. Khan, A.R. & M.N.G. James, *Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes.* Protein Science (1998), **7**(4): str. 815-836.
24. Einarsson, S. & P.S. Davies, *On the localisation and ultrastructure of pepsinogen, trypsinogen and chymotrypsinogen secreting cells in the Atlantic salmon, Salmo salar L.* Comparative Biochemistry and Physiology (1996), **114**(3): str. 295-301
25. Chai, S.C. & Q-Z. Ye, *Metal-mediated inhibition is a viable approach for inhibiting cellular methionine aminopeptidase.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2009), **19**(24): str. 6862-6864.
26. Deveraux, Q.L. & J.C. Reed, *IAP family proteins - suppressors of apoptosis.* Genes & Development (1999), **13**(3): str. 239-52.

27. Earnshaw, W.C., L.M. Martins & S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annual Review of Biochemistry (1999), **68**(1): str. 383-424.
28. Kasperkiewicz, P., A.D. Gajda & M. Drag, *Current and prospective applications of non-proteinogenic amino acids in profiling of proteases substrate specificity*. Biological Chemistry, 2012. **393**(9): str. 843-851.
29. Poreba, M. & M. Drag, *Current Strategies for Probing Substrate Specificity of Proteases*. Current Medicinal Chemistry, 2010. **17**(33): str. 3968-3995.
30. Berger, A.B., K.B. Sexton & M. Bogyo, *Commonly used caspase inhibitors designed based on substrate specificity profiles lack selectivity*. Cell Research (2006), **16**(12): str. 961-963.
31. Julien, O. & J.A. Wells, *Caspases and their substrates*. Cell Death and Differentiation (2017), **24**(8): str. 1380-1389.
32. Choe, Y., i in., *Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(18): str. 12824-12832.
33. Hewings D.S., i in., *Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights*. FEBS Journal, 2017. **284**(10): str. 1555-1576.
34. Schechter, I. & A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **27**(2): str. 157-162.
35. Puente, X.S., i in., *A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems*. Biochemical Society Transactions, 2005. **33**(2): str. 331-334.
36. Rawlings N.D., i in., *The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**(D1): str. D624-D632.
37. MEROPS – the Peptidase Database, Release 12.5, dostęp online: <https://www.ebi.ac.uk/merops/> (dostęp dnia 20.06.2023 r.)
38. Bergmann, M. and W.F. Ross, *On proteolytic enzymes X. The enzymes of papain and their activation*. Journal of Biological Chemistry, 1936. **114**(3): str. 717-726.
39. Barrett, A.J. & J.K. McDonald, *Nomenclature: protease, proteinase and peptidase*. Biochemical Journal (1986), **237**(3): str. 935.

40. van der Velden, V.H.J. & A.R. Hulsmann, *Peptidases: structure, function and modulation of peptide-mediated effects in the human lung*. Clinical and Experimental Allergy (1999), **29**(4): str. 445-456.
41. Mckay, M.J., et al., *Action of Human-Liver Cathepsin-B on the Oxidized Insulin B-Chain*. Biochemical Journal (1983), **213**(2): str. 467-471.
42. Kieliszek, M., i in., *Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria*. Molecules (2021), **26**, 1858
43. Hartley, B.S., *Proteolytic Enzymes*. Annual Review of Biochemistry (1960), **29**: str. 45-72
44. Seemuller, E., i in., *The proteasome from Thermoplasma acidophilum is neither a cysteine nor a serine protease*. FEBS Letters (1995), **359**(2-3): str. 173-178.
45. Seemuller, E., i in., *Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease*. Science (1995), **268**(5210): str. 579-82.
46. Fujinaga, M., i in., *The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from Scytalidium lignicolum*. PNAS (2004), **101**(10): str. 3364-3369.
47. Elsasser B. & P. Goettig, *Mechanisms of proteolytic enzymes and their inhibition in QM/MM Studies*, International Journal of Molecular Sciences (2021), **22**: str. 3232
48. Razzaq A., M.B. Afzal, Z. Haider, *Proteases and Serine Proteases Mechanisms*, Molecular Biology (2021), 10(1): 271
49. Rawlings, N.D., A.J. Barrett & A. Bateman, *Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes*. Journal of Biological Chemistry (2011), **286**(44): p. 38321-38328.
50. Liz, M.A. & M.M. Sousa, *Deciphering cryptic proteases*. Cellular and Molecular Life Sciences (2005), **62**(9): str. 989-1002.
51. Grzonka, Z., i in., *Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors*. Acta Biochimica Polonica (2001), **48**(1): str. 1-20.
52. Chapman, H.A., R.J. Riese, & G.P. Shi, *Emerging roles for cysteine proteases in human biology*. Annual Review of Physiology (1997), **59**(1): str. 63-88.
53. Rzychon, M., D. Chmiel & J. Stec-Niemczyk, *Modes of inhibition of cysteine proteases*. Acta Biochimica Polonica (2004), **51**(4): str. 861-873.

54. Storer, A.C. & R. Menard, *Catalytic Mechanism in Papain Family of Cysteine Peptidases*. *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* (1994), **244**: str. 486-500.
55. Brömme D., *Papain-like Cystine Proteases*. *Current Protocols in Protein Science* (2000), 21(1): 21.2.1-21.2.14.
56. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and prospects*. *Nature Reviews Drug Discovery* (2006), **5**(9): str. 785-799.
57. Balls, A.K., H. Lineweaver & R.R. Thompson, *Crystalline Papain*. *Science* (1937), **86**(2234): str. 379.
58. Coulombe, R., i in., *Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment*. *The EMBO Journal* (1996), **15**(20): str. 5492-5503.
59. Tao, K., i in., *The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1994), **311**(1): str. 19-27.
60. Cuozzo, J.W., i in., *Lysine-based structure in the proregion of procathepsin L is the recognition site for mannose phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry* (1995), **270**(26): str. 15611-15619.
61. Novinec M., B. Lenarcic & B. Turk, *Cysteine cathepsin activity regulation by glycosaminoglycans*, *BioMed Research International* (2014), str. 1-9.
62. Mason, R.W. & S.D. Massey, *Surface activation of pro-cathepsin L*. *Biochemical Biophysical Research Communications* (1992), **189**(3): str. 1659-1666.
63. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Families of cysteine peptidases*. *Methods in Enzymology* (1994), **244**: str. 461-86.
64. Powers, J.C., i in., *Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases*. *Chemical Reviews* (2002), **102**(12): str. 4639-4750.
65. Alvarez-Fernandez, M., i in., *Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site*. *Journal of Biological Chemistry* (1999), **274**(27): str. 19195-19203.
66. Chen, J-M., i in., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. *FEBS Letters* (1998), **441**(3): str. 361-365.

67. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, *Introduction: The Clans and Families of Cysteine Peptidases*, Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, 2013, str. 1743-1773
68. Fuentes-Prior P., G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochemical Journal, **384**(2), str. 210-232.
69. Seaman, J.E., i in., *Cacidas: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues*. Cell Death and Differentiation (2016), **23**(10): str. 1717-1726.
70. Timmer J.C. & G.S. Salvesen, *Caspase substrate*, Cell Death and Differentiation (2007), **14**: str. 66-72
71. Alnemri, E.S., i in., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell (1996), **87**(2): str. 171.
72. Cerretti, D.P., i in., *Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Science (1992), **256**(5053): str. 97-100.
73. Thornberry, N.A., i in., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature (1992), **356**(6372): str. 768-774.
74. Miura, M., et al., *Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3*. Cell, 1993. **75**(4): str. 653-60.
75. Yuan, J.Y., i in., *The C-Elegans Cell-Death Gene Ced-3 Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1-Beta-Converting Enzyme*. Cell (1993), **75**(4): str. 641-652.
76. Reed J.C. et al., *Comparative Analysis of Apoptosis and Inflammation Genes of Mice and Humans*. Genome Research (2003), **13**(6): str. 1376-1388.
77. Lavrik, I.N., A. Golks, & P.H. Krammer, *Caspases: pharmacological manipulation of cell death*. The Journal of Clinical Investigation (2005), **115**(10): str. 2665-2672.
78. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. Cell Death and Differentiation (1999), **6**(11): str. 1028-1042.
79. McIlwain, D.R., T. Berger & T.W. Mak, *Caspase Functions in Cell Death and Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(4): a008656

80. Hofmann, K., P. Bucher & J. Tschopp, *The CARD domain: A new apoptotic signalling motif*. Trends in Biochemical Sciences (1997), **22**(5): str. 155-156.
81. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: Enemies within*. Science (1998), **281**(5381): str. 1312-1316.
82. Denault, J.B. & G.S. Salvesen, *Caspases: Keys in the ignition of cell death*. Chemical Reviews (2002), **102**(12): str. 4489-4499.
83. Galluzzi, L., i in., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death and Differentiation (2012), **19**(1): str. 107-120.
84. Ameisen, J.C., *On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years*. Cell Death and Differentiation (2002), **9**(4): str. 367-393.
85. Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie & A.R. Currie, *Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics*. British Journal of Cancer (1972), **26**(4): str. 239-257
86. Arvanitis, M., i in., *Apoptosis in C. elegans: lessons for cancer and immunity*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (2013), **3**(67).
87. Woodcock, J., *Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis*. IUBMB Life, 2006. **58**(8): str. 462-466.
88. Syntichaki, P. & N. Tavernarakis, *Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?* EMBO Reports (2002), **3**(7): str. 604-609.
89. Fulda S., i in., *Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death*, International Journal of Cell Biology (2010), str. 1-23
90. Green, D.R. & J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*, Science (1998), **281**(5381): str. 1309-1312.
91. Korsmeyer, S.J., i in., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death and Differentiation (2000), **7**(12): str. 1166-1173.
92. Li, P., i in., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell (1997), **91**(4): str. 479-489.
93. Mahdizadeh S.J., M. Thomas & L.A. Eriksson, *Reconstruction of the Fas-Based Death-Inducing Signaling Complex (DISC) Using a Protein-Protein*

- Docking Meta-Approach*, Journal of Chemical Information and Modeling (2021), **61**: str. 3543-3558
94. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature (2000), **407**(6805): str. 770-776.
 95. Gonzalez F. i in., *tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak*, Cell Death and Differentiation (2005), **12**: str. 614-626.
 96. Cossu, F., i in., *Targeting the BIR Domains of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins in Cancer Treatment*. Computational and Structural Biotechnology Journal (2019), **17**: str. 142-150.
 97. Riedl, S.J., i in., *Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP*. Cell (2001), **104**(5): str. 791-800.
 98. Chai, J., i in., *Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP*. Cell (2001), **104**(5): p. 769- 780.
 99. Huang, Y., i in., *Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain*. Cell (2001), **104**(5): str. 781-790.
 100. Degterev A., i in., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*, Nature Chemical Biology (2005), **1**(2): str. 112-119.
 101. Wang G., i in., *Necroptosis: a potential, promising target and switch in acute pancreatitis*, Apoptosis, 2016; **21**(2): p. 121-129.
 102. Negroni, A., S. Cucchiara, & L. Stronati, *Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis*. Mediators of Inflammation (2015), str. 1-10
 103. Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Many stimuli pull the necrotic trigger; an overview*. Cell Death and Differentiation (2012). **19**(1): str. 75-86.
 104. Cookson, B.T. & M.A. Brennan, *Pro-inflammatory programmed cell death*. Trends in Microbiology (2001), **9**(3): str. 113-114.
 105. Zychlinsky, A., M.C. Prevost & P.J. Sansonetti, *Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages*. Nature (1992), **358**(6382): str. 167-169
 106. Yu P., i in., *Pyroptosis: mechanisms and diseases*, Signal Transduction and Targeted Therapy (2021) **6**(1): str. 128.

107. Liu, X., i in., *Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores*. Nature (2016), **535**(7610): str. 153-158
108. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, & E.S. Alnemri, *CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Journal of Biological Chemistry (1994), **269**(49): str. 30761-30764.
109. Teraoka, H., i in., *CPP32/Yama/apopain cleaves the catalytic component of DNA-dependent protein kinase in the holoenzyme*. FEBS Letters (1996), **393**(1): str. 1-6.
110. Elmore, S., *Apoptosis: A review of programmed cell death*. Toxicologic Pathology (2007), **35**(4): str. 495-516.
111. Fernandes-Alnemri, T., i in., *Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32*. Cancer Research (1995), **55**(24): str. 6045-6052.
112. Beghe V. T., K. Kersse & P. Vandenabeele, *Caspase-3 and Caspase-7*. Handbook of Proteolytic Enzymes (2013): str. 2256-2265
113. Pop C. & G.S. Salvesen, *Human Caspases: Activation, Specificity and Regulation*, The Journal of Biological Chemistry (2009), **284**(33): str. 21777-21781
114. Oberst A., i in., *Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both porocesses in caspase-8 activation*, The Journal of Biological Chemistry (2010) **285**(22): str. 16632-16642.
115. Stennicke, H.R., i in., *Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8*. Biochemical Journal (2000), **350**: str. 563-568.
116. Fu G., i in., *Structural Basis for Executioner Caspase Recognition of P5 Position in Substrates*, Apoptosis (2008), **13**(11): str. 1291-1302
117. Poreba, M., i in., *Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates*. Cell Death and Differentiation (2014), **21**(9): str. 1482-1492.
118. Kuo H-C., et al., *CASP3 gene single-nucleotide polymorphism (rs72689236) and Kawasaki disease in Taiwanese children*, Journal of Human Genetics (2011), **56**(2): str.161-165
119. Devarajan E., i in., *Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance*, Oncogene (2002), **21**(57): str. 8843-8851

120. Alghasi A., i in., *Single nucleotide polymorphisms associated with gastric cancer in Iranian patients*. Immunopathologia Persa (2021), **7**(2): e37
121. Jang J.S., i in., *Identification of polymorphisms in the Caspase-3 gene and their association with lung cancer risk*, Molecular Carcinogenesis (2008), **47**(5): str. 383-390.
122. Mittal R.D., i in., *Association of death receptor 4, Caspase 3 and 5 gene polymorphism with increased risk to bladder cancer in North Indians*, EJSO (2011), **37**(8): str. 727-733.
123. Garcia-Lozano J.R., i in., *Caspase 7 influences susceptibility to rheumatoid arthritis*, Rheumatology (2007), **46**(8): str. 1243-1247.
124. Lee K. L., i in., *Polymorphisms in the Caspase7 gene and the risk of lung cancer*. Lung Cancer (2009), **65**(1): str. 19-24
125. Xu H.I., i in. *Polymorphisms and haplotypes in the Caspase 3, 7, and 8 genes and risk for endometrial cancer: a population-based, case-control study in a Chinese population*, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (2009), **18**(7): str. 2114-2122.
126. Yadati T. i in., *The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management*, Cells (2020), **9**(7): str. 1679
127. Gutmann, H.R. & J.S. Fruton, *On the proteolytic enzymes of animal tissues; an intracellular enzyme related to chymotrypsin*. Journal of Biological Chemistry, 1948. **174**(3): str. 851-858.
128. Takio, K. i in., *Homology of amino acid sequences of rat liver cathepsins B and H with that of papain*. PNAS, 1983. **80**(12), str. 3666-3670.
129. Musil, D., i in., *The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity*. EMBO Journal (1991), **10**(9): str. 2321-2330.
130. Turk V., i in., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers*, Biochemica et Biophysica Acta (2012), **1824**(1): str. 68-88.
131. Conus S. & H.U Simon., *Cathepsins and their involvement in immune responses*, Swiss Medical Weekly (2010), **140**: w13042
132. Turk V. & W. Bode, *The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinase*, FEBS Letters (1991), **285**(2): str. 213-219.
133. Turk V., Turk B., Turk D., *Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities*, The EMBO Journal (2001), **20**(17): str. 4629-4633.

134. Turk B., Turk D & Turk V., Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers, *Biochemica et Biophysica Acta* (2000), **1477**(1-2): str. 98-111
135. Janiszewski T., i in., *Investigation of osteoclast cathepsin K activity in osteoclastogenesis and bone loss using a set of chemical reagents*, *Cell Chemical Biology* (2023), **30**(2): str. 159-174
136. Hsing L.C. & A.Y.Rudensky, *The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation*. *Immunological Reviews*, **207**(1): str. 229-241.
137. Brömme D. i in., *Human Cathepsin V Functional Expression, Tissue Distribution, Electrostatic Surface Potential, Enzymatic Characterization, and Chromosomal Localization*. *Biochemistry* (1999), **38**(8): str. 2377-2385.
138. Turnsek, T., I. Kregar, D. Lebez, *Acid sulphhydryl protease from calf lymph nodes*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1975), **403**(2), str. 514-520.
139. Kirschke H., i in., *Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins*, *Biochemical Journal* (1989), **264**(2): str. 467–473.
140. Lutzner, N. & H. Kalbacher, *Quantifying cathepsin S activity in antigen presenting cells using a novel specific substrate*. *The Journal of Biological Chemistry* (2008), **283**(52): str. 36185-36194
141. Kirschke, H., *Cathepsin S*. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (2013), Vols 1 and 2, 3rd Edition, str. 1824-1830
142. Wilkinson, R.D.A., i in., *Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential*. *Biological Chemistry* (2015), **396**(8): str. 867-882
143. Smyth, P., i in., *Cathepsin S (CTSS) activity in health and disease - A treasure trove of untapped clinical potential*. *Molecular Aspects of Medicine* (2022), **88**: 101106
144. Deschamps, K., i in., *Genetic and pharmacological evaluation of cathepsin S in a mouse model of asthma*, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (2011), **45**(1), str. 81-87
145. Liu, J., i in., *Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (2004), **24**(8): str. 1359-1366.
146. Small, D. M., R. E. Burden, & C. J. Scott, *The Emerging Relevance of the Cysteine Protease Cathepsin S in Disease*, *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* (2011), **9**(2): str. 122–132

147. Barclay J., i in. *Role of the cysteine protease cathepsin S in neuropathic hyperalgesia*, Pain (2007), **130**(3): str. 225–234.
148. Clark A.K., i in., *Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain*, PNAS (2007), **104**(25): str. 10655-10660.
149. Kwiatkowski K. & J. Mika, *Rola chemokin w bólu neuropatycznym*, Ból (2014), **15**(1): str. 19-35
150. Flannery T., i in., *The clinical significance of cathepsin S expression in human astrocytomas*. American Journal of Pathology (2003), **163**(1): str. 175–182
151. Flannery T., i in., *Cathepsin S expression: an independent prognostic factor in glioblastoma tumours - A pilot study*. International Journal of Cancer (2006), **119**(4): str. 854–860.
152. Dix, M.M., G.M. Simon & B.F. Cravatt, *Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis*. Cell (2008), **134**(4): str. 679-691.
153. Van Damme, P., i in., *Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis*. Nature Methods (2005), **2**(10): str. 771-777
154. Enoksson, M., i in., *Identification of proteolytic cleavage sites by quantitative proteomics*. Journal of Proteome Research (2007), **6**(7): str. 2850-2858.
155. Merrifield R.B., *Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie International Edition in English (1985), **24**(10): str. 799-810.
156. Merrifield B., *The Role of the Support in Solid Phase Peptide Synthesis*, British Polymer Journal, 1984; **16**: str. 173-178
157. Merrifield R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society (1963), **85**(14): str. 2149-2154.
158. Furka, A., i in., *General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures*. International Journal of Peptide and Protein Research (1991), **37**(6): str. 487-93.
159. Furka A., *Forty years of combinatorial technology*, Drug Discovery Today (2022), **27**(10): str. 1-12
160. Ostresh, J.M., i in., *Peptide libraries: determination of relative reaction rates of protected amino acids in competitive couplings*. Biopolymers (1994), **34**(12): str. 1681- 1689.

161. Rano, T.A., i in., *A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE)*. Chemistry & Biology (1997), **4**(2): str. 149-155.
162. Cheng, J.D., i in., *Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model*. Cancer Research (2002), **62**(16): str. 4767-4772.
163. Zimmerman, M., i in., *Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates*. Analytical Biochemistry (1977), **78**(1): str. 47-51.
164. Maly, D.J., i in., *Expedient solid-phase synthesis of fluorogenic protease substrates using the 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC) fluorophore*. Journal of Organic Chemistry (2002), **67**(3): str. 910-915.
165. Poreba, M., et al., *Caspase Substrates and Inhibitors*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (2013), **5**(8).
166. Feinstein, G., A. Kupfer, & M. Sokolovsky, *N-acetyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide as a new chromogenic substrate for elastase*. Biochemical and Biophysical Research Communications (1973), **50**(4): str. 1020-1026.
167. Gladysz R. i in., *Repositioning the Substrate Activity Screening (SAS) Approach as a Fragment-Based Method for Identification of Weak Binders*. ChemBioChem (2014), **15**(15): str. 2238-2247.
168. Patterson, A.W., W.J. Wood, & J.A. Ellman, *Substrate activity screening (SAS): a general procedure for the preparation and screening of a fragment-based non-peptidic protease substrate library for inhibitor discovery*, Nature Protocols (2007), **2**(2): str. 424-33
169. Wood, W.J.L., i in., *Substrate activity screening: a fragment-based method for the rapid identification of nonpeptidic protease inhibitors*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(44): str. 15521-15527.
170. Gladysz, R., i in., *Substrate Activity Screening (SAS) and Related Approaches in Medicinal Chemistry*. ChemMedChem, 2016. **11**(5): str. 467-476.
171. Patterson, A.W., i in., *Identification of selective, nonpeptidic nitrile inhibitors of cathepsin s using the substrate activity screening method*. Journal of Medicinal Chemistry (2006), **49**(21): str. 6298-307.

172. Kasperkiewicz P., i in., *Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling*. PNAS (2014), **111**(7): str. 2518-2523.
173. Rut W., i in., *Recent advances and concepts in substrate specificity determination of proteases using tailored libraries of fluorogenic substrates with unnatural amino acids*. Biological Chemistry (2015), **396**(4): str. 329-337
174. Poreba, G.S. Salvesen, M. Drag, *Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity*. Nature Protocols (2017), **12**(10): str. 2189-2214.
175. Modrzycka S., i in., *Parallel imaging of coagulation pathway proteases activated protein C, thrombin, and factor Xa in human plasma*. Chemical Science (2022), **13**: str. 6813-6829
176. Rut W. i in., *Selective Substrates and Activity-Based Probes for Imaging of the Human Constitutive 20S Proteasome in Cells and Blood Samples*. Journal of Medicinal Chemistry (2018), **61**(12): str. 5222-5234.
177. Rut W., i in., *Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate Dengue from Zika and West Nile viruses*. Antiviral Research (2020), **175**: str. 104731.
178. Maggiora, L.L., C.W. Smith, and Z.Y. Zhang, *A general method for the preparation of internally quenched fluorogenic protease substrates using solid-phase peptide synthesis*. Journal of Medicinal Chemistry (1992), **35**(21): str. 3727-3730
179. Yaron, A., A. Carmel & E. Katchalski-Katzir, *Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes*. Analytical Biochemistry (1979), **95**(1): str. 228-235.
180. Wysocka, M., i in., *Substrate specificity of human matriptase-2*. Biochimie (2014), **97**: str. 121-127.
181. Puzer, L., et al., *Comparative substrate specificity analysis of recombinant human cathepsin V and cathepsin L*. Archives of Biochemistry Biophysics (2004), **430**(2): str. 274-283.
182. Alves, F.M., i in., *Controlled peptide solvation in portion-mixing libraries of FRET peptides: improved specificity determination for Dengue 2 virus*

- NS2B-NS3 protease and human cathepsin S*. Journal of Combinatorial Chemistry (2007), **9**(4): str. 627-34.
183. Poreba, M., i in., *Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): str. 43135.
184. Krumpe L.R.H. & Mori T., *The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs*, International Journal of Peptide Research and Therapeutics (2006), **12**(1): str. 79-91
185. Matthews, D.J. & J.A. Wells, *Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display*. Science (1993), **260**(5111): str. 1113-1117.
186. Smith, M.M., L. Shi & M. Navre, *Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries*. Journal of Biological Chemistry (1995), **270**(12): str. 6440-6449.
187. Deperthes D., *Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity*. Biological Chemistry (2002), **383**(7-8): str. 1107-1112.
188. Beck Z.Q., i in., *Identification of efficiently cleaved substrates for HIV-1 protease using a phage display library and use in inhibitor development*. Virology (2000), **274**(2): str. 391-401.
189. Gallwitz M., i in., *The extended cleavage specificity of human thrombin*. PLoS ONE (2012), **7**(2): str. e31756.
190. Yi, L., i in., *Engineering of TEV protease variants by yeast ER sequestration screening (YESS) of combinatorial libraries*. PNAS (2013), **110**(18): str. 7229-7234.
191. Li, Q., i in., *Profiling Protease Specificity: Combining Yeast ER Sequestration Screening (YESS) with Next Generation Sequencing*. ACS Chemical Biology (2017), **12**(2): str. 510-518.
192. Winssinger, N., i in., *PNA-encoded protease substrate microarrays*. Chemistry & Biology, 2004. **11**(10): str. 1351-1360.
193. Vizovisek M., i in., *Current trends and challenges in proteomic identification of protease substrates*. Biochimie (2016), **122**: str. 77-87.
194. Schilling, O. & C.M. Overall, *Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites*. Nature Biotechnology (2008), **26**(6): str. 685-694

195. Van Damme P., i in., *A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation*. BMC Proceedings (2009), **3**(Suppl 6): str. S6
196. Kleifeld O., i in., *Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates*. Nature Protocols (2011), **6**(10): str. 1578-1611.
197. Vidmar R., i in., *Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain*. The EMBO Journal (2017), **36**(16): str. 2455-2465.
198. Shen A., *Allosteric regulation of protease activity by small molecules*. Molecular BioSystems (2010), **6**(8): str. 1431-1443
199. Craik C.S., M.J. Page & E.L. Madison, *Proteases as therapeutics*. Biochemical Journal (2011), **435**(1): str. 1-16.
200. Sanrattana W., C. Maas & S. de Maat, *SERPINS – From trap to treatment*, Frontiers in Medicine (2019), **6**(25).
201. Turk, B., D. Turk & G.S. Salvesen, *Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators*. Current Pharmaceutical Design (2002), **8**(18): str. 1623-37.
202. Kempf, D.J., i in., *Discovery of ritonavir, a potent inhibitor of HIV protease with high oral bioavailability and clinical efficacy*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(4): str. 602-617.
203. Deu, E., M. Verdoes & M. Bogyo, *New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery*. Nature Structural & Molecular Biology, (2012), **19**(1): str. 9-16.
204. Heal, W.P., T.H. Dang & E.W. Tate, *Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets*. Chemical Society Reviews (2011), **40**(1): str. 246-257.
205. Poreba M., et al., *Multiplexed Probing of Proteolytic Enzymes Using Mass Cytometry-Compatible Activity-Based Probes*. Journal of American Chemical Society, 2020. **142**(39): s. 16704-16715.
206. Fonovic, M. & M. Bogyo, *Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases*. Expert Review of Proteomics (2008), **5**(5): str. 721-730.

207. Pan Z. i in., *Development of activity-based probes for trypsin-family serine proteases*, Bioorganic & Medical Chemistry Letters (2006), **16**(11): str. 2882-2885
208. Liu Y., M.P Patricelli & B.F Cravatt., *Activity-based protein profiling: The serine hydrolases*, PNAS 1999, **96**(26): str. 14694-14699
209. Oleksyszyn J. & J.C. Powers, *Irreversible inhibition of serine proteases by peptidyl derivatives of alpha-aminoalkylphosphonate diphenyl esters*, Biochemical and Biophysical Research Communications (1989), **161**(1): str. 143-149
210. Powers, J.C., i in., *Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases*. Chemical Reviews (2002), **102**(12): str. 4639-750.
211. Verdoes M., i in., *Azido-BODIPY Acid Reveals Quantitative Staudinger-Bertozzi Ligation in Two-Step Activity-Based Proteasome Profiling*, ChemBioChem (2008), **9**(11): str. 1735-1738
212. Greenbaum D., i in., *Chemical Approaches for Functionally Probing the Proteome*. Molecular & Cellular Proteomics (2001), **1**(1): str. 60-68
213. Cull, M.G. & P.J. Schatz, *Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags*. Methods in Enzymology (2000), **326**: str. 430-440.
214. de Boer, E., i in., *Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice*. PNAS (2003), **100**(13): str 7480-7485.
215. Fang H., i in., *Recent advances in activity-based probes (ABPs) and affinity-based probes (AfBPs) for profiling of enzymes*. Chemical Science (2021), **12**: str. 8288-8310
216. Sanman, L.E. & M. Bogoy, *Activity-based profiling of proteases*. Annual Review of Biochemistry (2014), **83**(1): str. 249-273.
217. Poreba M., i in., *Counter Selection Substrate Library Strategy for Developing Specific Protease Substrates and Probes*. Cell Chemical Biology (2016), **23**(8): str. 1023-1035.
218. Maluch I., i in., *Applications of Unnatural Amino Acids in Protease Probes*. Chemistry – An Asian Journal (2019), **14**(23): str. 4055-4429.
219. Shaulov-Rotem, Y., i in., *A novel quenched fluorescent activity-based probe reveals caspase-3 activity in the endoplasmic reticulum during apoptosis*. Chemical Science (2016), **7**(2): str. 1322-1337.

220. Blum, G., i in., *Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes*. Nature Chemical Biology (2005), **1**(4): str. 203-209.
221. Bender, K.O., i in., *Design of a highly selective quenched activity-based probe and its application in dual color imaging studies of cathepsin S activity localization*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(14): str. 4771-4777.
222. Caglic, D., i in., *Functional in vivo imaging of cysteine cathepsin activity in murine model of inflammation*. Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011), **19**(3): str. 1055-1061.
223. Jessani, N., i in., *Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness*. PNAS (2002), **99**(16): str. 10335-10340.
224. Heal, W.P., T.H. Dang, & E.W. Tate, *Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets*. Chemical Society Reviews (2011), **40**(1): str. 246-257.
225. Buelna-Chontal M., i in., *Implications and Oxidative and NitroSative Post-Translational Modifications in Therapeutic Strategies against Reperfusion Damage*, Antioxidants (2021), **10**(5): str. 749.
226. Wang, Y. C., S. E. Peterson & J. F. Loring, *Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells*. Cell Research (2014) **24**, 143-160
227. Deribe, Y. L., T. Pawson & I. Dikic, *Post-translational modifications in signal integration*. Nature Structural & Molecular Biology (2010), **17**(6): str. 666-672
228. Duan, G. & D. Walther, *The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks*. PLOS Computational Biology (2015), **11**(2): e1004049
229. Mann, M., i in., *Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome*. Trends in Biotechnology (2002) **20**(6): str. 261-268
230. Uversky VN, *Posttranslational Modification*, Brenner's Encyclopedia of Genetics, (2013), **5**: str. 425-430.

231. Ramazi S. & J. Zahiri, *Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods*, Database (2021): baab012.
232. Levene P. A., and C. L. Alsberg, *The Cleavage Products of Vitellin*. Journal of Biological Chemistry, 1906. **2**(1): str. 127–133.
233. Pawson, T. & J.D. Scott *Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting*. Trends in Biochemical Sciences (2005), **30**(6): str. 286–290.
234. Forrest, A.R. i in., *PhosphoregDB: the tissue and sub-cellular distribution of mammalian protein kinases and phosphatases*. BMC Bioinformatics (2006), **7**(1): str. 82.
235. Gong,W., i in., *PepCyber: P~PEP: a database of human protein–protein interactions mediated by phosphoprotein-binding domains*. Nucleic Acids Research., Database, **36**: str. D679–D683.
236. Gong C.X. & K. Iqbal, *Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease*, Current Medicinal Chemistry (2008), **15**(23): str. 2321-2328.
237. Vanselow K., i in., *Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)*, Genes & Development (2006), **20**: str. 2660-2672.
238. Pearlman, S.M., Z. Serber, & J.E. Ferrell Jr. *A mechanism for the evolution of phosphorylation sites*. Cell (2011), **147**(4): str. 934-946
239. Tozser J., i in., *Effect of caspase cleavage-site phosphorylation on proteolysis*, The Biochemical Journal (2003), **372**: str. 137-143.
240. Attwood P.V., P.G. Besant & M.J. Piggott, *Focus on phosphoaspartate and phosphoglutamate*. Amino Acids (2011), **40**(4): str. 1035-1051
241. Besant P.G., P.V. Attwood & M.J. Piggott, *Focus on phosphoarginine and phospholysine*, Current Protein & Peptide Science (2009), **10**(6): str. 536-550
242. Klumpp S. & J. Krieglstein, *Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins*, European Journal of Biochemistry (2002), **269**(4): str. 1067-1071.
243. Kumar, S. & Cieplak, P., *Effect of phosphorylation and single nucleotide polymorphisms on caspase substrates processing*. Apoptosis (2018), **23**(3-4): str. 194-200

244. Rut, W., i in., *Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease*, Antiviral Research (2017), **139**: str: 88-94.
245. Burke M.C., i in., *Unexpected trypsin cleavage at ubiquitinated lysines*, Analytical Chemistry (2015), **87**(16): str. 8144-8148.
246. Sprung R., i in., *Identification and Validation of Eukaryotic Aspartate and Glutamate Methylation in Proteins*. Journal of Proteome Research (2008), **7**(3): str. 1001-1006.
247. Poreba, M., i in., *Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes*, Chemical Science (2019), **9**: str. 2113-2129.
248. Poreba M., i in., *Fluorescent probes towards selective cathepsin B detection and visualization in cancer cells and patient samples*, Chemical Science (2019), **10**: 8461-8477
249. Rückrich T., i in., *Specificity of human cathepsin S determined by processing of peptide substrates and MHC class II-associated invariant chain*. Biological Chemistry (2006), **387**(10): str. 1503-1511.
250. Harris, J.L., i in., *Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries*, PNAS, **97**(4): 7754-7759
251. Modrzycka S., i in., *Fluorescent Activity-Based Probe To Image and Inhibit Factor XIa Activity in Human Plasma*, Journal of Medicinal Chemistry (2023), **66**: str. 3785-3797.
252. Ng N.M., R.N. Pike & S.E. Boyd, *Subsite cooperativity in protease specificity*, Biological Chemistry (2009), **390**, str. 401-407.
253. Ullman B.R. i in., *Structure-Activity Relationships within a Series of Caspase Inhibitors: Effect of Leaving Group Modifications*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2003), **13**(20): str. 3623-3626.
254. Carreon J.R., i in., *Cyanine dye conjugates as probes for live cell imaging*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007), **17**(18): str. 5182-5185.
255. Degli E.M., i in., *Post-translational Modification of Bid Has Differential Effects on Its Susceptibility to Cleavage by Caspase 8 or Caspase 3*, The Journal of Biological Chemistry (2003), **278**(18): str. 15749-15757.

256. Turowec, J. P. i in., *An unbiased proteomic screen reveals caspase cleavage is positively and negatively regulated by substrate phosphorylation*, *Molecular & Cellular Proteomics* (2104), **13**(5): str. 1184-1197
257. Dix M.M., i in., *Functional Interplay between Caspase Cleavage and Phosphorylation Sculpt the Apoptotic Proteome*, *Cell*, 150: str. 426-440.
258. Duncan J.S., i in., *A Peptide-Based Target Screen Implicates the Protein Kinase CK2 in the Global Regulation of Caspase Signaling*, *Science Signalling* (2011), **4**(172): ra30
259. Crawford, E. D., i in., *The DegraBase: a database of proteolysis in healthy and apoptotic human cells*. *Molecular & Cellular Proteomics* (2013) **12**(3): str. 813-824
(DegraBase 1.0, dostęp online: <https://wellslab.ucsf.edu/degrabase/index.htm>, dostęp dnia 21.07.2023 r.)
260. Byun, Y., i in., *Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis*, *Cell Death and Differentiation* (2001), **8**(5): str. 443-450
261. Los M., i in., *Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling*, *Molecular Biology of the Cell* (2002), **13**(3): str. 978-988.
262. Stennicke, H.R. i G.S. Salvesen, *Caspases: preparation and characterization*, *Methods* (1999), **17**(4): str. 313-319.
263. Mihelic M. i in., *Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation*, *The Journal of Biological Chemistry* (2008), **283**(21): str. 14453–14460.
264. Brömme D., F. S. Nallaseth & B. Turk, *Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases*, *Methods* (2004), **32**(2), str. 199–206.
265. Kasperkiewicz P. i in., *Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4*, *PLOS ONE* (2015), **10**(7): e0132818
266. Poręba M. i in., *Positional Scanning Substrate Combinatorial Library (PS-SCL) Approach to Define Caspase Substrate Specificity*, *Methods in Molecular Biology* (2014), **1133**: str. 41-59