

**Politechnika Wroclawska**  
**Wydział Chemiczny**  
**Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania**

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**mgr inż. Mikołaj Żmudziński**

Opracowanie strategii syntezy pochodnych ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy w celu otrzymania specyficznych i selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów deubikwitynujących

Promotor:  
prof. dr hab. Marcin Drąg  
Promotor pomocniczy:  
dr inż. Wioletta Rut

Wrocław 2023





*Podziękowania*

*Dziękuję mojemu promotorowi, **prof. dr. hab. Marcinowi Drągowi** za ciekawą tematykę projektu doktorskiego oraz za możliwość pracy i rozwoju w sprzyjającej temu atmosferze. Serdecznie dziękuję mojej promotor pomocniczej, **dr inż. Wioletcie Rut** za przekazaną wiedzę oraz za to, że mogłem w każdej chwili liczyć na jej pomoc. **Rodzinie** oraz **Kasi** za nieustanne wsparcie, cierpliwość oraz stworzenie idealnych warunków do tego, abym mógł w pełni zaangażować się w pracę naukową. **Justynie, Sylwii, Radkowi** oraz pozostałym **Koleżankom i Kolegom** z zespołu za to, że w wielu sprawach to Wy byliście moją głową na karku oraz zawsze mogłem liczyć na Waszą pomoc i wsparcie.*

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.



*Z dedykacją dla Rodziny i Kasi*



## Spis treści

1. Wstęp teoretyczny .....	11
1.1. Wprowadzenie .....	11
1.2. Enzymy deubikwitynujące.....	14
1.2.1. Ubikwityna i ubikwitynacja.....	14
1.2.2. DUBs.....	16
1.2.3. DUBs jako cele molekularne .....	19
1.2.4. C-końcowa hydrolaza ubikwityny-L3 (UCH-L3) .....	21
1.2.5. MERS-CoV PL <sup>pro</sup> .....	23
1.3. Narzędzia chemiczne w badaniu proteaz.....	26
1.3.1. Specyficzność substratowa enzymów deubikwitynujących .....	26
1.3.2. Metody określania specyficzności substratowej proteaz .....	29
1.3.2.1. Metody chemiczne – biblioteki substratów peptydowych.....	29
1.3.2.2. Metody wykorzystujące spektrometrię mas .....	33
1.3.2.3. Metody biologiczne .....	35
1.3.2.4. Specyficzność substratowa DUBs względem łańcuchów poli-Ub .....	36
1.3.3. Markery chemiczne w badaniu enzymów proteolitycznych.....	38
1.3.4. Markery chemiczne do badania DUBs .....	40
1.3.5. Selektowności narzędzi chemicznych do badania DUBs .....	43
1.3.5.1. Dobór C-końcowego elektrofilowego ugrupowania.....	43
1.3.5.2. Metody wykorzystujące prezentację fagową.....	44
1.3.5.3. Metody wykorzystujące projektowanie mutantów Ub <i>in silico</i> .....	45
1.4. Synteza pochodnych ubikwityny .....	46
1.4.1. Metody semisyntetyczne.....	46
1.4.2. Metody syntezy totalnej.....	47
1.4.2.1. Wykorzystanie SPPS .....	47
1.4.2.2. Wykorzystanie reakcji NCL .....	48

2. Cel pracy.....	52
3. Badania własne.....	54
3.1. Określenie specyficzności substratowej MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3 .....	54
3.1.1. Zaprojektowanie biblioteki substratów do badania specyficzności substratowej DUBs w pozycji P2.....	54
3.1.2. Synteza zdefiniowanej biblioteki Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC .....	55
3.1.3. Specyficzność substratowa MERS-CoV PL <sup>pro</sup> i UCH-L3 w pozycji P2 .....	56
3.1.4. Biblioteka HyCoSuL do badania specyficzności substratowej DUBs w pozycjach P3 i P4.....	58
3.1.5. Określenie specyficzności substratowej MERS-CoV PL <sup>pro</sup> i UCH-L3 w pozycjach P3 i P4 za pomocą biblioteki HyCoSuL .....	59
3.1.5.1. MERS-CoV PL <sup>pro</sup> .....	59
3.1.5.2. UCH-L3 .....	61
3.2. Tetrapeptydowe substraty dla MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3 .....	62
3.2.1. Zaprojektowanie i synteza tetrapeptydowych substratów dla MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3 .....	62
3.2.2. Selektowność oraz specyficzność zsyntezowanych tetrapeptydowych substratów .....	64
3.3. Podsumowanie – selektywne tetrapeptydowe substraty dla MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3.....	67
3.3.1. Specyficzność substratowa MERS-CoV PL <sup>pro</sup> w pozycjach P4-P2.....	67
3.3.2. Specyficzność substratowa UCH-L3 w pozycjach P4-P2 .....	68
3.3.3. Selektowne, tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne dla MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3.....	69
3.4. Fluorogeniczne pochodne Ub zawierające zmodyfikowany C-końcowy fragment sekwencji peptydowej.....	69
3.4.1. Synteza hydrazydowych segmentów .....	71
3.4.2. Kondensacja peptydowych hydrazydów z wykorzystaniem reakcji natywnej chemicznej ligacji (NCL) .....	72



3.4.3. Desulfuryzacja i funkcjonalizacja C-końca pochodnych Ub.....	74
3.4.4. Zbadanie selektywności fluorogenicznych substratów.....	76
3.4.5. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla zsyntezowanych substratów .....	77
3.5. Dyskusja wyników – nienaturalne pochodne Ub jako selektywne i specyficzne substraty dla DUBs .....	79
3.6. Biotynyłowane markery chemiczne pochodne Ub do badania DUBs.....	82
3.6.1. Zaprojektowanie markerów chemicznych do selektywnej detekcji MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3 .....	82
3.6.2. Synteza markerów chemicznych.....	83
3.6.3. Inhibicja rekombinowanych enzymów przez zsyntezowane markery chemiczne .....	84
3.6.4. Określenie selektywności markerów chemicznych .....	85
3.6.4.1. Detekcja MERS-CoV PL <sup>pro</sup> w lizatach komórkowych.....	86
3.6.4.2. Detekcja UCH-L3 w lizatach komórkowych.....	89
3.7. Dyskusja wyników – nienaturalne pochodne Ub jako selektywne markery chemiczne do detekcji DUBs.....	92
4. Podsumowanie i wnioski końcowe .....	96
5. Część eksperymentalna .....	103
5.1. Synteza Fmoc-ACC-OH .....	103
5.2. Synteza zdefiniowanej biblioteki tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych P2 .....	106
5.3. Określenie profilu specyficzności substratowej MERS-CoV PL <sup>pro</sup> oraz UCH-L3 w pozycjach P4-P2 .....	111
5.4. Synteza tetrapeptydowych substratów dla DUBs.....	111
5.5. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla tetrapeptydowych substratów.....	112
5.6. Zbadanie selektywności tetrapeptydowych substratów względem DUBs .....	112
5.7. Synteza pochodnych ubikwityny .....	113
5.7.1. Synteza hydrazydowych segmentów peptydowych.....	113
5.7.2. Reakcje natywnej chemicznej ligacji (NCL) .....	115

5.7.3. Reakcja rodnikowej desulfuryzacji .....	116
5.7.4. Synteza reaktywnej grupy wiążącej H <sub>2</sub> N-Gly-VME .....	117
5.7.5. Synteza fluorogenicznej grupy H <sub>2</sub> N-Gly-ACC.....	118
5.7.6. Derywatywacja C-końca pochodnych Ub.....	119
5.8. Badanie selektywności substratów pochodnych Ub .....	120
5.9. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla substratów pochodnych Ub .....	120
5.10. Detekcja DUBs w lizatach komórkowych .....	121
5.11. Pomiar inhibicji DUBs przez markery chemiczne.....	122
5.12. Wyznaczenie $k_{obs}/I$ dla markerów chemicznych.....	122
6. Struktury aminokwasów użytych w bibliotece HyCoSuL oraz w zdefiniowanej bibliotece P2 .....	123
7. Wykaz stosowanych skrótów .....	132
8. Dorobek naukowy i aktywność dodatkowa .....	134
9. Piśmiennictwo .....	137

## 1. Wstęp teoretyczny

### 1.1. Wprowadzenie

Enzymy proteolityczne (proteazy, peptydazy) są enzymami należącymi do klasy hydrolaz (EC 3.4), których zadaniem jest hydroliza wiązań peptydowych znajdujących się między resztami aminokwasowymi w białkach i peptydach [1]. Baza MEROPS, która kataloguje informacje o substratach i inhibitorach proteaz, podaje, że w ludzkim organizmie występują 703 peptydazy [2], z czego aktywność katalityczną posiada 588 z nich [2, 3]. Około 2% genów we wszystkich organizmach to geny kodujące peptydazy lub ich homologi, co podkreśla znaczenie enzymów z tej grupy [2]. Istnieje kilka rodzajów klasyfikacji proteaz. Najczęściej stosuje się podział ze względu na mechanizm działania, w którym kluczowy jest rodzaj nukleofila atakującego węgiel karbonylowy hydrolizowanego wiązania peptydowego. W proteazach cysteinowych, serynowych i treoninowych nukleofilem jest reaktywna grupa hydroksylowa lub sulfhydrylowa reszty aminokwasowej w miejscu aktywnym, natomiast w proteazach aspartylowych, glutaminianowych i metaloproteazach nukleofilem jest aktywowana cząsteczka wody [4]. Innym często stosowanym podziałem peptydaz jest podział ze względu na lokalizację hydrolizowanego wiązania w substracie. Wyróżnia się w nim endopeptydazy, omega-peptydazy, egzopeptydazy, aminopeptydazy, karboksypeptydazy, peptydazy dipeptydylowe, peptydazy tripeptydylowe, dipeptydazy peptydylowe oraz dipeptydazy [2].

Proteazy pełnią w organizmach żywych wiele funkcji i biorą udział m.in. w transkrypcji i translacji, podziale i różnicowaniu się komórek, przebudowie tkanek, angiogenezie, odpowiedzi immunologicznej, procesie krzepnięcia krwi, procesach programowanej śmierci komórki czy homeostazie białkowej w komórkach [5, 6]. W związku z tym enzymy te stanowią ważny cel w poszukiwaniu skutecznych leków w chorobach takich jak nadciśnienie [7-9], zaburzenia krzepliwości krwi [10, 11], cukrzyca typu 2 [12], nowotwory [13] oraz niektóre choroby zakaźne [14-16]. Istotnym problemem z punktu widzenia projektowania nowych peptydowych terapeutyków, dla których celem molekularnym są proteazy, jest nakładająca się specyficzność substratowa tych enzymów. Za przykład ilustrujący to zjawisko mogą posłużyć kaspazy – peptydazy zaangażowane przede wszystkim w procesy związane z programowaną śmiercią komórki – apoptozą. Enzymy te cechuje wysoka specyficzność wobec substratów zawierających kwas asparaginowy w pozycji P1. W celu zaprojektowania substratów, które będą selektywne wobec poszczególnych kaspaz, Poręba i in. wykorzystali do zbadania specyficzności substratowych

tych enzymów biblioteki peptydowych substratów zawierające w swoich strukturach ponad 100 nienaturalnych aminokwasów. Wykorzystanie bogatej puli aminokwasów nieproteinogenicznych z łańcuchami bocznymi o różnych właściwościach umożliwiło syntezę selektywnych substratów dla kaspazy 6, 8, 9 i 10. Nie było to jednak możliwe dla kaspazy 3 i 7 ze względu na ich bliskie pokrewieństwo [17].

Do najczęściej wykorzystywanych narzędzi chemicznych w badaniach nad proteazami należą peptydowe substraty, inhibitory oraz tzw. markery chemiczne (ang. activity-based probes, ABPs). Substraty zawierające w swojej strukturze znacznik fluorogeniczny stosuje się w badaniach aktywności proteaz *in vitro* [18] lub *in vivo* [19, 20]. Inhibitory to związki chemiczne, które poprzez związanie się do enzymu hamują jego aktywność katalityczną [21]. Markery chemiczne również wiążą się do enzymów, ale od inhibitorów odróżnia je obecność tzw. grupy reporterowej. Jest to ugrupowanie umożliwiające wizualizację cząsteczki, do której kowalencyjnie związał się użyty marker chemiczny. Umożliwia to zbadanie poziomu aktywności enzymów, a nawet określenie ich lokalizacji wewnątrz komórek czy tkanek [22, 23].

W celu osiągnięcia selektywności względem wybranych enzymów, narzędzia chemiczne używane w badaniach proteaz zawierają najczęściej krótką sekwencję peptydową (tzw. linker), rozpoznawaną przez dany enzym. Jednak takie podejście w projektowaniu selektywnych narzędzi chemicznych nie sprawdza się w przypadku wszystkich peptydaz, czego przykładem są enzymy deubikwitynujące (DUBs). DUBs wykazują aktywność izopeptydazową, co oznacza, że hydrolizują wiązania  $\epsilon$ -amidowe, występujące między C-końcową grupą karboksylową małego białka regulatorowego, ubikwityny (Ub), a grupą  $\epsilon$ -aminową łańcucha bocznego lizyny zawartej w białku, do którego przyłączona jest Ub. Krótkie peptydowe linkery są niewystarczające do zaprojektowania narzędzi chemicznych, które będą selektywnie i specyficznie rozpoznawane przez enzymy z tej grupy. DUBs są wysoce specyficzne wobec cząsteczki Ub ze względu na sposób, w jaki wiążą swoje substraty. Wiązanie substratu odbywa się w dwóch regionach enzymu – domenach wiążących Ub na powierzchni enzymu, które wiążą się z wybranymi regionami Ub oraz w obrębie miejsca aktywnego, gdzie DUBs oddziałują z C-końcowym motywem LRGG cząsteczki Ub [24, 25].

Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest racjonalnemu projektowaniu oraz syntezie substratów i markerów chemicznych dla enzymów deubikwitynujących. Opisana w dysertacji strategia syntezy pochodnych ubikwityny umożliwia otrzymanie selektywnych narzędzi chemicznych do badania DUBs. Metoda ta została zwalidowana dla dwóch

enzymów deubikwitynujących: ludzkiego enzymu UCH-L3 oraz wirusowego enzymu MERS-CoV PL<sup>pro</sup>.

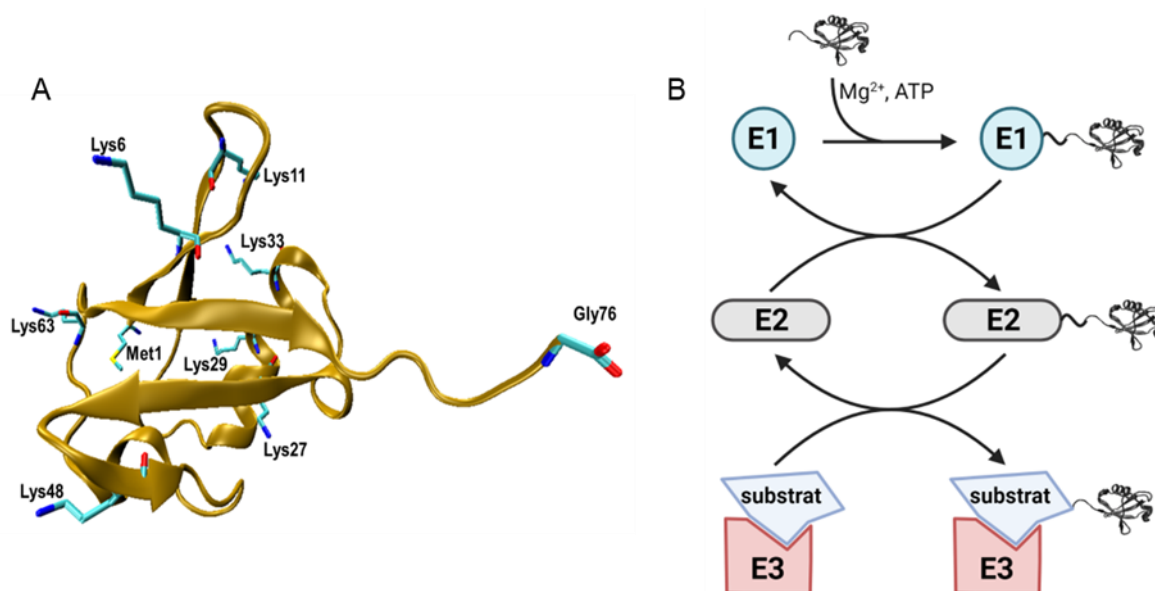
Wszystkie syntezy związków chemicznych oraz badania biologiczne opisane w niniejszej dysertacji doktorskiej zostały przeprowadzone w laboratorium prof. dr. hab. Marcina Drąga w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

## 1.2. Enzymy deubikwytynujące

### 1.2.1. Ubikwityna i ubikwytynacja

Ubikwityna jest jednym z najbardziej konserwatywnych ewolucyjnie białek występujących u eukariontów [26]. Po raz pierwszy została scharakteryzowana przez Gideona Goldsteina w 1975 roku podczas badań nad izolacją tymopoetyny z grasicy [27], a już 5 lat później jej rolę w ubikwitynozależnej degradacji białek z udziałem ATP opisali Hershko [28] oraz Ciechanover [29]. W 2004 roku Hershko, Ciechanover i Rose otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za opis tego szlaku [30]. Ubikwityna jest niewielkim białkiem o masie około 8,6 kDa, składającym się z 76 aminokwasów (Rysunek 1A) [26]. W komórkach syntezowana jest *de novo* w postaci prekursorów, które podlegają proteolitycznej obróbce regulowanej przez enzymy deubikwytynujące [31]. Cząsteczka Ub przyjmuje strukturę trzeciorzędową nazywaną zwinięciem ubikwitynopodobnym (ang. ubiquitin-like fold,  $\beta$ -grasp fold), charakteryzującym się antyrównoległą  $\beta$ -harmonijką złożoną z pięciu nici, otaczającą centralnie położoną  $\alpha$ -helisę [32]. Charakterystyczna struktura trzeciorzędowa stabilizowana wieloma wiązaniami wodorowymi zapewnia jej stabilność w szerokim zakresie temperatur oraz pH. Ponadto, pomimo obecności siedmiu reszt lizyny oraz czterech reszt argininy w strukturze pierwszorzędowej, trypsyna hydrolizuje ubikwitynę jedynie po karboksylowej stronie Arg72 i Arg74. Reszty te znajdują się w rejonie wolnego C-końcowego ogona (ang. C-terminal tail) Ub o sekwencji LRLRGG. Fragment ten nie bierze udziału w formowaniu wiązań wodorowych z resztami zawartymi w pozostałej części cząsteczki co nadaje mu giętkość [26]. Obecność ogona „wystającego” z mocno zwiniętego rdzenia związana jest z pełnioną przez Ub funkcją. Ubikwityna jest kowalencyjnie przyłączana C-końcową grupą karboksylową Gly76 do grupy aminowej białka substratowego w procesie zwanym ubikwytynacją. W procesie tym uczestniczą trzy enzymy: E1 – enzym aktywujący ubikwitynę, E2 – enzym przyłączający ubikwitynę oraz E3 – ligaza ubikwityny. Enzym E1, kosztem cząsteczki ATP, wiąże się kowalencyjnie z cząsteczką Ub. Reakcja ta przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie Ub jest adenylowana przez ATP•Mg<sup>2+</sup> z uwolnieniem PP<sub>i</sub>. W drugim etapie dochodzi do ataku grupy SH z katalitycznej reszty Cys enzymu E1 na Ub~AMP, co prowadzi do powstania Ub~E1 (tyldą zaznaczono wiązania wysokoenergetyczne) [33, 34]. Enzym E2 katalizuje reakcję transtioestryfikacji, w wyniku której powstaje Ub~E2. Następnie enzym E2 z aktywowaną cząsteczką Ub wiąże się do ligazy ubikwityny E3, która odpowiada za wiązanie białka substratowego, co umożliwia jego ubikwytynację (Rysunek 1B). Ligazy

ubikwityny dzielą się na dwie grupy w zależności od sposobu przeniesienia ubikwityny na białko substratowe. Ligazy typu RING (ang. really interesting new gene) katalizują przeniesienie Ub na substrat bezpośrednio z enzymu E2, natomiast ligazy typu HECT (ang. homologous to E6AP C-terminus) i RBR (ang. ring-between-ring) zawierają katalityczną resztę Cys, na którą przenoszona jest Ub z enzymu E2 zanim ta zostanie przeniesiona na białko substratowe [35].



Rysunek 1. A – model ubikwityny w reprezentacji NewCartoon. Kluczowe reszty aminokwasowe biorące udział w procesie ubikwitynacji przedstawiono w reprezentacji Licorice (PDB 1UBQ) [26]. B – schemat kaskady enzymatycznej prowadzącej do przyłączenia Ub do białek substratowych. Na podstawie [35].

Ubikwitynacja jest obok fosforylacji i acetylacji jedną z najlepiej poznanych modyfikacji potranslacyjnych. Najczęściej skutkuje ona powstaniem wiązania izopeptydowego między grupą  $\epsilon$ -aminową łańcucha bocznego lizyny białka substratowego a C-końcową grupą karboksylową Ub [33]. Do tej pory zaobserwowano kilka różnych sposobów ubikwitynacji. Do białka substratowego może przyłączyć się pojedyncza cząsteczka Ub (monoubikwitynacja) lub wiele pojedynczych cząsteczek Ub (multimonoubikwitynacja). W cząsteczce Ub występuje 7 reszt lizyny (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 oraz Lys63) oraz N-końcowa grupa aminowa (Met1), które również mogą służyć jako akceptory Ub, wskutek czego powstają tzw. łańcuchy poliubikwitynowe. Łańcuchy te mogą być homogeniczne (podjednostki Ub połączone są ze sobą kolejno przez tę samą resztę Lys, np. wyłącznie przez K48), heterogeniczne (w jednym łańcuchu poli-Ub występują połączenia przez różne reszty Lys, np. K48 i K63), linearne (do każdej Ub przyłączona jest tylko jedna cząsteczka Ub) lub rozgałęzione (do cząsteczki Ub w łańcuchu przyłączona jest

więcej niż jedna Ub) [36]. W naturze zaobserwowano również inne, tzw. niekanoniczne formy ubikwitynacji polegające na przenoszeniu cząsteczek Ub na grupy hydroksylowe reszt seryny i treoniny oraz grupy sulfhydrylowe reszt cysteiny [37].

Zasadniczą różnicą między ubikwitynacją a fosforylacją jest możliwość tworzenia się łańcuchów poli-Ub o zróżnicowanych topologiach. Sposób, w jaki połączone są między sobą podjednostki Ub w takich łańcuchach, definiuje ich funkcję. Związek między rodzajem ubikwitynacji a funkcją jaką pełni, niekiedy nazywany jest kodem ubikwityny (ang. ubiquitin code) [36]. Ze względu na niezwykle złożoność tego kodu wynikającą z olbrzymiej liczby możliwych do uzyskania topologii łańcuchów Ub, naukowcy od lat zajmują się jego rozszyfrowaniem. Jednym z najlepiej poznanych następstw ubikwitynacji jest degradacja białek w proteasomie 26S [36, 38]. Sygnałem do degradacji białka mogą być przyłączone łańcuchy złożone z co najmniej czterech podjednostek Ub połączonych ze sobą przez K48 [36], łańcuchy poli-Ub połączone przez K11 [39], lub pojedyncze cząsteczki Ub [40]. Multimonoubikwitynacja może być również sygnałem do internalizacji białek i ich degradacji w lizosomach [41]. Powszechna w komórkach monoubikwitynacja histonu H2A odgrywa rolę w regulacji ekspresji genów [42], z kolei powstawanie łańcuchów Ub połączonych przez K63 związane jest z procesami naprawy DNA [43]. Kompleks białkowy LUBAC (ang. linear ubiquitin chain assembly complex), pełniący funkcję ligazy ubikwityny, przenosi cząsteczki Ub na N-końcową resztę aminową Met1 innej cząsteczki Ub [44]. Powstałe w ten sposób liniowe łańcuchy Ub biorą udział przede wszystkim w regulacji kanonicznego szlaku sygnałowego NF- $\kappa$ B [45]. Na złożoność ubikwitynozależnej sygnalizacji komórkowej wpływa też fakt, że sama ubikwityna również może ulegać modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak fosforylacja, acetylacja i deamidacja [46]. W komórkach zaobserwowano też tworzenie się hybrydowych łańcuchów Ub z białkami podobnymi do ubikwityny (ang. ubiquitin-like proteins, UBLs) m.in. SUMO (ang. small ubiquitin-related modifier), NEDD8 (ang. neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8) oraz ISG15 (ang. interferon-stimulated gene 15), co dodatkowo utrudnia lepsze zrozumienie znaczenia i roli tych modyfikacji [47, 48].

### **1.2.2. DUBs**

Do tej pory u ludzi opisano blisko 100 różnych enzymów deubikwitynujących. Funkcją tych proteaz jest hydroliza wiązań między cząsteczkami ubikwityny a białkami lub peptydami, do których jest ona przyłączona (Rysunek 2). Ze względu na pochodzenie



ewolucyjne, DUBs można podzielić na siedem rodzin, z czego sześć to proteazy cysteinowe, a jedna to metaloproteazy cynkozależne [49-51]:

- 1) USPs (ang. ubiquitin specific proteases), najliczniejsza z rodzin, do której należy ponad 55 DUBs [51]. Nadekspresja wielu USP (m.in. USP15, USP32, USP9X, USP4 czy USP11) została zaobserwowana podczas różnych chorób, w tym licznych nowotworów [51, 52].
- 2) UCHs (ang. ubiquitin C-terminal hydrolases) to rodzina licząca u ludzi cztery izopeptydazy, których cechą wspólną jest obecność przy miejscu aktywnym motywu tzw. pętli krzyżowej (ang. crossover loop), która ogranicza wielkość substratów dla tych proteaz [53].
- 3) MJDs (ang. Machado-Josephin domain-containing proteases) to rodzina, której nazwa wywodzi się od neurodegeneracyjnej choroby Machado-Josepha (ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3). Jej rozwój związany jest z mutacją ataksyny-3 należącej do MJDs, która prowadzi do powstawania agregatów białkowych [54, 55].
- 4) OTUs (ang. ovarian tumour proteases), członkowie tej rodziny są zróżnicowani pod względem specyficzności substratowej wobec łańcuchów poli-Ub o różnej topologii [56].
- 5) MINDYs (ang. motif-interacting with ubiquitin-containing novel DUB family) to grupa enzymów licząca cztery izopeptydazy specyficzne wobec łańcuchów poli-Ub, połączonych przez K48 [57].
- 6) JAMMs (ang. JAB1, MPN, MOV34 family) stanowią jedyną opisaną do tej pory grupę metaloproteaz wśród DUBs. Katalityczna domena JAMM zawiera jon cynku stabilizowany przez dwie reszty His, resztę Asp lub Glu, oraz cząsteczkę wody [58].
- 7) ZUFSP (ang. zinc finger with UFM1-specific peptidase domain protein/C6orf113/ZUP1) to niedawno opisana siódma rodzina, licząca jednego członka, papaino-podobną proteazę cysteinową ZUFSP/ZUP1, hydrolizującą łańcuchy poli-Ub połączone przez K63 [49, 50].

Główną rolą enzymów deubikwytynujących jest edycja sygnalizacji komórkowej zależnej od ubikwityny. Ze względu na złożoność kodu ubikwityny i powszechność ubikwitynacji jako modyfikacji potranslacyjnej, DUBs pełnią wiele ważnych funkcji. Enzymy te utrzymują pulę wolnej Ub, która może zostać ponownie użyta przez biochemiczną maszynę komórki. Oprócz tego DUBs stabilizują białka poprzez usunięcie z nich ubikwitynowego znacznika, co w rezultacie chroni je przed proteolizą w proteasomie 26S. W tym kontekście istotną grupą substratów dla DUBs są ligazy ubikwityny, które mają

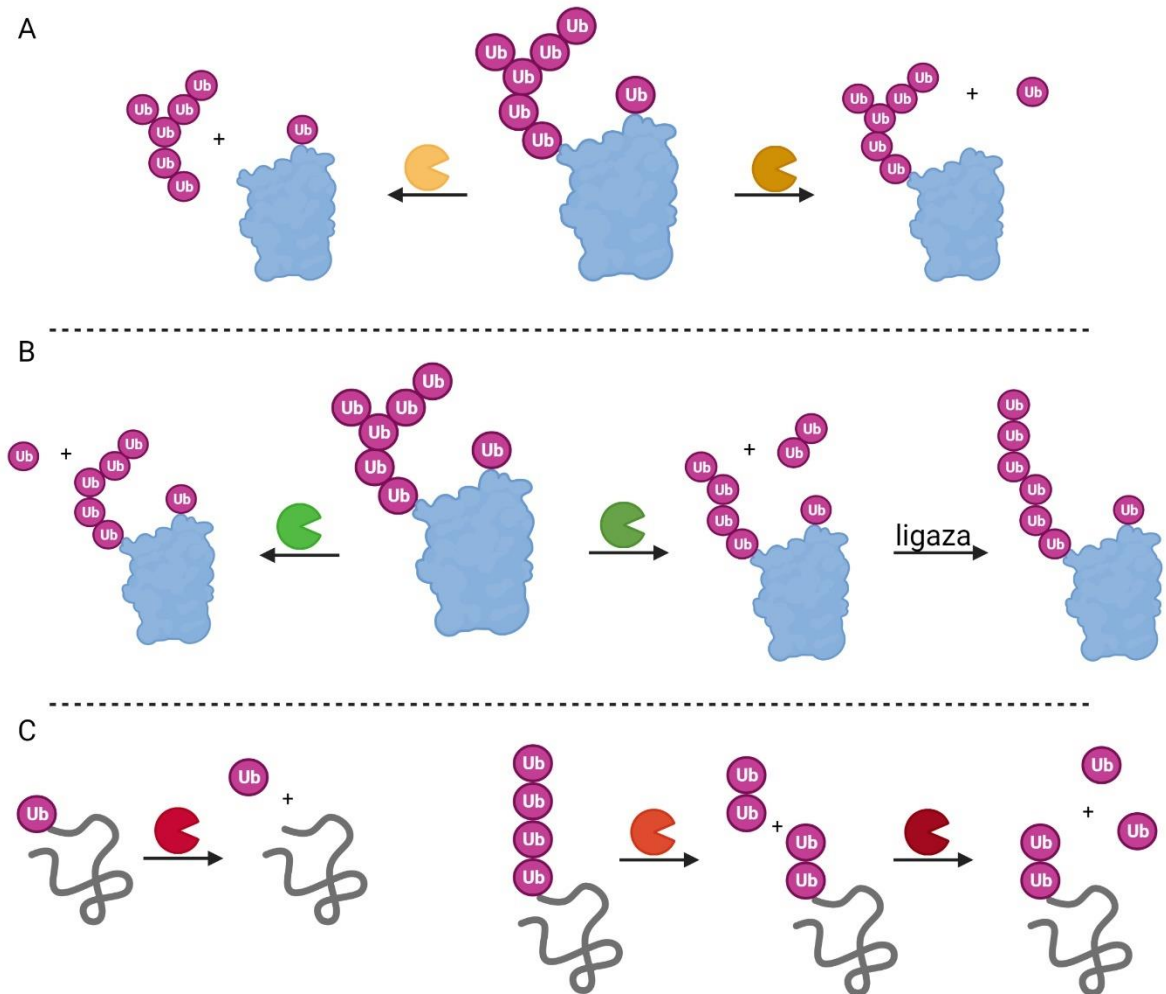
tendencję do ulegania autoubikwitynacji. Enzymy deubikwitynujące, usuwając z nich Ub, stabilizują je, co pośrednio powoduje destabilizację substratów dla tych ligaz [59]. POH1, USP14 oraz UCH-L5 (UCH37) to DUBs wchodzące w skład podjednostki regulatorowej 19S proteasomu. Ich funkcją jest usuwanie łańcuchów Ub z białek poddawanych degradacji w proteasomie 26S [60]. Enzymy deubikwitynujące biorą również udział w regulacji szlaków sygnalizacyjnych w komórkach. Zawierający domenę OTU enzym Trabid pełni rolę pozytywnego regulatora szlaku Wnt, który związany jest z procesami embriogenezy, proliferacji komórek oraz ich różnicowania [61]. Deubikwitynazy CYLD, A20 oraz OTUD7B są zaangażowane w regulację szlaku sygnałowego zależnego od czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, OTUD5 jest negatywnym regulatorem w szlaku aktywowanym przez interferony typu I, a enzymy USP17L2 i USP9X regulują szlaki sygnałowe zależne od kinaz [59]. Proces deubikwitynacji jest również istotny dla różnych form autofagii [62] i transportu białek z endosomów do lizosomów [63, 64]. DUBs mają również wpływ na ekspresję genów. USP7 stabilizuje czynnik transkrypcyjny, białko p53 [65], oraz metylotransferazę DNA 1 [66]. Wiele DUBs, m.in. USP16, USP21, MYSM1, BRCC3, USP3, USP12 czy USP46, bierze udział w deubikwitynacji histonów H2A i/lub H2B, a enzymy takie jak USP3, BRCC3, USP7 czy USP47 zaangażowane są w procesy związane z naprawą DNA [67].

Pomimo tego, że ubikwitynozależna sygnalizacja komórkowa jest cechą komórek eukariotycznych, enzymy posiadające aktywność ligazy ubikwityny E3 oraz enzymy o aktywności deubikwitynującej kodowane są również przez genomy bakterii i wirusów [68]. Wśród wirusów proteazy o aktywności DUB pełnią przede wszystkim dwie role:

1) hydrolizują wiązania peptydowe wewnątrz wirusowych poliprotein, co skutkuje powstaniem białek niestrukturalnych wirusów. Powstała w ten sposób wirusowa maszyna biochemiczna umożliwia powstawanie nowych wirionów oraz ich uwolnienie z zainfekowanych komórek [69];

2) wygaszają komórkową odpowiedź przeciwwirusową w wyniku zaburzenia ścieżek sygnałowych opartych na Ub i podobnym do ubikwityny białku ISG15. Podczas infekcji wirusowych w komórkach aktywowana jest nieswoista odpowiedź odpornościowa, podczas której produkowane są cytokiny, m.in. interferony typu I. Indukują one ekspresję białek ISG o działaniu przeciwwirusowym, w tym ekspresję białka ISG15. Przyłączane jest ono do białek w analogicznym do ubikwitynacji procesie nazywanym ISGlacją. Proteazy wirusowe wykazujące aktywność deubikwitynującą oraz deISGylującą poprzez hydrolizę wiązań

Ub-białko oraz ISG15-białko „wyciszają” komórkową odpowiedź nieswoistą, umożliwiając dalsze namnażanie się wirusa [69, 70].



Rysunek 2. Schemat działania enzymów deubikwitynujących i procesy, w które są zaangażowane. A – usuwanie cząsteczek Ub lub łańcuchów poli-Ub z białek substratowych; B – edycja łańcuchów poli-Ub przyłączonych do białek poprzez zmianę ich długości i/lub topologii; C – hydroliza prekursorów Ub. Na podstawie [71, 72].

### 1.2.3. DUBs jako cele molekularne

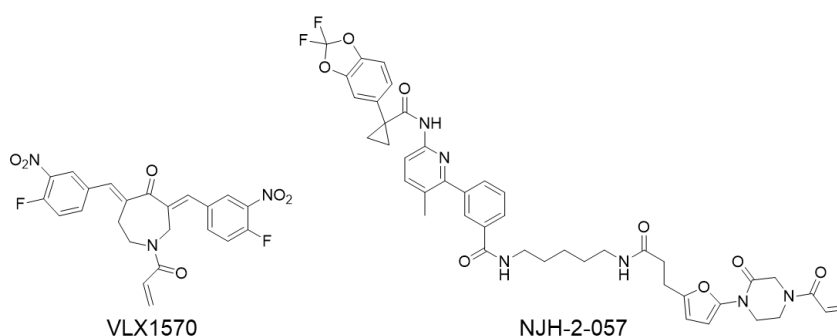
DUBs pełnią różnorodne funkcje i wpływają na wiele procesów w komórkach. Zaburzenia w ich aktywności zostały powiązane z rozwojem nowotworów [73], chorób neurodegeneracyjnych [56, 74] czy z infekcjami wirusowymi [75]. Ponadto większość z nich stanowią proteazy cysteinowe, a więc enzymy o dobrze poznanym katalitycznym mechanizmie działania oraz wielu opisanych klasach inhibitorów [76]. Jednym z przykładów DUBs, które budzą szczególne zainteresowanie badaczy, są POH1, USP14 oraz UCH-L5 – enzymy zlokalizowane w podjednostce regulatorowej 19S (PA700) proteasomu 26S [60]. Proteasom stanowi istotny cel molekularny m.in. w terapii szpiczaka

mnożonego (ang. multiple myeloma, MM) oraz chłoniaka z komórek płaszczka (ang. mantle cell lymphoma). Terapie tych nowotworów obejmują m.in. podawanie pacjentom bortezomibu, czyli inhibitora proteasomu. Innymi inhibitorami tego kompleksu proteolitycznego w leczeniu MM są karfilzomib i iksazomib, jednak ze względu na oporność niektórych szpiczaków na leki z tej klasy, poszukiwane są alternatywne cele molekularne [77]. Jeden z nich stanowią proteazy z podjednostki regulatorowej PA700 proteasomu 26S. Badacze zaobserwowali podwyższoną ekspresję POH1 w komórkach plazmatycznych pacjentów z MM. Nokaut genu odpowiedzialnego za ekspresję tej proteazy, jak również podanie inhibitora POH1, powodowały spadek żywotności komórek MM [78]. Podobne wyniki otrzymano w badaniach nad USP14 oraz UCH-L5, co pokazuje, że inhibicja DUBs znajdujących się w PA700 może stanowić alternatywę wobec inhibicji proteasomu [79]. Innym przykładem DUB, którego inhibicja może przynosić terapeutyczny skutek, jest UCH-L1. Wysoki poziom aktywności tego enzymu zaobserwowano m.in. w raku trzustki, raku płaskonabłonkowym skóry [80], w nowotworze piersi (potrójnie negatywnym oraz ER- – nie wykazującym ekspresji receptorów estrogenowych) [81] czy w idiopatycznym włóknieniu płuc (ang. idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) [82]. Panyain i in. opracowali selektywny względem UCH-L1 marker chemiczny (IMP-1710) oraz inhibitor tej proteazy. Podanie inhibitora do komórek płuc pobranych od pacjentów z IPF powodowało ponad 50% inhibicję różnicowania fibroblastów w miofibroblasty (ang. fibroblast to myofibroblast transition) [82]. Wyniki te świadczą o istotnej roli i możliwości wykorzystania UCH-L1 jako potencjalnego celu dla leków w IPF.

Mimo tego DUBs opisywane są w literaturze jako enzymy zasadniczo niemożliwe do wykorzystania jako cele molekularne. Do tej pory nie opracowano jeszcze cząsteczki, która wykazywałaby selektywną inhibicję wobec enzymu z tej grupy i która pomyślnie przeszła przez szereg badań klinicznych [51, 83]. Pierwszym, i jak dotąd jedynym inhibitorem DUBs, który został poddany badaniom klinicznym, był inhibitor USP14 – VLX1570 (Rysunek 3). Badania fazy I dotyczyły użycia go w terapii szpiczaka mnożonego, jednak ze względu na jego toksyczność i słabą rozpuszczalność zostały wstrzymane [84].

Przykładem innego podejścia w projektowaniu nowych terapeutyków wykorzystujących aktywność DUBs są tzw. DUBTACs (ang. deubiquitinase-targeting chimeras). Są to małowcząsteczkowe związki organiczne zaprojektowane tak, aby wiązać się selektywnie do wybranego enzymu deubikwitynującego oraz do białka, które ulega ubikwitynacji. Ich zbliżenie do siebie powoduje celowaną deubikwitynację białka, a co za tym idzie ochronę przed jego proteasomalną degradacją. W pierwszym badaniu przedstawiającym

tę technologię opisano związek NJH-2-057 (Rysunek 3) złożony z rekrutera enzymu OTUB1 (związek EN523) i rekrutera białka  $\Delta F508$ -CFTR (lumakaftor), połączonych linkerem. Rekrutacja  $\Delta F508$ -CFTR (mutant CFTR, którego proteosomalna degradacja związana jest z rozwojem mukowiscydozy [85]) do OTUB1 powodowała jego stabilizację poprzez deubikwitynację. W badaniu tym zmodyfikowano również strukturę NJH-2-057, wymieniając rekruter CFTR na rekruter białka WEE1. Zmiana ta spowodowała celowaną stabilizację (ang. targeted protein stabilization) WEE1 [86]. Idea DUBTACs oraz celowanej stabilizacji białek wywodzi się od tzw. PROTACs (ang. proteolysis-targeting chimeras), które reprezentują koncepcję celowanej degradacji białek (ang. targeted protein degradation) [86, 87].



Rysunek 3. Struktura inhibitora USP14 – VLX1570 oraz DUBTAC NJH-2-057.

#### 1.2.4. C-końcowa hydrolaza ubikwityny-L3 (UCH-L3)

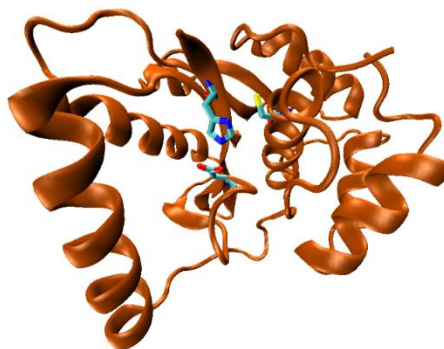
UCH-L3 (ang. ubiquitin C-terminal hydrolase) jest ludzkim enzymem deubikwitynującym o masie 26 kDa. W przeciwieństwie do swojego izozymu, UCH-L1, który ekspresjonowany jest przede wszystkim w mózgu, ekspresja UCH-L3 nie jest specyficzna tkankowo. W centrum aktywnym proteazy znajduje się triada katalityczna złożona z Cys95, His169 i Asp184, a pełna aktywność katalityczna możliwa jest dzięki obecności reszty Gln89, która stabilizuje dziurę oksyanionową [88]. Ważną cechą strukturalną UCH-L3 jest obecność motywu pętli krzyżowej, której rolą jest najprawdopodobniej limitowanie wielkości substratów mogących dostać się do miejsca aktywnego. Model enzymu przedstawiono na Rysunku 4. Enzym ten, podobnie jak inne izopeptydazy z grupy UCH, hydrolizuje wiązania między Ub a krótkimi peptydami o długości około 20-30 reszt aminokwasowych. Wyjątek stanowi enzym UCH-L5 (Uch37), który po związaniu się z podjednostką regulatorową 19S proteasomu zyskuje zdolność do hydrolizy wiązań pomiędzy cząsteczkami Ub wskutek zmiany położenia pętli krzyżowej [53, 89]. UCH-L3 należy do tzw. białek zawężlonych ze względu na skomplikowaną topologię szkieletu peptydowego typu węzeł-5<sub>2</sub> (ang. 5<sub>2</sub>-knotted protein), co

prawdopodobnie zwiększa stabilność enzymu [90]. Jest to jedyny przedstawiciel grupy UCH, który wykazuje aktywność deneddylującą, czyli zdolność do hydrolizy wiązań między C-końcem należącego do UBLs białka Nedd8 a krótkimi peptydami [91]. Zaobserwowano, że aktywność UCH-L3 regulowana jest przez obecność cząsteczek di-Ub połączonych przez K48, w obecności których spada jego aktywność hydrolityczna [92].

Ze względu na ekspresję w wielu tkankach, UCH-L3 zaangażowany jest w różnorodne procesy w organizmach żywych. Przede wszystkim enzym ten bierze udział w dojrzewaniu ubikwityny i usuwa krótkie sekwencje peptydowe z C-końca jej prekursorów [93]. Jego aktywność jest istotna dla komórek germinalnych i procesu gametogenezy, a jej niski poziom może być związany z zaburzeniami płodności [94]. Badania na organizmach z wyciszonym genem *Uchl3* (*Uchl3<sup>-/-</sup>*) wykazały również, że UCH-L3 ma antyapoptotyczne działanie w komórkach fotoreceptorowych [95], a także bierze udział w szlaku insulinowym i adipogenezie [96]. W mięśniach szkieletowych myszy *Uchl3<sup>-/-</sup>* zaobserwowano akumulację ubikwitynowanych białek oraz ekspresję białek stresowych i białek szoku cieplnego [97]. Badania na liniach komórkowych *Uchl3<sup>-/-</sup>* wykazały, że UCH-L3 bierze również udział w różnicowaniu osteoblastów poprzez regulację ścieżki sygnałowej zależnej od białka morfogenetycznego kości-2 (ang. bone morphogenic protein-2) w tkance kostnej. Podczas tego szlaku UCH-L3 stabilizuje białko Smad1, które po związaniu się z białkiem Smad4 pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego [98].

UCH-L3 budzi zainteresowanie naukowców w kontekście chorób nowotworowych i neurodegeneracyjnych. Enzym ten jako jedyny z grupy UCH ma zdolność do hydrolizy mutantów ubikwityny UBB<sup>+1</sup>, które cechuje substytucja Ub<sup>G76Y</sup> oraz obecność dziewiętnastoaminokwasowego przedłużenia na C-końcu. Obecność UBB<sup>+1</sup> związana jest z występowaniem m.in. choroby Alzheimera czy płasawicy Huntingtona. Rola UCH-L3 w rozwoju tych chorób pozostaje jednak niewyjaśniona [99]. Podwyższoną aktywność UCH-L3 zaobserwowano w keratynocytach unieśmiertelnianych białkami E6/E7 wirusa HPV [100], natomiast komórki raka piersi cechuje zwiększony poziom mRNA UCH-L3 [101]. Enzym ten nadekspresjonowany jest również podczas raka jajnika, gdzie stabilizuje białko TRAF2, co prowadzi do aktywacji ścieżki NF-κB [102]. Stabilizuje też białko FOXM1, wpływając w ten sposób na zdolność komórek raka trzustki do podziału, migracji i inwazji na sąsiadujące tkanki [103]. Obniżona ekspresja UCH-L3 została natomiast zaobserwowana w liniach komórkowych raka prostaty. Enzym ten wraz z UCH-L1 zaangażowany jest w przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. epithelial-mesenchymal transition) – proces, w którym komórki nabłonkowe zyskują fenotyp mobilnych komórek

mezenchymalnych, co wiąże się z rozwojem nowotworu i zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów [104].



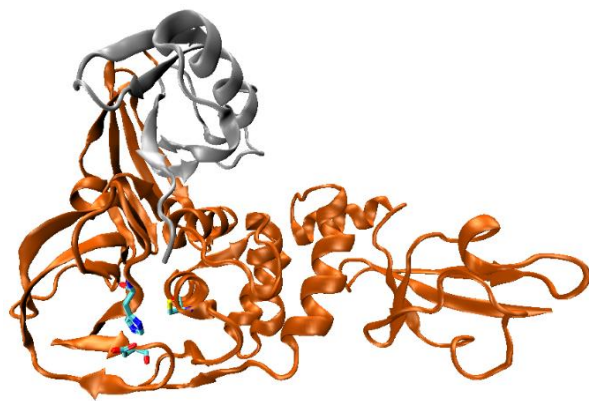
Rysunek 4. Model ludzkiego enzymu UCH-L3 w reprezentacji NewCartoon. Triadę katalityczną Cys95, His169 oraz Asp184 przedstawiono w reprezentacji Licorice (PDB 1UCH) [105].

### 1.2.5. MERS-CoV PL<sup>pro</sup>

Koronawirus MERS (ang. Middle East respiratory syndrome, MERS-CoV) jest jednym z siedmiu ludzkich koronawirusów. Wywołuje on bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (MERS), objawiający się gorączką, kaszlem i płytkim oddechem. U pacjentów może rozwinąć się zapalenie płuc, a niekiedy obserwowana jest biegunka. Podczas ciężkiego przebiegu choroby dochodzi do niewydolności oddechowej [106]. MERS-CoV po raz pierwszy zidentyfikowano w 2012 roku w płwocinie pacjenta z Arabii Saudyjskiej. W tym samym roku przypadki MERS zidentyfikowano również w Jordanie, Wielkiej Brytanii i Korei Południowej [107]. Do maja 2022 roku MERS zdiagnozowano w 27 różnych krajach u ponad 2600 pacjentów, z czego ponad 940 zmarło [108]. MERS cechuje śmiertelność na poziomie około 35%. Przypuszcza się jednak, że wartość ta może być nieco zawyżona ze względu na przypadki nosicieli bezobjawowych oraz pacjentów z łagodnym przebiegiem choroby, o zakażeniu niepotwierdzonym laboratoryjnie [106]. Wirus MERS-CoV przenosi się na ludzi przede wszystkim wskutek kontaktu z wielbłędami jednogarbnymi (*Camelus dromedarius*), które stanowią naturalny rezerwuuar wirusa [106, 107] oraz przez kontakt z zakażonymi osobami, głównie w szpitalach [107].

Genom MERS-CoV liczy 30,1 kb i jest jednym z największych wśród wirusów RNA. Podczas ekspresji materiału genetycznego w komórkach gospodarza dochodzi do translacji genu ORF1a, co prowadzi do powstania poliproteiny pp1a zawierającej 11 białek niestrukturalnych (ang. nonstructural proteins, nsp1-11). Wskutek zjawiska tzw. rybosomalnego przesunięcia ramki odczytu (ang. ribosomal frameshift) dochodzi do pominięcia kodonu stop w ORF1a i następuje dalsza translacja genu ORF1ab, co

prowadzi do powstania białka pp1ab, zawierającego białka nsp1-16. Pozostała część materiału genetycznego wirusa (około jedna trzecia) koduje białka strukturalne oraz pomocnicze. Białka pp1a i pp1ab hydrolizowane są przez dwie wirusowe proteazy – proteazę papaino-podobną (PL<sup>pro</sup>) oraz chymotrypsynopodobną (3CL<sup>pro</sup>, M<sup>pro</sup>), które uwalniane są w wyniku autoproteolizy. Ich aktywność prowadzi do powstania szesnastu białek niestrukturalnych, wchodzących w skład kompleksu replikacyjno-transkrypcyjnego [107, 109]. PL<sup>pro</sup> jest domeną o aktywności proteolitycznej, współtworzącą wielodomenowe białko nsp3 o wielkości około 200 kDa. Domena PL<sup>pro</sup> jest strukturalnie podobna do ludzkich enzymów USP7 (HAUSP) i USP14, a także niektórych enzymów wirusowych, przede wszystkim proteaz przedstawicieli rzędu *Nidovirales*, do którego należą koronawirusy. PL<sup>pro</sup> składa się z subdomen dłoni, kciuka, palca cynkowego i N-końcowej subdomeny podobnej do Ub (ang. ubiquitin-like domain, UBL) (Rysunek 5) [110]. Obecność subdomeny UBL nie wpływa na aktywność katalityczną PL<sup>pro</sup>. Mutanty pozbawione tej domeny zachowują aktywność izopeptydazową i, podobnie jak typ dziki (ang. wild type, WT), wpływają na obniżenie produkcji interferonu typu I w zainfekowanych komórkach [111]. Triada katalityczna złożona z Cys111, His278 i Asp293 zlokalizowana jest między subdomenami dłoni i kciuka [110]. Proteazy PL<sup>pro</sup> koronawirusów, w tym MERS-CoV, w pobliżu miejsca aktywnego posiadają tzw. pętlę blokującą BL2 (ang. blocking loop). Reszty wchodzące w jej skład współtworzą dziurę oksyanionową, a także regulują wiązanie substratów do miejsca aktywnego enzymu. W przypadku MERS-CoV PL<sup>pro</sup> różnice w budowie BL2 oraz obecność Leu106, czyli aminokwasu, którego łańcuch boczny nie może pełnić roli donora podczas formowania wiązań wodorowych, utrudniają formowanie dziury oksyanionowej, co skutkuje obniżoną aktywnością katalityczną enzymu [112].



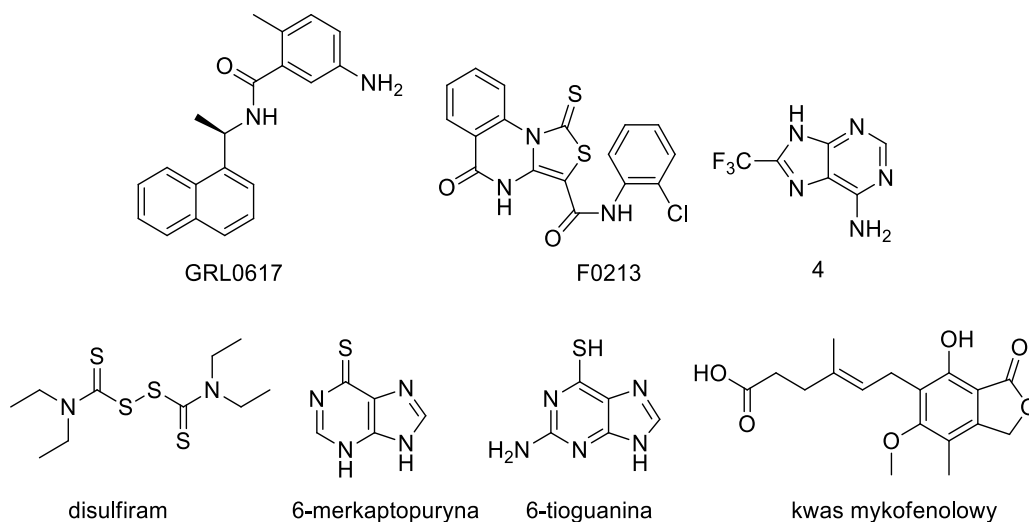
Rysunek 5. Model enzymu MERS-CoV PL<sup>pro</sup> (brązowy łańcuch) ze związaną cząsteczką Ub (srebrny łańcuch) w reprezentacji NewCartoon. Triada katalityczna przedstawiona została za pomocą reprezentacji Licorice (PDB 4RF0) [113].



Proteaza PL<sup>pro</sup> hydrolizuje wiązania peptydowe poliproteiny ppla/pplab między domenami nsp1 i nsp2 (LIGG↓DV, ↓ oznacza miejsce hydrolizy łańcucha peptydowego), nsp2 i nsp3 (LKGG↓AP) oraz nsp3 i nsp4 (IVGG↓AP). Specyficzność substratowa wobec sekwencji aminokwasowej LXGG ma kluczowe znaczenie również dla aktywności deubikwytynującej (specyficzność względem łańcuchów Ub połączonych przez K48 i K63) i deISGylującej tego enzymu [111, 114, 115]. W badaniach nad mutantami MERS-CoV PL<sup>pro</sup> niezdolnymi do wiązania ubikwityny wykazano, że aktywności te obniżają produkcję IFN-β zależną od MDA5, co wycisza komórkową odpowiedź przeciwwirusową [111]. Podobnie jak inne proteazy PL<sup>pro</sup> ludzkich koronawirusów, MERS-CoV PL<sup>pro</sup> reprezentuje potencjalny cel molekularny dla nowych leków antywirusowych. Inhibicja tego enzymu powodowałaby nie tylko zatrzymanie replikacji wirusa, ale także wzmocnienie antywirusowej odpowiedzi komórkowej gospodarza, związanej z produkcją interferonów typu I.

Literaturowe doniesienia na temat skutecznych inhibitorów MERS-CoV PL<sup>pro</sup> są nieliczne. Budowa BL2 proteaz PL<sup>pro</sup> poszczególnych koronawirusów różni się od siebie, co znacząco utrudnia projektowanie nowych inhibitorów PL<sup>pro</sup> o szerokim spektrum działania [116]. Przykładem ilustrującym ten problem jest pochodna naftalenu, inhibitor GRL0617. Wykazuje on silną inhibicję wobec PL<sup>pro</sup> pochodzących z koronawirusów wywołujących ostrą niewydolność oddechową (ang. severe acute respiratory syndrome, SARS) SARS-CoV oraz SARS-CoV-2. Z powodu różnic w budowie pętli BL2 nie wykazuje on jednak inhibicji względem PL<sup>pro</sup> z MERS-CoV. Mimo tego, pojawienie się SARS-CoV-2 o pandemicznym potencjale przyspieszyło prace nad inhibitorami PL<sup>pro</sup> o szerokim spektrum działania. Inhibitory z grupy 5-okso-1-tiokso-4,5-dihydro-1*H*-tiazolo[3,4-*a*]chinazolino-3-karboksyamidów, przede wszystkim związek F0213, wykazują skuteczną inhibicję proteaz PL<sup>pro</sup> z SARS-CoV, SARS-CoV-2 i MERS-CoV. Potwierdziły to eksperymenty przeprowadzone na rekombinowanych enzymach i ludzkich liniach komórkowych oraz w modelach zwierzęcych [117]. Innym związkiem wykazującym inhibicję względem MERS-CoV i SARS-CoV PL<sup>pro</sup> jest pochodna puryny, oznaczona w oryginalnym badaniu jako związek nr 4. Wykazywała ona selektywną inhibicję względem wirusowych proteaz w eksperymentach z wykorzystaniem również ludzkich DUBs (UCH-L3 i UCH-L1). Co więcej, enzym z SARS-CoV hamowany był w sposób allosteryczny, natomiast MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w sposób kompetycyjny [116]. W 2015 roku badacze z Tajwanu wykazali, że kwas mykofenolowy wraz z 6-merkaptopuryną bądź 6-tioguaniną synergistycznie hamują działanie MERS-CoV PL<sup>pro</sup> [118], a 3 lata później podobny efekt

zaobserwowano w obecności disulfiramu. Disulfiram, lek używany w terapii choroby alkoholowej, również hamuje PL<sup>pro</sup>, wykazując inhibicję niekompetycyjną względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz kompetycyjną względem SARS-CoV PL<sup>pro</sup>. W połączeniu z 6-tioguaniną oraz kwasem mykofenolowym wykazuje efekt synergistyczny w inhibicji proteazy PL<sup>pro</sup> z wirusa MERS [119]. Struktury inhibitorów MERS-CoV PL<sup>pro</sup> przedstawiono na Rysunku 6.



Rysunek 6. Struktury chemiczne GRL-0617 oraz inhibitorów proteazy MERS-CoV PL<sup>pro</sup>.

### 1.3. Narzędzia chemiczne w badaniu proteaz

#### 1.3.1. Specyficzność substratowa enzymów deubikwitynujących

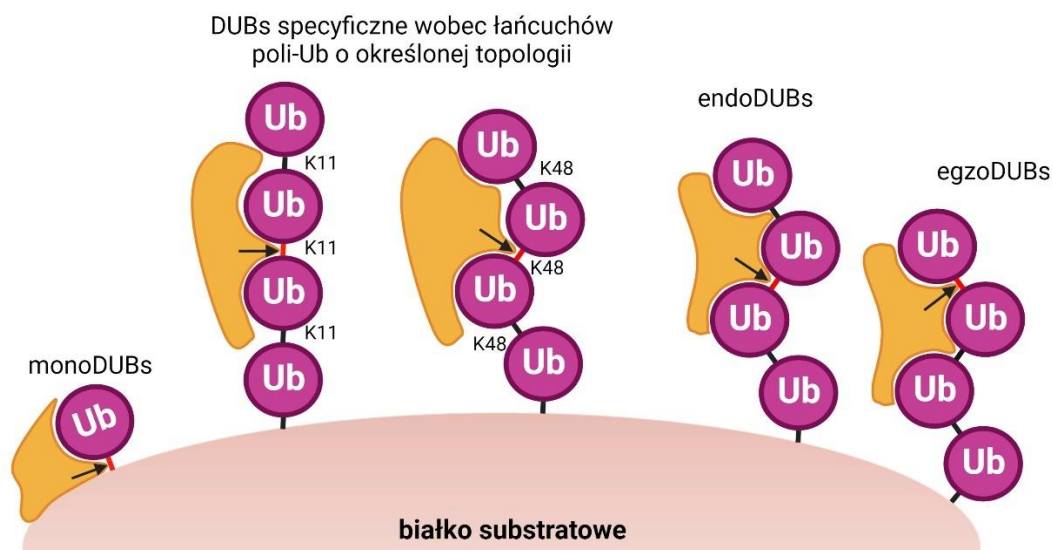
Zdolność proteaz do rozpoznawania i hydrolizy ściśle określonych sekwencji peptydowych substratu określana jest mianem specyficzności substratowej. Jest to jedna z najważniejszych cech enzymów proteolitycznych, która wynika z oddziaływań między łańcuchami bocznymi aminokwasów substratu z resztami aminokwasowymi, budującymi miejsce aktywne proteazy. Do opisu specyficzności substratowej najczęściej stosuje się nomenklaturę zaproponowaną przez Schechtera i Bergera w 1967 roku. Zgodnie z nią hydrolizowane wiązanie peptydowe substratu znajduje się pomiędzy resztami P1 i P1'. W wyniku hydrolizy powstają dwa produkty ...-P3-P2-P1-COOH (produkt N-końcowy) oraz H<sub>2</sub>N-P1'-P2'-P3'-... (produkt C-końcowy), gdzie litera P oznacza aminokwas w danej pozycji łańcucha peptydowego substratu. Kieszenie wiążące miejsca aktywnego enzymu oznaczają się literą S i numerem zgodnym z numeracją wiązanej reszty aminokwasowej substratu [120].

W kontekście nomenklatury Schechtera i Bergera enzymy deubikwitynujące są specyficzne wobec sekwencji LRRG w pozycjach P4-P1 hydrolizowanych substratów,

co wynika ze struktury konserwatywnego C-końca ubikwiny. Jednak niektóre DUBs rozpoznają również niekanoniczne aminokwasy w tych pozycjach. W badaniu opublikowanym przez Drąga i in. określono specyficzność substratową w pozycjach P4-P2 czterech DUBs: ludzkich IsoT, OTU-1, UCH-L3 oraz wirusowego SARS-CoV PL<sup>pro</sup>. Z dostępnych struktur krystalicznych tych enzymów wynikało, że znajdująca się w wąskiej szczelinie kieszeń wiążąca S1 jest w stanie pomieścić jedynie resztę glicyny, w związku z czym specyficzność substratowa w pozycji P1 nie była badana. Część spośród badanych enzymów cechowała stosunkowo szeroka specyficzność substratowa, przede wszystkim w pozycjach P3 i P4 [24]. Przykładem tego jest enzym SARS-CoV PL<sup>pro</sup>, którego główną fizjologiczną rolą jest hydroliza wirusowej poliproteiny w miejscach poprzedzonych sekwencją LXGG. W związku z pełnioną funkcją, kieszeń wiążąca S3 miejsca aktywnego enzymu wiąże przede wszystkim łańcuchy boczne aminokwasów o właściwościach zasadowych (Lys, Arg, His) oraz hydrofobowych i polarnych (m.in. Leu, Tyr, Nle) [110]. Zaobserwowano też nietypową dla DUBs specyficzność UCH-L3 wobec reszt alaniny oraz waliny w pozycji P2. Ponadto w badaniu pokazano, że, w przeciwieństwie do proteazy IsoT, UCH-L3 hydrolizuje wariant ubikwiny z niekanoniczną sekwencją LRVG [24]. UCH-L3 hydrolizuje również UBB<sup>+1</sup> – wariant ubikwiny z mutacją G76Y, czyli resztą tyrozyny w pozycji P1, w kluczowym dla DUBs miejscu cząsteczki Ub [99]. W badaniu przeprowadzonym przez Békés i in. określono profil specyficzności substratowej dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> korzystając z kombinatorycznych bibliotek substratów peptydowych. Enzym ten, podobnie jak SARS-CoV PL<sup>pro</sup>, rozpoznaje jedynie Gly w pozycji P2, natomiast jego specyficzność substratowa w pozycjach P3 i P4 jest stosunkowo szeroka, a enzym wykazuje specyficzność wobec substratów zawierających w tej pozycji przede wszystkim hydrofobowe reszty aminokwasowe (w P3 m.in. Leu, Nle, Tyr, Val i Arg, w P4 m.in. Leu, Ile, Val, Tyr). Profil specyficzności ujawnił również, że w pozycji P3 optymalnym aminokwasem jest Leu (dla Arg było to około 50% względnej aktywności enzymu), a stałe specyficzności  $k_{kat}/K_M$  dla tetrapeptydowych substratów Ac-LLGG-ACC i Ac-LRGG-ACC miały praktycznie taką samą wartość, wynoszącą około  $k_{kat}/K_M = 340 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Wyniki te odzwierciedlają fizjologiczne przystosowanie tego enzymu do hydrolizy wirusowej poliproteiny po sekwencji LXGG. Co więcej, MERS-CoV PL<sup>pro</sup> posiada nietypową dla DUBs zdolność hydrolizy wariantu di-Ub, zawierającego resztę Pro w obrębie C-końcowego ogona w miejscu reszty Leu. Łańcuchy di-Ub o różnych topologiach (M1, K11, K48 i K63), a także ich warianty zawierające jednostkę Ub<sup>L73P</sup>, zostały poddane działaniu ludzkiego USP2<sub>CD</sub> oraz wirusowych SARS-CoV i MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Hydrolizę

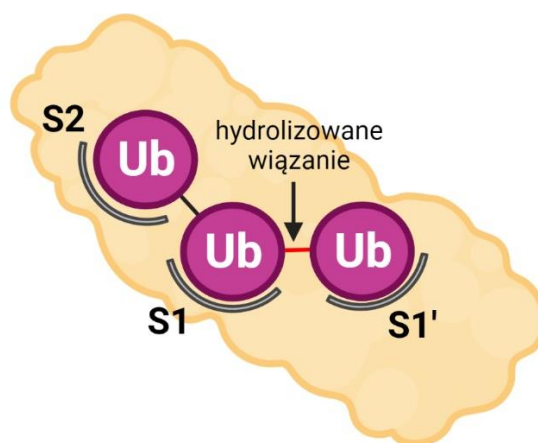
substratów di-Ub K48 i K63 zawierających Pro zaobserwowano jedynie w przypadku MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Ze względu na mechanizm wiązania łańcuchów poli-Ub przez SARS-CoV PL<sup>pro</sup> wymagający obecności co najmniej trzech podjednostek Ub w łańcuchu poli-Ub, enzym ten posiadał zdolność hydrolizy tetra-Ub<sup>L73P</sup> połączonych przez K48 [121].

Innym aspektem specyficzności substratowej DUBs jest preferencja tych enzymów względem łańcuchów ubikwitynowych w zależności od ich długości i/lub rodzajów połączeń między podjednostkami Ub (Rysunek 7). DUBs wiążą się z ubikwityną w miejscu aktywnym, gdzie rozpoznawany jest C-końcowy motyw LRGG, oraz w regionie poza miejscem aktywnym, gdzie ubikwityna oddziałuje allosterycznie z powierzchnią enzymów, niekiedy powodując zmianę ich konformacji i osiągnięcie pełnej aktywności katalitycznej [24, 25, 122]. Szacuje się, że w oddziaływaniu z DUBs zaangażowane jest między 20 a 40% całej powierzchni ubikwityny [59]. Oddziaływania te najczęściej mają związek z obecnością na powierzchni Ub tzw. łatki hydrofobowej (ang. hydrophobic patch), czyli regionu zawierającego kluczową dla oddziaływań hydrofobowych resztę Ile44 [59, 123]. Wśród DUBs można wyróżnić enzymy o aktywności egzo- oraz endodeubikwitynującej. EgzoDUBs oraz DUBs specyficzne wobec monoubikwitynowanych substratów posiadają jedno miejsce wiązania Ub do swojej powierzchni. EndoDUBs hydrolizują wiązania wewnątrz łańcucha poli-Ub. W przypadku endoDUBs rozpoznających łańcuchy poli-Ub, na powierzchni enzymu może występować kilka miejsc allosterycznego oddziaływania enzym-ubikwityna [25, 59].



Rysunek 7. Specyficzność substratowa DUBs. Strzałką oraz czerwonym kolorem zaznaczono hydrolizowane wiązania. Na podstawie [59].

O specyficzności DUB względem łańcuchów poli-Ub decyduje sposób wiązania tych łańcuchów przez enzym (Rysunek 8). Jako przykład mogą posłużyć USPs, u których występuje duża kieszeń S1, a o specyficzności substratowej decyduje druga kieszeń, wiążąca dystalną resztę Ub. U innych DUBs specyficzność może być wymuszana przez wiązanie proksymalnej reszty Ub do kieszeni S1'. W ten sposób proksymalna Ub wymusza ułożenie hydrolizowanego wiązania z dystalną cząsteczką Ub w optymalnym położeniu względem miejsca aktywnego, co skutkuje osiągnięciem specyficzności substratowej wobec określonych topologii łańcucha poli-Ub [56, 124].



Rysunek 8. Schemat nazewnictwa kieszeni wiążących przykładowego enzymu deubikwytynującego, specyficznego wobec łańcuchów tri-Ub. W zależności od mechanizmu wiązania substratu, DUBs mogą być specyficzne wobec łańcuchów Ub o różnej długości.

### 1.3.2. Metody określania specyficzności substratowej proteaz

Wraz z rozwojem technologicznym stale opracowywane są nowe metody określania specyficzności substratowej proteaz. Każda z nich oferuje szereg korzyści, ale ma również swoje ograniczenia. Najpopularniejsze z nich to: 1) metody chemiczne wykorzystujące biblioteki syntetycznych substratów peptydowych, reprezentowane głównie przez metodę PS-SCL i jej odmiany; 2) metody oparte o spektrometrię mas, która w sprzężeniu z technikami bioinformatycznymi umożliwia szybką analizę dużych ilości danych; 3) metody biologiczne, przede wszystkim oparte o technikę prezentacji fagowej (ang. phage display).

#### 1.3.2.1. Metody chemiczne – biblioteki substratów peptydowych

Opracowanie techniki syntezy peptydów na podłożu stałym (SPPS) przez Roberta Bruce'a Merrifielda w 1984 roku umożliwiło badaczom syntezę bibliotek substratów peptydowych, które mogły zostać wykorzystane w badaniach specyficzności substratowej proteaz [125]. SPPS umożliwia wydajną i szybką syntezę dzięki kowalencyjnemu

przyłączeniu peptydu do nośnika – najczęściej sfunkcjonalizowanej żywicy polistyrenowej. Z grupy aminowej aminokwasu przyłączonego do żywicy usuwana jest grupa blokująca (Fmoc lub Boc), a następnie przeprowadzana jest reakcja kondensacji z grupą karboksylową aminokwasu dodawanego do żywicy. Aminokwasy przyłączane są w cyklach, dzięki czemu możliwa jest automatyzacja syntezy. Synteza na nośniku stałym umożliwiła również syntezę tzw. bibliotek kombinatorycznych, czyli kolekcji peptydów złożonych z setek tysięcy różnych związków.

Większość metod syntezy kombinatorycznych bibliotek substratów bazuje na metodzie „dziel i mieszaj” (ang. split & mix) lub wykorzystaniu mieszaniny izokinetycznej aminokwasów. Technika „dziel i mieszaj”, opisana po raz pierwszy w latach 80. przez Árpáda Furkę, wykorzystuje metodologię SPPS. Polega na podzieleniu nośnika stałego (żywicy) na równe części („split”). Do każdej z tych części przyłączany jest następnie inny aminokwas. W kolejnym kroku porcje żywicy są ze sobą mieszane („mix”). Kroki te są powtarzane, co prowadzi do powstania biblioteki kombinatorycznej [126]. Izokinetyczna mieszanina aminokwasów, opisana w 1994 roku przez Ostresha i in., umożliwiła z kolei wprowadzenie do syntezy peptydu równomolowej mieszaniny aminokwasów bez potrzeby fizycznego dzielenia żywicy na porcje. W skład tej mieszaniny wchodzi aminokwasy w takich stosunkach molowych, aby szybkości reakcji między wszystkimi aminokwasami i wolną grupą aminową na nośniku stałym była taka sama [127]. Z reguły w mieszaninie izokinetycznej pomija się Cys, a Met jest zastępowana bioizosterem, norleucyną, w celu wyeliminowania ryzyka utlenienia atomu siarki w łańcuchach bocznych.

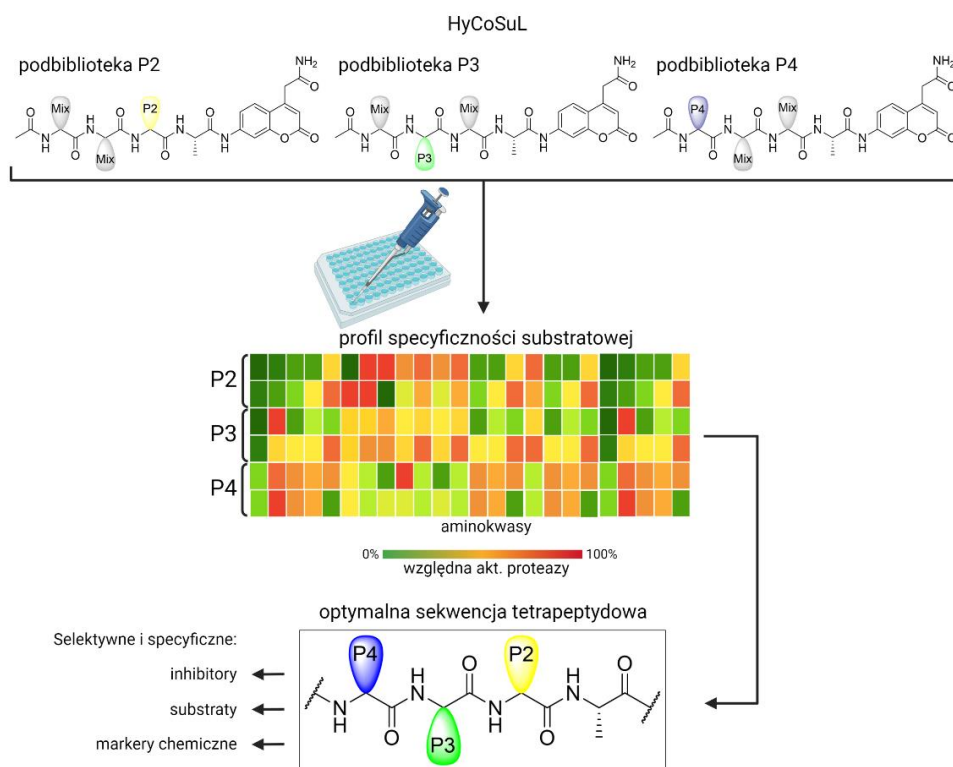
Najpowszechniej stosowanymi bibliotekami kombinatorycznymi peptydów do badania specyficzności substratowej proteaz są biblioteki używane w metodzie PS-SCL (ang. positional scanning synthetic combinatorial libraries). W bibliotekach tego typu substraty zawierają w określonych pozycjach zdefiniowane reszty aminokwasowe, natomiast pozostałe pozycje podstawione są w równym stopniu wszystkimi naturalnie występującymi aminokwasami. Użycie równomolowej mieszaniny aminokwasów pozwala zbadać preferencję substratową enzymu wyłącznie względem zdefiniowanej reszty w badanej pozycji, natomiast wpływ aminokwasów z pozostałych pozycji jest minimalizowany [128]. Na C-końcu substratów znajduje się fluorogeniczny znacznik, najczęściej pochodna kumaryny, który jest uwalniany po hydrolizie substratu. Do najpopularniejszych znaczników kumarynowych należą AMC – 7-amino-4-metylokumaryna, ACC – 7-amino-4-karbamoilometylokumaryna oraz AFC – 7-amino-4-trifluorometylokumaryna. Uwolnienie znacznika powoduje mierzalny przyrost fluorescencji. Przykładowy

tetrapeptydowy substrat ze zdefiniowanym aminokwasem w pozycji P3 o strukturze Ac-Mix-P3-Mix-Mix-ACC (Ac – grupa acetylowa, Mix – mieszanina równomolowa 20 aminokwasów) składa się z  $20 \times 20 \times 20 = 8000$  indywidualnych tetrapeptydów. Przy użyciu 20 zdefiniowanych aminokwasów w pozycjach P4-P1 ilość związków w całej bibliotece wynosi  $4 \times 20 \times 20 \times 20 \times 20 = 640000$ . Biblioteki PS-SCL zostały użyte do zbadania specyficzności substratowych wielu proteaz, m.in. DUBs (IsoT, OTU-1, UCH-L3, SARS-CoV PL<sup>pro</sup>) [24], matryptazy, granzymu A i B [128], katepsyny L, V, K, S, F, B, papainy i bromelainy [129].

Blisko spokrewnione ze sobą proteazy (m.in. kaspazy, katepsyny, DUBs) niekiedy wykazują nakładającą się specyficzność substratową. Informacje uzyskane w wyniku zastosowania bibliotek PS-SCL mogą być niewystarczające, aby zaprojektować selektywne peptydowe narzędzia chemiczne do badania indywidualnych przedstawicieli tych grup. By rozwiązać ten problem, w 2014 roku zespół prof. Drąga rozwinął metodę PS-SCL. Idea badaczy polegała na zastosowaniu podczas syntezy substratów nie tylko naturalnych aminokwasów, ale również szerokiej gamy ponad 100 aminokwasów nieproteinogenicznych, niewystępujących w naturze. Powstałe w ten sposób tzw. hybrydowe kombinatoryczne biblioteki substratów (ang. hybrid combinatorial substrate libraries, HyCoSuL) umożliwiają rozróżnienie blisko spokrewnionych ze sobą enzymów oraz projektowanie nowych, selektywnych i bardziej specyficznych narzędzi chemicznych do badania proteaz (Rysunek 9) [17, 130, 131]. Poręba i in. w badaniach nad ludzkimi kaspazami do syntezy bibliotek HyCoSuL użyli 129 aminokwasów (w tym 19 naturalnych), w wyniku czego zaprojektowano szereg substratów wykazujących selektywność względem kaspazy 3 i 7, 6, 8, 9 i 10 [17]. Kasperkiewicz i in. wykorzystali HyCoSuL do zaprojektowania wysoce specyficznych substratów dla neutrofilowej elastazy (NE). W wyniku użycia bibliotek zawierających 102 nienaturalne reszty aminokwasowe zaprojektowano substrat Ac-Nle(O-Bzl)-Met(O<sub>2</sub>)-Oic-Abu-ACC około stukrotnie bardziej specyficzny względem NE niż najlepszy dotychczasowy substrat Abz-APEEIMRRQ-EDDnp (Abz – kwas *o*-aminobenzoesowy; EDDnp – *N*-(2,4-dinitrofenylo)etylenodiamina). Specyficzna sekwencja peptydowa, zawierająca reszty nienaturalnych aminokwasów, została również wykorzystana do syntezy biotynylowanego markera chemicznego dla NE o sekwencji biot-PEG(4)-Nle(O-Bzl)-Met(O<sub>2</sub>)-Oic-Abu<sup>P</sup>(OPh)<sub>2</sub> [130]. Metoda HyCoSuL została z powodzeniem użyta w profilowaniu wielu proteaz, m.in. aktywowanego białka C, trombiny, czynnika Xa [132], NS2B-NS3 z wirusa dengi oraz Zachodniego Nilu [133], a także Lon z bakterii *E. coli* [134].

Biblioteki używane w metodzie PS-SCL oraz HyCoSuL nie dostarczają jednak informacji na temat preferencji substratowych w kieszeniach primowanych badanych enzymów. W substratach z bibliotek tego typu pozycję P1' zajmuje fluorofor, który uwalniany jest wskutek hydrolizy przez proteazę. Zbadanie primowanych pozycji wymaga użycia substratów o innej strukturze i w tym celu najczęściej stosowane są związki bazujące na zjawisku rezonansowego przeniesienia energii (ang. Förster resonance energy transfer, FRET). W zjawisku tym bierze udział tzw. donor fluorescencji oraz akceptor (wygaszacz). Dla FRET kluczowe znaczenie ma długość fali emitowanej przez wzbudzony donor, która musi pokrywać się z długością fali absorpcji akceptora. Wzbudzenie donora nie skutkuje emisją fotonu, a przeniesieniem energii poprzez oddziaływanie dipol-dipol między donorem i akceptorem [135]. W substratach typu FRET donor i akceptor oddzielone są od siebie za pomocą łańcucha peptydowego i energia wzbudzonego donora przenoszona jest bez emisji fotonu na akceptor. Hydroliza wiązania peptydowego wewnątrz łańcucha powoduje oddzielenie donora od akceptora, w wyniku czego donor emituje energię w postaci fotonów. Długość emitowanej fali elektromagnetycznej odpowiada maksimum emisji donora [135, 136]. Ograniczeniem metody wykorzystującej substraty typu FRET jest obserwacja sygnału od donora niezależnie od miejsca hydrolizy łańcucha peptydowego. Utrudnia to określenie specyficzności substratowej i potrzebne są dodatkowe eksperymenty, aby ją jednoznacznie określić [137]. Mimo tego substraty FRET z powodzeniem są używane w określaniu specyficzności substratowej proteaz, a technologia ta jest stale rozwijana [136]. Wiele par donorowo-akceptorowych jest kompatybilnych w odniesieniu do syntezy na nośniku stałym, co umożliwiło syntezę kombinatorycznych bibliotek peptydowych wewnętrznie wygaszanych substratów. Technologia PS-SCL, a potem HyCoSuL w połączeniu ze zjawiskiem FRET zostały wykorzystane do zbadania preferencji substratowych primowanych kieszeni wiążących m.in. endoproteazy cysteinowej MALT1 [138], serynowej proteazy HtrA2 [139], katepsyny B [140] czy ludzkiej konwertazy angiotensyny [141].





Rysunek 9. Schemat metody HyCoSuL na przykładzie biblioteki z Ala w P1, użytej do zbadania specyficzności substratowej elastazy neutrofilowej [130] oraz podjednostki  $\beta$ -5 ludzkiego proteasomu 20S [142]. „Mix” – mieszanina równomolowa 19 aminokwasów naturalnych z Nle zamiast Met oraz bez Cys.

### 1.3.2.2. Metody wykorzystujące spektrometrię mas

Degradomika to stosunkowo młoda dziedzina w obrębie proteomiki, zajmująca się badaniem degradomów, czyli proteaz oraz ich endogennych inhibitorów i substratów w kontekście całych komórek, tkanek, a nawet organizmów. Rozwój spektrometrii mas oraz wzrost mocy obliczeniowej komputerów w ostatnich dekadach umożliwiły opracowanie nowych technik w degradomice, które znajdują zastosowanie w identyfikacji fizjologicznych substratów dla proteaz. Nowe techniki umożliwiają również określanie specyficzności substratowej tych enzymów metodami, w których najczęściej, choć nie zawsze, wykorzystuje się proteom jako rezerwuuar substratów poddawanych hydrolizie. Następnie z pomocą baz danych analizuje się jego skład i identyfikuje produkty hydrolizy. W metodach proteomicznych identyfikowane i analizowane są C- i/lub N-końcowe peptydy powstałe wskutek aktywności badanej proteazy. Można więc wyróżnić metody C- oraz N-terminomiczne (ang. C/N-terminomics) [143].

Metoda PICS (ang. proteomic identification of protease cleavage sites) należy do najczęściej stosowanych proteomicznych technik określania specyficzności substratowej proteaz. Jest to przykład techniki N-terminomicznej – do dalszej analizy selekcjonowane są

C-końcowe peptydy zawierające grupę aminową, generowaną wskutek hydrolizy biblioteki substratów przez badany enzym. W metodzie tej proteom poddawany jest trawieniu enzymatycznemu (trypsyną, chymotrypsyną lub GluC). Następnie wszystkie wolne grupy aminowe (N-końcowe oraz z łańcuchów bocznych reszt lizyny) poddawane są reakcji dimetylacji aldehydem mrówkowym i cyjanoborowodorkiem sodu ( $\text{NaCNBH}_3$ ), a grupy sulfhydrylowe są alkiłowane jodoacetamidem. Kolejnym krokiem jest poddanie tak przygotowanej biblioteki peptydów hydrolizie przez badany enzym. W wyniku hydrolizy w peptydach generowane są N-końcowe wolne grupy aminowe poddawane w kolejnym kroku odwracalnej biotynylacji. Biotynylowane peptydy oczyszczane są za pomocą chromatografii powinowactwa i analizowane za pomocą LC-MS/MS (chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas), w wyniku czego identyfikowane są substraty badanej proteazy i określany jest jej profil specyficzności substratowej [144].

Metoda TAILS (ang. terminal amine isotopic labeling of substrates) należy do grupy metod C-terminomicznych. Proteom dzielony jest na dwie części – kontrolną oraz poddawaną działaniu badanej proteazy. Po hydrolizie przez badany enzym, wolne grupy aminowe w obu próbkach znakowane są izotopami. Następnie obie części są ze sobą mieszane i poddawane trypsynizacji. W jej wyniku powstają tzw. peptydy tryptyczne (C-końcowe peptydy powstałe w trakcie trypsynizacji) zawierające N-końcową grupę aminową. Są one usuwane z próbki za pomocą polimeru HPG-ALD, reaktywnego względem wolnych grup aminowych, a reszta peptydów poddawana jest analizie LC-MS/MS. Ze względu na możliwość użycia wielu różnych izotopów do wyznakowania grup aminowych, metoda TAILS pozwala na analizę do ośmiu proteaz jednocześnie. Dodatkowo, usunięcie z próbki peptydów tryptycznych zwiększa czułość tej metody względem alternatywnych technik [145].

Przykładem techniki wykorzystującej jednocześnie C- oraz N-końcowe peptydy powstałe w wyniku hydrolizy enzymatycznej jest metoda DIPPS (ang. direct in-gel profiling of protease specificity). W DIPPS proteom poddawany jest elektroforezie żelowej SDS-PAGE. Przygotowanie próbki do SDS-PAGE obejmuje denaturację białek, które po wnikięciu w żel są w postaci zlinearyzowanej. Po elektroforezie z żelu wycinane są paski zawierające białka. Paski suszy się, a następnie dodawana jest do nich badana proteaza, która hydrolizuje zawarte w nich białka. Kolejnym krokiem jest ekstrakcja powstałych peptydów z żelu i ich analiza z użyciem LC-MS/MS. W porównaniu do białek w stanie natywnym, ze względu na denaturację białek poddawanych degradacji w metodzie DIPPS, badany enzym ma dostęp do większej ilości potencjalnych miejsc hydrolizy. Dzięki

temu metoda ta pozwala określić profil specyficzności proteazy z większą dokładnością w porównaniu do PICS czy TAILS. Ograniczeniem DIPPS jest masa cząsteczkowa używanej proteazy – zbyt duże enzymy mogą nie być efektywnie absorbowane przez żel poliakrylamidowy zawierający białka [146].

Stosunkowo młodą techniką do określania specyficzności substratowej enzymów jest metoda multipleksowego profilowania substratowego z użyciem spektrometrii mas (ang. multiplex substrate profiling by mass spectrometry, MSP-MS) opracowana przez O'Donoghue i in. w 2012 roku [147]. W odróżnieniu od proteomicznych metod wykorzystujących proteom jako źródło substratów dla badanej proteazy, w metodzie tej wykorzystuje się bibliotekę syntetycznych, zdefiniowanych peptydów. Peptydy te zaprojektowane są w taki sposób, aby zawierały wszystkie możliwe pary bezpośrednio sąsiadujących ze sobą aminokwasów (XY), a także pary rozdzielone jedną lub dwoma resztami aminokwasowymi (X\*Y oraz X\*\*Y). Dodatkowo C- i N-końce tych substratów zaprojektowane są tak, aby możliwe było również badanie aktywności egzo- i endopeptydazowych. Do mieszaniny substratów dodawany jest badany enzym, który hydrolizuje peptydy z biblioteki. Następnie mieszanina poreakcyjna poddawana jest analizie LC-MS/MS. Na podstawie powstałych produktów hydrolizy określany jest profil specyficzności badanej proteazy w pozycjach P4-P4'. Metoda ta została wykorzystana do zbadania specyficzności substratowych enzymów takich jak ludzki i malaryczny proteasom [148], katepsyna E [147] czy destruktyna 1 z grzyba *Pseudogymnoascus destructans* [149].

### 1.3.2.3. Metody biologiczne

Metody biologiczne w badaniu specyficzności substratowej proteaz reprezentowane są przede wszystkim przez techniki oparte o technologię prezentacji fagowej. W monoklonalnym systemie prezentacji fagowej z użyciem faga M13 wykorzystuje się wektor fagemidowy, zawierający insert w obrębie genu białka płaszczka gIII. Insert ten składa się z informacji genetycznej, kodującej zrandomizowaną peptydową sekwencję, która wystawiana jest na działanie proteazy, oraz z białkowego znacznika powinowactwa umożliwiającego przyłączenie kapsydu fagemidu do podłoża. Fagemidy, które na swojej powierzchni zawierają sekwencję peptydową rozpoznawaną przez badany enzym, są uwalniane z podłoża i selekcjonowane do dalszych infekcji. Ze względu na niepełną informację genetyczną użytego wektora niezbędne jest zastosowanie tzw. fagów pomocniczych, które umożliwiają namnożenie i uwolnienie z komórek bakteryjnych cząstek

fagemidu. W ten sposób, po kilku rundach selekcji, uzyskuje się bibliotekę fagów, które wytwarzają na swojej powierzchni specyficzne względem badanej proteazy sekwencje peptydowe [150]. Wadą systemu monoklonalnego jest fakt, że fuzyjne białka gIII fagemidów rywalizują z gIII typu dzikiego fagów pomocniczych. Ze względu na to, mimo rund selekcji, prezentowane na powierzchni kapsydu białka mogą nie zawierać sekwencji peptydowych rozpoznawanych przez badaną proteazę. System poliklonalny nie wymaga użycia fagów pomocniczych, w związku z czym nie występuje problem ekspresji białek gIII typu dzikiego. Wykorzystuje on fagi M13 zawierające kompletny genom, co powoduje, że na swojej powierzchni prezentują one 5 kopii białka fuzyjnego gIII. Następstwem produkcji pięciu kopii tego białka jest uwolnienie faga z podłoża tylko w przypadku hydrolizy peptydu w każdej z kopii [151].

Zaletą metody prezentacji fagowej jest możliwość wygenerowania ponad miliona zróżnicowanych sekwencji peptydowych, a następnie wyselekcjonowanie z nich tych, które są najlepiej rozpoznawane przez badany enzym. Ani metody proteomiczne, pomimo wykorzystania proteomów jako bibliotek substratów, ani metody chemiczne, w których głównie syntezuje się stosunkowo krótkie peptydy, nie pozwalają na przebadanie tak wielu zróżnicowanych sekwencji peptydowych. Ograniczenie metod biologicznych wynika z wykorzystania maszyneryi enzymatycznych występujących w żywych organizmach. W związku z tym peptydy generowane w metodzie prezentacji fagowej mogą zawierać jedynie naturalnie występujące aminokwasy. Oprócz tego metody te nie dają tak dokładnej informacji na temat specyficzności substratowej jak metody chemiczne, oparte na wykorzystaniu bibliotek kombinatorycznych [152]. Dotychczas metody wykorzystujące prezentację fagową zostały użyte do poznania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych z różnych grup proteaz, m.in. trombiny (proteaza serynowa) [153, 154], ADAMTS13 (metaloproteaza) [153] czy HIV-1 Pr (proteaza aspartylowa) [155].

#### **1.3.2.4. Specyficzność substratowa DUBs względem łańcuchów poli-Ub**

Zrozumienie funkcji fizjologicznych badanych DUBs wymaga wiedzy na temat ich preferencji substratowych w stosunku do łańcuchów Ub o różnych długościach i topologiach. Opracowane w ostatnich latach metody syntezy cząsteczek Ub oraz łańcuchów di-Ub przyspieszyły i ułatwiły badania nad specyficznością substratową tej grupy proteaz [156-159], a kolejne rozwiązania w dziedzinie syntezy białek umożliwiają otrzymywanie coraz dłuższych syntetycznych łańcuchów poli-Ub [160]. Obok metod syntetycznych, opracowano również wiele metod enzymatycznych syntezy zdefiniowanych

łańcuchów poli-Ub. Wykorzystują one szereg reakcji katalizowanych przez enzymy z grup E1, E2 oraz E3. Następnie przeprowadzana jest „kontrola jakości” powstałych łańcuchów z użyciem DUBs, w celu usunięcia łańcuchów poli-Ub o „błędnej” topologii. Użycie DUBs nie jest natomiast wymagane w przypadku użycia mutantów Ub, w których reszty Lys, niebiorące udziału w formowaniu wiązań izopeptydowych, zastąpione są resztami Arg. Ograniczeniem metod enzymatycznych jest brak opisanego systemu enzymatycznego do syntezy łańcuchów połączonych przez K27 [161].

Określanie specyficzności substratowej DUBs za pomocą łańcuchów poli-Ub polega na poddaniu ich hydrolizie przez badany enzym. Następnie mieszanina poreakcyjna w różnych odstępach czasu analizowana jest za pomocą elektroforezy żelowej SDS-PAGE, po której, w celu wizualizacji, produkty hydrolizy wybarwiane są w żelu barwnikiem (np. Coomasie blue). W wyniku hydrolizy pasek pochodzący od substratowych łańcuchów poli-Ub o masie, która jest wielokrotnością masy pojedynczej cząsteczki Ub (około 8,6 kDa), ma mniejszą intensywność, natomiast w żelu widoczne stają się prążki pochodzące od produktów hydrolizy. Panele różnych substratów poli-Ub zostały użyte do scharakteryzowania specyficzności substratowej wielu DUBs. Mevissen i in. wykorzystali osiem różnych substratów di-Ub do określenia specyficzności substratowej wszystkich ludzkich OTUs. Badanie pokazało, że OTUs cechuje duża różnorodność względem preferowanych substratów i wynika to z kilku różnych mechanizmów wiązania łańcuchów poli-Ub [162]. Taki sam panel substratów di-Ub został wykorzystany przez Faesena i in. do zbadania DUBs z grupy USP. Badacze wykazali, że enzymy te cechuje brak selektywności względem konkretnych połączeń między cząsteczkami Ub [163].

Inną grupą intensywnie badanych pod względem specyficzności substratowej DUBs są proteazy PL<sup>pro</sup> koronawirusów. Proteazy te stanowią potencjalny cel dla leków, w związku z czym zrozumienie ich funkcji oraz znajomość architektury miejsca aktywnego są kluczowe dla projektowania nowych biologicznie aktywnych cząsteczek. W badaniu Békésa i in. porównano preferencje substratowe PL<sup>pro</sup> z SARS-CoV i MERS-CoV oraz ludzkiego DUB USP2<sub>CD</sub> z użyciem panelu różnych łańcuchów poli-Ub. Eksperyment wykorzystujący panel ośmiu różnych di-Ub wykazał, że MERS-CoV PL<sup>pro</sup> ma zdolność do hydrolizy wszystkich, poza liniowymi (przez M1), połączeń Ub-Ub w tych substratach. Następnie użycie tri- oraz tetra-Ub dowiodło, że proteaza z wirusa SARS wymaga obecności co najmniej trzech połączonych ze sobą cząsteczek Ub, aby skutecznie hydrolizować te substraty [121]. W 2020 roku, podczas pandemii COVID-19 wywołanej przez nowego koronawirusa SARS-CoV-2, kilka grup badawczych scharakteryzowało specyficzność

substratową enzymu PL<sup>pro</sup> z tego wirusa. W badaniu Rut i in. użyto substratów tetra-Ub, połączonych przez K48 i K63, aby porównać aktywności proteazy PL<sup>pro</sup> z SARS-CoV i SARS-CoV-2 względem nich. Badania wykazały, że mimo bliskiego pokrewieństwa i aż 83% identyczności sekwencji obu enzymów, SARS-CoV-2 PL<sup>pro</sup> wykazuje obniżoną zdolność do hydrolizy łańcuchów poli-Ub, połączonych przez K48 w stosunku do enzymu z SARS-CoV [164]. Klemm i in. zbadali zdolność hydrolizy SARS-CoV-2 PL<sup>pro</sup> wobec pięciu różnych wariantów tri-Ub. Jedynie tri-Ub połączone przez K48 ulegały hydrolizie, w przeciwieństwie do łańcuchów połączonych przez M1, K11, K33 oraz K63 [165].

### 1.3.3. Markery chemiczne w badaniu enzymów proteolitycznych

Aktywność enzymów proteolitycznych jest ściśle regulowana w komórkach. Wiele proteaz ekspresjonowanych jest w formie zymogenów, a aktywność części z nich regulują endogenne inhibitory. Oprócz tego, aby proteaza była aktywna w danym środowisku (kompartmencie komórkowym, tkance, narządzie), muszą panować w nim sprzyjające warunki fizykochemiczne, takie jak odpowiednie pH czy potencjał redoks [166]. Obecność mRNA danej proteazy jak i produktu jego translacji w badanej próbce nie dają odpowiedzi, czy poszukiwane białko jest aktywne enzymatycznie. Informację tę uzyskuje się najczęściej w wyniku zastosowania tzw. markerów chemicznych. ABPs to jedne z najpowszechniej wykorzystywanych narzędzi chemicznych w badaniu enzymów proteolitycznych, gdyż w przeciwieństwie do metod genomicznych, transkryptomycznych lub wykorzystujących przeciwciała, umożliwiają detekcję tzw. aktywomu (ang. activome), czyli aktywnych form tych białek [167]. Markery chemiczne używane są do identyfikacji nowych enzymów proteolitycznych, określania ich lokalizacji i aktywności w próbkach biologicznych (lizatach komórkowych, komórkach, tkankach, osoczu itd.), a także w badaniach nad nowymi inhibitorami dla tych enzymów. ABPs o szerokim spektrum działania używane są natomiast w eksperymentach profilowania z użyciem markerów chemicznych (ang. activity-based probe profiling, ABPP). W badaniach tego typu markery chemiczne stosowane są do monitorowania poziomu aktywności określonych enzymów wśród wszystkich białek zawartych w badanej próbce biologicznej [168]. Klasyczne ABPs złożone są z trzech elementów:

- 1) ugrupowania o elektrofilowym charakterze, wiążącego się do miejsca aktywnego proteazy (ang. warhead);
- 2) grupy reporterowej, umożliwiającej detekcję enzymu;

3) linkera oddzielającego grupę reporterową od reaktywnej grupy, wiążącej się do miejsca aktywnego.

Reaktywne elektrofilowe ugrupowanie umieszczane jest najczęściej na C-końcu markera. Jego rolą jest kowalencyjne związanie się do reaktywnego nukleofila w centrum aktywnym proteazy, co powoduje inhibicję enzymu oraz umożliwia jego detekcję. W trakcie projektowania markera chemicznego elektrofil ten wybierany jest pod względem reaktywności wobec badanej grupy proteaz. Zazwyczaj stosuje się ugrupowania wywodzące się z inhibitorów danych enzymów [76]. W przypadku DUBs wykorzystuje się są m.in. aldehydy, akceptory Michaela (np.  $\alpha,\beta$ -nienasycone estry, sulfony winylowe), amid propargilowy, nityle czy halogenki alkilowe [25].

Linker to alifatyczny łańcuch, którego zadaniem jest oddzielenie reaktywnego elektrofila od grupy reporterowej. W przypadku projektowania selektywnych markerów chemicznych dla proteaz jego rolę pełni najczęściej krótka sekwencja peptydowa, specyficzna i selektywna względem badanego enzymu. Źródłem selektywnych sekwencji mogą być miejsca hydrolizy substratów fizjologicznych danej proteazy. Ograniczone są one jednak do sekwencji zawierających stosunkowo niewielką pulę naturalnych aminokwasów, przez co może dochodzić do nieselektywnego wiązania markera przez inne enzymy. Metody określenia profilu specyficzności substratowej wykorzystujące nienaturalne aminokwasy (np. HyCoSuL, CoSeSuL) pozwalają otrzymać bardziej selektywne markery chemiczne [169].

Na N-końcu ABP z reguły znajduje się grupa reporterowa, czyli ugrupowanie umożliwiające wizualizację związanych z markerem proteaz. Rolę takiej grupy dawniej pełniły radioizotopy, jednak wyparły je fluorofory, takie jak barwniki cyjaninowe (m.in. Cy3, Cy5, Cy7), ksantenowe (m.in. fluoresceina, rodamina, TAMRA) czy BODIPY [168]. Zaletą fluoroforów jest prostota detekcji emitowanego sygnału, kompatybilność z chemią SPPS, dostępność komercyjna, a także możliwość syntezy wewnętrznie wygaszanych markerów chemicznych (ang. quenched ABP, qABP). qABPs, oprócz grupy reporterowej będącej donorem fluorescencji, zawierają w swoich strukturach także tzw. wygaszacz fluorescencji (ang. quencher). Po ataku nukleofilowym proteazy wygaszacz jest uwalniany, a donor zaczyna emitować sygnał fluorescencyjny [170]. Inną grupę reporterów stanowią znaczniki białkowe (np. His-tag, HA-tag), biotyna oraz azydki i alkiny. Reportery te umożliwiają wykonanie eksperymentów typu „pull-down” (selektywne „wyciągnięcie” wyznakowanych enzymów z mieszaniny za pomocą złoź wykazujących powinowactwo do użytego znacznika), a także wizualizację. Wizualizacja wymaga użycia koniugatów

przeciwniał względem peptydowych tagów (w przypadku biotyny – koniugatów streptawidyny), a alkiny i azydki wymagają przeprowadzenia reakcji „click chemistry” z odpowiednią grupą chemiczną na złożu [168]. W 2020 roku Poręba i in. zaprezentowali nowy typ grupy reporterowej, która zawiera w swojej strukturze schelatowany izotop metalu ziem rzadkich, a detekcja odbywa się przy użyciu cytometru masowego. Różnorodność dostępnych komercyjnie izotopów sprawia, że zastosowanie tego rodzaju markerów chemicznych w teorii umożliwia wizualizację nawet kilkudziesięciu proteaz jednocześnie [167].

#### **1.3.4. Markery chemiczne do badania DUBs**

Przystosowanie DUBs do hydrolizy Ub oraz łańcuchów poli-Ub sprawia, że ABP z krótkim peptydowym linkerem nie wiążą się specyficznie do miejsca aktywnego. W badaniu z 2005 roku Borodovsky i in. zsyntezowali serię peptydowych inhibitorów o różnej długości, opartych na sekwencjach aminokwasowych pochodzących z C-końca Ub. Badacze określili, że minimalna długość sekwencji aminokwasowej w inhibitorach efektywnie wiążących się do DUBs wynosi dwanaście reszt aminokwasowych. Mimo tego takie związki nadal były słabymi inhibitorami – zahamowanie aktywności DUBs zawartych w lizacie komórkowym wymagało użycia najlepszego inhibitora w wysokim stężeniu, wynoszącym 50  $\mu\text{M}$  [171]. W związku z tym struktury najskuteczniejszych i powszechnie stosowanych narzędzi chemicznych do badania enzymów z grupy deubikwitynaz oparte są na cząsteczce Ub lub krótkich łańcuchach poli-Ub. Związanie Ub do powierzchni DUB powoduje zmianę konformacji domeny katalitycznej na aktywną. Ponadto zapewnia właściwą orientację C-końcowego motywu LRGG w obrębie miejsca aktywnego. Markery chemiczne do badania DUBs to cząsteczki ubikwityny lub krótkie łańcuchy poli-Ub sfunkcjonalizowane elektrofilowym ugrupowaniem, które zwykle znajduje się na C-końcu cząsteczki. Podobnie jak w przypadku ABPs dla innych proteaz, do N-końca z reguły przyłączona jest grupa reporterowa [25].

Pierwszymi ABPs dla DUBs były cząsteczki pojedynczej Ub sfunkcjonalizowane elektrofilową grupą wiążącą na C-końcu i grupą reporterową na N-końcu. W 2001 roku Borodovsky i in. zsyntezowali pierwszy marker chemiczny na podstawie Ub, którego grupę reporterową stanowił izotop  $^{125}\text{I}$ , a na C-końcu znajdowała się grupa winylosulfonowa (VS) [172]. Przewagą VS nad wcześniej stosowanymi elektrofilowym C-końcowym aldehydem (Ubal) oraz nitrylem (Ub-CN) była nieodwracalność wiązania DUB-ABP w warunkach redukujących, co ograniczało użycie wcześniejszych narzędzi chemicznych. W kolejnych



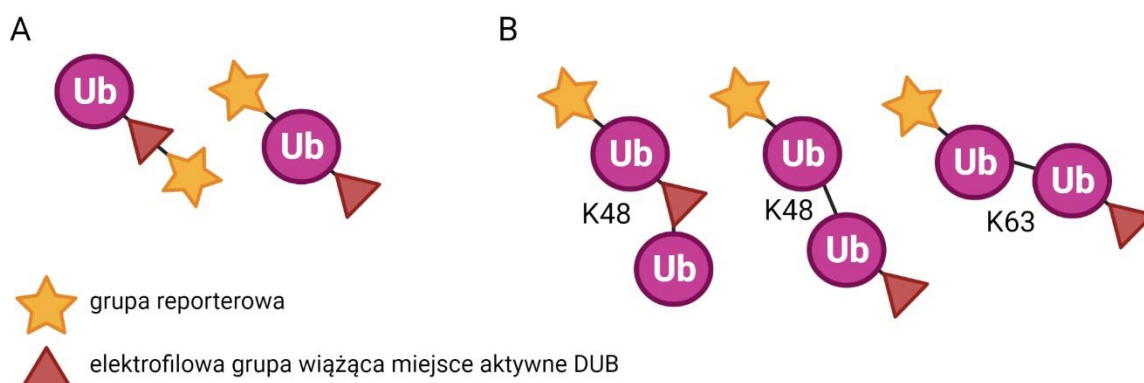
latach opracowano nowe elektrofilowe ugrupowania reaktywne względem miejsca aktywnego DUBs (m.in. propargilamina (PA), winylometyloester (VME), winylometylosulfon (VS), winylofenylosulfon (VSPH), chloroetyloamina (Cl), bromoetyloamina (Br2) czy bromopropiloamina (Br3)) [173, 174], a używanymi powszechnie grupami reporterowymi stały się fluorofory oraz znaczniki powinowactwa [175]. W 2012 roku McGouran i in. zaprojektowali i zsyntezowali marker chemiczny, w którym fluorofor (Cy5) znajdował się na C-końcu cząsteczki, a od reszty Ub oddzielał go akceptor Michaela (Rysunek 10A). Badacze dowiedli, że ułożenie grupy reporterowej w pozycji P1' nie wpływa negatywnie na wiązanie przez DUBs. Ponadto wykazali, że fluorescencyjne markery chemiczne pozwalają na dokładniejszą detekcję DUBs o masach w zakresie 100 – 250 kDa w porównaniu do markerów zawierających HA-tag jako grupę reporterową [176].

Istotnym krokiem w kierunku lepszego zrozumienia roli DUBs w procesach zachodzących w komórkach było zaprezentowanie ABPs przepuszczalnych przez błonę komórkową. Pierwszym badaniem ukazującym profilowanie DUBs w żywych komórkach była praca Ward i in. z 2016 roku, w której badacze użyli małej cząsteczki markera chemicznego z grupą alkinową, umożliwiającą dalszą reakcję typu „click chemistry” i analizę wyznakowanych enzymów za pomocą spektrometrii mas [177]. Zaprezentowany przez nich marker chemiczny cechowała specyficzność wobec DUBs z rodziny USP – jego użycie umożliwiło detekcję dwunastu enzymów z tej grupy, aktywnych w komórkach U2OS. Gui i in. zaprojektowali serię nowych ABP, pochodnych Ub, przepuszczalnych przez błonę komórkową [178]. Peptyd penetrujący komórkę cR<sub>10</sub> (cykliczna poliarginina) został przyłączony mostkiem disiarczkowym, dzięki czemu wnikięcie markera do komórek, w których panują warunki redukujące, powodowało redukcję mostka i uwolnienie reaktywnego fragmentu ABP do cytoplazmy. Obecność HA-tagu umożliwiła wyizolowanie związanych DUBs poprzez chromatografię powinowactwa, a barwnik fluorescencyjny tetraetylorodamina (TER) bezpośrednią wizualizację wyznakowanych proteaz. W eksperymencie profilowania DUBs w żywych komórkach potwierdzono za pomocą spektrometrii mas, że przepuszczalny przez błonę komórkową marker chemiczny HA-Cys(cR<sub>10</sub>)-Ub-PA wyznakował 34 różnych DUBs zlokalizowanych w różnych kompartmentach komórkowych. Profilowanie markerem chemicznym powtórzono również w lizatach komórkowych, co poskutkowało identyfikacją jedynie dziesięciu DUBs [178].

Ograniczeniem markerów chemicznych zawierających grupy kowalencyjnie wiążące się do miejsca aktywnego jest brak ich reaktywności względem metaloDUBs, które nie

zawierają w centrum aktywnym nukleofilowej reszty cysteiny. Zamiast tego, w ich centrum aktywnym znajduje się jon  $Zn^{2+}$  koordynowany przez dwie reszty His oraz jedną Asp. Badacze z grupy Ova'a zaproponowali użycie 8-merkaptochinoliny (8-MQ) jako chelatora jonu metalu w miejscu aktywnym Rpn11 w kompleksie z Rpn8 [179]. Zaprojektowali i zsyntezowali oni markery Rho-Ub<sub>74</sub>-8-MQ oraz Bio-PEG<sub>2</sub>-Ub<sub>74</sub>-8-MQ. Marker z rodaminą tworzył stabilny kompleks z Rpn11/Rpn8, umożliwiając detekcję aktywności i wizualizację proteazy w żelu. Biotynylowany marker pozwolił natomiast na przeprowadzenie eksperymentu typu pull-down w lizatach komórkowych HeLa nadekspresjonujących inne metaloDUBs: GFP-POH1, GFP-AMSH oraz GFP-AMSH-LP, a także izolację tych proteaz spośród pozostałych enzymów.

Ze względu na preferencję substratową niektórych DUBs wobec określonych łańcuchów poli-Ub ważnym krokiem w rozwoju ABPs dla tej grupy enzymów była synteza kowalencyjnych markerów chemicznych, których struktura była oparta na łańcuchach di-Ub (Rysunek 10B). W 2013 r. McGouran i in., korzystając z półsyntetycznych metod syntezy, otrzymali osiem różnych wariantów di-Ub zawierających akceptor Michaela między proksymalną i dystalną resztą Ub [180]. Zsyntezowane markery chemiczne zostały użyte do wyznakowania DUBs w lizatach komórek HEK-293T oraz porównano je do HA-Ub-VME i HA-Ub-alkin. Di-Ub ABPs wiązały się specyficznie z mniejszą liczbą enzymów w porównaniu do markerów referencyjnych mono-Ub. Rok później Haj-Yahya i in. przedstawili strategię syntezy di-Ub zawierających dehydroalaninę jako ugrupowanie reaktywne wobec cysteiny w miejscu aktywnym DUB. Reszta Dha umieszczona była między proksymalną i dystalną resztą Ub [181]. Również w 2014 roku Mulder i in. zaprezentowali ścieżkę totalnej syntezy dla wszystkich możliwych rozgałęzionych di-Ub, zawierających między podjednostkami Ub akceptor Michaela [182]. W celu walidacji metody badacze użyli do wyznakowania przez zsyntezowane markery chemiczne dwóch DUBs: USP8 z szeroką specyficznością substratową wobec różnych topologii połączeń między Ub, oraz OTUD7B z preferencją względem poli-Ub połączonych przez K11. Otrzymane wyniki potwierdziły selektywność markera chemicznego K11 względem OTUD7B. Oprócz tego fluorescencyjne markery di-Ub K11 i K48 zostały porównane z markerem chemicznym Cy5-Ub-VME w eksperymencie znakowania DUBs zawartych w lizacie komórkowym EL-4. W efekcie SDS-PAGE i wizualizacji w żelu wyznakowanych białek z lizatu otrzymano odmienne wzory prążków, świadczące o specyficzności markerów względem różnych DUBs.



*Rysunek 10.* Struktura markerów chemicznych do badania DUBs. A – markery chemiczne o strukturach opartych na jednej cząsteczce ubikwityny mogą różnić się położeniem grupy reporterowej. B – markery chemiczne o strukturach opartych na łańcuchach di-Ub. W zależności od mechanizmu wiązania łańcucha poli-Ub do enzymu, elektrofilowe ugrupowanie może znajdować się w innym fragmencie markera chemicznego, a łańcuch poli-Ub może mieć różną topologię.

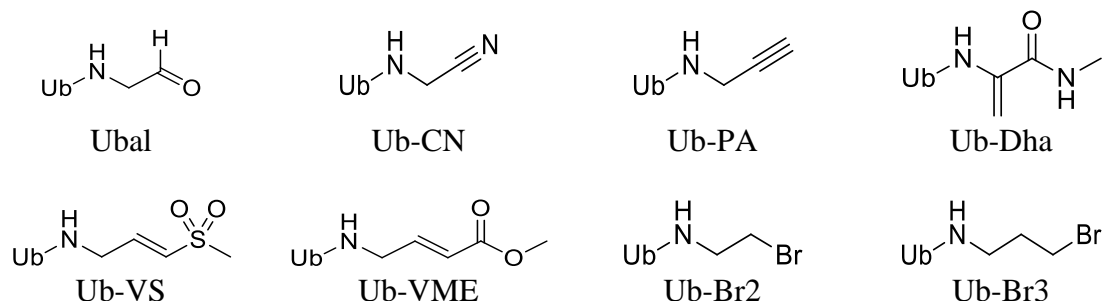
### 1.3.5. Selektywności narzędzi chemicznych do badania DUBs

Istotnym problemem w badaniach nad DUBs jest mała dostępność selektywnych narzędzi chemicznych do rozróżniania aktywności wybranych enzymów z tej grupy. Do tej pory badacze modulowali reaktywność projektowanych markerów chemicznych m.in. poprzez syntezę odpowiedniego łańcucha poli-Ub stanowiącego szkielet markera chemicznego [182], projektowanie mutantów Ub oddziałujących tylko z wybranymi DUBs [183, 184] oraz poprzez zastosowanie C-końcowego elektrofilowego ugrupowania reaktywnego względem wybranych DUBs [173, 174, 185].

#### 1.3.5.1. Dobór C-końcowego elektrofilowego ugrupowania

DUBs dzielą się na siedem rodzin, z czego sześć stanowią proteazy cysteinowe, zawierające w centrum aktywnym nukleofilową resztę cysteiny, reaktywną wobec elektrofilowych ugrupowań [25]. Borodovsky i in. porównali siedem różnych markerów HA-Ub-elektrofil różniących się między sobą elektrofilowym ugrupowaniem na C-końcu cząsteczki (HA-Ub-R; R= -VS, -VME, -VSPH, -Br<sub>2</sub>, -CN, -Cl, -Br<sub>3</sub>). W efekcie otrzymano siedem odmiennych wzorów prążków na żelu po wizualizacji wyznakowanych enzymów [173]. W badaniu opisującym nowe ugrupowanie elektrofilowe do badania DUBs, porównano powszechnie używany C-końcowy ester winylowo-metylowy do propargilamidu (PA). W jednym z eksperymentów pokazano, że PA wiąże się do większej liczby DUBs niż VME, oprócz tego znakuje DUBs z różnych rodzin (USP, OTU, UCH), a także może zostać użyty w badaniach nad kaspazami [174]. Z kolei Hewitt i in. wykorzystali różnicę w reaktywności markerów z VME i PA względem UCH-L1 i -L3, aby

zaprojektować marker selektywny względem UCH-L3. Badane enzymy wykazywały większą różnicę w reaktywności wobec markerów chemicznych zawierających grupę PA niż wobec markerów z grupą VME [186]. Struktury chemiczne wybranych ugrupowań elektrofilowych używanych do badania DUBs przedstawiono na Rysunku 11.



Rysunek 11. Przykłady grup elektrofilowych wykorzystywanych w syntezie markerów chemicznych dla enzymów deubikwitynujących [25].

### 1.3.5.2. Metody wykorzystujące prezentację fagową

W ostatnich latach popularność zyskuje synteza racjonalnie zaprojektowanych mutantów Ub, które za sprawą wprowadzonych zmian w strukturze trzeciorzędowej wykazują selektywne wiązanie do wybranych enzymów deubikwitynujących. Ernst i in. przedstawili metodę generowania wariantów Ub o wysokim powinowactwie wobec wybranych DUBs, które po ekspresji w komórkach pełnią rolę silnych inhibitorów kompetycyjnych tych enzymów [183]. Zaprezentowana metoda wykorzystuje prezentację fagową z randomizacją reszt aminokwasowych w trzech wybranych regionach Ub, które badacze określili jako kluczowe dla wiązania substratu przez modelowy enzym USP21. Następnie, po pięciu rundach selekcji fagów, uzyskano warianty Ub wiążące się selektywnie do USP8, USP2a, USP21 oraz OTUB1, a także rozwiązano struktury krystaliczne dla tych DUBs związanych z odpowiadającym im selektywnym wariantem Ub. Guo i in. wykorzystali metodę prezentacji fagowej do stworzenia inhibitorów – mutantów Ub selektywnych wobec STAMBPL1 z grupy metaloproteaz JAMMs [58]. Opracowane warianty Ub<sup>SP.1</sup>, Ub<sup>SP.2</sup> i Ub<sup>SP.3</sup> nie wykazywały powinowactwa wobec DUBs z innych grup (OTUD1, USP7, USP14), włączając w to inne JAMMs (enzym BRISC). Zhang i in. użyli tej metodologii do stworzenia wariantów Ub o wysokim powinowactwie wobec wirusowych DUBs: MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz proteazy OTU z wirusa krymsko-kongijskiej gorączki krwotocznej (CCHFV). Ekspresja w komórkach wariantu ME.4 selektywnego względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> powodowała redukcję miana wirusa nawet o cztery rzędy wielkości w komórkach MRC5 i do trzech rzędów wielkości w komórkach Huh7 [187].

### 1.3.5.3. Metody wykorzystujące projektowanie mutantów Ub *in silico*

Metoda prezentacji fagowej umożliwia uzyskanie wysoce selektywnych inhibitorów o strukturach bazujących na cząsteczce Ub. Metoda ta ma jednak istotne ograniczenie – mutanty otrzymane tą drogą nie mogą być przekształcone w markery chemiczne wiążące się do miejsca aktywnego. Najprawdopodobniej jest to skutek ułożenia C-końcowego ogona poza miejscem aktywnym. Gjonaj i in. opracowali własną metodę projektowania selektywnych wariantów Ub, które mogą posłużyć do syntezy markerów chemicznych oraz substratów do badania DUBs [184, 188]. Ich metoda zakłada racjonalne projektowanie mutantów na podstawie informacji pochodzących z różnych eksperymentów oraz symulacji *in silico*. Punktem wyjścia były wyniki otrzymane w eksperymentach prezentacji fagowej. Następnie wykorzystano algorytm FoldX do obliczenia względnych energii wiązania różnych mutantów Ub do wybranych DUBs [184]. Do trzeciej rundy selekcji przechodziły struktury Ub z wprowadzonymi substytucjami, które jednocześnie zwiększały powinowactwo mutantów do USP7 oraz obniżały je wobec innych wybranych DUBs (USP5, USP14, USP21 i UCH-L3). Ostatnia runda polegała na analizie strukturalnej USP5 i wyborze mutacji, które wykazywały jedynie negatywny wpływ na wiązanie mutantów do tego enzymu. W ten sposób zaprojektowano marker Rh-M6-PA selektywnie znakujący USP7 w lizatach HAP1. W kolejnym badaniu grupa ta w podobny sposób otrzymała selektywny marker chemiczny Rh-M20-PA i substrat M20-AMC dla USP16 [188]. Wykorzystując narzędzie Swiss-Model wymodelowano *in silico* struktury USP15 i USP16, dla których w tamtym czasie nie było dostępnych struktur krystalicznych. Modele te, wraz z metodą wykorzystaną w poprzednim badaniu [184], posłużyły do zaprojektowania selektywnego wariantu Ub, który został przekształcony w marker chemiczny i substrat. Działanie i selektywność tych narzędzi chemicznych zostało potwierdzone w eksperymentach z wykorzystaniem lizatów HAP1. W 2020 roku Hewitt i in. wykorzystali narzędzia bioinformatyczne FoldX oraz RosettaDesign do optymalizacji struktury wariantów Ub w celu uzyskania mutantów selektywnych względem DUBs z grupy UCH [185]. Dwa lata później, wykorzystując podobną strategię, grupa ta opublikowała badanie, w którym zaprezentowano selektywny względem UCH-L3 marker chemiczny, potrójny mutant Ub, HA-UbV<sup>Q40V/T66K/V70F</sup>-PA [186]. Selektywność jego wiązania przez UCH-L3 została potwierdzona w eksperymentach z użyciem lizatów z komórek MDA-MB-231.

## 1.4. Synteza pochodnych ubikwityny

Istnieje wiele metod otrzymywania pochodnych ubikwityny i można podzielić je na dwie grupy. Metody semisyntetyczne obejmują techniki wykorzystujące kondensację rekombinowanych białek i/lub peptydów, a także ich chemiczne modyfikacje. Metody syntetyczne natomiast opierają się na totalnej syntezie chemicznej cząsteczek Ub oraz ich pochodnych.

### 1.4.1. Metody semisyntetyczne

Już od lat 80. badacze zainteresowani są pozyskiwaniem narzędzi do badania enzymów regulujących ścieżki sygnałowe zależne od ubikwityny. Jednym z pierwszych substratów do badania aktywności DUBs był C-końcowy ester etylowy ubikwityny (Ub-COOEt). W 1986 roku Wilkinson i in. opisali otrzymywanie go poprzez transpeptydację Ub wyizolowanej z erytrocytów [189]. Metoda ta wykorzystywała odporność Ub na działanie trypsyny – pod jej wpływem hydrolizie ulega przede wszystkim wiązanie peptydowe po karboksylowej stronie reszty Arg74 i uwalniany jest dipeptyd Gly-Gly z C-końca Ub. Badacze przeprowadzili katalizowaną trypsyną reakcję transpeptydacji w warunkach wysokiego stężenia Gly-Gly-COOEt, co umożliwiło wyizolowanie Ub-COOEt z wydajnością około 30%. W tym samym roku opisano również metodę generowania jednego z pierwszych inhibitorów DUBs, czyli Ubal. Opierała się ona na redukcji do aldehydu C-końcowej grupy karboksylowej Ub w obecności NaBH<sub>4</sub> [190].

W 2002 roku Borodovsky i in. zaprezentowali nową metodę syntezy ABPs do badania DUBs polegającą na ekspresji białka fuzyjnego złożonego z czterech części: HA-tagu, Ub<sub>75</sub>, inteiny oraz domeny CBD, wiążącej chitynę (ang. chitin-binding domain) [173]. Białko ekspresjonowano w *E. coli*, a następnie izolowano z lizatu z użyciem chromatografii powinowactwa na złożu chitynowym. Kolejnym krokiem była transtioestryfikacja z MESNa (β-merkaptioetanosulfonian sodu), skutkująca uwolnieniem ze złoża Ub-MESNa. Uzyskany w ten sposób tioester poddawany był reakcji z wybranym elektrofilowym ugrupowaniem w obecności soli kwasu *p*-toluenosulfonowego i *N*-hydroksysukcynimidu w zasadowym środowisku. Pokrewna metoda wykorzystywana była również do syntezy m.in. selektywnych wariantów Ub do badania UCHs [185]. Li i in. zastosowali podobną strategię do otrzymania substratu Ub-AMC [191]. Ich metoda polegała na ekspresji białka fuzyjnego złożonego z Ub<sub>75</sub>, inteiny oraz domeny wiążącej chitynę. Po związaniu białka fuzyjnego do złoża chitynowego, badacze przeprowadzili reakcję hydrazynolizy i wyizolowali hydrazyd Ub<sub>75</sub>-NH-NH<sub>2</sub>. W kolejnym kroku został on aktywowany *in situ* do postaci Ub<sub>75</sub>-N<sub>3</sub>, uległ

konwersji do tioestru Ub<sub>75</sub>-MPAA, a następnie transtioestryfikacji z tiolową pochodną Gly-AMC, w rezultacie dając produkt Ub-AMC.

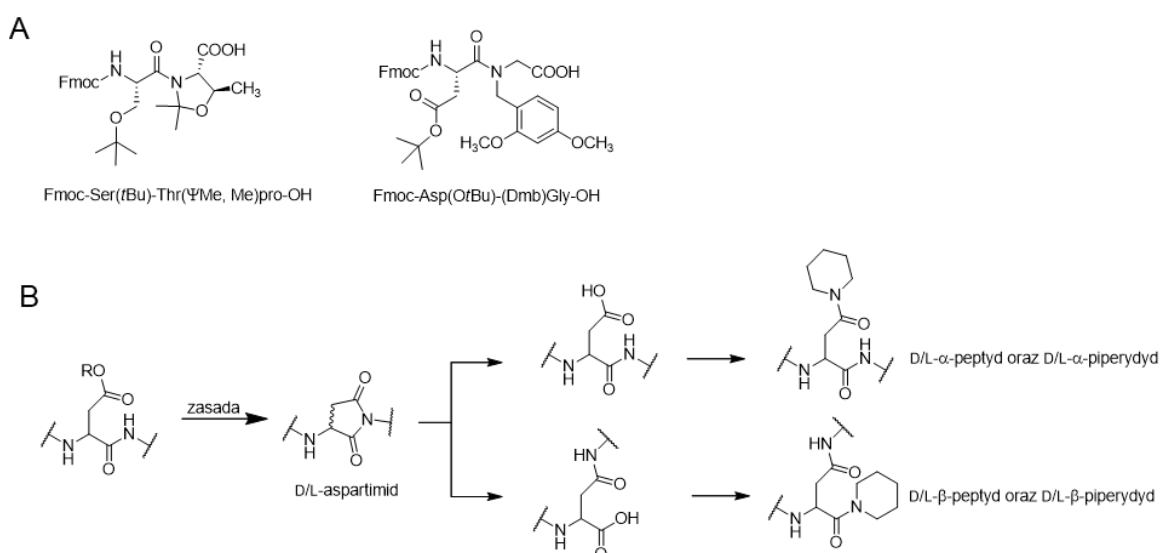
Ze względu na obecność wiązań izopeptydowych, wyzwaniem dla metod semisyntetycznych stanowi otrzymywanie łańcuchów poli-Ub o różnych topologiach. Stale rozwijane są techniki biochemiczne syntezy wybranych łańcuchów z użyciem enzymów E1, E2, E3 oraz DUBs [161, 192]. Innym podejściem jest wykorzystanie chemoselektywnych ugrupowań wprowadzanych do cząsteczek Ub, które umożliwiają utworzenie wiązań między dystalną i proksymalną resztą Ub. McGouran i in. wykorzystując metodę przedstawioną przez Borodovsky uzyskali HA-Ub-PA zawierającą akceptor Michaela pomiędzy Ub i PA. Korzystając z ukierunkowanej mutagenezy wyeksponowali warianty Ub zawierające w swoich strukturach nienaturalną resztę azydohomoalaniny (Aha) [180]. Aha zastępowała resztę lizyny w miejscu, w którym rozgałęziany był łańcuch Ub. Obecność C-końcowej grupy PA (alkin) w dystalnej Ub oraz grupy azydkowej w proksymalnej Ub umożliwiła połączenie ze sobą obu podjednostek w reakcji typu „click-chemistry” (CuAAC – cykloaddycja azydku do alkinu katalizowana jonami Cu(I)).

## **1.4.2. Metody syntezy totalnej**

### **1.4.2.1. Wykorzystanie SPPS**

Ubikwityna jest stosunkowo małym białkiem złożonym z 76 aminokwasów. Rozwój technik syntezy peptydów na podłożu stałym oraz opracowanie metody natywnej chemicznej ligacji (ang. native chemical ligation, NCL) i jej różnych odmian umożliwiły naukowcom otrzymywanie w pełni syntetycznych cząsteczek ubikwityny, jej pochodnych, a także łańcuchów poli-Ub [160]. Jednym z głównych ograniczeń SPPS jest długość syntezowanego peptydu. Przyjmuje się, że technika ta jest skuteczną metodą syntezy dla łańcuchów o długości do około pięćdziesięciu reszt aminokwasowych, jednak wartość ta jest umowna i w rzeczywistości zależy przede wszystkim od sekwencji syntezowanego peptydu [193]. Mimo tego synteza chemiczna ubikwityny jako jednego polipeptydu po raz pierwszy została opisana już w 1989 roku [194], jednak dopiero ponad 20 lat później rozwój SPPS umożliwił przeprowadzenie jej w wydajny sposób. Zespół Ova'a'y przedstawił protokół wykorzystujący 2,4-dimetoksybenzylowe (Dmb) i pseudoprolinowe dipeptydy (tzw. dipeptydowe bloki budulcowe, ang. dipeptide building blocks), używane w syntezie peptydów trudnych do uzyskania z użyciem klasycznej SPPS (Rysunek 12A) [156]. Niska wydajność syntezy tych peptydów najczęściej wynika ze spadku rozpuszczalności syntezowanego związku podczas wydłużania jego łańcucha na nośniku stałym.

Hydrofobowy peptyd agreguje i jego reaktywne grupy chemiczne stają się niedostępne dla aminokwasów i odczynników sprzęgających, w związku z czym spada wydajność dalszej syntezy. Użycie dipeptydów pseudoprolinowych i zawierających grupę Dmb chroni szkielet polipeptydowy przed formowaniem się wiązań wodorowych, co pozwala ograniczyć agregację. W warunkach uwolnienia peptydu z nośnika stałego i deprotekcji, dipeptydy pseudoprolinowe ulegają konwersji do reszt Ser lub Thr, a grupa Dmb jest usuwana wraz z pozostałymi grupami ochronnymi [193]. Ponadto, zaletą stosowania grupy Dmb jest ograniczenie reakcji formowania aspartimidu – reakcji pobocznej w peptydach, których sekwencje zawierają przede wszystkim połączenie Asp-Gly. Reakcja jest katalizowana zasadą (np. piperydyną używaną w SPPS do deprotekcji grupy Fmoc w strategii Fmoc/*t*Bu) i polega na cyklizacji wewnątrz łańcucha polipeptydowego (Rysunek 12B) [195].



Rysunek 12. A – dipeptydowe bloki budulcowe wykorzystywane w SPPS. Po lewej dipeptyd z resztą seryny oraz zamaskowaną resztą treoniny. B – Schemat reakcji powstawania aspartimidu. Na podstawie [193].

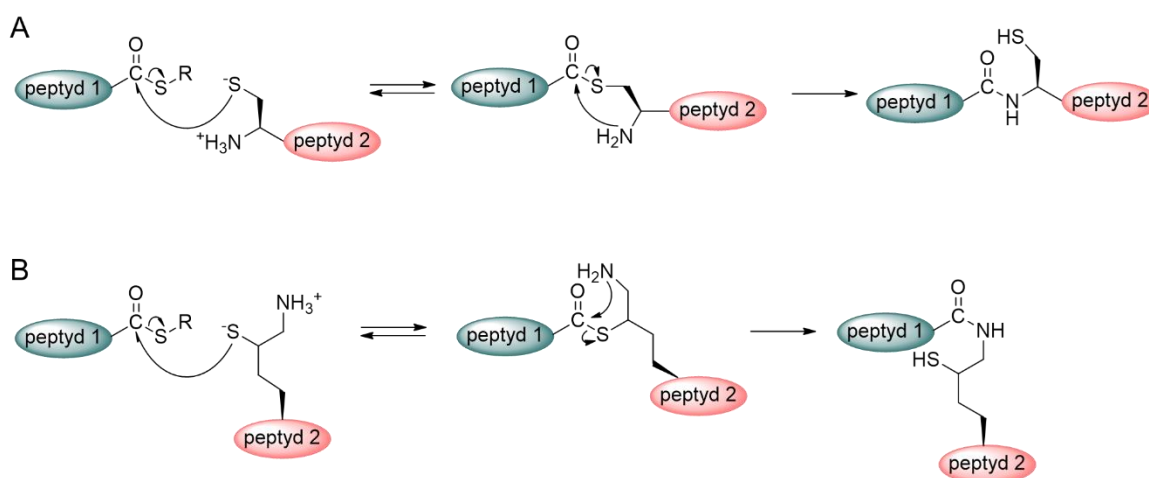
#### 1.4.2.2. Wykorzystanie reakcji NCL

Reakcja NCL została opisana przez grupę Kenta w połowie lat 90. i polega na reakcji peptydowego C-końcowego tioestru z drugim peptydem posiadającym N-końcową resztę cysteiny [196]. Reakcja ta zachodzi w dwóch etapach (Rysunek 13A):

- 1) wolna para elektronowa atomu siarki N-końcowej cysteiny atakuje karbonylowy atom węgla C-końcowego tioestru (odwracalna transtioestryfikacja);
- 2) przegrupowanie wskutek ataku wolnej pary elektronowej atomu azotu na węgiel karbonylowy tioestru, co prowadzi do nieodwracalnego przeniesienia acylu S→N. Formowane jest w ten sposób wiązanie amidowe między C- i N-końcami obu peptydów.



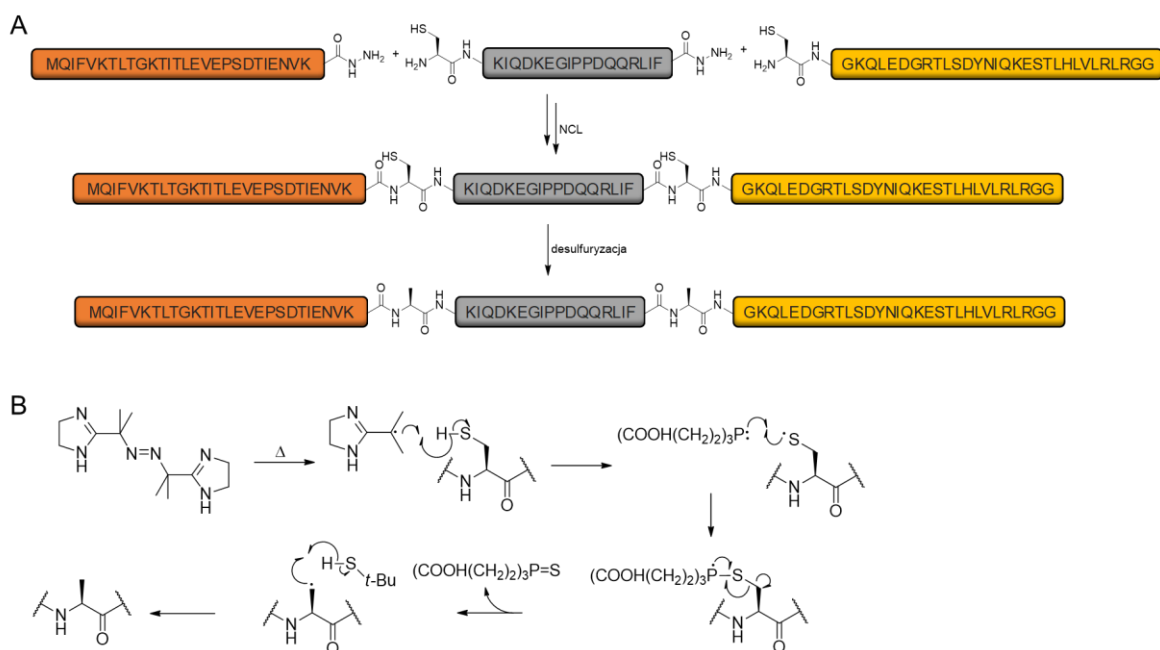
Reakcja ta znalazła szereg zastosowań w chemicznej syntezie białek oraz opracowano wiele modyfikacji tej metody [197]. Do głównych zalet metody należą warunki reakcji NCL. Zachodzi ona z wysoką wydajnością w buforze wodnym, w neutralnym pH, między peptydami pozbawionymi grup ochronnych. Pozwala to uniknąć często niewydajnej syntezy długich peptydów na nośniku stałym, którą można zastąpić syntezą kilku krótszych segmentów peptydowych i ich sekwencyjną ligacją. Przygotowanie peptydowych segmentów z użyciem SPPS umożliwia ich stosunkowo łatwą funkcjonalizację, a także włączanie do struktury przygotowywanego białka nienaturalnych aminokwasów. Z powyższych powodów reakcja NCL znalazła zastosowanie w syntezie ubikwityny i jej pochodnych [198-201].



Rysunek 13. A – mechanizm reakcji NCL. B – mechanizm reakcji ICL z wykorzystaniem  $\delta$ -merkaptolizyny. Na podstawie [202].

W mechanizmie reakcji NCL kluczową rolę odgrywa grupa tiolowa znajdująca się na N-końcu jednego z ligowanych segmentów [197]. Najczęściej jest to grupa z łańcucha bocznego N-końcowej reszty Cys. W strukturze Ub nie występują natomiast aminokwasy zawierające grupy tiolowe. Synteza Ub metodą wykorzystującą reakcje NCL stała się możliwa po opisanu przez Yana i Dawsona w 2001 roku reakcji desulfuryzacji [203]. Polega ona na selektywnym usunięciu grup tiolowych z łańcuchów bocznych Cys, co prowadzi do konwersji reszt Cys do Ala. Częsteczką Ub zawiera w swojej strukturze dwie reszty Ala (Ala28 oraz Ala46), w związku z czym możliwa jest synteza metodą NCL mutanta Ub<sup>A28C,A46C</sup>, a następnie przeprowadzenie reakcji desulfuryzacji, w wyniku czego otrzymuje się natywną cząsteczkę Ub (Rysunek 14A). Metoda Yana i Dawsona, wykorzystująca katalizę metalem (niklem Raneya lub Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>), została zoptymalizowana przez Wana i Danishefskiego tak, aby reakcja przebiegała w łagodniejszych warunkach [204]. Badacze opisali desulfuryzację bez użycia metalu

(ang. metal-free desulfurization), o mechanizmie rodnikowym. W reakcji zastosowali chlorowoderek tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP), 2-metylopropano-2-tiol (*t*BuSH) oraz chlorowoderek 2,2'-azobis-2-(2-imidazolin-2-yl)opropanu (VA-044). W przeciwieństwie do reakcji katalizowanej przez metal, metoda Wana i Danishefskiego jest kompatybilna z glikopeptydami oraz ugrupowaniami zawierającymi siarkę, innymi niż grupa tiolowa (Rysunek 14B).



Rysunek 14. A – synteza Ub poprzez strategię ligacji z wykorzystaniem hydrazydów i desulfuryzacji. B – proponowany mechanizm desulfuryzacji z wykorzystaniem VA-044, TCEP oraz *t*BuSH. Na podstawie [202].

Kolejnym ograniczeniem NCL w syntezie białek była dostępność peptydowych C-końcowych tioestrów. Tioestrowe linkery w żywicach do SPPS są wrażliwe na zasadowe warunki panujące podczas usuwania grupy Fmoc w strategii Fmoc SPPS. W celu umożliwienia syntezy peptydowych tioestrów strategią Fmoc, opracowano wygodną metodę syntezy peptydowych hydrazydów, które w łatwy sposób konwertowane są za pomocą azotanu (III) sodu do peptydowych azydków reaktywnych względem tioli z utworzeniem peptydowych tioestrów *in situ* [205]. Synteza hydrazydów tą metodą opiera się na funkcjonalizacji żywicy 2-chlorotrytylowej (2-CTC) za pomocą hydrazyny [199, 205] lub Fmoc-NH-NH<sub>2</sub> [206]. Dzięki takiemu przygotowaniu żywicy, po uwolnieniu produktu z nośnika stałego w standardowych warunkach deprotekcji (95% TFA, 2,5% H<sub>2</sub>O, 2,5% TIPS), otrzymuje się produkt gotowy do przekształcenia w tioester i reakcji NCL [206].

Wykorzystując potencjał metod opartych o NCL, zespół Brika zsyntezował  $\delta$ -merkaptolizynę – pochodną lizyny z grupą sulfhydrylową, której obecność w łańcuchu

peptydowym umożliwia chemoselektywne utworzenie wiązania izopeptydowego w reakcji ICL (ang. isopeptide chemical ligation) (Rysunek 13B) [207]. Zastąpienie wybranej reszty Lys w łańcuchu aminokwasowym Ub umożliwia chemoselektywne utworzenie wybranego wiązania izopeptydowego, a co za tym idzie syntezę wybranych łańcuchów poli-Ub [160] lub syntezę i badanie wybranych ubikwitynowanych peptydów [207].

## 2. Cel pracy

Enzymy deubikwitynujące zaangażowane są w wiele procesów komórkowych. Ich aktywność odpowiada m.in. za utrzymywanie homeostazy białkowej poprzez regulację ubikwitynozależnej degradacji białek w proteasomie 26S, regulację procesów naprawy DNA poprzez usuwanie Ub z histonów czy regulację cyklu komórkowego i transportu wewnątrzkomórkowego [208]. Istotnym problemem utrudniającym projektowanie narzędzi chemicznych do badania tej grupy enzymów jest ich nakładająca się specyficzność substratowa. DUBs są grupą proteaz liczącą prawie 100 członków, a każdy z nich jest specyficzny wobec Ub. Podczas wiązania substratu enzymy te oddziałują z cząsteczką Ub w przynajmniej dwóch regionach. Jednym z nich są domeny wiążące Ub, które znajdują się na powierzchni enzymu poza miejscem aktywnym. Drugi, kluczowy dla związania substratu region to miejsce aktywne, które oddziałuje z krótkim motywem LRGG znajdującym się na C-końcu cząsteczki Ub [25].

Wiele DUBs toleruje w kieszeniach wiążących S4-S2 aminokwasy różniące się od kanonicznych reszt LRG obecnych na C-końcu cząsteczki Ub. Papaino-podobne proteazy SARS-CoV [24], SARS-CoV-2 [164] czy MERS-CoV [121] wykazują stosunkowo szeroką specyficzność substratową w pozycjach P4 oraz P3. Podobnie niektóre ludzkie DUBs, takie jak UCH-L3, OTU-1 czy IsoT mają zdolność hydrolizowania wiązań za niekanonicznymi sekwencjami peptydowymi, jednak ich profile specyficzności w P4-P2 znacząco różnią się od siebie [24]. Ponadto UCH-L3 wykazuje nietypową dla innych badanych DUBs aktywność hydrolityczną względem mutantów Ub zawierających substytucje w obrębie C-końcowego motywu LRGG [24, 99]. Wyniki te sugerują, że możliwe jest zaprojektowanie wariantów ubikwityny selektywnych względem wybranych DUBs poprzez wprowadzenie niekanonicznych aminokwasów w obrębie C-końcowego ogona ubikwityny w miejsce sekwencji LRGG. Preferencje enzymu względem niekanonicznych aminokwasów mogą zostać przewidziane na podstawie profilu specyficzności substratowej tych proteaz, uzyskanego z wykorzystaniem bibliotek tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych.

**Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie było opracowanie strategii syntezy selektywnych oraz specyficznych narzędzi chemicznych o strukturze opartej na strukturze ubikwityny.** Do walidacji tej strategii użyto dwóch enzymów deubikwitynujących: wirusowego MERS-CoV PL<sup>Pro</sup> oraz ludzkiego UCH-L3. Realizacja celu obejmowała:

- 1) syntezę zdefiniowanej biblioteki substratów fluorogenicznych do badania specyficzności substratowej enzymów deubikwitynujących w pozycji P2, o ogólnej strukturze Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, gdzie „X” to jeden ze 128 zdefiniowanych naturalnych bądź nienaturalnych aminokwasów;
- 2) określenie profilu specyficzności substratowej enzymów MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 w pozycjach P4-P2, z wykorzystaniem biblioteki HyCoSuL (Ac-X-Mix-Gly-Gly-ACC – podbiblioteka P4; Ac-Mix-X-Gly-Gly-ACC - podbiblioteka P3) oraz zdefiniowanej biblioteki substratów Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC (pozycja P2), gdzie „Mix” to równomolowa mieszanina 19 aminokwasów, a „X” to zdefiniowany naturalny lub nienaturalny aminokwas;
- 3) zaprojektowanie i syntezę tetrapeptydowych substratów selektywnych wobec MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 i wyznaczenie dla nich stałej specyficzności  $k_{kat}/K_M$ ;
- 4) wykorzystując strategię ligacja-desulfuryzacja, syntezę substratów – pochodnych ubikwityny zawierających C-końcowy znacznik fluorogeniczny ACC oraz określenie ich selektywności i specyficzności względem rekombinowanych enzymów;
- 5) wykorzystując strategię ligacja-desulfuryzacja, syntezę markerów chemicznych – pochodnych Ub, zawierających biotynę jako N-końcową grupę reporterową oraz C-końcową grupę VME jako reaktywną grupę wiążącą;
- 6) określenie selektywności zsyntezowanych ABPs względem rekombinowanych DUBs oraz enzymów zawartych w lizatach komórkowych.

Badania zrealizowano w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, pod opieką prof. dr. hab. Marcina Dąga oraz we współpracy z dr inż. Wiolettą Rut.

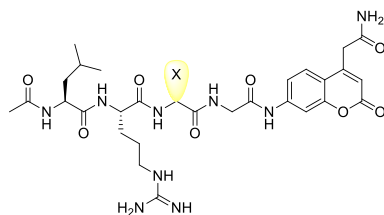
### 3. Badania własne

#### 3.1. Określenie specyficzności substratowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3

##### 3.1.1. Zaprojektowanie biblioteki substratów do badania specyficzności substratowej DUBs w pozycji P2

Do tej pory preferencje substratowe DUBs w pozycji P2 określano za pomocą metody PS-SCL z użyciem bibliotek związków zawierających jedynie naturalne aminokwasy [24, 121]. W porównaniu do klasycznej metody PS-SCL wykorzystanie bibliotek z nienaturalnymi aminokwasami umożliwia dokładne zbadanie architektury miejsca aktywnego. Uzyskane informacje pozwalają na zaprojektowanie specyficznych i selektywnych sekwencji peptydowych względem badanego enzymu [131]. Ze względu na mechanizm wiązania substratów przez DUBs polegający na związaniu cząsteczki Ub w obrębie co najmniej dwóch regionów – C-końcowego ogona LRGG oraz powierzchni Ub, najczęściej poprzez hydrofobowy region łańki Ile44 – krótkie peptydowe substraty cechuje niska specyficzność względem tych enzymów. Na przykład, w badaniu Békésy i in. wyznaczono stałą specyficzności  $k_{cat}/K_M$  dla enzymu MERS-CoV PL<sup>pro</sup> wobec substratów Ub-AMC oraz Ac-LRGG-ACC, które wynosiły odpowiednio  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  oraz około  $340 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (tetrapeptydowy substrat hydrolizowany był ponad 1000 razy mniej wydajnie) [121]. Ze względu na stosunkowo niską wydajność katalityczną hydrolizy tetrapeptydowych substratów oraz preferencję substratową DUBs względem C-końcowej sekwencji LRGG ubikwityny, zaprojektowano bibliotekę P2 o ogólnej strukturze Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, gdzie „X” to 19 naturalnych i 109 nienaturalnych aminokwasów (Rysunek 15). Zastosowanie zdefiniowanej biblioteki pozwala zmaksymalizować stężenie substratów użytych w badaniach preferencji substratowych oraz zmniejsza ryzyko wytrącania się substratów podczas pomiarów kinetycznych.

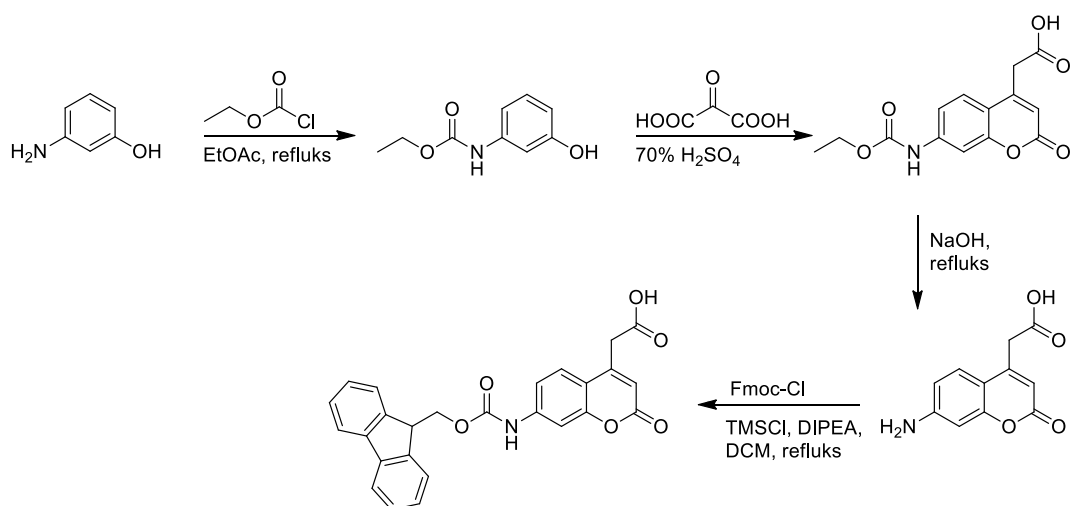
W pozycji P1' umieszczono kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (ACC), który jest uwalniany wskutek hydrolizy wiązania amidowego pomiędzy ACC a aminokwasem w pozycji P1. Jest to pochodna kumaryny wykorzystywana w syntezie substratów fluorogenicznych na podłożu stałym. Przewagą ACC nad innym często stosowanym znacznikiem, 7-amino-4-metylokumaryną (AMC), jest obecność grupy karboksylowej, umożliwiającej kowalencyjne przyłączenie ACC do podłoża stałego, a także prawie trzykrotnie wyższa wydajność kwantowa fluorescencji [209]. Ponadto relatywnie tania i prosta jest jego synteza w dużej skali, co uzasadnia wykorzystanie go do syntezy bibliotek fluorogenicznych substratów na podłożu stałym [210].



Rysunek 15. Schemat ogólnej struktury związków wchodzących w skład biblioteki substratów użytych do określenia specyficzności substratowej badanych proteaz w pozycji P2. „X” oznacza jeden z 19 naturalnych lub 109 nienaturalnych aminokwasów.

### 3.1.2. Synteza zdefiniowanej biblioteki Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC

Syntezę biblioteki rozpoczęto od syntezy bifunkcyjnego znacznika fluorogenicznego Fmoc-ACC-OH, który otrzymano wykorzystując zmodyfikowany protokół Maly’ego i in. (Rysunek 16) [210]. Synteza znacznika fluorogenicznego obejmowała cztery etapy. W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję 3-aminofenolu z chloromrówczanem etylu w celu otrzymania (3-hydroksyfenilo)karbaminianu etylu. W drugim etapie produkt poddano reakcji kondensacji Pechmanna z kwasem 1,3-acetonodikarboksylowym, w wyniku czego otrzymano kwas 7-*N*-(etoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowy. Następnie usunięto grupę etoksykarbonylową w reakcji hydrolizy zasadowej. W ostatnim etapie kwas 7-aminokumaryno-4-octowy poddano reakcji z Fmoc-Cl w celu zabezpieczenia wolnej grupy aminowej grupą ochronną Fmoc. Tak otrzymany znacznik wykorzystano do dalszych badań.

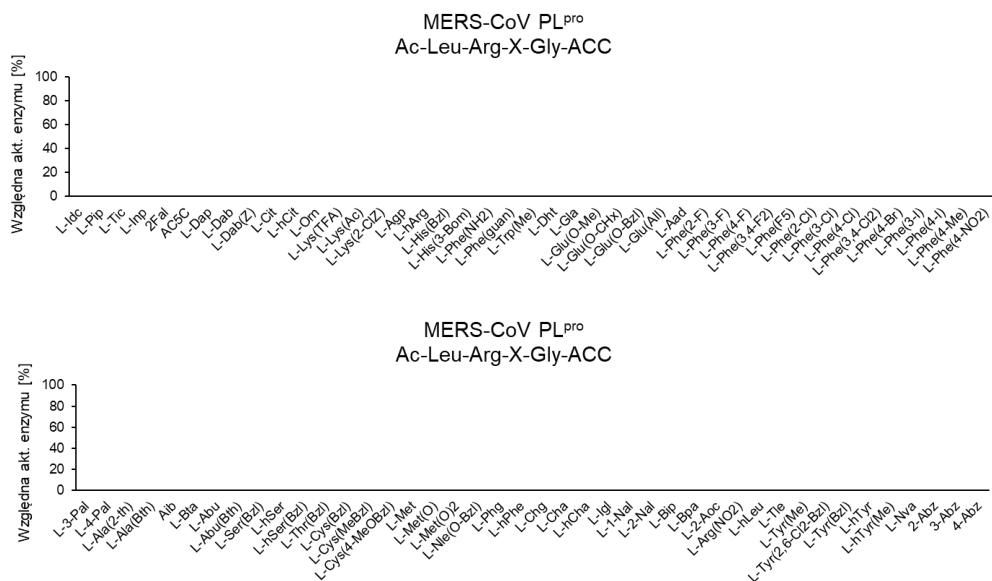


Rysunek 16. Schemat syntezy Fmoc-ACC-OH, na podstawie [210].

Syntezę tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych wchodzących w skład biblioteki P2 przeprowadzono na podłożu stałym na podstawie zmodyfikowanego protokołu opisanego w literaturze [131]. Do syntezy użyto żywicy amidowej Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,74 mmol/g. Do żywicy przyłączono bifunkcyjny znacznik Fmoc-

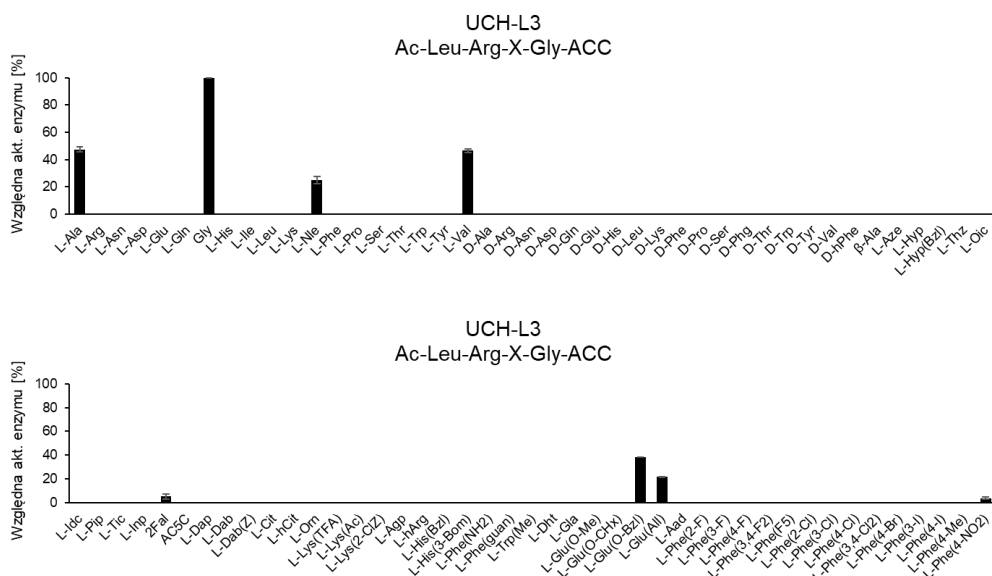


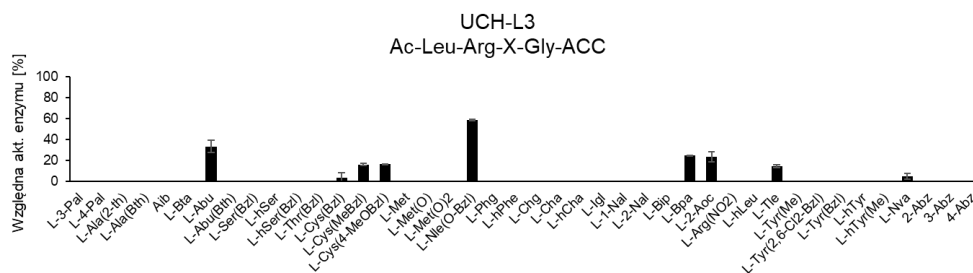




Rysunek 17. Profil specyficzności substratowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w pozycji P2.

W przeciwieństwie do MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, UCH-L3 wykazuje szerszą specyficzność substratową w pozycji P2 (Rysunek 18). Najlepiej rozpoznawanym aminokwasem jest glicyna (100%), ale kieszeń wiążąca S2 tego enzymu toleruje również aminokwasy o małych, alifatycznych łańcuchach bocznych takich jak: Ala (47%), Val (46,5%), Abu (33,5%), Ile (25%), czy 2-Aoc (24%). UCH-L3 toleruje w kieszeni S2 również nieliczne aminokwasy o dużych, aromatycznych łańcuchach bocznych: Ile(OBzl) (38%), Glu(OBzl) (31%) i Bpa (25%).





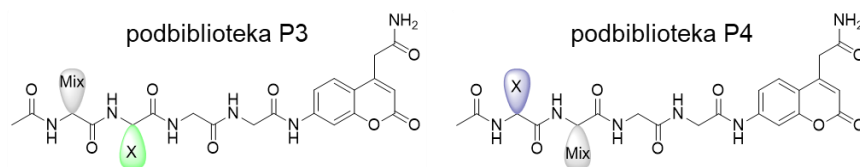
Rysunek 18. Profil specyficzności substratowej UCH-L3 w pozycji P2.

### 3.1.4. Biblioteka HyCoSuL do badania specyficzności substratowej DUBs w pozycjach P3 i P4

Podobnie jak w przypadku badania preferencji substratowych DUBs w pozycji P2, pozycje P3 oraz P4 nie były do tej pory badane z użyciem bibliotek substratów zawierających nienaturalne aminokwasy [24, 121]. Biblioteka HyCoSuL (Rysunek 19) złożona z dwóch podbibliotek o ogólnych strukturach:

- 1) podbiblioteka do badania specyficzności substratowej kieszeni wiążącej S3, o strukturze ogólnej Ac-Mix-X-Gly-Gly-ACC,
- 2) podbiblioteka do badania specyficzności substratowej kieszeni wiążącej S4, o strukturze ogólnej Ac-X-Mix-Gly-Gly-ACC („X” oznacza jeden z 19 naturalnych lub 118 nienaturalnych aminokwasów, a „Mix” to równomolowa mieszanina 19 naturalnych aminokwasów bez Cys oraz z Nle zamiast Met),

została zsyntezowana metodą SPPS z użyciem mieszaniny izokinetycznej aminokwasów przez dr inż. Wioletę Rut z Katedry Chemii Biologicznej i Bioobrazowania z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Biblioteka substratów z C-końcowym motywem Gly-Gly może zostać użyta również do zbadania preferencji substratowych innych enzymów o aktywności izopeptydazowej, jak np. enzymów deSUMOylujących SENPs (ang. Sentrin/SUMO-specific proteases) [211].



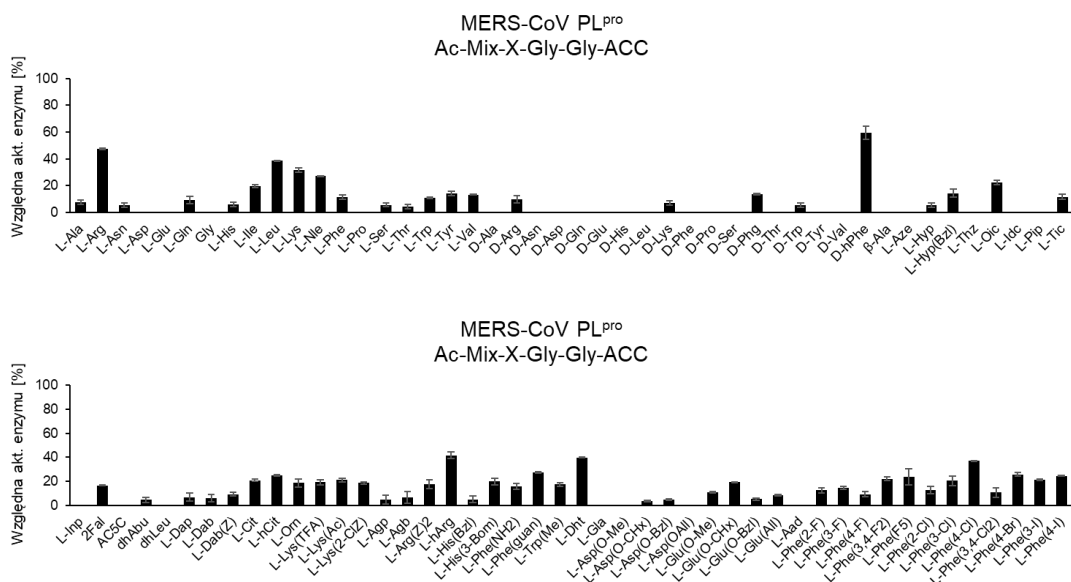
Rysunek 19. Schemat ogólnej struktury substratów wchodzących w skład kombinatorycznej biblioteki substratów użytej do określenia specyficzności substratowej badanych proteaz w pozycjach P3 i P4. „X” oznacza jeden z 19 naturalnych i 118 nienaturalnych aminokwasów, a „Mix” to równomolowa mieszanina 19 naturalnych aminokwasów bez Cys oraz z Nle zamiast Met.

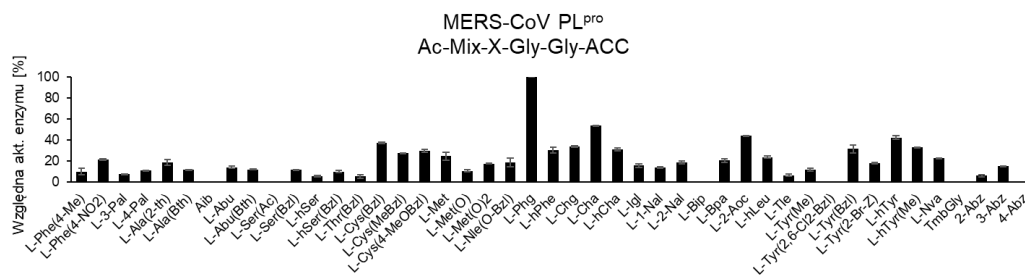
### 3.1.5. Określenie specyficzności substratowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> i UCH-L3 w pozycjach P3 i P4 za pomocą biblioteki HyCoSuL

Do wyznaczenia profilu specyficzności substratowej badanych proteaz w pozycjach P3 i P4 użyto MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w stężeniu 2  $\mu$ M oraz UCH-L3 w stężeniach odpowiednio 12  $\mu$ M i 20  $\mu$ M. Stężenie substratów dla obu proteaz i podbibliotek było takie samo i wynosiło 200  $\mu$ M. Pomiary przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, a wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych, w których na osi OX umieszczono aminokwasy, natomiast oś OY przedstawia względną aktywność enzymu wobec substratu, gdzie 100% to aktywność względem najlepszego z substratów.

#### 3.1.5.1. MERS-CoV PL<sup>pro</sup>

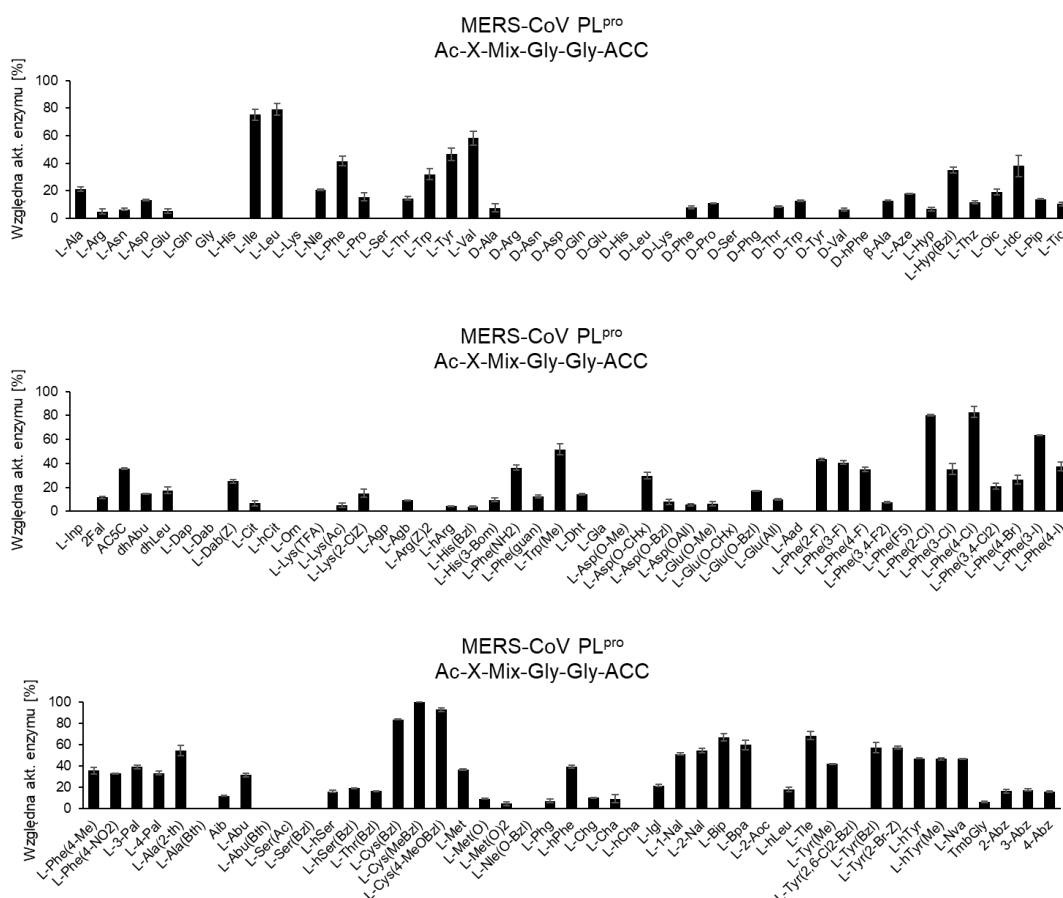
Kieszka wiążąca S3 MERS-CoV PL<sup>pro</sup> wykazuje preferencje wobec hydrofobowych oraz zasadowych aminokwasów (Rysunek 20). Trzy najlepiej rozpoznawane reszty aminokwasowe w tej pozycji należały do grupy nienaturalnych, hydrofobowych aminokwasów: Phg (100%), D-hPhe (60%) oraz Cha (54%). Arginina, która zajmuje pozycję P3 w fizjologicznym substracie tej proteazy, była dopiero czwartym najlepiej rozpoznawanym aminokwasem (47%) i jednocześnie najlepiej rozpoznawanym aminokwasem z zasadowym łańcuchem bocznym. Następne były: hydrofobowy alifatyczny 2-Aoc (44%), zasadowa hArg (42%), hydrofobowa hTyr (42%) i drugi najlepszy naturalny aminokwas – hydrofobowa Leu (38,5%).





Rysunek 20. Profil specyficzności substratowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w pozycji P3.

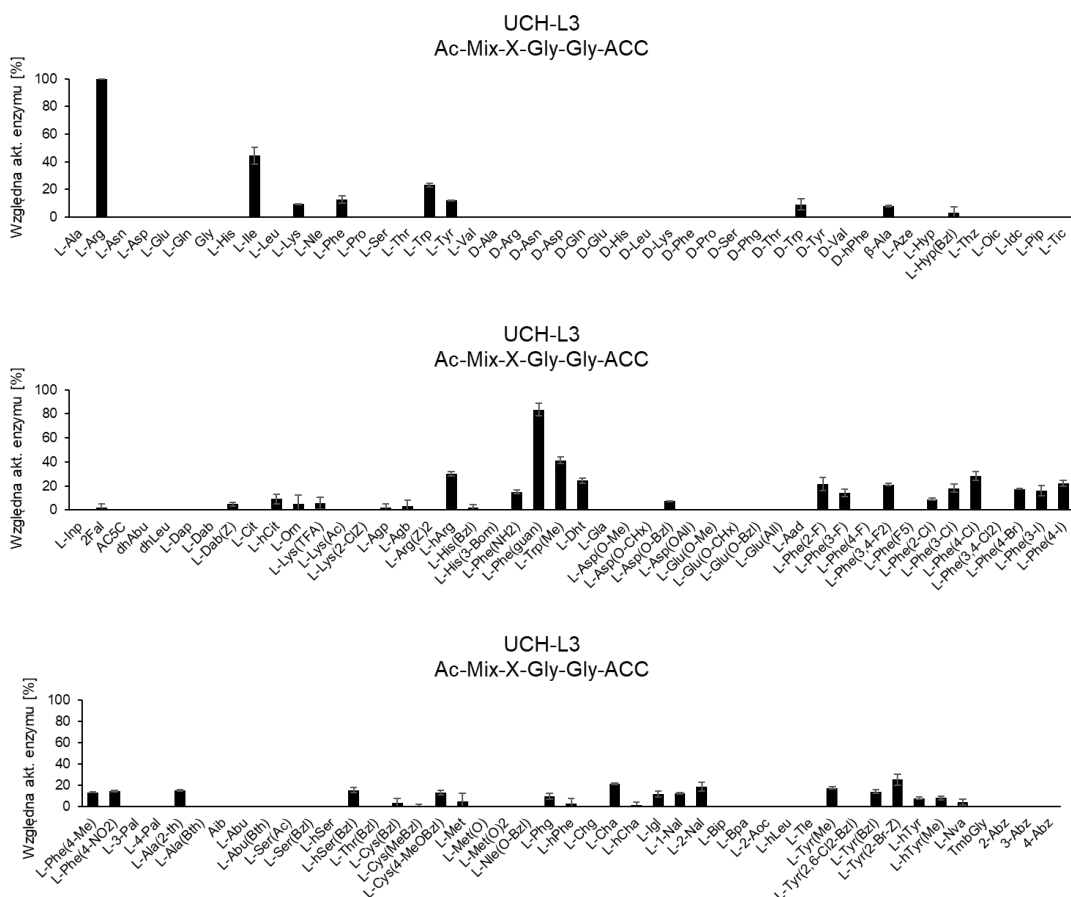
MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w pozycji P4 preferuje aminokwasy hydrofobowe o dużych, alifatycznych oraz aromatycznych łańcuchach bocznych, natomiast praktycznie nie wykazuje aktywności wobec substratów z resztami kwasowymi i zasadowymi (Rysunek 21). Najlepiej rozpoznawane były benzytowe pochodne cysteiny: Cys(MeBz) (100%), Cys(4-MeOBz) (93%) i Cys(Bz) (84%) oraz pochodne fenyloalaniny: Phe(4-Cl) (83%) i Phe(2-Cl) (80%). Wobec substratu z Leu względna aktywność enzymu wynosiła 79%. Niewiele mniej, 75% aktywności, enzym wykazał wobec substratu z Ile, a wobec substratu zawierającego Tle, izomeru szkieletowego Leu i Ile, enzym wykazał 68% względnej aktywności.



Rysunek 21. Profil specyficzności substratowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w pozycji P4.

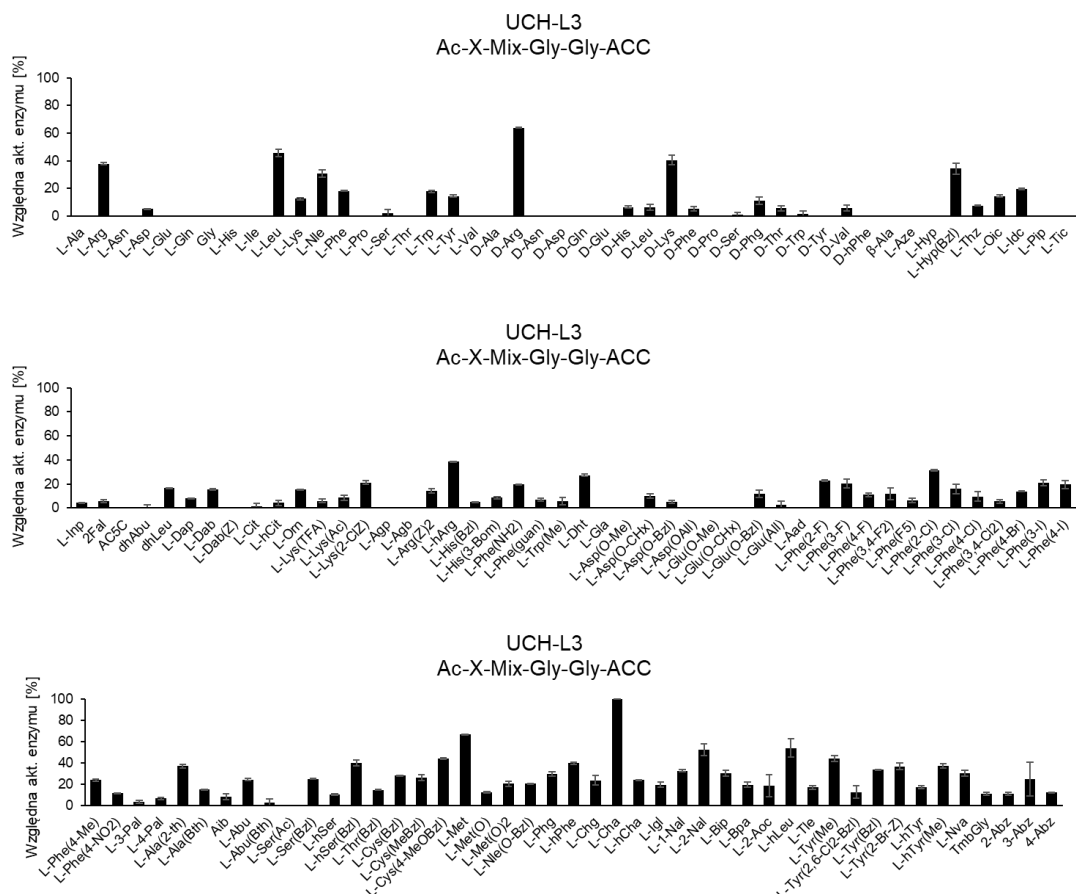
### 3.1.5.2. UCH-L3

Specyficzność substratowa UCH-L3 w pozycji P3 jest wąska, preferowane są aminokwasy zasadowe oraz hydrofobowe (Rysunek 22). Najlepiej rozpoznawanym aminokwasem jest Arg (100%), co wynika z przystosowania tego enzymu do hydrolizy Ub. Drugim najlepszym aminokwasem w pozycji P3 jest Phe(guan) (81%) – nienaturalna pochodna fenyloalaniny, posiadająca, podobnie jak Arg, grupę guanidynową. Pozostałe aminokwasy w P3 są znacznie słabiej rozpoznawane, a najlepsze z nich to Trp(Me) (41%), Ile (36%) i hArg (30%).



Rysunek 22. Profil specyficzności substratowej UCH-L3 w pozycji P3.

UCH-L3 w pozycji P4 preferuje aminokwasy hydrofobowe oraz, w przeciwieństwie do MERS-CoV PL<sup>PRO</sup>, zasadowe (Rysunek 23). Najlepsza w tej pozycji była Cha (100%), następnie Met (66,5%), hLeu (54%), aromatyczna 2-Nal (52,5%) i Leu (46%). W przypadku aminokwasów zasadowych enzym tolerował zarówno aminokwasy o konfiguracji L jak i D. Spośród nich najlepsza była D-Arg (64%), D-Lys (40,5%), hArg (39%) i Arg (38%).



Rysunek 23. Profil specyficzności substratowej UCH-L3 w pozycji P4.

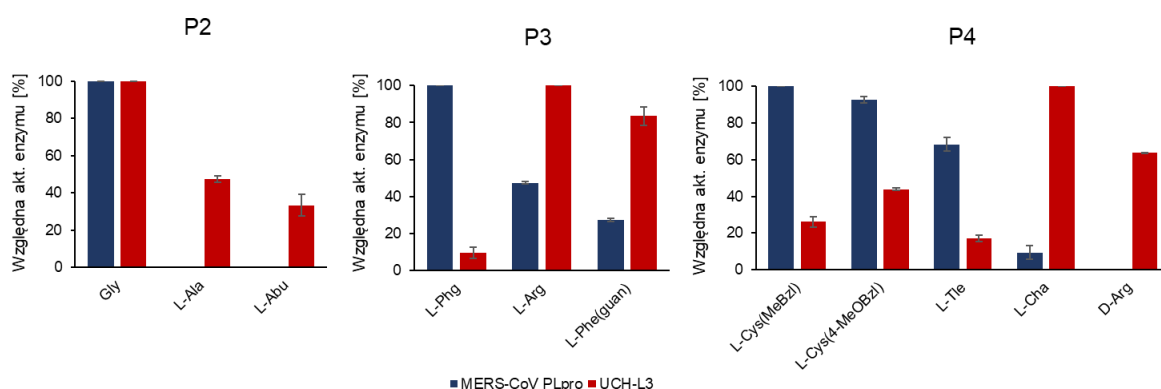
### 3.2. Tetrapeptydowe substraty dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3

#### 3.2.1. Zaprojektowanie i synteza tetrapeptydowych substratów dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3

W kolejnym etapie badań wykorzystano otrzymane profile specyficzności substratowej obu proteaz do zaprojektowania tetrapeptydowych substratów o strukturze ogólnej Ac-P4-P3-P2-Gly-ACC. Enzymy o aktywności deubikwitynującej stanowią dużą i różnorodną grupę proteaz o nakładających się specyficznościach substratowych. W celu osiągnięcia selektywności względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> i UCH-L3, podczas projektowania sekwencji tetrapeptydowych brano pod uwagę aminokwasy selektywnie rozpoznawane przez badane enzymy. Kolejnym czynnikiem była stereochemia – użycie aminokwasów nieproteinogenicznych, a w szczególności tych o konfiguracji D, może również zapewnić selektywność, gdyż kieszenie wiążące ludzkich proteaz z reguły nie są specyficzne względem reszt aminokwasowych o konfiguracji innej niż L [212]. Istotnym również brany pod uwagę czynnikiem były właściwości łańcucha bocznego – jeśli DUB preferował w pozycji P4 aminokwasy hydrofobowe oraz zasadowe, preferowane było umieszczenie

w tej pozycji w zaprojektowanym substracie aminokwasu zasadowego. Pozycja P4 w naturalnej sekwencji LRGG zajmowana jest przez hydrofobową resztę Leu, dlatego użycie aminokwasu o innych właściwościach potencjalnie może prowadzić do selektywności względem badanego enzymu.

MERS-CoV PL<sup>pro</sup> wykazuje bardzo wąską specyficzność w pozycji P2 i wszystkie zaprojektowane substraty dla tego enzymu zawierały w tej pozycji glicynę. W pozycji P3 wybrano Phg – aminokwas o aromatycznym łańcuchu bocznym, który był najlepiej rozpoznawany w kieszeni wiążącej S3. W pozycji P4 wybrano Cys(MeBzl), Cys(4-MeOBzl) oraz Tle, czyli reszty aminokwasowe o hydrofobowych łańcuchach bocznych. Ponadto benzytowe pochodne Cys były najlepszymi aminokwasami w P4 dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. UCH-L3 cechuje specyficzność w pozycji P2 wobec glicyny (100%) oraz aminokwasów o małych alifatycznych łańcuchach bocznych. Zaprojektowane substraty zawierały w tej pozycji Ala oraz Abu, które były ponad dwukrotnie słabsze od Gly, jednak ze względu na bardzo wąską specyficzność substratową innych DUBs w pozycji P2, ich użycie mogło skutkować uzyskaniem selektywnych substratów. W pozycji P3 użyto aminokwasów zasadowych: najlepiej rozpoznawanej Arg oraz Phe(guan) o aromatycznym łańcuchu bocznym z grupą guanidynową. W pozycji P4 wybrano dwa nienaturalne aminokwasy: Cha o cyklicznym, alifatycznym łańcuchu bocznym, a także D-Arg, aminokwas zasadowy o izomerii niespotykanej w naturalnych substratach DUBs (Rysunek 24).



Rysunek 24. Porównanie specyficzności substratowych badanych DUBs w pozycjach P4-P2 wobec aminokwasów wybranych do zaprojektowanych substratów. Wyniki pochodzą z profilów specyficzności substratowej. Oś OY przedstawia względną aktywność enzymów wyrażoną w procentach, gdzie 100% to wartość dla najlepszego aminokwasu w badanej pozycji.

Substraty zsyntezowano na podłożu stałym na podstawie zmodyfikowanego protokołu opisanego w literaturze [131]. Do syntezy użyto żywicy amidowej Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,74 mmol/g. Do żywicy przyłączono fluorogeniczny znacznik

Fmoc-ACC-OH. W następnym kroku do ACC na żywicy przyłączono Fmoc-Gly-OH w pozycji P1. Następnie żywicę podzielono na porcje i kontynuowano syntezę indywidualnych peptydów. Do N-końcowej grupy aminowej przyłączono grupę acetylową. Żywicę wysuszono, a następnie peptydy zostały uwolnione z podłoża stałego wraz z usunięciem grup blokujących z łańcuchów bocznych aminokwasów. Substraty zostały oczyszczone za pomocą HPLC oraz scharakteryzowane z użyciem HRMS. Czystość związków określona za pomocą HPLC analitycznego wynosiła  $\geq 95\%$ . Związki zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2. Selektywność oraz specyficzność zsyntezowanych tetrapeptydowych substratów

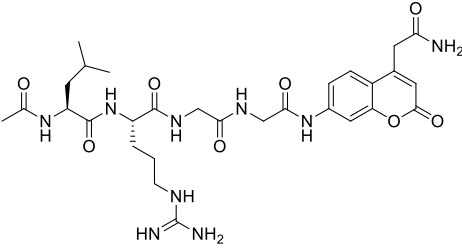
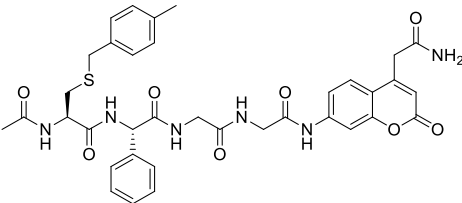
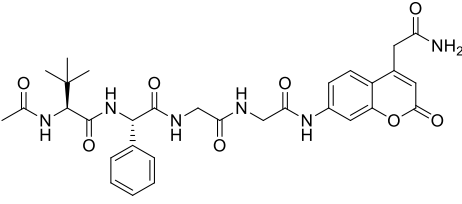
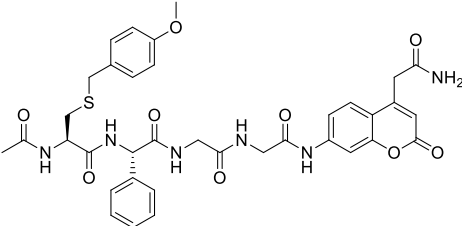
W celu porównania wydajności katalitycznych enzymów względem zsyntezowanych substratów wyznaczono stałe specyficzności  $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ . Struktury substratów wraz z wartościami stałych specyficzności przedstawiono w Tabeli 1. Z powodu relatywnie niskiej aktywności DUBs wobec substratów i precypitacji substratów w buforze w wyższych stężeniach, nie było możliwe wyznaczenie indywidualnych parametrów  $k_{\text{kat}}$  oraz  $K_{\text{M}}$ .

Najlepszym spośród substratów dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> był substrat M2 zawierający w pozycji P4 Tle. Stała specyficzności wynosiła dla niego  $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 613,8 \pm 14,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  i była 1,7 razy wyższa niż dla substratu referencyjnego ( $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 360,4 \pm 21,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Stała specyficzności  $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$  dla substratu M1 zawierającego w pozycjach P3 i P4 najlepsze aminokwasy ( $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 106,7 \pm 9,8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) była ponad trzykrotnie niższa niż dla substratu referencyjnego, a dla substratu M3 ( $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 213,5 \pm 20,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) była prawie dwukrotnie niższa. Względnie niskie wartości stałych specyficzności dla substratów M1 i M3 zawierających w swoich strukturach najlepsze reszty aminokwasowe wynikać mogą z zawady sterycznej. Reszta Tle zawarta w najlepszym substracie M2 ma mniejszy łańcuch boczny od benzylowych pochodnych cysteiny obecnych w substratach M1 i M3. Spośród substratów zaprojektowanych dla UCH-L3, oba były wydajniej hydrolizowane od substratu referencyjnego. Substrat S2 ( $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 8,13 \pm 0,23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), zawierający D-Arg oraz Phe(guan) w pozycjach P4 i P3, był trzykrotnie lepszy od substratu referencyjnego ( $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 2,70 \pm 0,15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Substrat S1 złożony z najlepszych aminokwasów w pozycjach P4 (Cha) i P3 (Arg) oraz zawierający resztę Abu w pozycji P2 miał nieznacznie wyższą stałą specyficzności ( $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 2,88 \pm 0,08 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) od stałej specyficzności uzyskanej dla Ac-LRGG-ACC. Wynik ten prawdopodobnie jest skutkiem zastąpienia w pozycji P2 najlepszego aminokwasu (Gly) resztą Abu. Ze względu na wąską specyficzność substratową



DUBs w pozycji P2, użycie Abu może skutkować uzyskaniem selektywnych narzędzi chemicznych do badania UCH-L3.

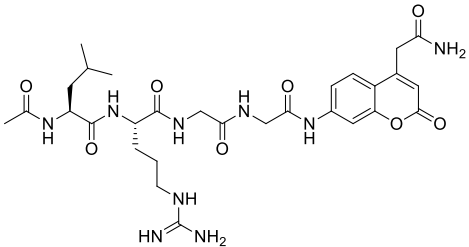
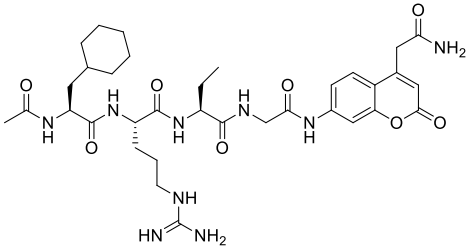
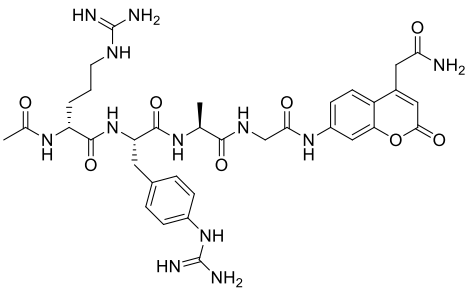
Tabela 1. Struktury zaprojektowanych tetrapeptydowych substratów oraz wyznaczone dla nich stałe specyficzności. Pomiar przeprowadzono trzykrotnie, błąd wyrażono jako odchylenie standardowe. Substrat Ac-LRGG-ACC pełnił rolę substratu referencyjnego, którego struktura wywodzi się z C-końcowej sekwencji peptydowej Ub.

<b>MERS-CoV PL<sup>pro</sup></b>		
substrat	struktura	$k_{kat}/K_M, M^{-1}s^{-1}$
	Ac-Leu-Arg-Gly-Gly-ACC	
Ac-LRGG-ACC		$360,4 \pm 21,0$
	Ac-Cys(MeBzl)-Phg-Gly-Gly-ACC	
M1		$106,7 \pm 9,8$
	Ac-Tle-Phg-Gly-Gly-ACC	
M2		$613,8 \pm 14,7$
	Ac-Cys(4-MeOBzl)-Phg-Gly-Gly-ACC	
M3		$213,5 \pm 20,0$

---

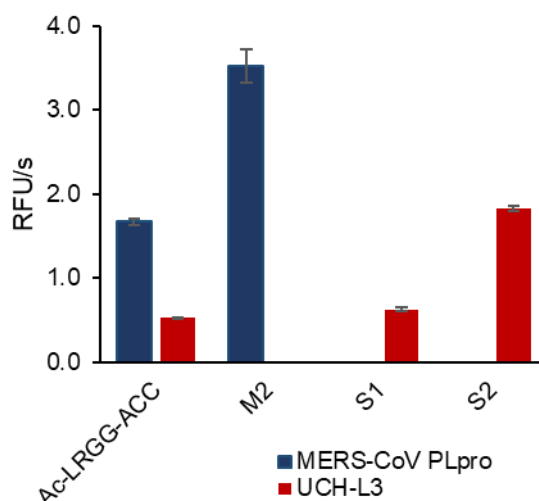
**UCH-L3**

---

substrat	struktura	$k_{\text{kat}}/K_M, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
	Ac-Leu-Arg-Gly-Gly-ACC	
Ac-LRGG-ACC		$2,70 \pm 0,15$
	Ac-Cha-Arg-Abu-Gly-ACC	
S1		$2,88 \pm 0,08$
	Ac-D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-ACC	
S2		$8,13 \pm 0,23$

---

Do dalszych badań wybrano związki M2, S1 i S2, które były lepiej rozpoznawane przez badane DUBs niż substrat referencyjny. W następnym kroku zbadano selektywność tetrapeptydowych substratów względem badanych proteaz. Otrzymane wyniki pokazują, że tetrapeptydowe substraty są selektywne względem enzymów, dla których zostały zaprojektowane (Rysunek 25). Substrat referencyjny był hydrolizowany przez obie proteazy, natomiast M2 hydrolizowany był jedynie przez MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, a S1 i S2 wyłącznie przez UCH-L3.



Rysunek 25. Selektywność tetrapeptydowych substratów względem wybranych DUBs (RFU/s – jednostki względnego przyrostu fluorescencji w czasie). Stężenie substratów wynosiło 10  $\mu$ M, UCH-L3 6  $\mu$ M, MERS-CoV PL<sup>pro</sup> 2,5  $\mu$ M.

### 3.3. Podsumowanie – selektywne tetrapeptydowe substraty dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3

Celem projektu doktorskiego było opracowanie strategii syntezy wariantów ubikwityny selektywnie rozpoznawanych przez UCH-L3 oraz MERS-CoV PL<sup>pro</sup> za sprawą zmodyfikowanej C-końcowej sekwencji peptydowej zawierającej nienaturalne reszty aminokwasowe. Do znalezienia sekwencji, które miały za zadanie zastąpić natywną C-końcową sekwencję LRGG, w pierwszym etapie badań użyto biblioteki HyCoSuL do zbadania specyficzności substratowej w pozycji P3 oraz P4, a także zdefiniowanej biblioteki substratów do zbadania specyficzności substratowej w pozycji P2. Drugi etap obejmował zaprojektowanie i syntezę tetrapeptydowych fluorogenicznych substratów, określenie ich stałych specyficzności oraz selektywności rozpoznawania przez UCH-L3 i MERS-CoV PL<sup>pro</sup>.

#### 3.3.1. Specyficzność substratowa MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w pozycjach P4-P2

Ze względu na architekturę miejsca aktywnego MERS-CoV PL<sup>pro</sup> projektowane narzędzia chemiczne dla tego enzymu muszą zawierać w pozycji P2 resztę Gly [112], a ich selektywność i specyficzność może być modulowana dzięki wprowadzeniu niekanonicznych reszt aminokwasowych w pozycjach P3 oraz P4. Rozszerzony profil specyficzności substratowej w pozycji P3 ukazał, że kieszeń wiążąca S3 wykazuje preferencje przede wszystkim względem aminokwasów hydrofobowych o konfiguracji D i L. Najlepszy aminokwas zasadowy, Arg (47%), był ponad dwukrotnie słabiej

preferowany od najlepszego aminokwasu hydrofobowego L-Phe (100%) i o 23 punkty procentowe słabszy od D-hPhe (70%). Spośród naturalnych aminokwasów również Leu (38%) była dobrze rozpoznawana w tej pozycji. W pozycji P4 MERS-CoV PL<sup>pro</sup> jest specyficzna wobec hydrofobowych aminokwasów z dużymi łańcuchami bocznymi. Najlepszym aminokwasem w tej pozycji była nienaturalna pochodna L-Cys(MeBzl), lepszym o 21 punktów procentowych od Leu (79%) zajmującej tę pozycję w sekwencji peptydowej Ub. Badanie HyCoSuL potwierdziło również niewielką tolerancję wobec Pro w pozycji P4. Otrzymane wyniki mają uzasadnienie w kontekście roli proteazy w procesowaniu wirusowych poliprotein pp1a/pp1ab oraz Ub i ISG15 po karboksylowej stronie motywu LXGG [112].

### 3.3.2. Specyficzność substratowa UCH-L3 w pozycjach P4-P2

UCH-L3 wykazuje relatywnie szeroką specyficzność substratową w pozycji P2 w porównaniu do innych DUBs [24]. Eksperyment z wykorzystaniem zdefiniowanej biblioteki substratów P2 potwierdził nietypową dla DUBs tolerancję UCH-L3 wobec Ala, Val oraz Nle w pozycji P2, którą po raz pierwszy zaobserwowano w 2008 roku [24]. W badaniu tym do zbadania specyficzności substratowej enzymu zastosowano metodę PS-SCL. Oprócz tych reszt aminokwasowych, enzym rozpoznawał też niektóre nienaturalne aminokwasy, w tym hydrofobowy aromatyczny aminokwas Nle(OBzl) czy Abu o krótkim alifatycznym łańcuchu. Mimo tego, że Gly była najlepiej rozpoznawaną resztą aminokwasową w tej pozycji, użycie innych aminokwasów o hydrofobowych łańcuchach bocznych może skutkować otrzymaniem selektywnych narzędzi chemicznych do badań nad tym enzymem. Profil specyficzności substratowej w pozycji P3 jest zgodny z wynikami otrzymanymi przez Drąga i in., którzy wykazali, że UCH-L3 ma wysoką specyficzność względem Arg w pozycji P3. Struktura krystaliczna enzymu pokazuje, że grupa guanidynowa argininy oddziałuje na powierzchni enzymu z resztami Asp i Glu [24]. Oddziaływania te tłumaczą również wyniki uzyskane z użyciem biblioteki HyCoSuL. Zaobserwowano preferencję w tej pozycji dla Phe(guan) i w mniejszym stopniu dla hArg, które również posiadają grupę guanidynową w swoich łańcuchach bocznych. W pozycji P4 otrzymane wyniki pokrywają się z wynikami opublikowanymi przez Drąga i in. [24]. UCH-L3 preferuje w tej pozycji przede wszystkim aminokwasy o hydrofobowych łańcuchach bocznych. Najlepszym aminokwasem była Cha (100%), a wobec substratu z Leu względna aktywność była ponad dwukrotnie niższa (46%). Rozszerzona analiza preferencji

substratowych wykazała dodatkowo specyficzną UCH-L3 w tej pozycji wobec zasadowych aminokwasów o konfiguracji D (przede wszystkim D-Arg (64%)).

### **3.3.3. Selektowne, tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3**

Dla zsyntezowanych na podłożu stałym tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych wyznaczono parametr  $k_{kat}/K_M$ . Wartości stałych specyficzności były niskie dla wszystkich otrzymanych związków. Dla najlepszego substratu dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> (M2) wynosił on  $613,8 \pm 14,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , podczas gdy w badaniu Békésa i in. stała  $k_{kat}/K_M$  dla fluorogenicznego substratu Ub-AMC wynosiła  $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [121]. Wartości stałych specyficzności dla krótkich substratów wyznaczone dla UCH-L3 były jeszcze niższe. Dla najlepszego substratu S2, stała  $k_{kat}/K_M$  wynosiła jedynie  $8,13 \pm 0,23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Wyniki te pokazują, że krótkie substraty nie są efektywnie hydrolizowane. Wiele DUBs osiąga pełną aktywność katalityczną dopiero po związaniu cząsteczki Ub do swojej powierzchni, co prowadzi do zmian konformacyjnych i w rezultacie osiągnięcia pełnej aktywności katalitycznej enzymu. Związanie do miejsca aktywnego krótkiej sekwencji nie jest wystarczające aby osiągnąć ten efekt [24, 25, 122].

Do kolejnego eksperymentu wybrano tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne M2, S1 oraz S2, dla których wartości wyznaczonych stałych specyficzności były wyższe niż dla substratu referencyjnego Ac-LRGG-ACC. Określono ich selektywność względem UCH-L3 oraz MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w eksperymencie z wykorzystaniem rekombinowanych enzymów. Oba enzymy wykazywały aktywność względem substratu referencyjnego. Potwierdzono też, że użycie nienaturalnych aminokwasów wyselekcjonowanych na podstawie profili specyficzności substratowej w pozycjach P4-P2 prowadzi do otrzymania substratów, które są selektywnie hydrolizowane przez badane enzymy.

### **3.4. Fluorogeniczne pochodne Ub zawierające zmodyfikowany C-końcowy fragment sekwencji peptydowej**

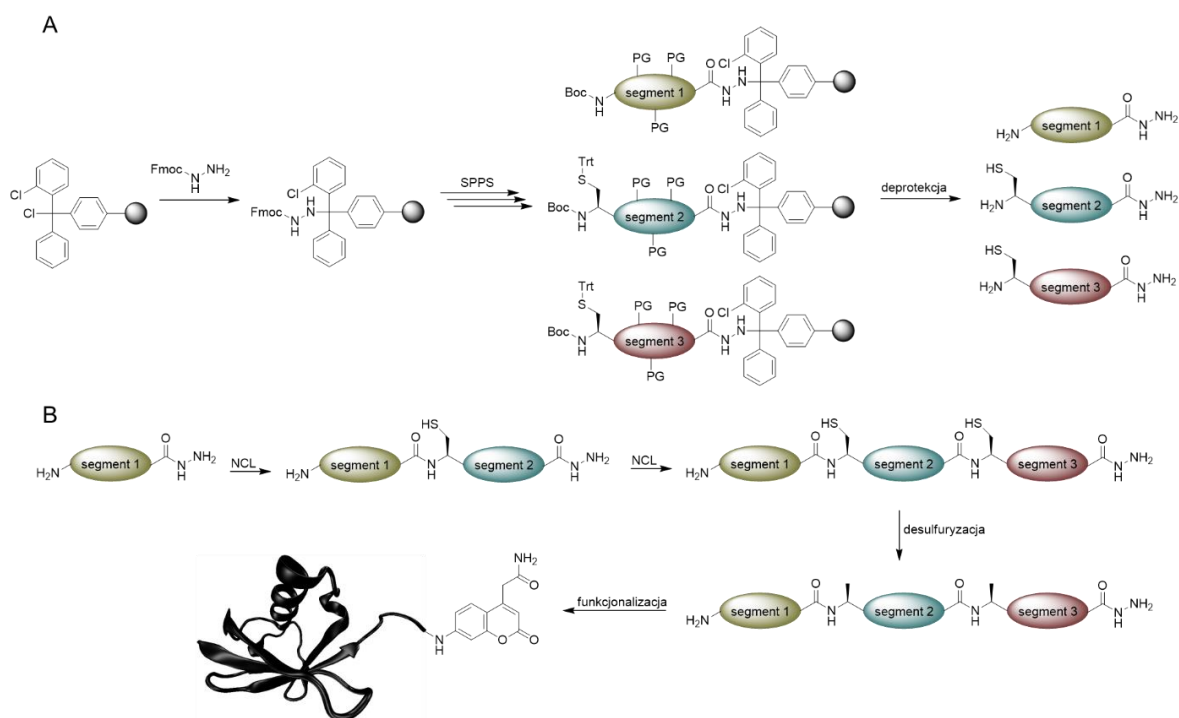
Celem kolejnej części pracy było opracowanie metody syntezy pochodnych ubikwityny, które zawierają w swojej strukturze zmodyfikowaną C-końcową sekwencję peptydową, warunkującą selektywność względem wybranych DUBs. Ubikwityna jest stosunkowo małym białkiem, dzięki czemu można otrzymać ją metodami półsyntetycznymi lub w pełni syntetycznymi. Metody syntetyczne polegają na syntezie całego łańcucha polipeptydowego Ub na podłożu stałym i jego późniejszej funkcjonalizacji [156] lub syntezie krótszych segmentów peptydowych i ich kondensacji z użyciem reakcji natywnej chemicznej ligacji

[198-201]. Strategia syntezy Ub i jej pochodnych opisana w niniejszej dysertacji bazuje na zmodyfikowanym protokole Zhenga i in. Metoda ta zakłada wykorzystanie hydrazydów acylu, syntezowanych na nośniku stałym, a następnie przekształcenie ich *in situ* w tioestry, które poddawane są reakcji NCL [205]. Mechanizm reakcji NCL wymaga obecności w strukturze pierwszorzędowej białka reszty Cys, która nie występuje w Ub. Obecne są natomiast dwie reszty Ala (Ala28 oraz Ala46), dzięki którym można zastosować strategię ligacja-desulfuryzacja. Polega ona na syntezie trzech segmentów hydrazydowych, których sekwencyjna kondensacja za pomocą reakcji NCL skutkuje powstaniem mutantu Ub<sup>A28C,A46C</sup> bez C-końcowej reszty glicyny, a następnie konwersji reszt Cys do reszt Ala w reakcji desulfuryzacji. Segmenty użyte do syntezy pochodnych ubikwityny przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Zsyntezowane segmenty hydrazydowe użyte do otrzymania pochodnych Ub, substratów z grupą ACC w pozycji P1'. N-końcowy segment Ub[1-27] oraz środkowy Ub[28-45]<sup>A46C</sup> miały uniwersalne struktury i zostały użyte w syntezie każdego z wariantów Ub. C-końcowe segmenty zawierające reszty 46-75 ubikwityny różniły się między sobą C-końcowymi aminokwasami (różniące się reszty zaznaczono pogrubioną czcionką oraz zastosowano dla nich trzyliterowe oznaczenia). Oprócz nienaturalnych substratów Ub.M2-ACC, Ub.S1-ACC oraz Ub.S2-ACC zsyntezowano również Ub-ACC o sekwencji peptydowej natywnej Ub.

Nazwa:	Sekwencja:
Ub[1-27]	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVK-NH-NH <sub>2</sub>
Ub[28-45] <sup>A28C</sup>	CKIQDKEGIPPDQQRLIF-NH-NH <sub>2</sub>
Ub[46-75] <sup>A46C</sup>	CGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR- <b>Leu-Arg-Gly</b> -NH-NH <sub>2</sub>
Ub.M2[46-75] <sup>A46C</sup>	CGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR- <b>Tle-Phg-Gly</b> -NH-NH <sub>2</sub>
Ub.S1[46-75] <sup>A46C</sup>	CGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR- <b>Cha-Arg-Abu</b> -NH-NH <sub>2</sub>
Ub.S2[46-75] <sup>A46C</sup>	CGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR- <b>D-Arg-Phe(guan)-Ala</b> -NH-NH <sub>2</sub>

Następnym etapem w syntezie pochodnych Ub była reakcja desulfuryzacji przeprowadzana w celu konwersji reszt Cys do reszt Ala, które występują w natywnej Ub [204]. Do C-końca tak przygotowanych cząsteczek przyłączono fluorogeniczne ugrupowanie H<sub>2</sub>N-Gly-ACC-OH, w wyniku czego otrzymano pochodną Ub, którą można stosować jako substrat do badania DUBs. Schemat syntezy przedstawiono na Rysunku 26.



Rysunek 26. Schemat totalnej syntezy fluorogenicznych pochodnych Ub. A – funkcjonalizacja żywicy 2-chlorotrytylowej za pomocą Fmoc-NH-NH<sub>2</sub> oraz synteza segmentów hydrazydowych na podłożu stałym. B – sekwencyjne reakcje NCL hydrazydów acylu, reakcja desulfuryzacji oraz funkcjonalizacja C-końca cząsteczki ubikwityny.

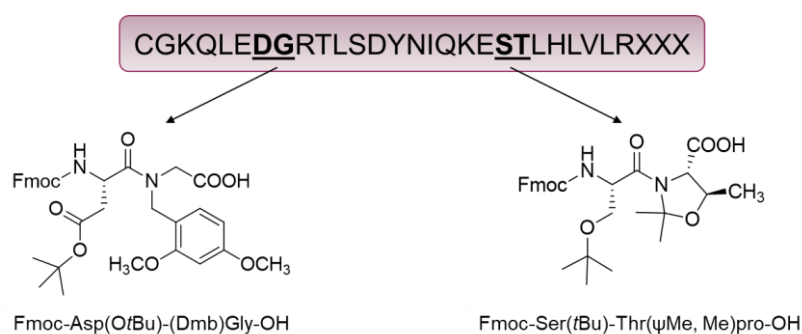
### 3.4.1. Synteza hydrazydowych segmentów

Pierwszym krokiem w syntezie hydrazydowych segmentów peptydowych była funkcjonalizacja żywicy 2-chlorotrytylowej za pomocą Fmoc-NH-NH<sub>2</sub> zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem Huang i in. [206]. Wykorzystano żywicę o stopniu podstawienia 0,97 mmol/g. Po przyłączeniu Fmoc-NH-NH<sub>2</sub> żywicę wysuszone i przechowywano w 4°C.

Hydrazydy zsyntezowano korzystając z metodologii Fmoc/*t*Bu SPPS z wykorzystaniem HATU oraz 2,4,6-kolidyny jako odczynników sprzęgających. Postęp reakcji acylacji monitorowano za pomocą testu ninhydrynowego: niewielką ilość przemytych ziarenek żywicy umieszczano w probówce, do ziarenek dodawano 0,5 ml roztworu ninhydryny w 96% EtOH skażonym Et<sub>2</sub>O i inkubowano przez 5 min w 95°C. Zmiana koloru ziarenek na ciemny oznaczała obecność wolnych grup aminowych, a brak zmiany koloru żywicy oznaczał całkowitą acylację grup aminowych na nośniku stałym. W przypadku niecałkowitego przereagowania wolnych grup aminowych po 24 h prowadzenia reakcji, żywicę przemywano i dodawano świeżą porcję aminokwasu i odczynników sprzęgających w DMF. Po syntezie hydrazydy uwolniono z nośnika stałego oraz usunięto grupy ochronne

za pomocą mieszaniny TFA, TIPS i H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5, v/v/v). Produkty oczyszczono na HPLC i zliofilizowano. Czystość i masę molową otrzymanych segmentów potwierdzono za pomocą LC-MS.

W przeciwieństwie do uniwersalnych segmentów Ub[1-27] oraz Ub[28-45]<sup>A28C</sup>, po przeprowadzeniu syntezy C-końcowych hydrazydów (reszty 46-75) z użyciem standardowych aminokwasów do syntezy na podłożu stałym strategią Fmoc/*t*Bu, wydajność procesu była bardzo niska, a otrzymane produkty były zanieczyszczone pomimo oczyszczenia za pomocą HPLC. W celu otrzymania produktów niezbędne było użycie tzw. dipeptydowych bloków budulcowych. Ich zastosowanie w syntezie Ub zostało opisane po raz pierwszy przez Oualida i in. [156]. Badacze zidentyfikowali sześć miejsc w sekwencji Ub, w których użycie tych związków umożliwiło uzyskanie produktu. Na podstawie tego badania wybrano dwa miejsca w sekwencji C-końcowego segmentu: Ser<sup>65</sup>Thr<sup>66</sup> oraz Asp<sup>52</sup>Gly<sup>53</sup> (Rysunek 27). Podczas syntezy użyto komercyjnie dostępnych dipeptydowych bloków budulcowych: Fmoc-Ser(*t*Bu)-Thr( $\psi$ Me, Me)pro-OH oraz Fmoc-Asp(*O*tBu)-(Dmb)Gly-OH. Użycie tych reagentów podczas syntezy SPPS umożliwiło uzyskanie segmentów z dobrą wydajnością i o wysokiej czystości.



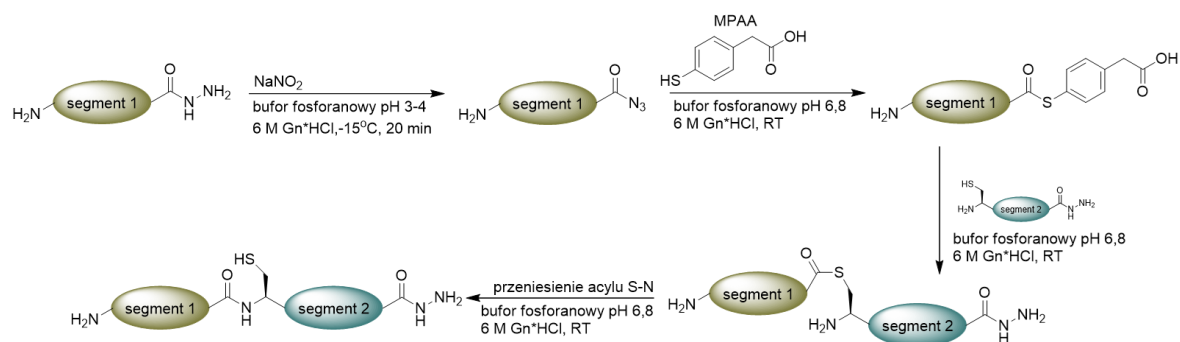
Rysunek 27. Struktury dipeptydowych bloków budulcowych użytych do syntezy segmentów zawierających reszty 46-75 ubikwityny, wraz z miejscami w sekwencji, w których zostały one zastosowane.

### 3.4.2. Kondensacja peptydowych hydrazydów z wykorzystaniem reakcji natywnej chemicznej ligacji (NCL)

Reakcja NCL wykorzystywana jest najczęściej do kondensacji peptydów zawierających C-końcowe ugrupowanie tioestrowe z peptydami posiadającymi na N-końcu resztę cysteiny. Zachodzi ona w łagodnych warunkach, w buforze wodnym i w temperaturze pokojowej. Ze względu na wysoką chemoselektywność, reakcji tej można poddać peptydy niezawierające grup ochronnych na grupach funkcyjnych łańcuchów bocznych. Bufor fosforanowy, w którym prowadzona jest reakcja, zawiera wysokie stężenie chlorowodoru guanidyny lub mocznika, które pozwalają uniknąć agregacji peptydów oraz poprawić ich rozpuszczalność.



Zalety te sprawiają, że reakcja NCL jest powszechnie stosowana w syntezie białek oraz długich peptydów [202]. Podczas realizacji projektu doktorskiego do syntezy pochodnych ubikwityny wykorzystano odmianę reakcji NCL opartą o syntezę peptydowych hydrazydów, pełniących rolę zamaskowanych tioestrów (Rysunek 28) [205]. Użycie peptydowych hydrazydów w reakcji NCL wymaga ich wcześniejszej aktywacji za pomocą azotanu (III) sodu oraz przekształcenia w reaktywny tioester, który następnie ulega transtioestryfikacji z drugim segmentem peptydowym. W wyniku nieodwracalnego przeniesienia acylu S→N dochodzi do uformowania wiązania peptydowego pomiędzy dwoma segmentami.



Rysunek 28. Schemat reakcji NCL. W pierwszym etapie hydrazyd aktywowany jest za pomocą azotanu (III) sodu do azydku acylu, który w kolejnym kroku przekształcany jest w tioester z użyciem MPAA. Następnie tioester ulega transtioestryfikacji wskutek ataku nukleofilowego atomu siarki reszty cysteiny na N-końcu segmentu 2. W ostatnim etapie dochodzi do przeniesienia acylu S→N z utworzeniem wiązania amidowego między segmentem 1 i 2.

W celu syntezy segmentu Ub[1-45]<sup>A28C</sup>, segment Ub[1-27] rozpuszczono w buforze fosforanowym o pH 3,0 zawierającym 6 M chlorowodorek guanidyny. Następnie mieszaninę umieszczono na mieszadle magnetycznym i schłodzono do -15°C w łaźni lodowej z NaCl. Dodano azotan (III) sodu w celu aktywacji hydrazydu, reakcję prowadzono przez 15 min. Po tym czasie dodano mieszaninę MPAA z segmentem Ub[28-45]<sup>A28C</sup> w buforze fosforanowym o pH 6,5 z Gn\*HCl i usunięto łaźnię lodową. Gdy mieszanina reakcyjna osiągnęła temperaturę pokojową, pH zostało podniesione do 6,8. Reakcję prowadzono przez 3 h z mieszaniem. Po przereagowaniu substratów dodano reduktor (TCEP) i oczyszczono produkt, segment Ub[1-45]<sup>A28C</sup> na HPLC. Następnie określono czystość produktu za pomocą LC-MS, zliofilizowano i przechowywano w 4°C.

Ub[1-45]<sup>A28C</sup> jest segmentem o uniwersalnej sekwencji i używano go podczas syntezy wszystkich substratów o strukturach opartych na strukturze Ub. Reakcje NCL między nim a segmentami zawierającymi reszty 46-75 prowadzono w taki sam sposób, jak opisano wyżej dla reakcji między Ub[1-27] i Ub[28-45]<sup>A28C</sup>. W ich wyniku otrzymano segmenty użyte w dalszym etapie syntezy fluorogenicznych pochodnych ubikwityny: Ub[1-75]<sup>A28C,A46C</sup>,

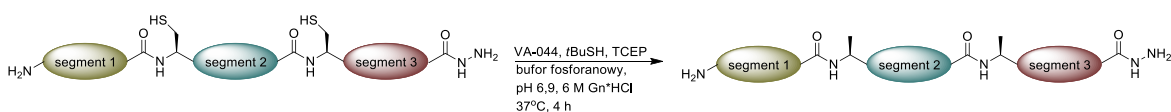
Ub.S1[1-75]<sup>A28C,A46C</sup>, Ub.S2[1-75]<sup>A28C,A46C</sup> oraz Ub.M2[1-75]<sup>A28C,A46C</sup>. Sekwencje otrzymanych hydrazydów przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Sekwencje hydrazydowych segmentów otrzymanych w wyniku reakcji NCL oraz desulfuryzacji. Podkreślono reszty cysteiny ulegające desulfuryzacji oraz odpowiadające im reszty alaniny.

Przed desulfuryzacją
Ub[1-45] <sup>A28C</sup> MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>C</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF-NH-NH <sub>2</sub>
Ub[1-75] <sup>A28C,A46C</sup> MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>C</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>C</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-Leu-Arg-Gly-NH-NH <sub>2</sub>
Ub.M2[1-75] <sup>A28C,A46C</sup> MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>C</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>C</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-Tle-Phg-Gly-NH-NH <sub>2</sub>
Ub.S1[1-75] <sup>A28C,A46C</sup> MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>C</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>C</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-Cha-Arg-Abu-NH-NH <sub>2</sub>
Ub.S2[1-75] <sup>A28C,A46C</sup> MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>C</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>C</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-D-Arg-Phe(guan)-Ala-NH-NH <sub>2</sub>
Po desulfuryzacji:
Ub[1-75] MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>A</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>A</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-Leu-Arg-Gly-NH-NH <sub>2</sub>
Ub.M2[1-75] MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>A</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>A</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-Tle-Phg-Gly-NH-NH <sub>2</sub>
Ub.S1[1-75] MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>A</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>A</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-Cha-Arg-Abu-NH-NH <sub>2</sub>
Ub.S2[1-75] MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVK <u>A</u> KIQDKEGIPPDQQLRIF <u>A</u> GGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR-D-Arg-Phe(guan)-Ala-NH-NH <sub>2</sub>

### 3.4.3. Desulfuryzacja i funkcjonalizacja C-końca pochodnych Ub

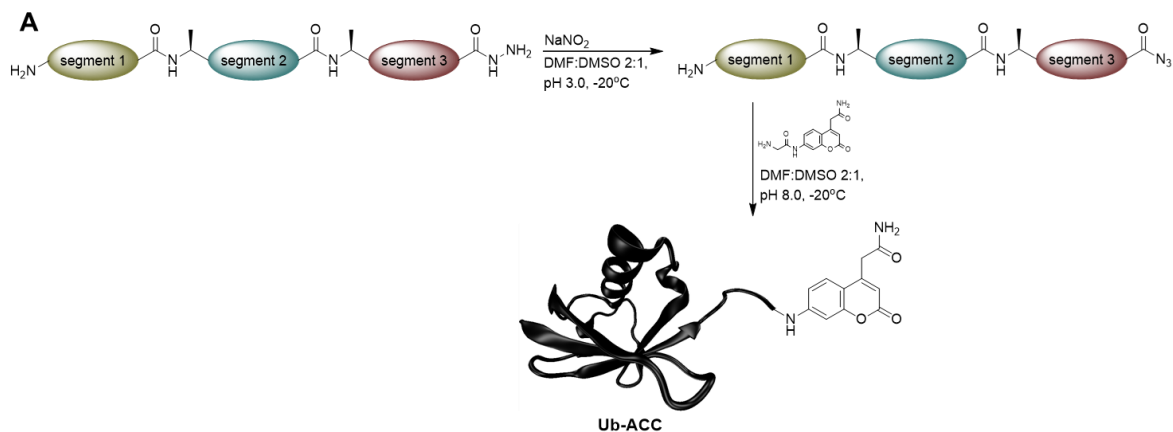
Reakcje NCL pomiędzy hydrazydowymi segmentami peptydowymi były możliwe za sprawą obecności reszt cysteiny, które nie są obecne w strukturze natywnej Ub. Badanie Lianga i in. wykazało, że obecność mutacji Ala<sup>28</sup>Cys może mieć istotny wpływ na wiązanie się pochodnych Ub do UCH-L3 [199], w związku z czym konieczna jest konwersja reszt Cys do Ala. Do przeprowadzenia konwersji reszt Cys do Ala dla hydrazydów Ub[1-75]<sup>A28C,A46C</sup>, Ub.S1[1-75]<sup>A28C,A46C</sup>, Ub.S2[1-75]<sup>A28C,A46C</sup> i Ub.M2[1-75]<sup>A28C,A46C</sup> zastosowano zmodyfikowany protokół opisany przez Zhenga i in. (Rysunek 29) [205] wykorzystujący reakcję rodnikową, opisaną przez Wana i Danishefskiego [204].

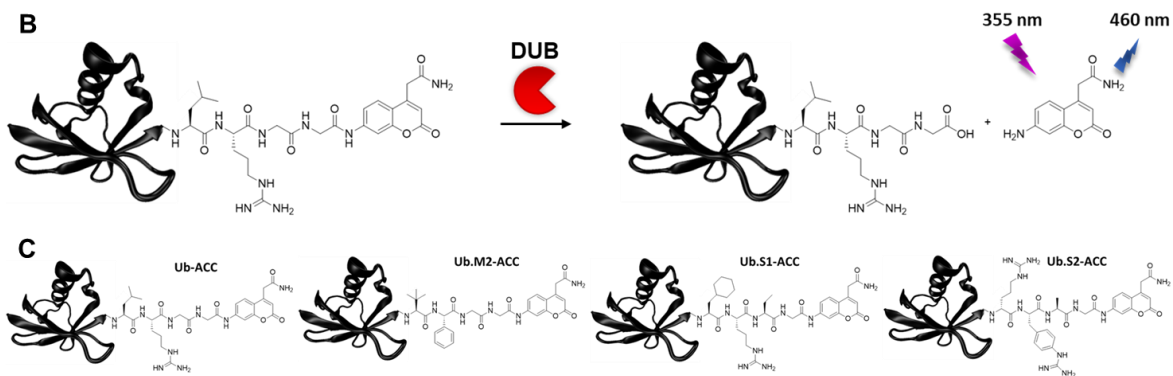


Rysunek 29. Schemat reakcji desulfuryzacji.

Reakcję prowadzono w buforze fosforanowym o pH 6,9 z dodatkiem  $Gn^*HCl$ . W buforze z dodatkiem inicjatora rodnikowego VA-044 i TCEP rozpuszczono hydrazyd acylu i dodano *t*BuSH. Reakcja prowadzona była w łaźni wodnej w temperaturze 37°C z mieszaniem. Po całkowitej konwersji substratu mieszaninę oczyszczono za pomocą HPLC. Czystość i masa molowa wszystkich otrzymanych w ten sposób peptydów została określona za pomocą LC-MS.

Po reakcji desulfuryzacji otrzymano hydrazydowe pochodne Ub, pozbawione C-końcowej reszty glicyny. W celu otrzymania kompletnych pochodnych Ub zawierających fluorogeniczną grupę ACC na C-końcu, do segmentów Ub[1-75] przyłączono  $H_2N-Gly-ACC$ .  $H_2N-Gly-ACC$  zsyntezowano na podłożu stałym, używając żywicy amidowej Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,74 mmol/g. Do żywicy przyłączono Fmoc-ACC-OH i usunięto grupę ochronną Fmoc. Następnie przyłączono Fmoc-Gly-OH, usunięto grupę Fmoc i wysuszono żywicę.  $H_2N-Gly-ACC$  uwolniono z nośnika stałego za pomocą mieszaniny TFA:TIPS:H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5, v/v/v), zliofilizowano i używano bez oczyszczenia. Reakcja między hydrazydami i  $H_2N-Gly-ACC$  prowadzona była w dwóch etapach. W pierwszym etapie hydrazydy przekształcono w reaktywny azydek acylu. Substrat rozpuszczono w mieszaninie DMF i DMSO (2:1, v/v) i reakcję prowadzono z mieszaniem w -20°C w łaźni lodowej z NaCl. Mieszaninę zakwaszono do pH 3,0 i dodano azotan (III) sodu rozpuszczony w mieszaninie DMF i DMSO (2:1, v/v). Reakcję prowadzono przez 30 min. Następnie dodano  $H_2N-Gly-ACC$  rozpuszczone w DMF i DMSO (2:1, v/v) z dodatkiem DIPEA. Za pomocą DIPEA pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzono do 8,0. Po zakończeniu reakcji produkty oczyszczono za pomocą HPLC, zliofilizowano oraz scharakteryzowano za pomocą LC-MS i HRMS. Schemat derywatyzacji C-końca przedstawiono na Rysunku 30A.





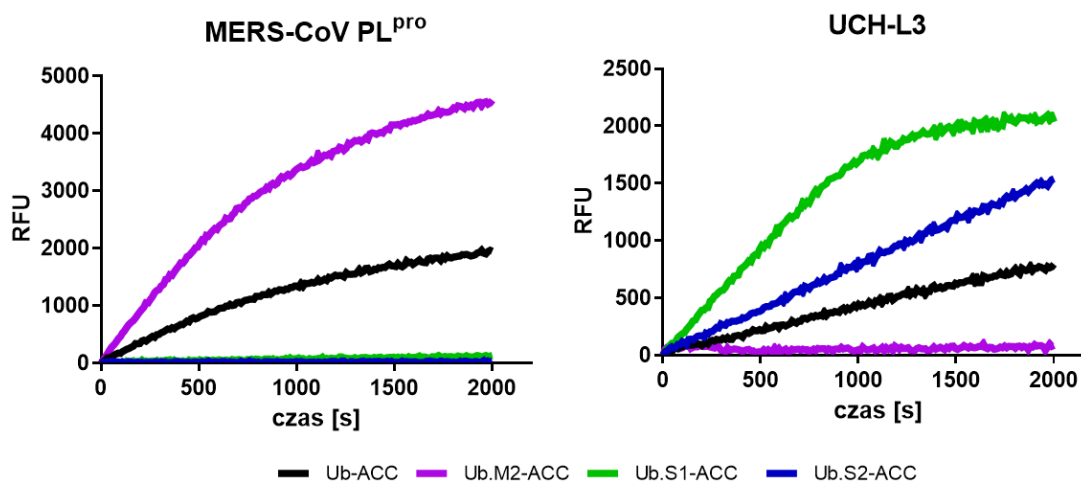
Rysunek 30. A – schemat dwuetapowej derywatywacji peptydowego hydrazynu w celu otrzymania pochodnych z fluorogeniczną grupą ACC na C-końcu cząsteczki. B – schemat działania substratów do badania DUBs na przykładzie Ub-ACC. Wskutek aktywności enzymów deubikwitynujących, uwalniana jest C-końcowa grupa ACC i obserwowany jest przyrost fluorescencji w czasie. C – otrzymane substraty, pochodne Ub, do badania MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3.

#### 3.4.4. Badanie selektywności fluorogenicznych substratów

Do badania aktywności enzymów deubikwitynujących z reguły używa się cząsteczek Ub z C-końcową fluorogeniczną grupą odchodzącą (Rysunek 30B). Jednym z najpowszechniej stosowanych substratów do badań aktywności enzymów deubikwitynujących jest Ub-AMC. Substrat ten składa się z cząsteczki Ub i przyłączonej do jego C-końca 7-amino-4-metylokumaryny (AMC). W 2016 roku Li i in. pokazali, że Ub-ACC, pochodna Ub zawierająca na C-końcu 7-amino-4-karbamoilokumarynę (ACC), jest od niego ponad dwukrotnie czulsza w detekcji aktywności DUBs za sprawą wyższej wydajności kwantowej fluorescencji ACC w porównaniu do AMC [198]. Substraty te nie dyskryminują poszczególnych DUBs i są rozpoznawane przez wszystkie enzymy z tej grupy. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza substratów, które będą selektywne i specyficzne względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. W wyniku totalnej syntezy otrzymano cztery warianty Ub z C-końcową grupą fluorogeniczną ACC, których schematy przedstawiono na Rysunku 30C:

1. Ub-ACC – substrat referencyjny, cząsteczka Ub o natywnej sekwencji;
2. Ub.M2-ACC – substrat dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> z C-końcową nienaturalną sekwencją -Tle-Phg-Gly-Gly-ACC;
3. Ub.S1-ACC – substrat dla UCH-L3 z C-końcową nienaturalną sekwencją -Cha-Arg-Abu-Gly-ACC;
4. Ub.S2-ACC – substrat dla UCH-L3 z C-końcową nienaturalną sekwencją -D-Arg-Phe(guan)-Ala-ACC.

W celu zbadania wpływu substytucji aminokwasów w obrębie C-końcowej sekwencji LRGG na selektywność substratów, przeprowadzono eksperyment z użyciem rekombinowanych enzymów. Substraty w stężeniu 1  $\mu$ M poddano hydrolizie przez MERS-CoV PL<sup>pro</sup> (5 nM) lub UCH-L3 (1 nM) i mierzono przyrost względnych jednostek fluorescencji w czasie. Wyniki przedstawiono na Rysunku 31.



Rysunek 31. Badanie selektywności zsyntezowanych substratów. Wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końcowego ogona Ub powoduje selektywną hydrolizę pochodnych Ub przez rekombinowane enzymy.

Przeprowadzony eksperyment potwierdził selektywność zsyntezowanych substratów względem badanych enzymów. Substrat uniwersalny Ub-ACC jest rozpoznawany zarówno przez MERS-CoV PL<sup>pro</sup> jak i UCH-L3. Oprócz Ub-ACC, MERS-CoV PL<sup>pro</sup> hydrolizuje jedynie substrat Ub.M2-ACC zawierający C-końcową sekwencję Tle-Phg-Gly-Gly-ACC zaprojektowaną na podstawie profilu specyficzności substratowej tej proteazy. UCH-L3 natomiast hydrolizuje wszystkie substraty za wyjątkiem Ub.M2-ACC. Co więcej, najszybszy przyrost fluorescencji obserwowany był dla Ub.S1-ACC, czyli substratu zawierającego C-końcową sekwencję Cha-Arg-Abu-Gly. Substrat referencyjny hydrolizowany był wolniej, niż obie fluorogeniczne pochodne nienaturalnej ubikwityny.

### 3.4.5. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla zsyntezowanych substratów

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie parametrów kinetycznych dla otrzymanych substratów. W tym celu przygotowano seryjne rozcieńczenia substratów, a następnie dodano do nich MERS-CoV PL<sup>pro</sup> (10 nM) lub UCH-L3 (1 nM) i mierzono przyrost fluorescencji w czasie. Pomiary powtórzono trzykrotnie. Parametry kinetyczne wyznaczono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism. Wyniki przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Parametry kinetyczne wyznaczone dla pochodnych Ub. Wartości przedstawiono jako średnia arytmetyczna z trzech pomiarów, a błąd wyrażono jako odchylenie standardowe.

<b>MERS-CoV PL<sup>pro</sup></b>			
	$k_{kat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [μM]	$k_{kat}/K_M$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
Ub-ACC	3,679 ± 0,179	3,55 ± 0,09	(1,0 ± 0,034) × 10 <sup>6</sup>
Ub.M2-ACC	12,386 ± 0,341	7,62 ± 0,51	(1,6 ± 0,076) × 10 <sup>6</sup>
Ub.S1-ACC	b.d.	b.d.	b.d.
Ub.S2-ACC	-	-	-
<b>UCH-L3</b>			
	$k_{kat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [μM]	$k_{kat}/K_M$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
Ub-ACC	0,107 ± 0,004	0,048 ± 0,002	(2,2 ± 0,093) × 10 <sup>6</sup>
Ub.M2-ACC	0,023 ± 0,0005	2,11 ± 0,07	(1,1 ± 0,060) × 10 <sup>4</sup>
Ub.S1-ACC	0,387 ± 0,017	0,099 ± 0,011	(3,9 ± 0,22) × 10 <sup>6</sup>
Ub.S2-ACC	0,224 ± 0,018	0,083 ± 0,005	(2,7 ± 0,25) × 10 <sup>6</sup>

„b.d.” – wyznaczenie parametrów nie było możliwe ze względu na precypitację substratu w wysokim stężeniu;

„-” – brak hydrolizy substratu przez enzym

Parametry kinetyczne wyznaczone dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> ukazują, że enzym ma dwukrotnie wyższe powinowactwo wobec Ub-ACC ( $K_M = 3,55 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ) w porównaniu do wariantu Ub.M2-ACC ( $K_M = 7,62 \pm 0,51 \mu\text{M}$ ). Stała specyficzności dla nienaturalnego wariantu Ub jest natomiast 1,6 razy wyższa. Wynika to z prawie czterokrotnie wyższej stałej  $k_{kat}$ , wynoszącej  $k_{kat} = 12,386 \pm 0,341 \text{ s}^{-1}$  dla tego wariantu oraz  $3,679 \pm 0,179 \text{ s}^{-1}$  dla substratu referencyjnego. Parametry kinetyczne dla Ub.S1-ACC oraz Ub.S2-ACC jako substratów dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> nie zostały wyznaczone ze względu na brak aktywności enzymu względem substratu Ub.S2-ACC oraz precypitację Ub.S1-ACC w wysokich stężeniach.

UCH-L3 również cechuje najwyższe powinowactwo wobec Ub-ACC spośród wszystkich substratów. Stała Michaelisa  $K_M$  dla wariantów Ub.S1-ACC i Ub.S2-ACC ma około dwa razy wyższą wartość od  $K_M$  zmierzonej dla substratu referencyjnego. Mimo tego substraty Ub.S1-ACC i Ub.S2-ACC cechuje wyższa specyficzność ze względu na wyższe wartości stałej szybkości  $k_{kat}$ . Wysoka stała Michaelisa oraz stosunkowo niska stała  $k_{kat}$  powodują, że substrat Ub.M2-ACC jest słabo rozpoznawany przez UCH-L3.

### 3.5. Dyskusja wyników – nienaturalne pochodne Ub jako selektywne i specyficzne substraty dla DUBs

Celem tej części pracy była synteza i ocena selektywności oraz specyficzności substratów – pochodnych Ub z C-kończącą grupą ACC. Związki te zostały zsyntezowane metodą ligacja-desulfuryzacja. Do przeprowadzenia reakcji NCL zastosowano strategię wykorzystującą peptydowe hydrazydy jako zamaskowane tioestry. Strategia ta pozwala na syntezę hydrazydów na podłożu stałym z wykorzystaniem standardowych odczynników do SPPS. Do przygotowania C-kończących segmentów wykorzystano dipeptydowe bloki budulcowe, stosowane w syntezie trudnych sekwencji peptydowych. Po syntezie i oczyszczeniu segmentów hydrazydowych, segmenty poddano następującym po sobie reakcjom NCL, w wyniku których otrzymano 75-peptydowe hydrazydy. Następnie przeprowadzono ich rodnikową desulfuryzację i sfunkcjonalizowano C-koniec za pomocą H<sub>2</sub>N-Gly-ACC. Tak otrzymane substraty poddano dalszym eksperymentom – określeniu selektywności względem DUBs oraz wyznaczeniu parametrów kinetycznych.

W pierwszym badaniu sprawdzono, czy substraty są selektywne względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. W tym celu użyto rekombinowanych enzymów. Wyniki potwierdziły, że hydroliza substratów zawierających na C-końcu sekwencje zaprojektowane dla UCH-L3, Ub.S1-ACC oraz Ub.S2-ACC, zachodzi jedynie pod wpływem aktywności tego enzymu. Podobne wyniki otrzymano dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, która hydrolizowała jedynie substrat referencyjny oraz Ub.M2-ACC. Wyniki te pokrywają się z wynikami otrzymanymi dla substratów tetrapeptydowych, które wykazywały podobną selektywność. Określenie preferencji substratowych DUBs za pomocą bibliotek tetrapeptydowych substratów umożliwia więc zaprojektowanie selektywnych substratów o strukturze opartej na Ub.

W następnym etapie wyznaczono parametry kinetyczne dla zsyntezowanych substratów. Wartości otrzymane dla substratu referencyjnego odbiegają od wartości stałych, jakie można znaleźć w literaturze. Li i in. w 2016 roku zsyntezowali Ub-ACC i porównali otrzymane dla niego parametry kinetyczne  $k_{kat}$ ,  $K_M$  oraz  $k_{kat}/K_M$  z parametrami dla Ub-AMC [198]. Badanie to przeprowadzono dla trzech różnych DUBs: UCH-L3, OTUD2 i USP30. Wartości uzyskane dla Ub-ACC oraz Ub-AMC były zbliżone, a więc użycie ACC zamiast AMC nie zmieniło powinowactwa substratów do enzymu ani wydajności ich hydrolizy. Dzięki wyższej wydajności kwantowej fluorescencji ACC, nowy substrat zapewnił również czulszą detekcję aktywności DUBs w porównaniu do Ub-AMC. Wyznaczona przez badaczy wartość  $K_M$  dla UCH-L3 i Ub-ACC wynosiła  $K_M = 0,047 \pm 0,010 \mu M$ , co pokrywa się z wartością

$K_M = 0,048 \pm 0,002 \mu\text{M}$ , uzyskaną w wyniku badań opisanych w niniejszej dysertacji. Występuje natomiast istotna rozbieżność w wartościach stałych specyficzności. Wyznaczona w rozprawie wartość  $k_{\text{kat}}/K_M$  wynosi  $k_{\text{kat}}/K_M = (2,2 \pm 0,093) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , podczas gdy w badaniu Li i in. wartość ta jest około osiemdziesiąt razy wyższa i wynosi  $k_{\text{kat}}/K_M = (1,77 \pm 0,38) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Wynika to z różnic w wyznaczonych wartościach parametrów  $k_{\text{kat}}$ . W rozprawie, dla hydrolizy Ub-ACC przez UCH-L3, uzyskano  $k_{\text{kat}} = 0,107 \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$ , podczas gdy w badaniu Li i in. stała wynosiła  $k_{\text{kat}} = 8,4 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ . Różnice te mogą wynikać z dwóch czynników. Stała  $k_{\text{kat}}$  to stała szybkości reakcji zależna od temperatury. Eksperymenty opisane przez Li i in. prowadzone były w  $30^\circ\text{C}$ , natomiast parametry kinetyczne przedstawione w rozprawie wyznaczone zostały w  $37^\circ\text{C}$ . Drugim czynnikiem mogącym wytłumaczyć te rozbieżności jest różnica w aktywności enzymatycznej użytego enzymu. W badaniu Li i in. użyto enzymu o stężeniu  $100 \text{ pM}$  aby zaobserwować aktywność wymaganą do wyznaczenia parametrów kinetycznych, podczas gdy do eksperymentu opisanego w rozprawie użyto  $1 \text{ nM}$ , a więc dziesięciokrotnie wyższego stężenia UCH-L3.

W badaniu Békésa i in. [121] wyznaczono  $k_{\text{kat}}/K_M = 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  dla Ub-AMC względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, podczas gdy stała specyficzności zmierzona w ramach badań przedstawionych w niniejszej dysertacji dla Ub-ACC wyniosła  $k_{\text{kat}}/K_M = (1,0 \pm 0,034) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Ponad dwukrotna różnica między wartościami stałych specyficzności ponownie mogła wynikać z różnego stopnia aktywności próbek enzymu użytych do badań. Stężenie MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w obu opisanych procedurach było inne: w badaniu Békésa i in. wynosiło  $50 \text{ nM}$  i było pięciokrotnie wyższe, niż w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie.

Podczas analizy kinetycznej tetrapeptydowych substratów wyznaczono dla nich parametr  $k_{\text{kat}}/K_M$ . Spośród wszystkich substratów, najwyższą stałą specyficzności dla UCH-L3 miał substrat S2, dla którego wartość tej stałej wyniosła  $k_{\text{kat}}/K_M = 8,13 \pm 0,23 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  i była około trzykrotnie wyższa od stałej otrzymanej dla Ac-LRGG-ACC. Dla substratu S1 wartość  $k_{\text{kat}}/K_M$  była tylko nieznacznie wyższa od stałej specyficzności dla substratu referencyjnego. W przypadku pochodnych Ub, Ub.S1-ACC był natomiast substratem najwydajniej hydrolizowanym przez UCH-L3, a różnica między nim a Ub-ACC była w przybliżeniu dwukrotna. Substrat Ub.S2-ACC ( $k_{\text{kat}}/K_M = (2,7 \pm 0,25) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), z sekwencją pochodzącą od najlepszego tetrapeptydu, był natomiast nieznacznie lepszy od Ub-ACC ( $k_{\text{kat}}/K_M = (2,2 \pm 0,093) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Tłumaczyć to mogą zmiany konformacyjne enzymu, zachodzące pod wpływem związania ubikwityny, które mogą wpływać na wydajności katalityczne hydrolizy zarówno tetrapeptydów jak i pochodnych Ub. UCH-L3 hydrolizował



również pochodną Ub.M2-ACC, jednak stała specyficzności była dla niej dwustukrotnie niższa niż dla Ub-ACC i aż prawie czterystukrotnie niższa, niż dla najlepszego substratu Ub.S1-ACC. W przypadku MERS-CoV PL<sup>pro</sup> zarówno tetrapeptydowy substrat M2 i pochodna M2.Ub-ACC były najwydajniej hydrolizowanymi substratami spośród substratów tetrapeptydowych i fluorogenicznych pochodnych Ub. Enzym nie hydrolizował substratu Ub.S2-ACC, natomiast Ub.S1-ACC podczas badań wytrącał się w wysokich stężeniach roztworu, przez co nie było możliwe wyznaczenie parametrów kinetycznych.

W porównaniu do Ub-ACC, pomimo wzrostu stałych specyficzności dla nienaturalnych mutantów projektowanych dla UCH-L3 oraz MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, substraty te wykazywały wyższe stałe Michaelisa, a wzrost specyficzności spowodowany był wzrostem stałej szybkości  $k_{kat}$ . Ponadto otrzymane wyniki pokazują wysoką specyficzność badanych enzymów deubikwitynujących względem pochodnych Ub. Tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne zawierające krótkie sekwencje peptydowe były słabo rozpoznawane przez MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. W przypadku UCH-L3 parametr  $k_{kat}/K_M$  dla tetrapeptydowych substratów był o sześć rzędów wielkości niższy, niż dla pochodnych ubikwityny. Dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> różnica ta była mniejsza i wynosiła cztery rzędy wielkości. Większa tolerancja MERS-CoV PL<sup>pro</sup> względem substratów niebędących Ub może wynikać z fizjologicznej roli tego enzymu, którego substratem, oprócz Ub i ISG15, jest też wirusowa poliproteina. UCH-L3 natomiast wykazuje aktywność wyłącznie deubikwitynującą, co tłumaczy jego wysoką specyficzność wobec pochodnych Ub oraz bardzo niską specyficzność względem krótkich peptydowych substratów.

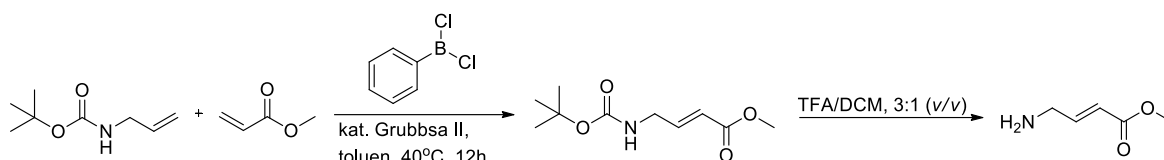
### 3.6. Biotynylowane markery chemiczne pochodne Ub do badania DUBs

#### 3.6.1. Zaprojektowanie markerów chemicznych do selektywnej detekcji MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3

Kolejnym etapem badań była synteza markerów chemicznych do selektywnej wizualizacji badanych DUBs w lizatach komórkowych. Struktura ABPs do badania DUBs jest oparta na jednej bądź kilku połączonych ze sobą cząsteczkach Ub, elektrofilowym ugrupowaniu, które wiąże się z miejscem aktywnym oraz grupie reporterowej, umożliwiającej wizualizację kompleksu marker-enzym [25]. Wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końca pochodnych Ub pozwoliło otrzymać selektywne i specyficzne substraty do badania MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. Taką samą strategię zastosowano do zaprojektowania selektywnych markerów chemicznych. Zsyntezowano pochodne Ub z nienaturalnymi sekwencjami aminokwasowymi na C-końcach. Ponadto, pochodne zawierały na C-końcu grupę VME kowalencyjnie wiążącą się z miejscem aktywnym, a do N-końcowej grupy aminowej przyłączono biotynę jako grupę reporterową.

W zaprojektowanych markerach chemicznych wykorzystano biotynę jako N-końcową grupę reporterową. Jest to relatywnie tania i dostępna komercyjnie substancja, kompatybilna z wykorzystywanym protokołem SPPS, a także stabilna podczas reakcji NCL oraz rodnikowej desulfuryzacji. Oprócz tego jej obecność w strukturze markera umożliwia zarówno detekcję za pomocą fluorescencyjnych koniugatów streptawidyny, jak i przeprowadzenie eksperymentów typu pull-down na złożach ze streptawidyną. Ze względu na to, że grupa aminowa reszty Met1 w Ub nie jest mocno wyeksponowana na zewnątrz cząsteczki [26], biotynę oddzielono od reszty markera chemicznego za pomocą alifatycznego linkera, kwasu 6-aminoheksanowego (6-ahx), który zapobiega potencjalnym zawodom sterycznym, a tym samym ułatwia przyłączenie biotyny do N-końca oraz jej wiązanie do streptawidyny.

Na C-końcu markerów chemicznych umieszczono elektrofilowy ester winylowo-metylowy (VME). Grupa VME jest akceptorem Michaela reaktywnym wobec DUBs i jest powszechnie wykorzystywana w badaniach enzymów z tej grupy [173]. W celu otrzymania tego ugrupowania zastosowano protokół syntezy opisany przez Vedrenne'a i in. (Rysunek 32) [213]. Synteza obejmowała dwa etapy: w pierwszym przeprowadzono reakcję metatezy olefin pomiędzy *N-tert*-butoksykarbonyloalliloaminą i akrylanem metylu. W drugim etapie usunięto grupę Boc. Produkt w postaci soli TFA oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na złożu krzemionkowym. Tak przygotowaną grupę VME użyto do dalszych syntez.

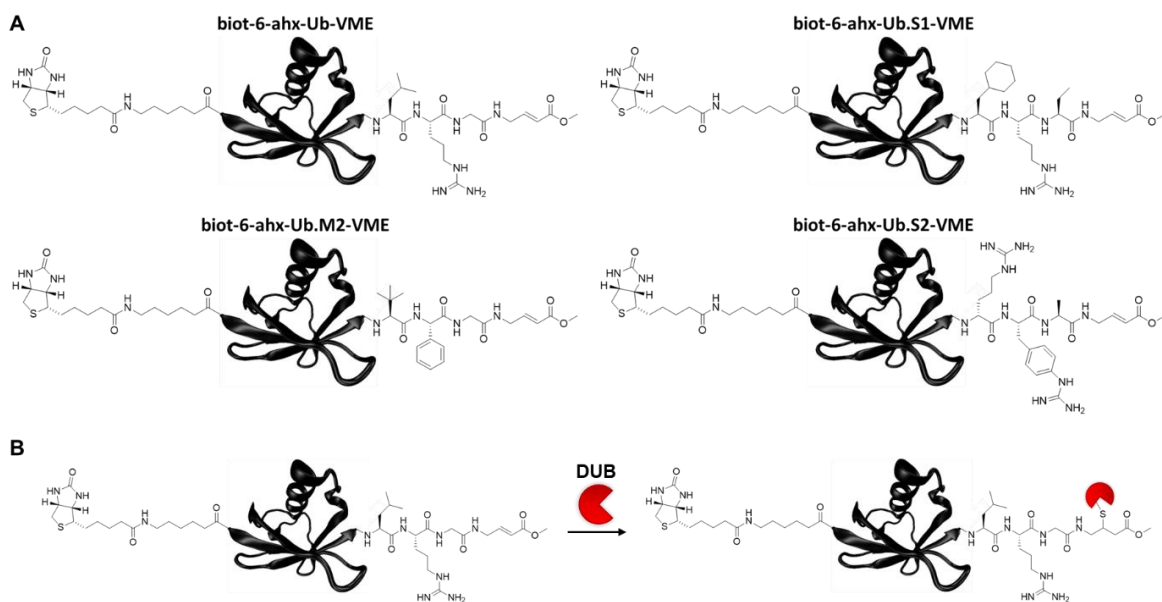


Rysunek 32. Schemat syntezy grupy VME.

### 3.6.2. Synteza markerów chemicznych

Synteza zaprojektowanych markerów chemicznych obejmowała te same etapy, które występowały podczas syntezy substratów pochodnych Ub. Do syntezy hydrazydowych segmentów peptydowych użyto żywicy Fmoc-NH-NH-2-CTC. Zsyntezowano nowy, uniwersalny dla wszystkich markerów chemicznych, N-końcowy segment biot-6-ahx-Ub [1-27]. Następnie przeprowadzono reakcję NCL tego segmentu z segmentem Ub[28-45]<sup>A28C</sup>, w wyniku czego otrzymano biot-6-ahx-Ub[1-45]<sup>A28C</sup>. Produkt ten poddano kolejnej ligacji z czterema różnymi segmentami: Ub[46-75]<sup>A28C,A46C</sup>, Ub.M2[46-75]<sup>A28C,A46C</sup>, Ub.S1 [46-75]<sup>A28C,A46C</sup> oraz Ub.S2[46-75]<sup>A28C,A46C</sup>. Otrzymane w ten sposób hydrazydy poddano reakcji desulfuryzacji i w rezultacie otrzymano biot-6-ahx-Ub[1-75], biot-6-ahx-Ub.M2 [1-75], biot-6-ahx-Ub.S1[1-75] oraz biot-6-ahx-Ub.S2[1-75]. Następnie przeprowadzono rodnikową desulfuryzację w taki sam sposób, jak podczas syntezy substratów. W kolejnym kroku przeprowadzono funkcjonalizację C-końca pochodnych Ub w sposób analogiczny jak podczas syntezy substratów, jednak zamiast H<sub>2</sub>N-Gly-ACC, jako substratu użyto H<sub>2</sub>N-Gly-VME. Zsyntezowane w ten sposób markery chemiczne oczyszczono za pomocą HPLC i scharakteryzowano za pomocą LC-MS i HRMS. W wyniku totalnej syntezy otrzymano cztery markery chemiczne pochodne Ub z C-końcową grupą VME oraz N-końcową biotyną (Rysunek 33A):

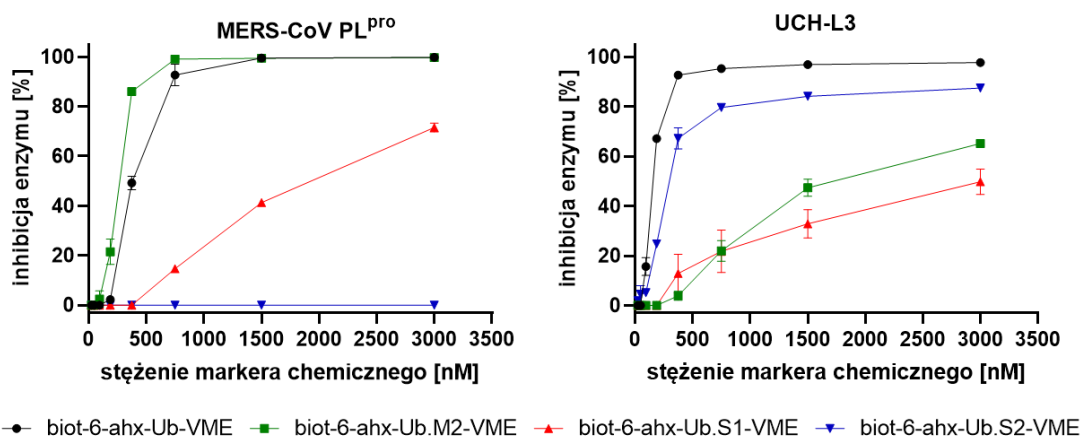
1. biot-6-ahx-Ub-VME – referencyjny marker chemiczny zawierający Ub o natywnej sekwencji;
2. biot-6-ahx-Ub.M2-VME – marker chemiczny dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> z C-końcową nienaturalną sekwencją -Tle-Phg-Gly-Gly-VME;
3. biot-6-ahx-S1.Ub-VME – marker chemiczny dla UCH-L3 z C-końcową nienaturalną sekwencją -Cha-Arg-Abu-Gly-VME;
4. biot-6-ahx-Ub.S2-VME – marker chemiczny dla UCH-L3 z C-końcową nienaturalną sekwencją -D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-VME.



Rysunek 33. A – struktury otrzymanych markerów chemicznych pochodnych Ub do badania MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. B – schemat działania markerów chemicznych na przykładzie biot-6-ahx-Ub-VME. Obecność biotyny na N-końcu markera chemicznego umożliwia wizualizację enzymu za pomocą koniugatów streptawidyny z fluorescencyjnym barwnikiem.

### 3.6.3. Inhibicja rekombinowanych enzymów przez zsyntezowane markery chemiczne

Zsyntezowane markery chemiczne zawierają C-końcowy ester winylowo-metylowy, reaktywny wobec reszty Cys w miejscu aktywnym DUBs. Związki te kowalencyjnie wiążąc się do miejsca aktywnego powodują nieodwracalną inhibicję tych proteaz (Rysunek 33B). W celu porównania efektywności inhibicji enzymów przez zsyntezowane markery chemiczne, wyznaczono resztkowe aktywności rekombinowanych enzymów wobec substratu po inkubacji z markerami chemicznymi w różnych stężeniach. Wyniki przedstawiono na Rysunku 34.



Rysunek 34. Pomiar aktywności resztkowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 po 30 min inkubacji z markerami w różnych stężeniach. Jako substratu użyto Ub-ACC w stężeniu 30  $\mu$ M, a stężenie enzymów wynosiło 50 nM.

Eksperyment pokazał, że marker chemiczny biot-6-ahx-Ub.M2-VME jest skuteczniejszym inhibitorem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> niż marker referencyjny biot-6-ahx-Ub-VME. Całkowita inhibicja osiągana jest w 750 nM stężeniu dedykowanego markera, podczas gdy marker referencyjny wykazuje taką samą siłę inhibicji dopiero w stężeniu 1500 nM. Marker biot-6-ahx-Ub.S1-VME również hamuje wirusową proteazę, ale dopiero w stężeniach przekraczających 1500 nM wykazuje powyżej 50% inhibicji. Związek biot-6-ahx-Ub.S2-VME jest selektywny i nie hamuje wirusowej proteazy, nawet po inkubacji enzymu z markerem chemicznym w najwyższym stężeniu.

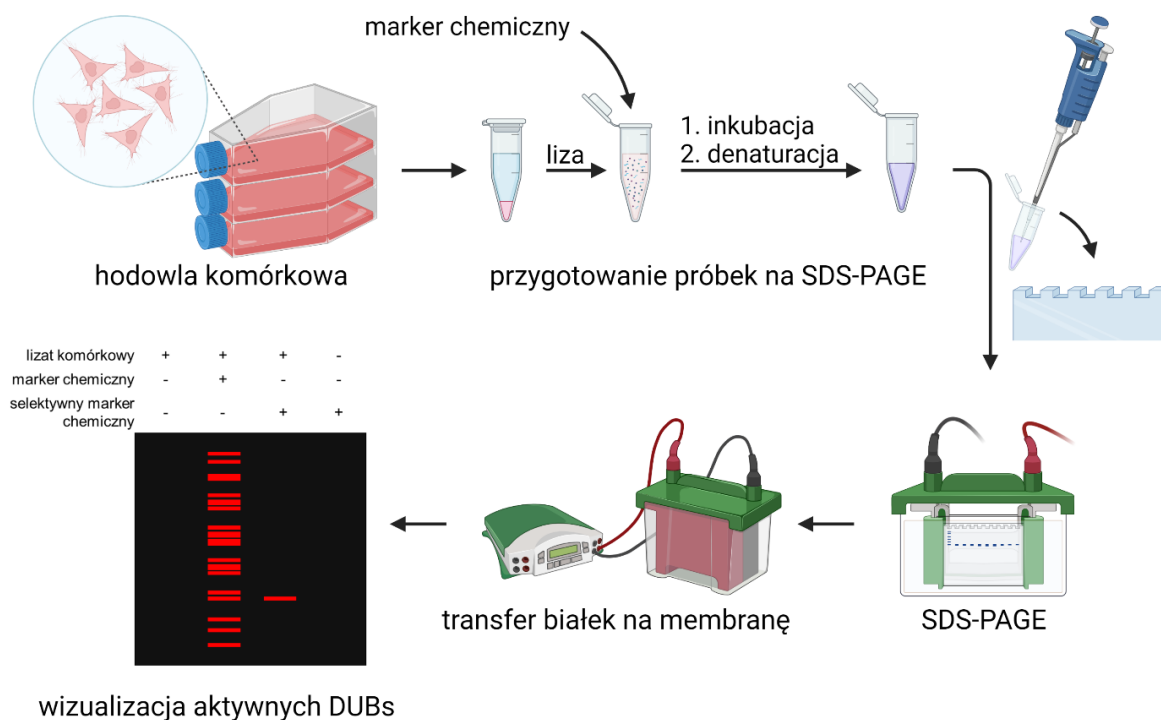
Najlepszym inhibitorem UCH-L3 w badaniu był marker referencyjny, który jako jedyny w warunkach eksperymentu całkowicie zahamował aktywność enzymu, a inhibicję powyżej 90% wykazywał już od stężenia inhibitora wynoszącego 375 nM. Drugim najlepszym inhibitorem był biot-6-ahx-Ub.S2-VME, jednak nawet w najwyższym zbadanym stężeniu (3000 nM) nie hamował on całkowicie aktywności UCH-L3. Inhibicję na poziomie około 80% wykazywał przy stężeniu  $\geq 750$  nM. Drugi marker chemiczny dla tej proteazy, biot-6-ahx-Ub.S1-VME, był słabszym inhibitorem, porównywalnym do markera dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> biot-6-ahx-Ub.M2-VME.

W celu dodatkowego scharakteryzowania zdolności markerów chemicznych do inhibicji enzymów, wyznaczono stałą  $k_{obs}/I$  umożliwiającą porównanie skuteczności katalitycznej inhibitorów nieodwracalnych. Przygotowano seryjne rozcieńczenia markerów chemicznych zawierające substrat (Ub-ACC) w stałym stężeniu. Następnie do mieszaniny inhibitor-substrat dodano enzym i mierzono przyrost fluorescencji przez 30 min. Parametr  $k_{obs}/I$  wyznaczono w programie GraphPad Prism. Dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> i dwóch markerów chemicznych: referencyjnego biot-6-ahx-Ub-VME oraz biot-6-ahx-Ub.M2-VME parametr ten wynosił kolejno  $k_{obs}/I = 7660 \pm 475 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  oraz  $k_{obs}/I = 22144 \pm 1431 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Wartości te pokazują, że marker z nienaturalnymi aminokwasami jest prawie trzykrotnie silniejszym inhibitorem od pochodnej naturalnego wariantu Ub. Dla UCH-L3 i trzech inhibitorów: markera referencyjnego, biot-6-ahx-Ub.S1-VME oraz biot-6-ahx-Ub.S2-VME nie wyznaczono  $k_{obs}/I$  ze względu na zbyt szybką hydrolizę substratu, która uniemożliwiła przeprowadzenie pomiarów wymaganych do obliczenia tego parametru.

#### **3.6.4. Określenie selektywności markerów chemicznych**

W następnym etapie badań scharakteryzowano selektywność markerów chemicznych względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 zgodnie z procedurą przedstawioną na Rysunku 35. Eksperymenty z użyciem lizatów komórkowych wykonano we współpracy z dr inż.

Wioletta Rut. Ze względu na niską specyficzność tkankową ekspresji UCH-L3 [214], do zmierzenia aktywności UCH-L3 i MERS-CoV PL<sup>pro</sup> wybrano trzy linie komórkowe, które posłużyły do przygotowania lizatów komórkowych: HeLa (ludzkie komórki raka szyjki macicy), A-431 (ludzkie komórki raka kolczystokomórkowego skóry) oraz HEK-293T (ludzkie embrionalne komórki nerki). Użyto trzech różnych linii komórkowych, gdyż komórki pochodzące z różnych tkanek charakteryzują się innym profilem ekspresji DUBs [214]. Ze względu na brak ekspresji MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w ludzkich tkankach, enzym ten był dodany do lizatu przed inkubacją z badanym markerem chemicznym. Markery chemiczne w różnych stężeniach inkubowano z lizatami przez 30 min w 37°C. Następnie do próbek dodano bufor do elektroforezy żelowej białek i białka poddano denaturacji w 95°C przez 5 min. Po tym czasie wykonano rozdział białek metodą SDS-PAGE i przeprowadzono transfer białek z żelu na membranę, którą inkubowano ze streptawidyną znakowaną barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor 647.

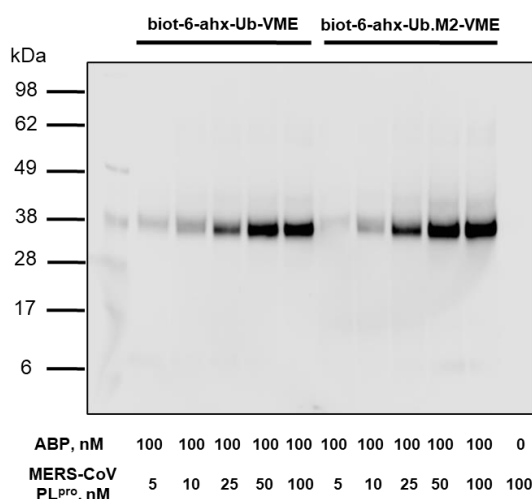


Rysunek 35. Schemat znakowania aktywnych DUBs zawartych w lizatach komórkowych za pomocą zsyntezowanych markerów chemicznych.

### 3.6.4.1. Detekcja MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w lizatach komórkowych

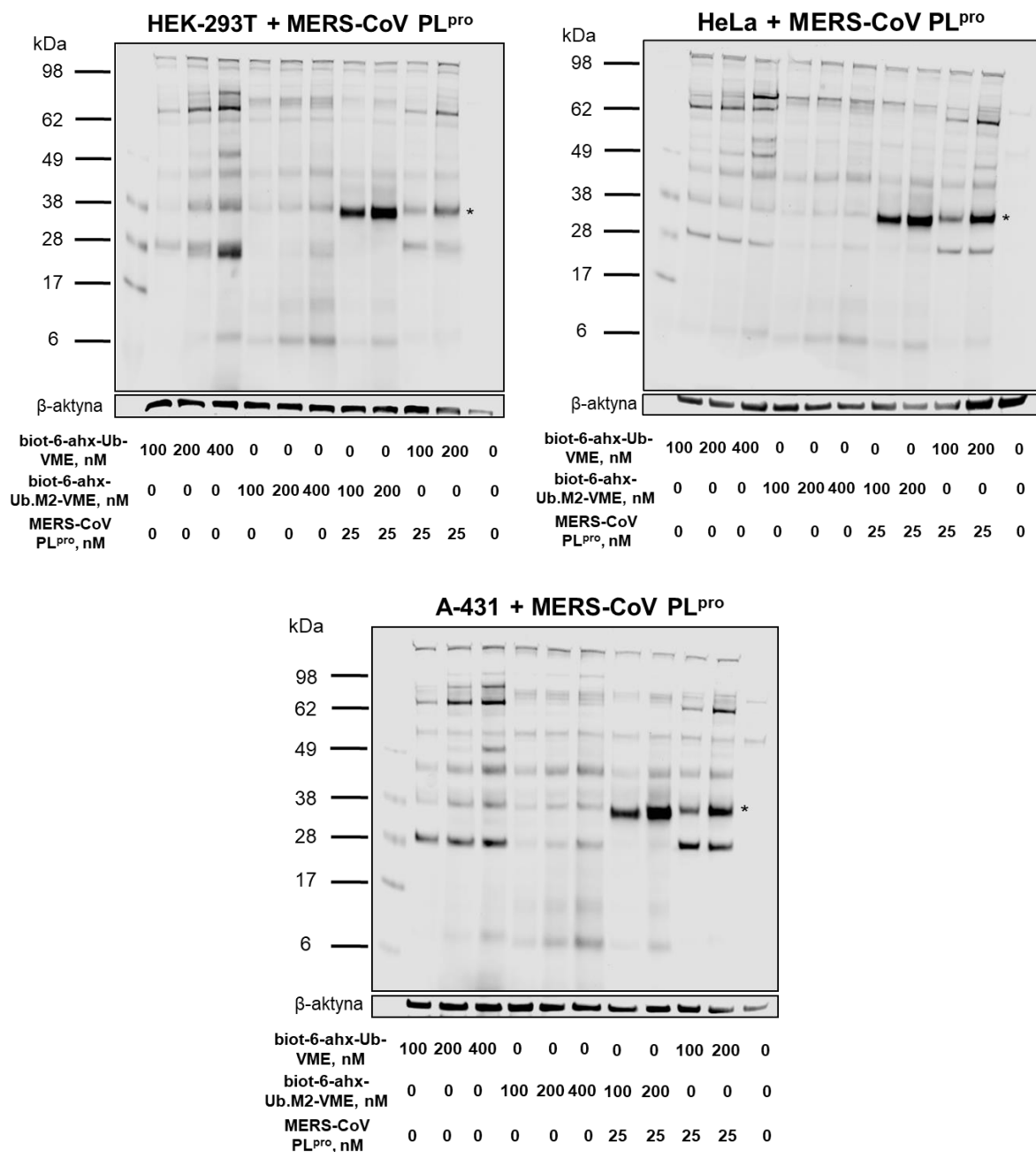
Enzym MERS-CoV PL<sup>pro</sup> nie jest ekspresjonowany w ludzkich komórkach. W celu zbadania selektywności markera chemicznego względem tej proteazy w mieszaninie zawierającej również inne hydrolazy przygotowano próbki lizatów komórkowych, do których dodano rekombinowanego enzymu PL<sup>pro</sup>. W literaturze brakuje informacji na temat

stężeń tego enzymu osiągniętych w zakażonych komórkach. W celu określenia ilości enzymu, jaka powinna zostać dodana do lizatów w celu jego optymalnej detekcji, porównano skuteczność znakowania rekombinowanego enzymu za pomocą dwóch markerów: uniwersalnego biot-6-ahx-Ub-VME oraz biot-6-ahx-Ub.M2-VME stosując różne stężenia enzymów i stężenie markerów wynoszące 100 nM. Wyniki eksperymentu przedstawiono na Rysunku 36.



*Rysunek 36.* Badanie wpływu stężenia MERS-CoV PL<sup>pro</sup> na intensywność fluorescencji w wyniku wyznakowania go markerem chemicznym. Użyto dwóch ABPs: referencyjnego biot-6-ahx-Ub-VME oraz biot-6-ahx-Ub.M2-VME. Stężenie markerów chemicznych było stałe i wynosiło 100 nM, natomiast stężenie enzymu wynosiło od 5 do 100 nM.

Eksperyment wykazał, że znakowanie MERS-CoV PL<sup>pro</sup> markerami chemicznymi w stężeniu 100 nM jest optymalne w stężeniu enzymu wynoszącym 25 nM. Po znalezieniu warunków do wizualizacji proteazy, przygotowano próbki do SDS-PAGE. Do lizatów z trzech linii komórkowych dodano MERS-CoV PL<sup>pro</sup> i markery chemiczne w różnych stężeniach, próbki inkubowano w 37°C przez 30 min. W celu przerwania reakcji i zdenaturowania białek dodano bufor z SDS, glicerolem oraz DTT i inkubowano próbki przez 5 min w 95°C. Przeprowadzono eksperyment western blot, a membranę na którą przeniesiono białka inkubowano z koniugatem streptawidyny z Alexa Fluor 647. Wyznakowane białka na membranie wizualizowano z użyciem czytnika fluorescencji. Wyniki przedstawiono na Rysunku 37.



Rysunek 37. Detekcja MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w lizatach komórkowych z komórek HEK-293T, HeLa oraz A-431 przy użyciu dwóch markerów chemicznych: referencyjnego biot-6-ahx-Ub-VME oraz biot-6-ahx-Ub.M2-VME. Ze względu na brak ekspresji enzymu w komórkach został on dodany do lizatów przed inkubacją z markerami chemicznymi ([E] = 25 nM). Gwiazdką (\*) oznaczono prążki pochodzące od proteazy MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Prążek na wysokości około 8 kDa to niezwiązany marker chemiczny. Do kontroli ilości nałożonych białek użyto β-aktyny. W ostatnim dołku nałożono sam lizat komórkowy, w celu wizualizacji naturalnie biotynylowanych białek.

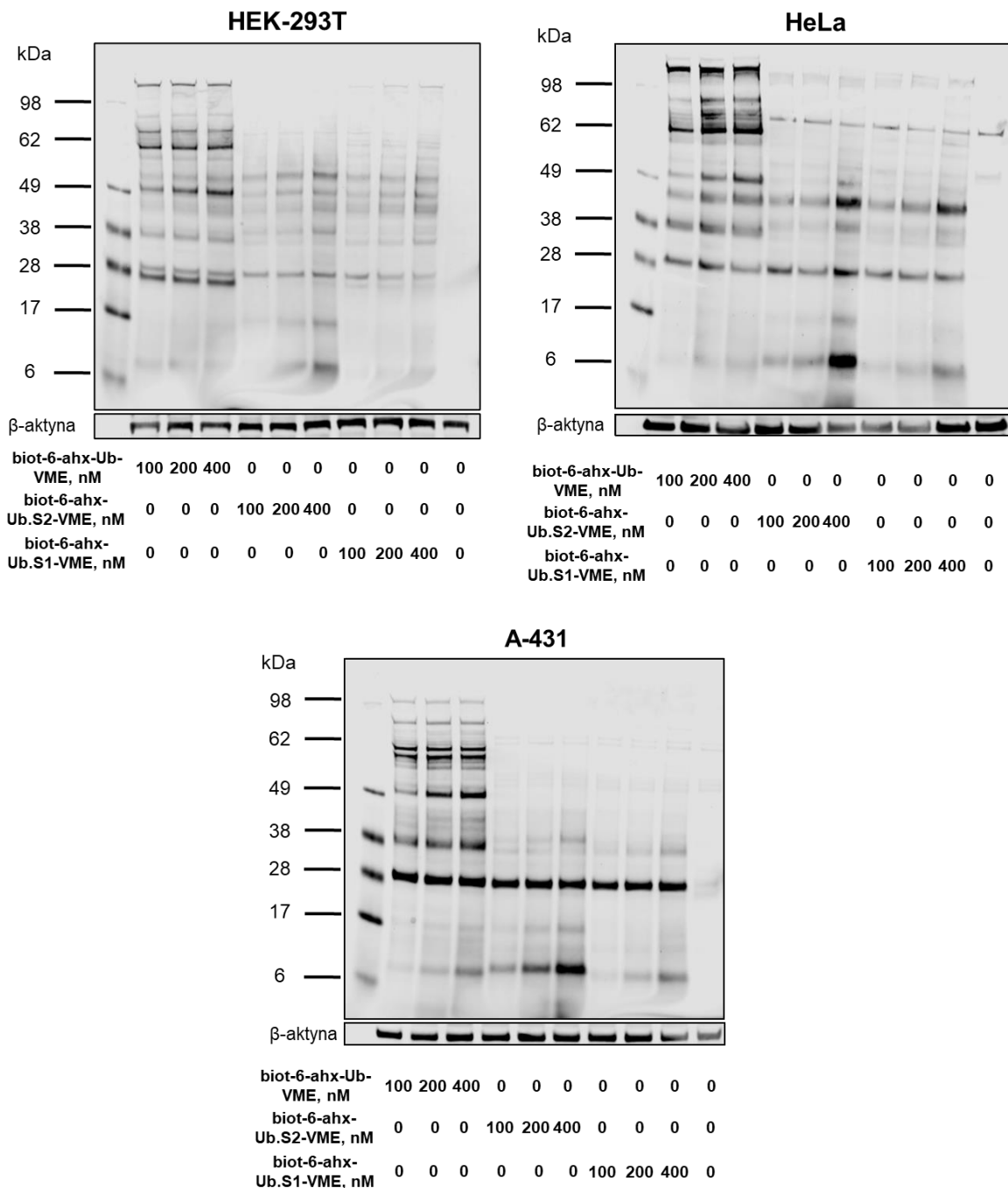
W badaniu selektywności markera chemicznego dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> użyto dwóch pochodnych ubikwityny: biot-6-ahx-Ub.M2-VME oraz biot-6-ahx-Ub-VME (marker referencyjny). Marker referencyjny zawierał sekwencję LRGG na C-końcu zsyntezowanego



wariantu Ub, co powinno skutkować związaniem go przez wszystkie aktywne, obecne w lizacie DUBs. Marker dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> za sprawą C-końcowej sekwencji peptydowej Tle-Phg-Gly-Gly powinien wykazywać selektywność względem wirusowej proteazy PL<sup>pro</sup>. Użyto trzech stężeń obu związków: 100, 200 oraz 400 nM. Ze względu na użycie koniugatu streptawidyny z barwnikiem fluorescencyjnym, w celu wizualizacji biotynylowanych markerów chemicznych, do jednego z dołków na żelu dodano sam lizat komórkowy, aby wykryć naturalnie biotynylowane białka obecne w komórkach. We wszystkich badanych lizatach marker referencyjny wyznakował aktywne DUBs, które są widoczne jako ciemne prążki na membranach. W próbkach zawierających MERS-CoV PL<sup>pro</sup> marker chemiczny biot-6-ahx-Ub.M2-VME efektywnie wyznakował wirusową proteazę w każdym z lizatów już w stężeniu 100 nM. W próbkach zawierających biot-6-ahx-Ub.M2-VME widoczne były prążki pochodzące od innych DUBs obecnych w lizatach komórkowych, jednak były one nieliczne i mało intensywne w porównaniu do wzorów prążkowania uzyskanych za pomocą markera referencyjnego. Marker chemiczny biot-6-ahx-Ub.M2-VME umożliwił czulszą detekcję MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w porównaniu do markera referencyjnego. Dla tych samych stężeń obu markerów chemicznych prążki od wirusowej proteazy były wyraźnie intensywniejsze w przypadku wyznakowania enzymu za pomocą biot-6-ahx-Ub.M2-VME. Użycie pochodnej Ub biot-6-ahx-Ub.M2-VME umożliwia czułą i selektywną detekcję MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w lizatach komórkowych.

#### **3.6.4.2. Detekcja UCH-L3 w lizatach komórkowych**

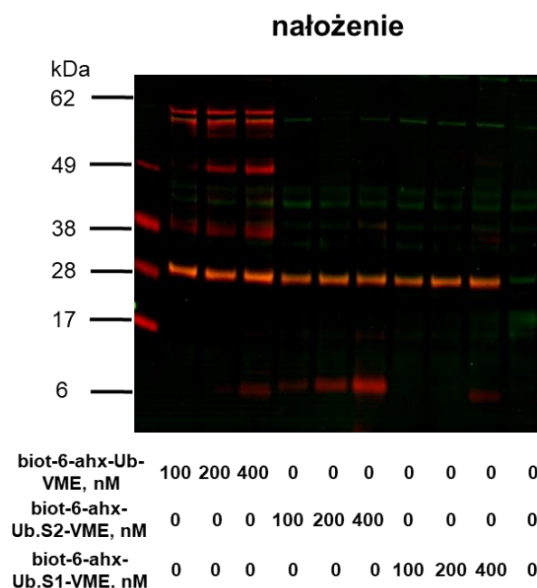
Na podstawie wyników otrzymanych dla substratów, pochodnych Ub, zsyntezowano markery chemiczne biot-6-ahx-Ub.S1-VME oraz biot-6-ahx-Ub.S2-VME, a ich selektywność względem UCH-L3 zbadano na lizatach komórkowych. Następnie porównano otrzymane wzory prążków pochodzących od białek wiążących markery dla UCH-L3 z prążkami otrzymanymi dla białek związanych z markerem referencyjnym, znakującym wszystkie aktywne DUBs w próbkach. Próbki przygotowywano analogicznie do badania markera chemicznego biot-6-ahx-Ub.M2-VME. Wyniki przedstawiono na Rysunku 38.



Rysunek 38. Detekcja UCH-L3 w lizatach komórkowych z komórek HEK-293T, HeLa oraz A-431 przy użyciu trzech markerów chemicznych: referencyjnego biot-6-ahx-Ub-VME oraz markerów chemicznych zaprojektowanych do selektywnej detekcji UCH-L3 biot-6-ahx-Ub.S1-VME i biot-6-ahx-Ub.S2-VME. Prążek na wysokości około 8 kDa to niezwiązany marker chemiczny. Do kontroli ilości nałożonego białka użyto  $\beta$ -aktyny. Ostatni dołek zawierał sam lizat komórkowy, w celu wizualizacji naturalnie biotynylowanych białek.

Białka wyznakowane przez zsyntezowane biotynylowane markery chemiczne zwizualizowano na membranie techniką western blot z wykorzystaniem streptawidyny skoniugowanej z Alexa Fluor 647. Badanie to wykazało, że w każdym z badanych lizatów znajdował się enzym o masie około 28 kDa, który wiązał się ze wszystkimi użytymi





Rysunek 39. Wizualizacja DUBs w lizacie komórkowym A-431 za pomocą koniugatu streptawidyny z Alexa Fluor 647 (czerwony kanał) oraz pierwszorzędowego mysiego przeciwciała anti-UCH-L3 i drugorzędowego przeciwciała anti-mysiego, skoniugowanego z Alexa Fluor 488 (kanał zielony).

Prążek od białka na wysokości 28 kDa był widoczny zarówno podczas wizualizacji w 647 nm (wizualizacja biotynylowanych markerów chemicznych wyznakowanych streptawidyny z Alexa Fluor 647) jak i 488 nm (wizualizacja przeciwciała drugorzędowego z Alexa Fluor 488, wiążącego przeciwciała pierwszorzędowe anti-UCH-L3). Po nałożeniu na siebie obrazów z obu kanałów, prążki na wysokości 28 kDa pokrywały się. Immunoblotting potwierdził, że wyznakowane białko to UCH-L3, a markery chemiczne biot-6-ahx-Ub.S1-VME oraz biot-6-ahx-Ub.S2-VME selektywnie się z nim wiążą.

### 3.7. Dyskusja wyników – nienaturalne pochodne Ub jako selektywne markery chemiczne do detekcji DUBs

Celem ostatniej części badań opisanych w niniejszej dysertacji było zaprojektowanie i synteza selektywnych markerów chemicznych o strukturach opartych na cząsteczce ubikwityny, które za sprawą mutacji w obrębie C-końcowej sekwencji Ub, selektywnie znakują MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. Do tej pory jedynie Hewitt, Das i Flaherty zaprezentowali strategię syntezy selektywnego markera chemicznego do znakowania UCH-L3 [186]. Ich metoda polegała na analizie komputerowej struktur trzeciorzędowych UCH-L3 i blisko spokrewnionego z nim UCH-L1, a następnie zaprojektowaniu *in silico* wariantu Ub, który faworyzowałby wiązanie się jedynie do UCH-L3. Marker chemiczny HA-UbV<sup>Q40V/T66K/V70F</sup>-PA umożliwił selektywne znakowanie UCH-L3 w lizatach komórek

MDA-MB-231, a także miał wyższe powinowactwo wobec badanego enzymu w porównaniu do markera opartego na natywnej sekwencji Ub.

W celu otrzymania selektywnych markerów chemicznych pochodnych Ub do badania UCH-L3 oraz MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, wykorzystano strategię ligacja-desulfuryzacja z użyciem peptydowych hydrazydów jako zamaskowanych tioestrów. Metoda ta z powodzeniem została użyta w syntezie selektywnych substratów pochodnych Ub z ACC. Zaprojektowane markery chemiczne posiadały biotynę jako grupę reporterową na N-końcu cząsteczki oraz C-końcowe elektrofilowe ugrupowanie VME, które wiąże się kowalencyjnie do nukleofilowej reszty Cys w miejscu aktywnym DUBs. Podobnie jak w selektywnych substratach dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 rolę linkera pełniły warianty Ub różniące się od siebie sekwencją na C-końcu łańcucha polipeptydowego. Sekwencje te wyselekcjonowane zostały na podstawie wyników otrzymanych w badaniach z użyciem bibliotek tetrapeptydowych substratów. Zsyntezowano cztery markery chemiczne:

1. biot-6-ahx-Ub-VME – marker referencyjny, biotynylowana pochodna cząsteczki Ub typu dzikiego z C-kończącą grupą VME ;
2. biot-6-ahx-Ub.M2-VME – marker chemiczny dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> z C-kończącą sekwencją peptydową -Tle-Phg-Gly-Gly-VME;
3. biot-6-ahx-Ub.S1-VME – marker chemiczny dla UCH-L3 z C-kończącą sekwencją peptydową -Cha-Arg-Abu-Gly-VME;
4. biot-6-ahx-Ub.S2-VME – marker chemiczny dla UCH-L3 z C-kończącą sekwencją peptydową -D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-VME.

Zsyntezowane markery chemiczne wiążą się nieodwracalnie do miejsca aktywnego DUBs za sprawą obecnego na C-końcu ugrupowania VME. W kolejnym etapie zbadano zdolność inhibicji rekombinowanych DUBs przez otrzymane markery chemiczne. W tym celu inkubowano MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 przez 30 min z badanymi pochodnymi Ub w różnych stężeniach i określono resztkową aktywność hydrolityczną enzymów względem Ub-ACC. Badanie to wykazało, że biot-6-ahx-Ub.M2-VME jest najskuteczniejszym inhibitorem MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Nienaturalny marker chemiczny całkowicie hamuje aktywność enzymu w stężeniu niższym, niż marker chemiczny oparty na naturalnym wariantie Ub. Słabą inhibicję względem wirusowej proteazy wykazał jeden z markerów dla UCH-L3, biot-6-ahx-Ub.S1-VME, natomiast biot-6-ahx-Ub.S2-VME nie hamował aktywności enzymu nawet w najwyższym stężeniu tego inhibitora. Może być to spowodowane tym, że biot-6-ahx-Ub.S2-VME zawiera w pozycji P4 resztę D-Arg, a więc zasadowy aminokwas o konfiguracji D. Analiza specyficzności substratowej MERS-

CoV PL<sup>pro</sup> pokazała, że enzym ten toleruje w kieszeni S4 jedynie hydrofobowe aminokwasy oraz przede wszystkim izomery o konfiguracji L. Wyznaczone parametry  $k_{obs}/I$  wykazały, że biot-6-ahx-Ub.M2-VME jest trzykrotnie skuteczniejszym inhibitorem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> od biot-6-ahx-Ub-VME. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami otrzymanymi dla substratów – użycie nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końca cząsteczki Ub prowadzi do wzrostu specyficzności i selektywności pochodnych Ub względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup>.

W badaniu resztkowych aktywności enzymów najlepszym inhibitorem UCH-L3 był marker referencyjny, który hamował aktywność proteazy w ponad 90% już w stężeniu 375 nM. Drugim najlepszym inhibitorem był związek biot-6-ahx-Ub.S2-VME, który oprócz silnej inhibicji UCH-L3 nie wiązał się do MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Marker biot-6-ahx-Ub.S1-VME wykazywał podobne właściwości inhibicyjne UCH-L3 do biot-6-ahx-Ub.M2-VME. Wynik ten był nieoczekiwany w związku z wynikami otrzymanymi dla substratów. Rozbieżności w preferencjach UCH-L3 wobec substratów i markerów chemicznych opartych o te same nienaturalne warianty Ub ukazują złożoność zjawisk stojących za regulacją aktywności tego enzymu. Jednym z możliwych wytłumaczeń dla tej obserwacji jest obecność stosunkowo dużej reszty ACC w pozycji P1' substratów, podczas gdy pozycja P1' markerów chemicznych zajmowana jest przez względnie niewielką grupę VME. Różnice we właściwościach tych ugrupowań mogą mieć wpływ na oddziaływania C-końcowego motywu Ub z miejscem aktywnym i modulować reaktywność enzymu wobec tych pochodnych Ub jednak wymaga to potwierdzenia w dalszych badaniach.

Do zbadania selektywności zsyntezowanych związków wybrano trzy linie komórkowe (HEK-293T, HeLa oraz A-431) różniące się profilem ekspresjonowanych DUBs. Lizaty inkubowano z markerami chemicznymi, a następnie przeprowadzono eksperyment western blot i za pomocą fluorescencyjnego koniugatu streptawidyny wizualizowano enzymy związane z biotynyłowanymi markerami chemicznymi. Otrzymane wyniki potwierdziły, że zastosowanie nienaturalnych aminokwasów w obrębie C-końcowego fragmentu sekwencji peptydowej ubikwityny prowadzi do otrzymania selektywnych względem wybranych DUBs pochodnych Ub. We wszystkich próbkach lizatów wyznakowanych markerem referencyjnym widocznych było wiele prążków pochodzących od aktywnych enzymów deubikwytynujących związanych z tym markerem. Zastosowanie markerów chemicznych zaprojektowanych dla UCH-L3 lub MERS-CoV PL<sup>pro</sup> skutkowało mniejszą liczbą wyznakowanych DUBs. Najlepszy rezultat zaobserwowano dla biot-6-ahx-Ub.S1-VME oraz biot-6-ahx-Ub.S2-VME, które w stężeniu 100 nM w lizacie z komórek A-431 wyznakowały wyłącznie UCH-L3, co potwierdzono w eksperymencie immunoblottingu.

W przypadku lizatów HEK-293T oraz HeLa intensywność prążka na wysokości 28 kDa była mniejsza niż dla lizatów A-431. Prążki miały taką samą intensywność niezależnie od użytych stężeń markerów chemicznych, co wskazuje na niższą ekspresję UCH-L3 w tych liniach. Wynik ten zgodny jest z poziomami mRNA dla UCH-L3 w wybranych liniach komórkowych [214].

Wyniki badań z wykorzystaniem markera chemicznego biot-6-ahx-Ub.M2-VME oraz rekombinowanego enzymu MERS-CoV PL<sup>pro</sup> pokazują, że wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów do C-końcowego fragmentu sekwencji Ub umożliwia selektywną detekcję wirusowej proteazy spośród DUBs zawartych w lizatach komórkowych. Inkubacja lizatów z markerem biot-6-ahx-Ub.M2-VME w stężeniu 100 nM skutkowała wyznakowaniem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> w stężeniu 25 nM, a otrzymany prążek był intensywny. Prążki pochodzące od innych DUBs były mniej liczne i mniej wyraźne w porównaniu do prążków pochodzących od próbek inkubowanych z markerem referencyjnym, w szczególności dla próbek przygotowanych ze 100 nM stężeniem markerów chemicznych. Brak pełnej selektywności biot-6-ahx-Ub.M2-VME mógł być spowodowany obecnością reszty Gly w pozycji P2. Warianty Ub dla UCH-L3 posiadały w tej pozycji reszty Ala lub Abu, podczas gdy wiele DUBs toleruje w tej pozycji jedynie Gly. Mogło mieć to kluczowe znaczenie dla wysokiej selektywności markerów dla UCH-L3. Specyficzność kieszeni wiążących S3 oraz S4 DUBs jest z reguły szersza [24], a więc warianty Ub zawierające modyfikacje jedynie w tych pozycjach są bardziej narażone na związanie przez pozostałe enzymy deubikwitynujące zawarte w próbce.

Uzyskanie w pełni selektywnych pochodnych Ub wymagałoby projektowania selektywnych sekwencji w oparciu o znajomość profilów specyficzności wszystkich ludzkich enzymów deubikwitynujących. W niniejszej rozprawie wykazano, że wiedza na temat specyficzności substratowej tylko dwóch spośród DUBs umożliwia zaprojektowanie wysoce selektywnych oraz specyficznych narzędzi chemicznych. Selektywność i specyficzność wariantów Ub ze zmodyfikowanymi C-końcowymi fragmentami sekwencji peptydowych łańcucha ubikwityny potwierdzono w eksperymentach z użyciem rekombinowanych enzymów jak i lizatów komórkowych.

#### 4. Podsumowanie i wnioski końcowe

Enzymy deubikwitynujące stanowią liczną grupę proteaz, które regulują w komórkach ścieżki sygnałowe zależne od ubikwityny. W wyniku ich aktywności hydrolizowane są wiązania amidowe pomiędzy C-końcową grupą karboksylową Ub oraz grupami aminowymi, najczęściej należącymi do łańcuchów bocznych reszt lizyny innych białek. Określenie biologicznej roli DUBs w organizmach żywych jest utrudnione ze względu na brak selektywnych narzędzi chemicznych do monitorowania aktywności tych enzymów. Nakładające się specyficzności substratowe oraz wymóg związania do swojej powierzchni cząsteczki (lub kilku cząsteczek) Ub do osiągnięcia pełnej aktywności katalitycznej, stanowią istotne przeszkody w projektowaniu nowych biologicznie aktywnych cząsteczek oddziałujących z DUBs. Ze względu na struktury oparte na cząsteczce ubikwityny, która jest fizjologicznym substratem dla DUBs, większość dostępnych komercyjnie substratów, inhibitorów oraz markerów chemicznych nie jest selektywna i jest reaktywna względem wielu enzymów deubikwitynujących [25].

Rozwój chemicznych i półsyntetycznych metod syntezy białek w ostatnich latach umożliwił projektowanie i otrzymywanie różnych pochodnych Ub. Połączenie tych metod z analizą strukturalną DUBs *in silico* oraz techniką prezentacji fagowej dały początek racjonalnemu projektowaniu i syntezie wariantów Ub, selektywnie rozpoznawanych przez wybrane enzymy z tej grupy. DUBs rozpoznają swoje substraty oddziałując z nimi w dwóch rejonach: w miejscu aktywnym, gdzie wiążą C-końcowy ogon ubikwityny o sekwencji LRGG, oraz w obrębie domen wiążących ubikwitynę, które oddziałują z powierzchnią Ub [24]. Badacze z zespołu Ova'a wykorzystując analizę bioinformatyczną zaprojektowali markery chemiczne dla USP7 [184] oraz USP16 [188] poprzez wprowadzenie mutacji do cząsteczek ubikwityny. Mutacje zwiększały powinowactwo wariantów Ub względem enzymów przy jednoczesnym zaburzeniu oddziaływań białko-białko z innymi DUBs. Podobną strategię wykorzystali Hewitt i in. do opracowania markera chemicznego selektywnie znakującego UCH-L3 w lizatach komórkowych [186]. Oprócz metod *in silico*, selektywne warianty ubikwityny otrzymywane były również dzięki technologii prezentacji fagowej [183]. W metodzie tej fagi prezentują na swojej powierzchni warianty Ub ze zrandomizowanymi resztami aminokwasowymi w obszarach kluczowych dla interakcji białko-białko. Dzięki temu możliwe jest wyselekcjonowanie mutantów Ub, które wykazują wysokie powinowactwo wobec badanego enzymu. Technika ta umożliwiła syntezę wariantów Ub, które za sprawą wysokiego powinowactwa względem DUBs pełniły funkcję



inhibitorów kompetycyjnych dla USP8, USP2a, USP21, OTUB1 [183], STAMBP, STAMBPL1 [58], MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz OTU z wirusa krymsko-kongijskiej gorączki krwotocznej [187]. Do tej pory przede wszystkim dwie metody: *in silico* oraz wykorzystująca prezentację fagową, umożliwiały projektowanie opartych na ubikwitynie narzędzi chemicznych do badania DUBs. W niniejszej dysertacji przedstawiono nową strategię uzyskiwania selektywnych i specyficznych narzędzi chemicznych dla tej grupy enzymów.

W badaniu Drąga i in. pokazano, że specyficzność substratowa niektórych DUBs w pozycjach P4-P1 wykracza poza kanoniczny motyw LRGG obecny na C-końcu cząsteczki ubikwityny. W przeprowadzonym przez naukowców badaniu specyficzności substratowej metodą PS-SCL, ludzki enzym UCH-L3 jako jedyny wykazywał specyficzność substratową wobec tetrapeptydów zawierających w pozycji P2 resztę waliny. W następnym kroku mutanta ubikwityny Ub<sup>G75V</sup> poddano hydrolizie przez badane DUBs. Wprowadzenie mutacji skutkowało hydrolizą tego wariantu jedynie przez UCH-L3 [24]. W badaniu Békésá i in. pokazano, że spośród badanych DUBs, proteaza PL<sup>pro</sup> z wirusa MERS-CoV jako jedyna wykazuje niewielką tolerancję wobec tetrapeptydów zawierających w pozycji P4 resztę Pro. Podobnie jak w badaniu Drąga i in. zdolność do hydrolizy tetrapeptydu z sekwencją różniącą się od kanonicznej LRGG skutkowało zdolnością do hydrolizy wariantu Ub – mutanta Ub<sup>L73P</sup> [121]. Na podstawie tych obserwacji postawiono hipotezę, że zbadanie specyficzności substratowej DUB z użyciem bibliotek tetrapeptydowych substratów umożliwia zaprojektowanie wariantów Ub, które za sprawą substytucji w obrębie C-końcowego ogona LRGG będą selektywnie rozpoznawane przez ten enzym. Ponadto, użycie dużej puli nienaturalnych aminokwasów pozwala zaprojektować warianty nie tylko selektywne, ale i bardziej specyficzne wobec badanej proteazy.

Do sprawdzenia tej hipotezy wybrano ludzki enzym UCH-L3 oraz wirusowy MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Badania rozpoczęto od syntezy na podłożu stałym zdefiniowanej biblioteki tetrapeptydowych substratów o ogólnej strukturze Ac-Leu-Arg-X-Gly-ACC, gdzie „X” oznacza jeden ze 128 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów. Do określenia specyficzności substratowych enzymów w pozycjach P4-P2 wraz z biblioteką substratów P2 użyto również biblioteki kombinatorycznej HyCoSuL złożonej z podbibliotek P3 oraz P4. Ogólna struktura substratów w podbibliotekach to Ac-Mix-X-Gly-Gly-ACC dla podbiblioteki P3 oraz Ac-X-Mix-Gly-Gly-ACC dla podbiblioteki P4 („X” oznacza jeden ze 137 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów, a „Mix” to równomolowa mieszanina 19 aminokwasów). Otrzymane profile specyficzności pokazały, że w pozycji P2 MERS-

CoV PL<sup>pro</sup> toleruje jedynie glicynę, natomiast UCH-L3 wykazuje nietypową dla DUBs tolerancję wobec aminokwasów zawierających niewielki alifatyczny łańcuch boczny. W pozycji P3 MERS-CoV PL<sup>pro</sup> najlepiej rozpoznawał aminokwasy z aromatycznymi łańcuchami bocznymi, a reszty zasadowe były rozpoznawane słabiej. UCH-L3 w tej pozycji wykazywał z kolei specyficzną przede wszystkim wobec aminokwasów zasadowych. Oba enzymy wykazywały najwyższą aktywność względem substratów z hydrofobowymi aminokwasami w P4. Ponadto, UCH-L3 tolerował w tej pozycji wybrane zasadowe aminokwasy o konfiguracji zarówno L jak i D.

Na podstawie otrzymanych wyników zaprojektowano serię fluorogenicznych substratów tetrapeptydowych, a następnie określono aktywność rekombinowanych enzymów względem nich. Do dalszych badań wybrano cztery substraty: referencyjny substrat Ac-LRGG-ACC o sekwencji pochodzącej z C-końcowego motywu Ub oraz trzy substraty, które były rozpoznawane lepiej niż substrat referencyjny. Substrat dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> miał sekwencję Ac-Tle-Phg-Gly-Gly-ACC (M2), a substraty dla UCH-L3 Ac-Cha-Arg-Abu-Gly-ACC (S1) oraz Ac-D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-ACC (S2). W kolejnym etapie badań sprawdzono selektywność substratów wobec badanych DUBs. Wyniki eksperymentu pokazały selektywność substratów względem enzymów dla których były projektowane. Następnie wyznaczono stałe specyficzności dla tetrapeptydowych substratów. Otrzymane wyniki pokazały, że użycie nienaturalnych reszt aminokwasowych prowadzi do wzrostu selektywności oraz specyficzności tetrapeptydowych substratów względem DUBs.

Zbadanie specyficzności substratowych MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 w pozycjach P4-P2 pozwoliło na znalezienie specyficznych i selektywnych sekwencji aminokwasowych, które zostały użyte do zaprojektowania pochodnych Ub. Zaprojektowano cztery substraty, których struktury były oparte na cząsteczce ubikwityny, zawierającej modyfikacje w obrębie C-końca cząsteczki:

1. Ub-ACC – substrat referencyjny, fluorogeniczna pochodna Ub typu dzikiego z C-końcowym motywem -Leu-Arg-Gly-Gly-ACC,
2. Ub.M2-ACC – substrat dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> z C-końcowym motywem -Tle-Phg-Gly-Gly-ACC,
3. Ub.S1-ACC – substrat dla UCH-L3 z C-końcowym motywem -Cha-Arg-Abu-Gly-ACC,
4. Ub.S2-ACC – substrat dla UCH-L3 z C-końcowym motywem -D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-ACC.

Fluorogeniczne pochodne Ub otrzymano stosując strategię ligacja-desulfuryzacja z wykorzystaniem peptydowych C-końcowych hydrazydów jako zamaskowanych tioestrów. Łańcuch polipeptydowy ubikwityny podzielono na trzy peptydowe segmenty hydrazydowe:

- 1) liczący 27 reszt aminokwasowych segment N-końcowy;
- 2) segment środkowy o długości 18 reszt aminokwasowych;
- 3) segment C-końcowy, złożony z 30 reszt aminokwasowych, którego C-koniec zawierał, zależnie od wariantu, sekwencję pochodzącą od jednego z czterech substratów tetrapeptydowych, specyficznych wobec UCH-L3 lub MERS-CoV PL<sup>pro</sup>.

Segmenty zsyntezowano na podłożu stałym na żywicy 2-CTC sfunkcjonalizowanej Fmoc-NH-NH<sub>2</sub>. Długość poszczególnych segmentów podyktowana była lokalizacją reszt Ala w obrębie łańcucha Ub. Białko to zawiera w swojej strukturze dwie reszty Ala (Ala28 oraz Ala46), które ze względu na mechanizm reakcji NCL zostały zastąpione przez Cys. Reszty Cys zlokalizowane były na N-końcu środkowego oraz C-końcowego segmentu peptydowego. Dzięki temu możliwa była reakcja kondensacji NCL pomiędzy C-końcowymi tioestrami oraz N-końcowymi tiolami. Reakcję NCL przeprowadzono między N-końcowym i środkowym peptydem (segmentami zawierającymi reszty 1-27 oraz 28-45). W ten sposób otrzymano 45-peptydowy hydrazyd, który poddano kolejnej reakcji NCL z C-końcowymi segmentami zawierającymi reszty 46-75. Produkty, czyli hydrazydy złożone z 75 reszt aminokwasowych, poddano reakcji rodnikowej desulfuryzacji w celu konwersji reszt Cys do Ala. W ostatnim etapie do C-końcowego ugrupowania hydrazydowego przyłączono H<sub>2</sub>N-Gly-ACC, w wyniku czego otrzymano produkty końcowe, fluorogeniczne substraty będące pochodnymi Ub z fluoroforem na C-końcu. Korzystając z opisanej strategii zsyntezowano cztery substraty – pochodne Ub zawierające nienaturalne aminokwasy oraz C-końcową grupą fluorogeniczną ACC.

Kolejny etap badań obejmował określenie selektywności oraz specyficzności uzyskanych substratów. Uzyskane wyniki wykazały, że pochodne Ub, które na C-końcach zawierały sekwencje wywodzące się z selektywnie rozpoznawanych substratów tetrapeptydowych, również były selektywne względem badanych DUBs. Ponadto, stałe specyficzności  $k_{\text{kat}}/K_M$  oraz stałe szybkości  $k_{\text{kat}}$  dla nienaturalnych pochodnych Ub były wyższe niż dla referencyjnego substratu Ub-ACC.

W następnym etapie badań zsyntezowano markery chemiczne do selektywnej detekcji wybranych DUBs w lizatach komórkowych. Zaprojektowane markery miały struktury oparte na cząsteczkach Ub ze zmodyfikowanymi C-końcowymi fragmentami sekwencji peptydowych. Użyto biotyny jako grupy reporterowej, zlokalizowanej na N-końcu

pochodnych Ub. Jako C-końcowego elektrofila wiążącego się do miejsca aktywnego DUBs użyto estru winylowo-metylowego, który jest reaktywny wobec enzymów z tej grupy. Syntezę markerów chemicznych przeprowadzono podobnie jak syntezę substratów z drobnymi modyfikacjami. N-końcowy segment został zmodyfikowany poprzez dodanie na jego N-końcu kwasu 6-aminoheksanowego, oddzielającego biotynę od reszty cząsteczki Ub. W ostatnim etapie do C-końca przyłączono H<sub>2</sub>N-Gly-VME. Otrzymano w ten sposób cztery markery chemiczne: biot-6-ahx-Ub-VME (marker referencyjny), biot-6-ahx-Ub.M2-VME (marker chemiczny do badania MERS-CoV PL<sup>pro</sup>), biot-6-ahx-Ub.S1-VME oraz biot-6-ahx-Ub.S2-VME (markery chemiczne do badania UCH-L3).

Następnie scharakteryzowano otrzymane markery chemiczne pod kątem inhibicji UCH-L3 oraz MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Ze względu na obecność C-końcowego elektrofilowego ugrupowania VME zsyntezowane markery chemiczne kowalencyjnie wiążą się do miejsca aktywnego DUBs, co skutkuje utratą aktywności tych enzymów. Pomiar inhibicji MERS-CoV PL<sup>pro</sup> przez badane markery pokazał, że biot-6-ahx-Ub.M2-VME był silniejszym inhibitorem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> niż marker referencyjny i powodował praktycznie całkowitą dezaktywację proteazy w stężeniu 750 nM. Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone pomiarem parametru kinetycznego  $k_{obs}/I$  dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, który wyznaczono dla biot-6-ahx-Ub.M2-VME oraz biot-6-ahx-Ub-VME. Dla pochodnej nienaturalnego wariantu Ub wartość tego parametru była trzykrotnie wyższa niż dla pochodnej Ub o natywnej sekwencji. Marker chemiczny dla UCH-L3, biot-6-ahx-Ub.S2-VME, był selektywny względem badanego DUB. Drugi marker chemiczny dla UCH-L3, biot-6-ahx-Ub.S1-VME, wiązał się z wirusowym enzymem, jednak jego działanie było słabsze w porównaniu z markerem referencyjnym i biot-6-ahx-Ub.S2-VME. Nawet w najwyższym stężeniu (3 μM) nie hamował on całkowicie MERS-CoV PL<sup>pro</sup>. Spośród zsyntezowanych markerów chemicznych najskuteczniejszym inhibitorem UCH-L3 był marker referencyjny.

W celu określenia selektywności zsyntezowanych markerów przeprowadzono eksperymenty z użyciem lizatów komórkowych z linii HEK-293T, HeLa oraz A-431. W przypadku MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, który nie jest ekspresjonowany w komórkach, enzym ten dodano do lizatów. Otrzymane wyniki potwierdziły, że zsyntezowane markery chemiczne zawierające nienaturalne aminokwasy selektywnie wiązały się do MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. Referencyjny marker chemiczny biot-6-ahx-Ub-VME we wszystkich lizatach komórkowych znakował wiele aktywnych DUBs. W porównaniu do markera referencyjnego biot-6-ahx-Ub.M2-VME cechowała wysoka selektywność. Najwyraźniejszy prążek zaobserwowano dla dodanego do lizatu rekombinowanego MERS-CoV PL<sup>pro</sup>, a pozostałe

prążki pochodzące od DUBs obecnych w lizacie były nieliczne i mało intensywne. Oba markery chemiczne dla UCH-L3, biot-6-ahx-Ub.S1-VME oraz biot-6-ahx-Ub.S2-VME, w stężeniu 100 nM znakowały prawie wyłącznie UCH-L3, a prążki pochodzące od innych DUBs były mało wyraźne i nieliczne. W celu potwierdzenia, że zsyntezowane markery znakują UCH-L3, przeprowadzono eksperyment immunoblottingu, który potwierdził, że wyznakowane białko to UCH-L3.

Wyniki eksperymentów opisanych w niniejszej rozprawie pokazały, że **C-końcowy rejon cząsteczki Ub jest kluczowy dla jej wiązania się do miejsca aktywnego badanych enzymów deubikwitynujących**. Pokazano również, że **możliwe jest modulowanie selektywności oraz specyficzności narzędzi chemicznych dla DUBs poprzez wprowadzanie wyselekcjonowanych (w tym nienaturalnych) reszt aminokwasowych w obrębie tego rejonu**. Do tej pory w literaturze opisane zostały dwie strategie stosowane w projektowaniu i syntezie selektywnych wariantów ubikwityny do badania DUBs. W przeciwieństwie do opisanej w rozprawie metody, nie skupiają się one na C-końcowym fragmencie sekwencji peptydowej tego białka, które pełni kluczową rolę podczas wiązania Ub do DUBs. Opisana w niniejszej dysertacji metoda składa się z trzech etapów. W pierwszym badana jest specyficzność substratowa wybranego enzymu deubikwitynującego w pozycjach P4-P2. Na podstawie uzyskanego profilu specyficzności substratowej w drugim etapie syntezowane są tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne, które następnie sprawdzane są pod kątem specyficzności i selektywności względem badanego DUB. W ostatnim etapie syntezowane są pochodne ubikwityny ze zmodyfikowanym C-końcowym motywem LRGG. Sekwencja LRGG występująca w natywnej Ub zastępowana jest sekwencjami aminokwasowymi, pochodzącymi z optymalnych substratów tetrapeptydowych, co prowadzi do otrzymania selektywnych i specyficznych pochodnych Ub.

**Podsumowując, w niniejszej dysertacji opisano nową strategię otrzymywania selektywnych wariantów Ub, które dzięki zastosowaniu totalnej syntezy chemicznej, mogą zostać przekształcone w substraty, markery chemiczne oraz inhibitory selektywnie rozpoznawane przez wybrane DUBs.** Do zalet przedstawionej metody projektowania narzędzi chemicznych do badania DUBs należą:

- zastosowanie różnorodnych nieproteinogenicznych aminokwasów prowadzi do wzrostu selektywności oraz specyficzności otrzymanych wariantów Ub względem pochodnych Ub typu dzikiego;

- wykorzystanie totalnej chemicznej syntezy pochodnych Ub umożliwia dowolną funkcjonalizację C-końcowej grupy karboksylowej oraz N-końcowej grupy aminowej. Zmiana elektrofilowego ugrupowania na chelator (np. 8-merkaptochinolinę) potencjalnie może pozwolić na wykorzystanie tej metody również w badaniach nad metaloDUBs [179];
- przedstawiona strategia nie jest ograniczona jedynie do DUBs. Użyta w rozprawie biblioteka HyCoSuL może zostać wykorzystana do zbadania preferencji substratowych również innych enzymów wykazujących specyficzną wobec motywu XXGG (np. SENPs), a uzyskane wyniki mogą zostać wykorzystane do syntezy nienaturalnych pochodnych innych UBLs;
- w połączeniu z innymi metodami projektowania selektywnych wariantów Ub *in silico* lub z wykorzystaniem prezentacji fagowej metoda ta potencjalnie może doprowadzić do uzyskania jeszcze bardziej specyficznych oraz selektywnych narzędzi do badania enzymów z grupy deubikwitynaz.

## 5. Część eksperymentalna

Wszystkie badania opisane w rozprawie zostały wykonane w laboratorium prof. dra hab. Marcina Dąga, w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Odczynniki użyte do syntez zakupione zostały w firmach Sigma-Aldrich, VWR International, Iris Biotech GmbH, Combi-Blocks, AAPPTec, Merck Millipore, Creosalus, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen oraz Bio-Techne. Rekombinowany enzym UCH-L3 został wyekspresjonowany oraz oczyszczony przez dra Scotta Snipasa (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute w La Jolla, CA, Stany Zjednoczone), MERS-CoV PL<sup>pro</sup> wyekspresjonował i oczyścił dr Miklos Békés (Department of Biochemistry & Molecular Pharmacology, New York University School of Medicine w Nowym Jorku, NY, Stany Zjednoczone).

Wysokorozdzielcze widma masowe zsintezowanych związków chemicznych zostały przygotowane przez dr inż. Gabrielę Maciejewską w Laboratorium Wysokorozdzielczej Spektrometrii Masowej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Analizy wykonano z wykorzystaniem systemu WATERS LCT Premier XE, złożonego z wysokorozdzielczego spektrometru masowego z analizatorem czasu przelotu (TOF) oraz jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI).

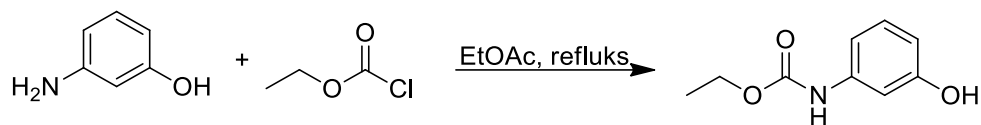
Widma magnetycznego rezonansu jądrowego <sup>1</sup>H zarejestrował mgr inż. Paweł Dąbrowski w Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądrowego na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Analizy zostały wykonane na aparacie Bruker Avance DRX300.

Analizy LC-MS otrzymanych związków wykonano z użyciem systemu Waters Alliance e2695, detektora UV-Vis 2489 oraz spektrometru masowego Acquity QDa. System LC był wyposażony w kolumnę analityczną Phenomenex Jupiter C4 (średni rozmiar cząstki złoża 10 μm, porowatość 300 Å, wymiary 250 x 4,6 mm). Rozdział prowadzono w układzie odwróconych faz, A – 0,1% wodny roztwór HCOOH, B – 0,1% roztwór HCOOH w ACN. Gradient 95% A → 95% B przez 15 min.

### 5.1. Synteza Fmoc-ACC-OH

Synteza znacznika bifunkcyjnego Fmoc-ACC-OH obejmowała cztery etapy i została przeprowadzona na podstawie zmodyfikowanego protokołu Mały'ego i in. [210]. W trakcie realizacji badań syntezę powtórzono kilkakrotnie.

### Synteza (3-hydroksyfenylo)karbaminianu etylu

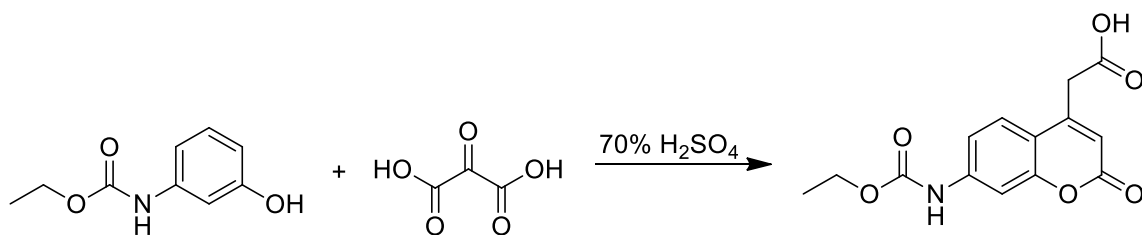


Rysunek 40. Schemat syntezy (3-hydroksyfenylo)karbaminianu etylu.

Do trójzszyjnej kolby okrągłodennej o objętości 2 l dodano 3-aminofenol (154,63 g, 1,42 mol) oraz 750 ml EtOAc. Mieszaninę ogrzewano w koszu grzejnym pod chłodnicą zwrotną przez 30 min w temperaturze wrzenia EtOAc. Następnie przez godzinę wkraplano chloromrówczan etylu (65,8 ml, 0,687 mol). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 30 min, a następnie schłodzono do temperatury pokojowej. Powstały biały osad przefiltrowano na lejku Schotta i przemyto 3 x 300 ml EtOAc. Osad odrzucono, a przesącz zagęszczono na wyparce. Gdy roztwór w kolbie uzyskał postać gęstego, żółtawego syropu, przelano go do krystalizatora i mieszano szklaną bagietką w celu zapoczątkowania krystalizacji. Produkt wykrystalizował w postaci białych kryształów. Odsączono go na lejku Schotta, przeniesiono do krystalizatora i suszono na powietrzu. Otrzymano 110,69 g (3-hydroksyfenylo)karbaminianu etylu (wydajność 88,9%). Masę molową produktu potwierdzono za pomocą LC-MS ( $m/z_{\text{obliczone}} [M+H]^+ = 182,08$ ,  $m/z_{\text{zmierzone}} [M+H]^+ = 181,88$ ).

$^1\text{H NMR}$ : (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C):  $\delta$  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).

### Synteza kwasu 7-N-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowego metodą kondensacji Pechmanna



Rysunek 41. Schemat syntezy kwasu 7-N-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowego.

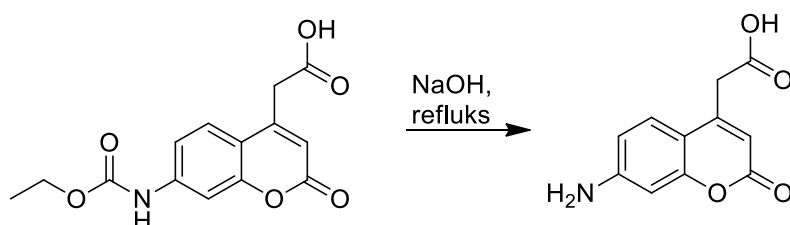
Do kolby okrągłodennej o pojemności 3 l z mieszadłem dodano 1,5 l 70%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i schłodzono w łaźni lodowej. Przez godzinę dodawano porcjami (3-hydroksyfenylo)karbaminian etylu (55,02 g, 0,304 mol), a następnie przez kolejną godzinę porcjami dodawano kwas 1,3-acetonodikarboksylowy (49 g, 0,335 mol). Usunięto łaźnię lodową i prowadzono reakcję w temperaturze pokojowej przez 10 h (Rysunek 41). Po tym czasie



zawartość kolby przelano do dwóch zlewek zawierających 2 l lodu i mieszano przez 30 min. Powstały biały osad przefiltrowano na lejku Schotta. Produkt przemyto Et<sub>2</sub>O, a następnie rozpuszczono w acetonitrylu. Mieszaninę doprowadzono do wrzenia i mieszano przez 30 min. Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i odsączono na lejku Schotta. Otrzymano 75,39 g kwasu 7-*N*-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowego (wydajność 85,1%). Masę molową produktu potwierdzono za pomocą LC-MS ( $m/z_{\text{obliczone}} [M+H]^+ = 292,08$ ,  $m/z_{\text{zmierzone}} [M+H]^+ = 291,93$ ).

<sup>1</sup>H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 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).

#### Synteza kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego

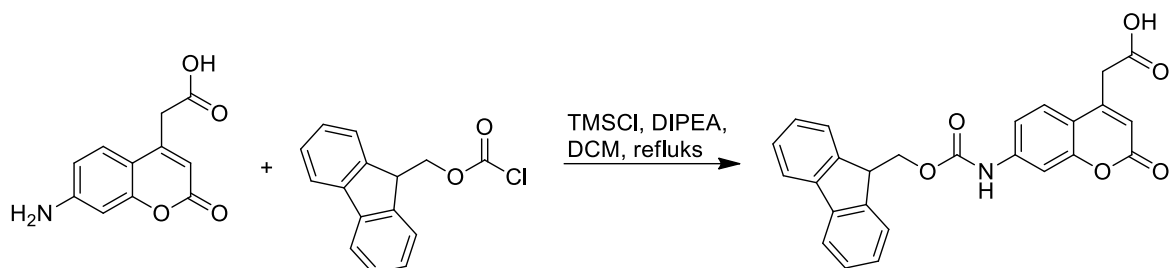


Rysunek 42. Schemat syntezy kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 3 l z mieszadłem magnetycznym rozpuszczono NaOH (189,84 g, 4,75 mol) w 1,24 l wody destylowanej. Porcjami dodawano kwas 7-*N*-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowy (138,84 g, 0,477 mol), mieszaninę ogrzano do wrzenia i przez 3 h prowadzono reakcję pod chłodnicą zwrotną (Rysunek 42). Mieszaninę poreakcyjną schłodzono do temperatury pokojowej, następnie zawartość kolby przelano do zlewki o pojemności 5 l z mieszadłem magnetycznym. Mieszaninę schłodzono w łaźni lodowej, a następnie niewielkimi porcjami H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zakwaszono ją do pH 2,35. Kwas 7-aminokumaryno-4-octowy wytrącał się z roztworu w postaci żółtego osadu wraz z produktem ubocznym – Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zawiesinę odsączono na lejku Schotta, a osad wysuszono w ekzykatorze nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. W celu oddzielenia produktu od Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, do kolby gruszkowej o pojemności 1 l, dodawano po około 20 g otrzymanego osadu oraz 200 ml acetonu i mieszano w 60°C przez 20 min. Kwas rozpuszczał się w acetonie, a Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> usuwano przesączając roztwór na lejku Schotta. Produkt wyizolowano poprzez odparowanie acetonu na wyparce próżniowej. Uzyskano 55,17 g produktu (wydajność 52,8%). Masę molową i czystość produktu potwierdzono za pomocą LC-MS ( $m/z_{\text{obliczone}} [M+H]^+ = 220,06$ ,  $m/z_{\text{zmierzone}} [M+H]^+ = 219,87$ ).

$^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):  $\delta$  3,73 (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).

Synteza kwasu 7-*N*-(fluorenylometoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego



Rysunek 43. Schemat syntezy kwasu 7-*N*-(fluorenylometoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 1 l z mieszadłem magnetycznym dodano kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (9,70 g, 0,044 mol), DCM (73 ml) i DIPEA (17 ml). Mieszaninę schładzano w łaźni lodowej przez 15 min. Dodano  $\text{TMSCl}$  (13 ml), pod chłodnicą zwrotną i ogrzewano mieszaninę w temperaturze wrzenia przez 3 h. Po tym czasie zawartość kolby schłodzono w łaźni lodowej do temp. poniżej  $10^\circ\text{C}$  i porcjami dodawano Fmoc-Cl (12,8 g, 0,049 mol). Reakcję prowadzono przez 11 h na mieszadle magnetycznym (Rysunek 43). Po tym czasie usunięto mieszadło z kolby, dodano 243 ml MeOH i mieszano ręcznie przez 30 min. W trakcie mieszania wytrącał się produkt w postaci białego osadu, który przefiltrowano na lejku Schotta, a następnie przemyto dwukrotnie MeOH i dwukrotnie  $\text{Et}_2\text{O}$ . Wyszuszony produkt przeniesiono do krystalizatora. Otrzymano 15,73 g Fmoc-ACC-OH (wydajność 81,0%). Masę molową i czystość produktu potwierdzono za pomocą LC-MS ( $m/z_{\text{zobliczone}} [\text{M}+\text{H}]^+ = 442,13$   $m/z_{\text{zmierzone}} [\text{M}+\text{H}]^+ = 442,21$ ).

$^1\text{H NMR}$ : (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ):  $\delta$  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).

## 5.2. Synteza zdefiniowanej biblioteki tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych P2

Zdefiniowaną bibliotekę substratów do badania specyficzności substratowej DUBs w pozycji P2 zsyntezowano na podłożu stałym. Do dwóch aparatów do ręcznej syntezy peptydów na podłożu stałym dodano po 9,6 g żywicy Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,74 mmol/g. Żywicę spulchniano w 25 ml dichlorometanu (DCM) przez 20 min, a następnie przemyto 3 x DMF. W celu usunięcia grupy ochronnej Fmoc, do żywicy dodano 20 ml 20% roztworu piperydyny w DMF i przez 5 min prowadzono reakcję

z mieszaniem. Po tym czasie żywicę przemyto DMF i dodano świeżej porcji roztworu piperydyny. Reakcję prowadzono przez 25 min, a następnie żywicę przemyto 7 x DMF. W celu potwierdzenia obecności wolnych grup aminowych, przeprowadzono test ninhydrynowy: przeniesiono kilka ziaren żywicy do próbówki i dodano do niej roztwór ninhydryny w 96% etanolu skażonym eterem dietylowym. Żywicę inkubowano przez 5 min w 95°C. Po tym czasie ziarenka żywicy zmieniły kolor na ciemnognatowy, oznaczający obecność wolnych grup aminowych na nośniku stałym. W dwóch próbówkach wirówkowych typu Falcon o pojemności 50 ml przygotowano po 30 ml roztworu DMF zawierającego po 2 równoważniki molowe Fmoc-ACC-OH (6,266 g, 14,2 mmol), HATU (5,402 g, 14,2 mmol) oraz 2,4,6-kolidyny (1,875 ml, 14,2 mmol). Roztwory dodano do żywicy w reaktorach i prowadzono reakcję z mieszaniem przez 24 h. Po tym czasie przemyto żywicę 3 x DMF i wykonano test ninhydrynowy, którego wynik wskazywał na dalszą obecność wolnych grup aminowych (ciemny kolor części z ziaren żywicy). Dodano świeżą porcję 30 ml roztworu Fmoc-ACC-OH, HATU i 2,4,6-kolidyny (2 ekwiwalenty molowe odczynników) w DMF. Reakcję prowadzono przez 24 h. Żywicę przemyto 3 x DMF, przeprowadzono test ninhydrynowy, a następnie usunięto grupę ochronną Fmoc w cyklach 5 i 25 min w sposób opisany powyżej. Do żywicy w reaktorach dodano po 30 ml roztworu DMF zawierającego po 2,5 równoważnika molowego Fmoc-Gly-OH (5,280 g, 17,8 mmol), HATU (6,753 g, 17,8 mmol) i 2,4,6-kolidyny (2,344 ml, 17,8 mmol). Reakcję sprzęgania Gly w pozycji P1 prowadzono przez noc. Po tym czasie żywicę przemyto 3 x DMF i usunięto grupę ochronną Fmoc w 20% roztworze piperydyny w DMF cyklach 5 i 25 min. Żywicę przemyto 3 x DCM i 3 x MeOH i wysuszono nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Następnie połączono żywicę z dwóch reaktorów i podzielono na 128 porcji, które przeniesiono do aparatu do półautomatycznej syntezy równoległej (48-well semiautomatic FlexChem synthesizer). Do każdego dołka dodano po 1 ml DCM i spulchniano żywicę przez 20 min. Żywicę przemyto 3 x DMF. Do 128 próbówek Eppendorfa o pojemności 2 ml odważono po 2 równoważniki molowe jednego ze 128 naturalnych lub nienaturalnych aminokwasów (Tabela 5). Przygotowano roztwór 10,805 g HATU w 115,2 ml DMF. Do próbówek Eppendorfa z aminokwasami dodano po 0,9 ml r-ru HATU i po 29 µl 2,4,6-kolidyny (2 równoważniki molowe). Następnie zawartość próbówek Eppendorfa przeniesiono do dołków aparatu do syntezy równoległej. Reakcję prowadzono 24 h. Obecność wolnych grup aminowych po każdym sprzęganiu oraz po usunięciu grupy ochronnej Fmoc badano za pomocą testu ninhydrynowego. Żywicę w dołkach przemyto 3 x DMF i usunięto grupę ochronną Fmoc w 20% roztworze piperydyny w DMF w cyklach 5 i 25 min. Żywicę przemyto 7 x DMF. W kolejnym etapie, w celu

przyłączenia Fmoc-Arg(pbf)-OH w pozycji P3, przygotowano 115,2 ml roztworu zawierającego Fmoc-Arg(pbf)-OH (23,044 g), HATU (13,506 g) oraz 2,4,6-kolidynę (4,689 ml) (porcje po 0,9 ml roztworu zawierały po 2,5 równoważnika molowego odczynników sprzęgających oraz aminokwasu). Mieszaninę dodano do każdego z dołków reaktora i reakcję prowadzono przez około 24 h. Następnie przemyto żywicę 3 x DMF, usunięto grupę ochronną Fmoc w 20% roztworze piperydyny w DMF w cyklach 5 i 25 min i przemyto żywicę 7 x DMF. Fmoc-Leu-OH przyłączano analogicznie jak Fmoc-Arg(pbf)-OH stosując 2,5 równoważnika molowego każdego z reagentów i usunięto grupę Fmoc. W celu przyłączenia grupy acetylowej do N-końcowej grupy aminowej przygotowano 115,2 ml (po 0,9 ml na dołek) mieszaniny DMF z 5 równoważnikami molowymi HBTU (26,942 g), AcOH (4,063 ml) i DIPEA (12,374 ml). Reakcję prowadzono przez 1 h. Po tym czasie wykonano test ninhydrynowy potwierdzający brak wolnych grup aminowych. Żywicę przemyto 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH i wysuszono nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. W celu uwolnienia substratów z podłoża stałego i usunięcia grup ochronnych, do każdego z dołków aparatu do syntezy dodano 1 ml mieszaniny TFA, TIPS i wody (95:2,5:2,5, v/v/v). Reakcję prowadzono przez 1 h 45 min. Roztwór TFA z uwolnionymi peptydami przeniesiono do probówek wirówkowych typu Falcon o pojemności 15 ml, dodano 13 ml zimnego Et<sub>2</sub>O w celu wytrącenia peptydów i inkubowano w -20°C przez 20 min. Po tym czasie zwirowano probówki (4400 rpm, 3 min, 4°C) i zdekantowano roztwór z nad osadu. Do probówek dodano po 10 ml zimnego Et<sub>2</sub>O, przemyto osad i inkubowano w -20°C przez 20 min. Probówki zwirowano (4400 rpm, 3 min, 4°C), zdekantowano eter i wysuszono peptydy na powietrzu przez noc. Substraty zostały oczyszczone na HPLC na kolumnie Supelco Wide Pore C8 Discovery (średni rozmiar cząstki złoża 10 µm, wymiary kolumny: 250 x 21,2 mm) oraz scharakteryzowane z użyciem systemu LC-MS. Czystość związków wynosiła ≥95%. Bibliotekę zliofilizowano, rozpuszczono w DMSO w stężeniu 10 mM i przechowywano w -80°C.

Tabela 5. Wyniki analizy LC-MS tetrapeptydowych fluorogenicznych substratów wchodzących w skład biblioteki zdefiniowanej P2, m/z zmierzono za pomocą detektora masowego Waters Acquity QDa.

<b>Substrat:</b>	<b>Ac-Leu-Arg-P2-Gly-ACC</b>	<b>m/Zobliczone</b>	<b>m/Zmierzone</b>
P2/1	L-Ala	658,33	658,28
P2/2	L-Arg	743,39	743,37
P2/3	L-Asn	701,34	701,30
P2/4	L-Asp	702,32	702,28
P2/5	L-Glu	716,34	716,30
P2/6	L-Gln	715,35	715,15
P2/7	Gly	644,32	644,15

P2/8	L-His	724,35	724,25
P2/9	L-Ile	700,38	700,28
P2/10	L-Leu	700,38	700,29
P2/11	L-Lys	715,39	715,30
P2/12	L-Nle	700,38	700,20
P2/13	L-Phe	734,36	734,23
P2/14	L-Pro	684,35	684,19
P2/15	L-Ser	674,33	674,19
P2/16	L-Thr	688,34	688,21
P2/17	L-Trp	773,37	773,29
P2/18	L-Tyr	750,36	750,27
P2/19	L-Val	686,36	686,26
P2/20	D-Ala	658,33	658,20
P2/21	D-Arg	743,39	743,29
P2/22	D-Asn	701,34	701,24
P2/23	D-Asp	702,32	702,22
P2/24	D-Gln	715,35	715,25
P2/25	D-Glu	716,34	716,23
P2/26	D-His	724,35	724,27
P2/27	D-Leu	700,38	700,28
P2/28	D-Lys	715,39	715,29
P2/29	D-Phe	734,36	734,28
P2/30	D-Pro	684,35	684,22
P2/31	D-Ser	674,33	674,21
P2/32	D-Phg	720,35	720,25
P2/33	D-Thr	688,34	688,23
P2/34	D-Trp	773,37	773,31
P2/35	D-Tyr	750,36	750,30
P2/36	D-Val	686,36	686,25
P2/37	D-hPhe	748,38	748,29
P2/38	$\beta$ -Ala	658,33	658,21
P2/39	L-Aze	670,33	670,23
P2/40	L-Hyp	700,34	700,22
P2/41	L-Hyp(Bzl)	790,39	790,23
P2/42	L-Thz	702,30	702,12
P2/43	L-Oic	738,39	738,23
P2/44	L-Idc	732,35	732,18
P2/45	L-Pip	698,36	698,19
P2/46	L-Tic	746,36	746,20
P2/47	Inp	698,36	698,20
P2/48	L-2Fal	724,34	724,17
P2/49	AC5C	698,36	698,19
P2/50	L-Dap	673,34	673,26
P2/51	L-Dab	687,36	687,26
P2/52	L-Dab(Z)	821,39	821,36
P2/53	L-Cit	744,38	744,32
P2/54	L-hCit	758,39	758,36
P2/55	L-Orn	701,37	701,29
P2/56	L-Lys(TFA)	811,37	811,32

P2/57	L-Lys(Ac)	757,40	757,28
P2/58	L-Lys(2-ClZ)	883,39	883,28
P2/59	L-Agp	715,36	715,24
P2/60	L-hArg	757,41	757,31
P2/61	L-His(Bzl)	814,40	814,31
P2/62	L-His(3-Bom)	844,41	844,34
P2/63	L-Phe(NH <sub>2</sub> )	749,37	749,29
P2/64	L-Phe(guan)	791,39	791,30
P2/65	L-Trp(Me)	787,39	787,29
P2/66	L-Dht	775,39	775,30
P2/67	L-Gla	760,33	760,23
P2/68	L-Glu(O-Me)	730,35	730,25
P2/69	L-Glu(O-cHx)	798,41	798,34
P2/70	L-Glu(O-Bzl)	806,38	806,32
P2/71	L-Glu(All)	756,37	756,31
P2/72	L-Aad	730,35	730,28
P2/73	L-Phe(2-F)	752,35	752,29
P2/74	L-Phe(3-F)	752,35	752,28
P2/75	L-Phe(4-F)	752,35	752,29
P2/76	L-Phe(3,4-F <sub>2</sub> )	770,34	770,27
P2/77	L-Phe(F <sub>5</sub> )	824,32	824,26
P2/78	L-Phe(2-Cl)	768,32	768,24
P2/79	L-Phe(3-Cl)	768,32	768,25
P2/80	L-Phe(4-Cl)	768,32	768,25
P2/81	L-Phe(3,4-Cl <sub>2</sub> )	802,28	802,31
P2/82	L-Phe(4-Br)	812,27	812,30
P2/83	L-Phe(3-I)	860,26	860,31
P2/84	L-Phe(4-I)	860,26	860,31
P2/85	L-Phe(4-Me)	748,38	748,40
P2/86	L-Phe(4-NO <sub>2</sub> )	779,35	779,37
P2/87	L-3-Pal	735,36	735,35
P2/88	L-4-Pal	735,36	735,34
P2/89	L-Ala(2-th)	740,32	740,30
P2/90	L-Ala(Bth)	791,33	791,35
P2/91	Aib	672,35	672,30
P2/92	L-Bta	790,33	790,38
P2/93	L-Abu	672,35	672,32
P2/94	L-Abu(Bth)	805,35	805,41
P2/95	L-Ser(Bzl)	764,33	764,40
P2/96	L-hSer	688,34	688,31
P2/97	L-hSer(Bzl)	778,39	778,42
P2/98	L-Thr(Bzl)	778,39	778,43
P2/99	L-Cys(Bzl)	780,35	780,38
P2/100	L-Cys(MeBzl)	794,37	794,38
P2/101	L-Cys(4-MeOBzl)	810,36	810,33
P2/102	L-Met	718,33	718,27
P2/103	L-Met(O)	734,33	734,29
P2/104	L-Met(O <sub>2</sub> )	750,32	750,29

P2/105	L-Nle(O-Bzl)	806,42	806,40
P2/106	L-Phg	720,35	720,34
P2/107	L-hPhe	748,38	748,39
P2/108	L-Chg	726,39	726,39
P2/109	L-Cha	740,41	740,41
P2/110	L-hCha	754,42	754,44
P2/111	L-Igl	760,38	760,39
P2/112	L-1-Nal	784,38	784,42
P2/113	L-2-Nal	784,38	784,42
P2/114	L-Bip	810,39	810,44
P2/115	L-Bpa	838,39	838,44
P2/116	L-2-Aoc	728,41	728,40
P2/117	L-Arg(NO <sub>2</sub> )	788,38	788,40
P2/118	L-hLeu	714,39	714,37
P2/119	L-Tle	700,38	700,36
P2/120	L-Tyr(Me)	764,37	764,43
P2/121	L-Tyr(2,6-Cl <sub>2</sub> -Bzl)	908,33	908,41
P2/122	L-Tyr(Bzl)	840,40	840,48
P2/123	L-hTyr	764,37	764,41
P2/124	L-hTyr(Me)	778,39	778,43
P2/125	L-Nva	686,36	686,33
P2/126	2-Abz	706,33	706,33
P2/127	3-Abz	706,33	706,31
P2/128	4-Abz	706,33	706,30

### 5.3. Określenie profilu specyficzności substratowej MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 w pozycjach P4-P2

W celu określenia specyficzności substratowej badanych DUBs w pozycjach P2, P3 oraz P4 do dołków płytki 96-dołkowej Corning dodano po 1  $\mu$ l substratów z bibliotek. Enzymy preinkubowano przez 30 min w 37°C w buforach (dla UCH-L3: 50 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,5; dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup>: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 8,0). Następnie dodano 99  $\mu$ l roztworu enzymu w buforze. Pomiar prowadzono z użyciem spektrofлуorymetru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w 37°C. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Końcowe stężenia substratów w dołkach wynosiły 100  $\mu$ M dla biblioteki P2 oraz 200  $\mu$ M dla biblioteki HyCoSuL P3 i P4. Stężenie enzymów podczas badania bibliotek P2, P3 i P4 wynosiło dla UCH-L3 kolejno 6  $\mu$ M, 12  $\mu$ M i 20  $\mu$ M, a dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> 2  $\mu$ M. Pomiar przeprowadzono co najmniej dwukrotnie.

### 5.4. Synteza tetrapeptydowych substratów dla DUBs

Synteza tetrapeptydowych substratów dla UCH-L3 oraz MERS-CoV PL<sup>pro</sup> została przeprowadzona na podłożu stałym, na żywicy Rink Amide AM o stopniu podstawienia

0,74 mmol/g, stosując procedurę opisaną dla biblioteki zdefiniowanej P2. Po syntezie substraty oczyszczono za pomocą HPLC, zliofilizowano, i przechowywano w  $-20^{\circ}\text{C}$  w postaci 10 mM roztworów w DMSO. Wyniki analizy HRMS dla substratów przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Wyniki analizy HRMS dla zsyntezowanych substratów.

<b>Substrat:</b>	<b>m/Zobliczone</b>	<b>m/Zmierzone</b>
Ac-Leu-Arg-Gly-Gly-ACC	644,3151	644,3158
(M1) Ac-Cys(MeBzl)-Phg-Gly-Gly-ACC	715,2545	715,2556
(M2) Ac-Tle-Phg-Gly-Gly-ACC	621,2595	621,2672
(M3) Ac-Cys(4-MeOBzl)-Phg-Gly-Gly-ACC	731,2494	731,2478
(S1) Ac-Cha-Arg-Abu-Gly-ACC	712,3777	712,3780
(S2) Ac-D-Arg-Phe(guan)-Ala-Gly-ACC	749,3478	749,3479

### 5.5. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla tetrapeptydowych substratów

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych w dołkach płytki 96-dołkowej Corning przygotowano seryjne rozcieńczenia substratów w buforach dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. Następnie do dołków z substratami dodano po 80  $\mu\text{l}$  roztworów enzymów. Przed dodaniem enzymy preinkubowano przez 30 min w  $37^{\circ}\text{C}$ . Końcowe stężenia w dołkach dla użytych substratów wynosiły 0,88 – 50  $\mu\text{M}$ , natomiast w przypadku enzymów wynosiły 2,5  $\mu\text{M}$  dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz 6  $\mu\text{M}$  dla UCH-L3. Przyrost fluorescencji mierzono z użyciem spektrofotometru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w  $37^{\circ}\text{C}$ . Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Pomiar powtórzono trzykrotnie. Parametr  $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$  wyznaczono w programie GraphPad Prism. W warunkach niskiego stężenia substratu ( $[\text{S}] \ll K_{\text{M}}$ ) krzywe szybkości reakcji w funkcji stężenia substratu mają postać linii prostych o nachyleniu równym  $v_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ , natomiast  $v_{\text{max}}$  równe jest  $[\text{E}] \times k_{\text{kat}}$ , a więc  $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = \text{nachylenie}/[\text{E}]$ .

### 5.6. Zbadanie selektywności tetrapeptydowych substratów względem DUBs

Badanie selektywności substratów względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych Corning. Do dołków nałożono po 1  $\mu\text{l}$  roztworów substratów w DMSO. Następnie do dołków z substratami dodano po 99  $\mu\text{l}$  roztworu enzymu. Przed dodaniem enzymy preinkubowano przez 30 min w  $37^{\circ}\text{C}$ . Końcowe stężenia w dołkach dla użytych substratów wynosiły 10  $\mu\text{M}$ , natomiast enzymów 2  $\mu\text{M}$  dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz 6  $\mu\text{M}$  dla UCH-L3. Przyrost fluorescencji mierzono za pomocą spektrofotometru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w  $37^{\circ}\text{C}$ . Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Pomiar powtórzono trzykrotnie.



## 5.7. Synteza pochodnych ubikwityny

Synteza substratów oraz markerów chemicznych, których struktura oparta była na strukturze cząsteczki Ub, przeprowadzona została w czterech etapach. Obejmowały one syntezę na podłożu stałym hydrazydowych peptydowych segmentów, ich kondensację w następujących po sobie reakcjach NCL, desulfuryzację powstałego 75-peptydowego hydrazydu oraz przyłączenie C-końcowej grupy fluorogenicznej H<sub>2</sub>N-Gly-ACC (dla substratów) lub elektrofilowej grupy wiążącej H<sub>2</sub>N-Gly-VME (dla markerów chemicznych). Spośród hydrazydowych segmentów używanych do syntezy substratów oraz markerów chemicznych, jedynie N-końcowe segmenty różniły się od siebie. Do syntezy markerów chemicznych używany był segment biot-6-ahx-Ub[1-27] zawierający linker w postaci kwasu 6-aminoheksanowego oddzielający biotynę od reszty cząsteczki Ub. Substraty zawierały natomiast segment Ub[1-27] z wolną N-końcową grupą aminową reszty Met1. Pozostałe zsyntezowane segmenty hydrazydowe mogły zostać użyte zarówno do syntezy markerów chemicznych jak i substratów.

### 5.7.1. Synteza hydrazydowych segmentów peptydowych

#### *Funkcjonalizacja żywicy 2-chlorotrytylowej*

Syntezę hydrazydów na podłożu stałym rozpoczęto od funkcjonalizacji żywicy 2-chlorotrytylowej za pomocą Fmoc-NH-NH<sub>2</sub>. Do aparatu do syntezy peptydów na podłożu stałym odważono 400 mg żywicy 2-chlorotrytylowej o stopniu podstawienia 0,97 mmol/g. Żywicę spulchniano przez 20 min za pomocą DCM. Po tym czasie żywicę przemyto 3 x DCM. Do probówki wirówkowej typu Falcon o pojemności 15 ml odważono 4 równoważniki molowe Fmoc-NH-NH<sub>2</sub> (395 mg), dodano 5 ml mieszaniny DMF:DCM (8:1, v/v), 10 równoważników molowych DIPEA (676 μl) i aktywowano przez minutę w łaźni ultradźwiękowej. Mieszaninę dodano do żywicy i prowadzono reakcję z mieszaniem. Po upływie 1 h dodano 5 równoważników molowych DIPEA (338 μl) i kontynuowano reakcję przez 3 h. Po tym czasie żywicę przemyto 3 x DMF, a pozostałe miejsca aktywne na żywicy zablokowano poprzez dodanie mieszaniny DMF, MeOH i DIPEA (3,5:0,5:0,2, v/v/v). Reakcję prowadzono z mieszaniem przez 30 min, a następnie żywicę przemyto 3 x DMF, 3 x DCM i 3 x MeOH, wysuszono i przechowywano w 4°C. W trakcie realizacji projektu doktorskiego syntezę tę powtórzono kilkakrotnie.

Synteza Ub[1-27], biot-6-ahx-Ub[1-27], Ub[28-45]<sup>A28C</sup>, Ub[46-75]<sup>A46C</sup>, Ub.M2[46-75]<sup>A46C</sup>, S1.[46-75]<sup>A46C</sup> oraz S2.[46-75]<sup>A46C</sup>

Syntezę segmentów hydrazydowych przeprowadzono manualnie, korzystając z procedury opisanej w punkcie 5.2. Do syntezy wykorzystano żywicę Fmoc-NH-NH-2-CTC. 500 mg żywicy umieszczono w naczyniu do syntezy peptydów na podłożu stałym i spulchniano przez 20 min w DCM. Następnie usunięto grupę Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF w cyklach 5 i 25 min i przemyto żywicę 7 x DMF. Wszystkie aminokwasy sprzęgano używając 2,5 równoważnika molowego aminokwasu, HATU oraz 2,4,6-kolidyny. W przypadku segmentu biot-6-ahx-Ub[1-27] sprzęganie biotyny przeprowadzono w mieszaninie zawierającej DMF:DMSO w stosunku objętościowym 1:1. Podczas syntezy C-końcowych segmentów zastosowano dipeptydowe bloki budulcowe: Fmoc-Ser(*t*Bu)-Thr( $\psi$ Me, Me)pro-OH, który zastąpił Ser<sup>65</sup>Thr<sup>66</sup> oraz Fmoc-Asp(O*t*Bu)-(Dmb)Gly-OH, który zastąpił Asp<sup>52</sup>Gly<sup>53</sup>. Dipeptydy sprzęgane były w takich samych warunkach jak pozostałe aminokwasy. Postępy reakcji sprzęgania monitorowano za pomocą testów ninhydrynowych. W przypadku, gdy po 24 h reakcji test ninhydrynowy wskazywał na obecność wolnych grup aminowych, stosowano podwójne sprzęganie z mniejszym nadmiarem molowym odczynników sprzęgających. Po ostatnim cyklu sprzęgania produkty zostały uwolnione z podłoża stałego poprzez dodanie do wysuszonej żywicy około 10 ml mieszaniny TFA, TIPS i H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5, v/v/v). Reakcję prowadzono przez 1 h 45 min z mieszaniem. Produkt w mieszaninie TFA, TIPS i H<sub>2</sub>O przeniesiono do probówki wirówkowej typu Falcon o pojemności 50 ml, dodano około 30 ml Et<sub>2</sub>O i schładzano

Tabela 7. Analiza m/z dla zsyntezowanych na podłożu stałym segmentów hydrazydowych (m/z zmierzono korzystając z detektora masowego Waters Acquity QDa).

Ub[1-27]			biot-6-ahx-Ub[1-27]		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+3H] <sup>+3</sup>	1017,22	1017,17	[M+3H] <sup>+3</sup>	1130,27	1130,69
Ub[28-45] <sup>A28C</sup>			Ub[46-75] <sup>A46C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+2H] <sup>+2</sup>	1072,08	1072,13	[M+3H] <sup>+3</sup>	1153,28	1153,54
[M+3H] <sup>+3</sup>	715,06	715,22	[M+4H] <sup>+4</sup>	865,21	865,41
Ub.M2[46-75] <sup>A46C</sup>			Ub.S1[46-75] <sup>A46C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+3H] <sup>+3</sup>	1145,60	1145,66	[M+3H] <sup>+3</sup>	1175,97	1176,18
[M+4H] <sup>+4</sup>	859,45	859,58	[M+4H] <sup>+4</sup>	882,23	882,37
[M+5H] <sup>+5</sup>	687,76	687,80			
Ub.S2[46-75] <sup>A46C</sup>					
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone			
[M+4H] <sup>+4</sup>	891,47	891,54			

w  $-20^{\circ}\text{C}$  przez 20 min. Po tym czasie zwirowano i zdekantowano roztwór z osadu. Osad przemyto  $\text{Et}_2\text{O}$ , zwirowano zawartość probówki, zdekantowano  $\text{Et}_2\text{O}$  i suszono go na powietrzu. Wszystkie segmenty zostały oczyszczone za pomocą HPLC (kolumna Supelco Wide Pore C8 Discovery) i poddane analizie masowej (Tabela 7). Następnie hydrazydy zostały zliofilizowane i przechowywano je w postaci proszku w  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 5.7.2. Reakcje natywnej chemicznej ligacji (NCL)

Reakcję natywnej chemicznej ligacji opisano na przykładzie NCL pomiędzy segmentem biot-6-ahx-Ub[1-27] oraz Ub[28-45] $^{\text{A}28\text{C}}$ . Przygotowano 10 ml buforu do ligacji, zawierającego 6 M chlorowodorek guanidyny (5,74 g) i 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (276 mg) o pH 3,0. Do probówki wirówkowej typu Falcon o pojemności 15 ml dodano biot-6-ahx-Ub[1-27] (27,4 mg, 7,13  $\mu\text{mol}$ ) rozpuszczony w 2 ml buforu do ligacji. Peptyd w buforze schłodzono mieszając w łaźni lodowej z NaCl do  $-15^{\circ}\text{C}$  przez 20 min. W celu przekształcenia hydazydu acylu w azydek acylu, do peptydu w buforze dodano 10 równoważników molowych azotanu (III) sodu (71,3  $\mu\text{mol}$ , 40  $\mu\text{l}$  wodnego roztworu o stężeniu 123 mg/ml). Reakcję prowadzono przez 20 min w  $-15^{\circ}\text{C}$ . Równocześnie w 1,5 ml buforu do ligacji rozpuszczono 19,3 mg segmentu Ub[28-45] $^{\text{A}28\text{C}}$  (7,13  $\mu\text{mol}$ ), dodano 120 mg MPAA (0,713 mmol) i pH doprowadzono za pomocą wodorotlenku sodu do 6,5. Roztwór ten dodano do biot-6-ahx-Ub[1-27] przekształconego w azydek acylu. Usunięto łaźnię lodową z NaCl i po osiągnięciu przez mieszaninę reakcyjną temperatury pokojowej, pH podniesiono do wartości 6,9. Reakcję prowadzono przez 3 h, a jej przebieg monitorowano za pomocą LC-MS. Próbkę do analizy LC-MS przygotowano poprzez dodanie 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej do 650  $\mu\text{l}$  wody oraz 40  $\mu\text{l}$  TCEP (0,1 M roztwór w buforze do ligacji o pH 7,0). Po zaniku sygnałów pochodzących od substratów, do mieszaniny reakcyjnej dodano 200  $\mu\text{l}$  roztworu TCEP (skład j.w.) i oczyszczono na HPLC, na kolumnie półpreparatywnej Phenomenex Jupiter C4 (średni rozmiar cząstki złoża 10  $\mu\text{m}$ , porowatość 300 Å, wymiary 250 x 10 mm). Uzyskany segment biot-6-ahx-Ub[1-45] $^{\text{A}28\text{C}}$  zliofilizowano i przechowywano w postaci proszku w  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie w taki sam sposób przeprowadzono reakcję NCL pomiędzy uzyskanym produktem oraz segmentem Ub[46-75] $^{\text{A}46\text{C}}$ , w rezultacie otrzymując biot-6-ahx-Ub[1-75] $^{\text{A}28\text{C},\text{A}46\text{C}}$ . Wyniki analiz masowych dla produktów reakcji NCL przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Analiza m/z segmentów otrzymanych w wyniku reakcji NCL (m/z zmierzono korzystając z detektora masowego Waters Acquity QDa).

Ub[1-45] <sup>A28C</sup>			biot-6-ahx-Ub[1-45] <sup>A28C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+5H] <sup>+5</sup>	1032,75	1032,87	[M+5H] <sup>+5</sup>	1100,59	1100,65
[M+6H] <sup>+6</sup>	860,79	860,96	[M+6H] <sup>+6</sup>	917,32	917,53
Ub[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>			biot-6-ahx-Ub[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+7H] <sup>+7</sup>	1227,23	1227,56	[M+8H] <sup>+8</sup>	1116,34	1116,62
[M+8H] <sup>+8</sup>	1073,95	1074,41	[M+9H] <sup>+9</sup>	992,42	992,65
[M+9H] <sup>+9</sup>	954,74	945,95	[M+10H] <sup>+10</sup>	893,27	893,48
[M+10H] <sup>+10</sup>	859,36	859,47	[M+11H] <sup>+11</sup>	812,16	812,27
Ub.M2[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>			biot-6-ahx-Ub.M2[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+7H] <sup>+7</sup>	1223,93	1224,26	[M+8H] <sup>+8</sup>	1113,59	1113,65
[M+8H] <sup>+8</sup>	1071,07	1071,42	[M+9H] <sup>+9</sup>	989,45	990,12
[M+9H] <sup>+9</sup>	952,17	952,39	[M+10H] <sup>+10</sup>	891,07	891,17
[M+10H] <sup>+10</sup>	857,05	857,24			
Ub.S1[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>			biot-6-ahx-Ub.S1[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+7H] <sup>+7</sup>	1236,96	1237,27	[M+8H] <sup>+8</sup>	1125,98	1125,13
[M+8H] <sup>+8</sup>	1082,46	1082,77	[M+9H] <sup>+9</sup>	1000,09	1000,15
[M+9H] <sup>+9</sup>	962,30	962,51	[M+10H] <sup>+10</sup>	900,18	900,29
[M+10H] <sup>+10</sup>	866,17	866,43			
Ub.S2[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>			biot-6-ahx-Ub.S2[1-75] <sup>A28C,A46C</sup>		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+8H] <sup>+8</sup>	1087,08	1087,41	[M+8H] <sup>+8</sup>	1129,60	1129,79
[M+9H] <sup>+9</sup>	966,41	966,62	[M+9H] <sup>+9</sup>	1004,20	1004,39
[M+10H] <sup>+10</sup>	869,87	870,31	[M+10H] <sup>+10</sup>	903,88	904,06

### 5.7.3. Reakcja rodnikowej desulfuryzacji

W celu przeprowadzenia reakcji desulfuryzacji przygotowano 10 ml buforu zawierającego 6 M Gn·HCl (5,74 g), 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (138 mg), 375 mM TCEP (430 mg) oraz 37,5 mM VA-044 (121 mg) o pH wynoszącym 6,9. Do probówki wirówkowej typu Falcon o pojemności 15 ml dodano 20 mg biot-6-ahx-Ub[1-75]<sup>A28C,A46C</sup> (1,92 μmol). Peptyd rozpuszczono w 1,8 ml buforu do desulfuryzacji i do mieszaniny dodano 30,4 μl tBuSH (stężenie końcowe 150 mM). Reakcję prowadzono z mieszaniem przez 4 h w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą LC-MS. Po pełnej konwersji substratu w produkt mieszaninę reakcyjną oczyszczono na HPLC na kolumnie półpreparatywnej Phenomenex Jupiter C4. Otrzymany produkt zliofilizowano

i przechowywano w postaci proszku w 4°C. Wyniki analiz masowych dla produktów desulfuryzacji zawarto w Tabeli 9.

Tabela 9. Analiza m/z produktów otrzymanych w wyniku reakcji desulfuryzacji (m/z zmierzono korzystając z detektora masowego Waters Acquity QDa).

Ub[1-75]			Ub.M2[1-75]		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+7H] <sup>+7</sup>	1218,10	1218,28	[M+7H] <sup>+7</sup>	1214,80	1215,07
[M+8H] <sup>+8</sup>	1065,96	1066,22	[M+8H] <sup>+8</sup>	1063,07	1063,32
[M+9H] <sup>+9</sup>	947,63	947,81	[M+9H] <sup>+9</sup>	945,06	945,24
[M+10H] <sup>+10</sup>	852,97	853,18	[M+10H] <sup>+10</sup>	850,66	850,81
[M+11H] <sup>+11</sup>	775,52	775,64	[M+11H] <sup>+11</sup>	773,42	773,61
Ub.S1[1-75]			Ub.S2[1-75]		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+7H] <sup>+7</sup>	1227,82	1227,96	[M+8H] <sup>+8</sup>	1079,09	1079,50
[M+8H] <sup>+8</sup>	1074,47	1074,60	[M+9H] <sup>+9</sup>	959,30	959,48
[M+9H] <sup>+9</sup>	955,20	955,38	[M+10H] <sup>+10</sup>	863,47	863,60
[M+10H] <sup>+10</sup>	859,78	859,96			
biot-6-ahx-Ub[1-75]			biot-6-ahx-Ub.M2[1-75]		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+8H] <sup>+8</sup>	1108,47	1108,51	[M+8H] <sup>+8</sup>	1105,59	1105,56
[M+9H] <sup>+9</sup>	985,42	985,38	[M+9H] <sup>+9</sup>	982,86	982,78
[M+10H] <sup>+10</sup>	886,98	887,04			
biot-6-ahx-Ub.S1[1-75]			biot-6-ahx-Ub.S2[1-75]		
jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zzmierzone
[M+8H] <sup>+8</sup>	1116,98	1116,98	[M+8H] <sup>+8</sup>	1121,60	1121,77
[M+9H] <sup>+9</sup>	992,98	993,11	[M+9H] <sup>+9</sup>	997,09	997,27
[M+10H] <sup>+10</sup>	893,79	893,79	[M+10H] <sup>+10</sup>	897,48	897,64
[M+11H] <sup>+11</sup>	812,62	812,63	[M+11H] <sup>+11</sup>	815,98	816,05

#### 5.7.4. Synteza reaktywnej grupy wiążącej H<sub>2</sub>N-Gly-VME

Do kolby dwuszyjnej o objętości 100 ml z mieszadłką magnetyczną dodano 500 mg *N-tert*-butoksykarbonyloalliloaminy (3,18 mmol) i rozpuszczono w 10 ml bezwodnego toluenu. Następnie do kolby dodano 580 µl akrylanu metylu (6,44 mmol), 42 µl dichlorofenyloboranu (0,33 mmol) oraz 50 mg katalizatora Hoveydy-Grubbsa II generacji. Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 40°C przez 12 h. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml i odparowano rozpuszczalnik. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej stosując żel krzemionkowy jako wypełnienie oraz heksan i AcOEt (5:1) jako eluent (dla produktu R<sub>f</sub> = 0,14). Połączono zebrane frakcje z produktem i odparowano rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem. W celu usunięcia grupy Boc, do kolby z produktem dodano

4,2 ml mieszaniny złożonej z 3 ml TFA, 1 ml DCM i 0,2 ml TIPS. Reakcję prowadzono przez 45 min. Po tym czasie do kolby dodano około 50 ml zimnego Et<sub>2</sub>O i przeniesiono ją do -20°C na 3 h. Następnie zawartość kolby podzielono pomiędzy dwie probówki wirówkowe typu Falcon o pojemności 50 ml, zwirowano, zdekantowano Et<sub>2</sub>O i produkt suszono na powietrzu przez noc. Produkt przechowywano w -20°C. Otrzymano 232,2 mg produktu (wydajność 32%) (m/z<sub>obliczone</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 116,0712, m/z<sub>zmierzone</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 116,0705).

#### 5.7.5. Synteza fluorogenicznej grupy H<sub>2</sub>N-Gly-ACC

Syntezę H<sub>2</sub>N-Gly-ACC przeprowadzono na podłożu stałym używając 100 mg żywicy amidowej Rink Amide AM o stopniu podstawienia 0,74 mmol/g. Żywicę spulchniono w DCM przez 20 min, a następnie przemyto 3 x DMF. Grupę ochronną Fmoc usunięto w cyklach 5 i 25 min za pomocą roztworu 20% piperydyny w DMF, a następnie żywicę przemyto 7 x DMF. Przeprowadzono test ninhydrynowy w celu potwierdzenia obecności wolnych grup aminowych. W probówce wirówkowej typu Falcon o pojemności 15 ml odważono po dwa równoważniki molowe Fmoc-ACC-OH (65 mg) oraz HATU (56 mg), rozpuszczono w 1,5 ml DMF i dodano 2 równoważniki molowe 2,4,6-kolidyny (20 μl). Roztwór dodano do żywicy w reaktorze i prowadzono reakcję z mieszaniem przez 24 h. Po tym czasie przemyto żywicę 3 x DMF i dodano świeżą porcję roztworu Fmoc-ACC-OH, HATU i 2,4,6-kolidyny (po 2 równoważniki molowe) w DMF. Reakcję prowadzono przez 24 h. Żywicę przemyto 3 x DMF, a następnie usunięto grupę ochronną Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF w cyklach 5 i 25 min i przemyto żywicę 7 x DMF. Do żywicy w reaktorze dodano roztwór DMF zawierający po 2,5 równoważnika molowego Fmoc-Gly-OH (55 mg), HATU (70 mg) i 2,4,6-kolidyny (24 μl). Reakcję sprzęgania Fmoc-Gly-OH prowadzono przez noc. Po tym czasie żywicę przemyto 3 x DMF i usunięto grupę ochronną Fmoc za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF w cyklach 5 i 25 min. Żywicę przemyto 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x MeOH i wysuszono nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Produkt został uwolniony z podłoża stałego poprzez dodanie do wysuszonej żywicy mieszaniny TFA, TIPS i H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5, v/v/v). Reakcję prowadzono przez 100 min delikatnie mieszając reaktor z żywicą. Produkt w mieszaninie TFA, TIPS i H<sub>2</sub>O przeniesiono do probówki wirówkowej typu Falcon o pojemności 15 ml, dodano zimny Et<sub>2</sub>O i schładzano w -20°C przez 20 min. Po tym czasie zawartość probówki zwirowano (4400 rpm, 3 min, 4°C) i zdekantowano roztwór znad osadu. Osad przemyto nową porcją Et<sub>2</sub>O. Zwirowano zawartość probówki, odrzucono Et<sub>2</sub>O znad osadu i wysuszono produkt na powietrzu. H<sub>2</sub>N-Gly-ACC używano bez dodatkowego oczyszczania (m/z<sub>obliczone</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 276,10, m/z<sub>zmierzone</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 275,91).

### 5.7.6. Derywatywacja C-końca pochodnych Ub

Reakcje przyłączania H<sub>2</sub>N-Gly-ACC oraz H<sub>2</sub>N-Gly-VME przeprowadzono w taki sam sposób. Procedurę przedstawiono na przykładzie reakcji przyłączania H<sub>2</sub>N-Gly-VME do biot-6-ahx-Ub[1-75]. Do próbki typu Falcon o pojemności 15 ml odważono 6,7 mg biot-6-ahx-Ub[1-75] (0,65 μmol). Peptyd rozpuszczono w 0,3 ml DMSO i dodano 0,6 ml DMF. Falcon umieszczono w łaźni lodowej z NaCl o temperaturze -20°C

Tabela 10. Analiza HRMS otrzymanych substratów oraz markerów chemicznych.

Ub-ACC			Ub.M2-ACC		
jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone
[M+6H] <sup>+6</sup>	1461,6221	1461,8839	[M+5H] <sup>+5</sup>	1749,1354	1749,5309
[M+7H] <sup>+7</sup>	1252,9628	1253,2618	[M+6H] <sup>+6</sup>	1457,7807	1457,9774
[M+8H] <sup>+8</sup>	1096,4684	1096,708	[M+7H] <sup>+7</sup>	1249,6702	1249,8422
[M+9H] <sup>+9</sup>	974,7505	974,9593	[M+8H] <sup>+8</sup>	1093,5874	1093,7565
[M+10H] <sup>+10</sup>	877,3762	877,6428	[M+9H] <sup>+9</sup>	972,1896	972,3176
[M+11H] <sup>+11</sup>	797,7063	797,846	[M+10H] <sup>+10</sup>	875,0713	875,1980
Ub.S1-ACC			Ub.S2-ACC		
jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone
[M+5H] <sup>+5</sup>	1767,3576	1767,8867	[M+4H] <sup>+4</sup>	2218,1876	2218,8503
[M+6H] <sup>+6</sup>	1472,9659	1473,3879	[M+5H] <sup>+5</sup>	1774,7516	1775,1068
[M+7H] <sup>+7</sup>	1262,6861	1263,0165	[M+6H] <sup>+6</sup>	1479,1275	1479,4045
[M+8H] <sup>+8</sup>	1104,9762	1105,1364	[M+7H] <sup>+7</sup>	1267,9675	1268,1271
[M+9H] <sup>+9</sup>	982,3130	982,4749	[M+8H] <sup>+8</sup>	1109,5975	1109,8116
[M+10H] <sup>+10</sup>	884,1824	884,3774			
[M+11H] <sup>+11</sup>	803,8938	804,0812			
[M+12H] <sup>+12</sup>	736,9866	737,1602			
biot-6-ahx-Ub-VME			biot-6-ahx-Ub.M2-VME		
jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone
[M+6H] <sup>+6</sup>	1491,4778	1491,8063	[M+6H] <sup>+6</sup>	1487,6364	1487,8646
[M+7H] <sup>+7</sup>	1278,5535	1278,8268	[M+7H] <sup>+7</sup>	1275,2608	1275,4232
[M+8H] <sup>+8</sup>	1118,8602	1119,2485	[M+8H] <sup>+8</sup>	1115,9791	1116,2777
[M+9H] <sup>+9</sup>	994,6543	994,8820	[M+9H] <sup>+9</sup>	992,0934	992,2054
[M+10H] <sup>+10</sup>	895,2896	895,3971	[M+10H] <sup>+10</sup>	892,9848	893,1783
[M+11H] <sup>+11</sup>	813,9912	814,0791	[M+11H] <sup>+11</sup>	811,8959	812,1168
[M+12H] <sup>+12</sup>	746,2426	746,3508			
biot-6-ahx-Ub.S1-VME			biot-6-ahx-Ub.S2-VME		
jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone	jon	m/Zobliczone	m/Zmierzone
[M+8H] <sup>+8</sup>	1127,3680	1127,5012	[M+8H] <sup>+8</sup>	1131,9893	1132,2377
[M+9H] <sup>+9</sup>	1002,2168	1002,3268	[M+9H] <sup>+9</sup>	1006,3246	1006,6258
[M+10H] <sup>+10</sup>	902,0959	902,2721	[M+10H] <sup>+10</sup>	905,7929	905,9586
[M+11H] <sup>+11</sup>	820,1787	820,2746	[M+11H] <sup>+11</sup>	823,5396	823,6242
[M+12H] <sup>+12</sup>	751,9144	752,0181	[M+12H] <sup>+12</sup>	754,9953	755,0801
			[M+13H] <sup>+13</sup>	696,9962	697,1877

i schładzano przez 20 min z mieszaniem na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie, w celu przekształcenia hydrazynu w azydek, do mieszaniny dodano 10 równoważników molowych azotanu (III) sodu (45  $\mu$ l roztworu  $\text{NaNO}_2$  w DMF:DMSO 2:1 o stężeniu 10 mg/ml) i za pomocą 4 M HCl w dioksanie, pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzono do wartości 3,0 (pH sprawdzano za pomocą papierków wskaźnikowych). Reakcję konwersji hydrazynu w azydek prowadzono w łaźni lodowej z NaCl w  $-20^\circ\text{C}$ , a jej postęp monitorowano za pomocą LC-MS. Po około 30 min, gdy cały substrat został przekształcony w azydek acylu, do mieszaniny reakcyjnej dodano 20 równoważników molowych  $\text{H}_2\text{N-Gly-VME}$  (2,1 mg) oraz 2  $\mu$ l DIPEA. Następnie pH mieszaniny podniesiono do wartości około 9,0 za pomocą DIPEA. Reakcję prowadzono przez 1 h. Po tym czasie przerwano reakcję, a mieszaninę reakcyjną zwirowano (4400 rpm, 3 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Supernatant oddzielono od osadu, który rozpuszczono w 2 ml DMSO. Supernatant oraz osad oczyszczono na HPLC analitycznym na kolumnie Phenomenex Jupiter C4 (średni rozmiar cząstki złoża 10  $\mu\text{m}$ , porowatość 300  $\text{\AA}$ , wymiary 250 x 4,6 mm). Produkty scharakteryzowano za pomocą HRMS (Tabela 10), zliofilizowano i przechowywano w postaci proszku w  $-20^\circ\text{C}$ .

### **5.8. Badanie selektywności substratów pochodnych Ub**

Badanie selektywności substratów względem MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3 przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych Corning. Do dołków nałożono po 1  $\mu$ l roztworów substratów w DMSO. Następnie do dołków z substratami dodano po 99  $\mu$ l roztworów enzymów. Przed dodaniem enzymy preinkubowano przez 30 min w  $37^\circ\text{C}$ . Końcowe stężenia użytych substratów wynosiły 1  $\mu\text{M}$ , natomiast enzymów 5 nM dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz 1 nM dla UCH-L3. Mierzono przyrost fluorescencji z użyciem spektrofлуorymetru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w  $37^\circ\text{C}$ . Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Pomiar powtórzono trzykrotnie.

### **5.9. Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla substratów pochodnych Ub**

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych w dołkach płytki 96-dołkowej Corning przygotowano seryjne rozcieńczenia substratów w buforach dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3. Następnie do dołków z substratami dodano po 80  $\mu$ l roztworów enzymów. Przed dodaniem enzymy preinkubowano przez 30 min w  $37^\circ\text{C}$ . Końcowe stężenia w dołkach dla użytych substratów wynosiły 0,1 – 75  $\mu\text{M}$ , natomiast enzymów 10 nM dla MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz 1 nM dla UCH-L3. Mierzono przyrost fluorescencji z użyciem spektrofлуorymetru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w  $37^\circ\text{C}$ . Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Pomiar powtórzono trzykrotnie.



Parametr  $k_{\text{kat}}/K_M$  wyznaczono w programie GraphPad Prism wykorzystując równanie Michaelisa-Menten.

### 5.10. Detekcja DUBs w lizatach komórkowych

Do badań użyto trzech linii komórkowych: HEK-293T, HeLa oraz A-431. Hodowle komórkowe prowadzono w butelkach do hodowli komórek adhezyjnych, jako medium hodowlanego użyto DMEM z dodatkiem 10% serum płodowego z cieląt (FBS), 2 mM L-glutaminy, 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, wysokiej wilgotności i w temperaturze 37°C. Około 1200000 komórek przeniesiono do probówek Eppendorfa o pojemności 2 ml i przeprowadzono ich lizę za pomocą sonikatora w buforze zawierającym 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 8,0. Następnie probówki Eppendorfa z komórkami zwirowano, a supernatant przeniesiono do nowych probówek Eppendorfa o pojemności 2 ml i przechowywano w -80°C.

Próbki do SDS-PAGE przygotowano poprzez inkubację 20 µl lizatów z 80 µl roztworami markerów chemicznych o różnym stężeniu (końcowe stężenia markerów: 100, 200, 400 nM) przez 30 min w 37°C. Następnie do probówek dodano 50 µl buforu z SDS i DTT i inkubowano przez 5 min w 95°C w celu denaturacji białek. Próbki zwirowano i nałożono po 30 µl do dołków żelu gradientowego Bis-Tris Plus 4-12%. Elektroforezę prowadzono przez 45 min przy napięciu 165 V. Następnie żel przeniesiono do kasety do blottingu. Transfer białek na membranę prowadzono przez 1 h (napięcie 10 V). Po tym czasie membranę inkubowano przez 1 h w 2% roztworze BSA w TBS-T. Przemyto ją w TBS-T (3 x 5 min) i przez 1 h inkubowano z roztworem 10 µg/ml streptawidyny skoniugowanej z fluoroforem Alexa Fluor 647. Membranę przemyto w TBS-T (3 x 5 min). Białka z markerem wizualizowano za pomocą systemu do wizualizacji Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager.

Do wizualizacji UCH-L3 zastosowano technikę immunoblottingu. Membranę z białkami inkubowano przez 24 h w 4°C z mysim przeciwciałem IgG skierowanym przeciwko ludzkiemu UCH-L3 (stężenie przeciwciała 3 µg/ml w TBS-T z 1% BSA). Następnie membranę przemyto TBS-T (3 x 15 min) i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej z kozim drugorzędowym przeciwciałem IgG z Alexa Fluor 488 skierowanym przeciwko mysim przeciwciałom (stężenie przeciwciała 3 µg/ml w TBS-T z 1% BSA). Membranę przemyto TBS-T (3 x 5 min). Białka na membranie wizualizowano za pomocą systemu do wizualizacji Azure Biosystems Sapphire Biomolecular Imager.

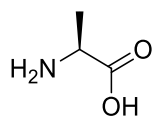
### 5.11. Pomiar inhibicji DUBs przez markery chemiczne

W celu przeprowadzenia pomiaru inhibicji MERS-CoV PL<sup>pro</sup> oraz UCH-L3, w dołkach płytki 96-dołkowej przygotowano po 20  $\mu$ l inhibitorów w różnych stężeniach (końcowe stężenia markerów chemicznych wynosiły 0 – 3  $\mu$ M). Do inhibitorów dodano 60  $\mu$ l enzymów preinkubowanych przez 30 min w 37°C i inkubowano przez 30 min. Końcowe stężenie enzymów wynosiło 50 nM. Następnie do enzymów z inhibitorami dodano po 20  $\mu$ l substratu Ub-ACC (końcowe stężenie 30  $\mu$ M) i mierzono przyrost fluorescencji z użyciem spektrofotometru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w 37°C. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Pomiar powtórzono trzykrotnie.

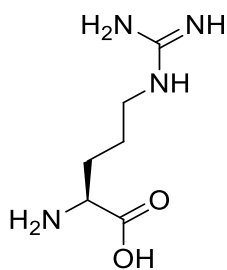
### 5.12. Wyznaczenie $k_{obs}/I$ dla markerów chemicznych

W celu wyznaczenia parametru  $k_{obs}/I$  dla markerów chemicznych, do siedmiu dołków płytki 96-dołkowej, zawierających substrat Ub-ACC (20  $\mu$ l) oraz seryjnie rozcieńczone markery chemiczne (20  $\mu$ l), dodano MERS-CoV PL<sup>pro</sup> (60  $\mu$ l) preinkubowany w buforze przez 30 min w 37°C. Końcowe stężenia reagentów wynosiły: 10 nM enzymu, 25  $\mu$ M substratu oraz 1,8 - 7  $\mu$ M markerów chemicznych. Mierzono przyrost fluorescencji w czasie z użyciem spektrofotometru Molecular Devices Spectramax Gemini XPS przez 30 min w 37°C. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm, a emisji 460 nm. Parametr  $k_{obs}/I$  został wyznaczony w programie GraphPad Prism. Wyznaczono pozorną stałą szybkości reakcji inhibicji drugiego rzędu w warunkach pseudopierwszorzędowych ( $k_{obs(poz)}/I$ ), a następnie, uwzględniając wartość stałej Michaelisa ( $K_M$ ) oraz stężenie ( $[S]$ ) użytego substratu, obliczono stałą  $k_{obs}/I$  stosując zależność  $k_{obs}/I = k_{obs(poz)}/I \times (1+[S]/K_M)$  [215].

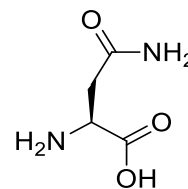
**6. Struktury aminokwasów użytych w bibliotece HyCoSuL oraz w zdefiniowanej bibliotece P2**



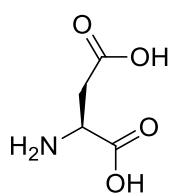
L-Ala



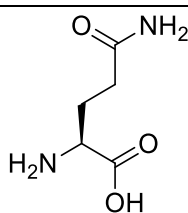
L-Arg



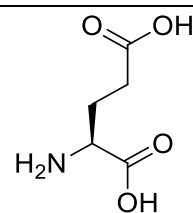
L-Asn



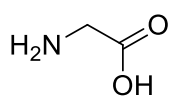
L-Asp



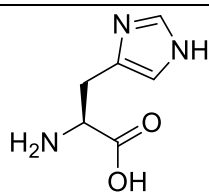
L-Gln



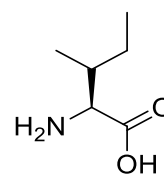
L-Glu



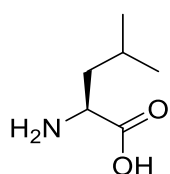
Gly



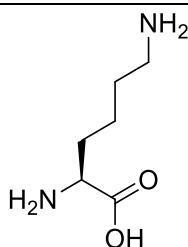
L-His



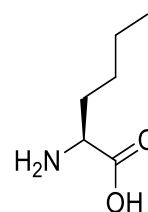
L-Ile



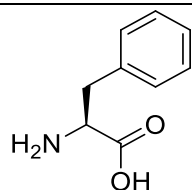
L-Leu



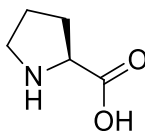
L-Lys



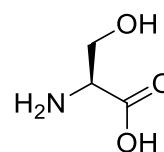
L-Nle



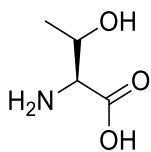
L-Phe



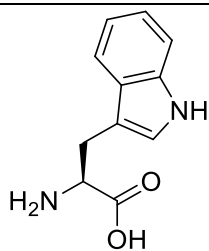
L-Pro



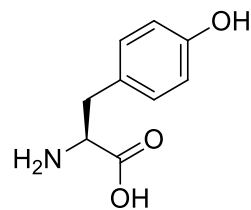
L-Ser



L-Thr

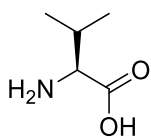


L-Trp

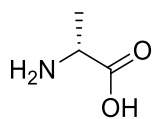


L-Tyr

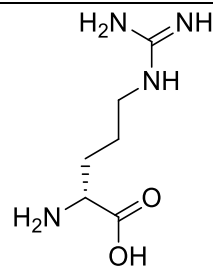
---



L-Val

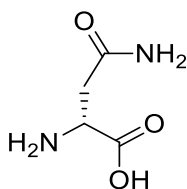


D-Ala

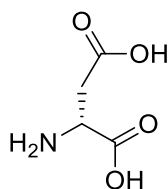


D-Arg

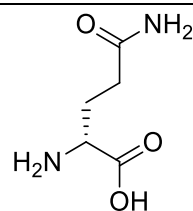
---



D-Asn

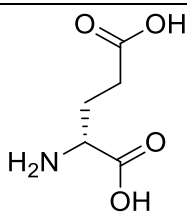


D-Asp

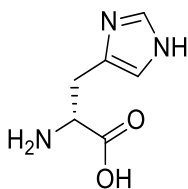


D-Gln

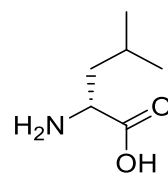
---



D-Glu

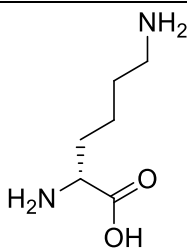


D-His

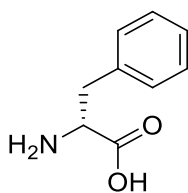


D-Leu

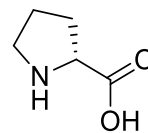
---



D-Lys

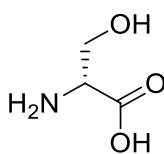


D-Phe

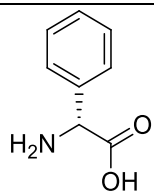


D-Pro

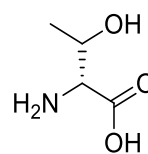
---



D-Ser

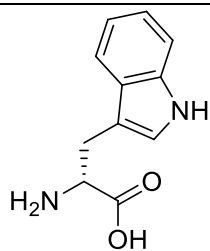


D-Phg

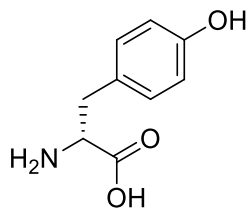


D-Thr

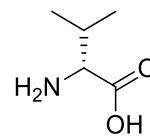
---



D-Trp

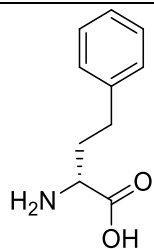


D-Tyr

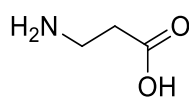


D-Val

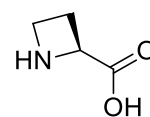
---



D-hPhe

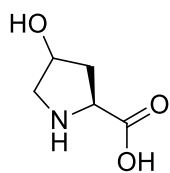


$\beta$ -Ala

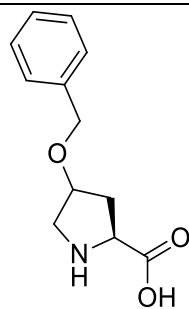


L-Aze

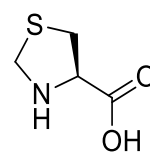
---



L-Hyp

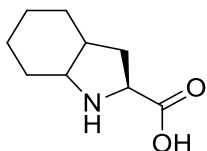


L-Hyp(Bzl)

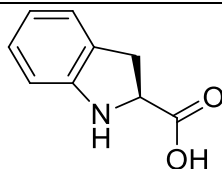


L-Thz

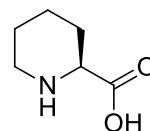
---



L-Oic

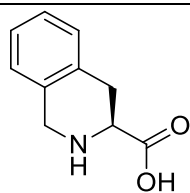


L-Idc

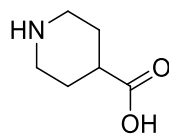


L-Pip

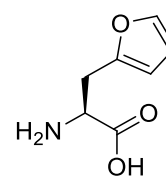
---



L-Tic

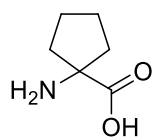


Inp

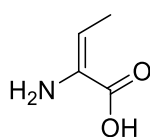


L-2Fal

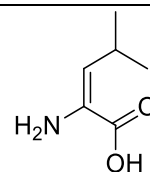
---



AC5C

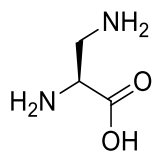


dhAbu

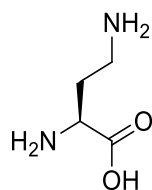


dhLeu

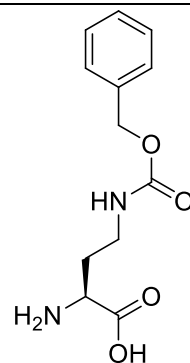
---



L-Dap

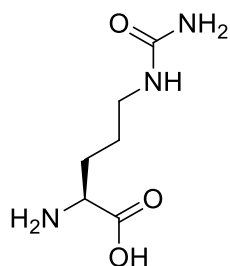


L-Dab

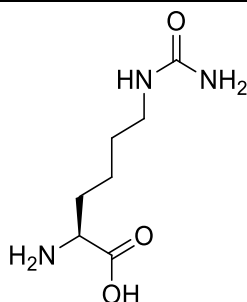


L-Dab(Z)

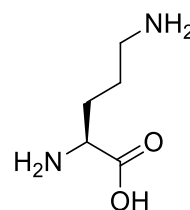
---



L-Cit

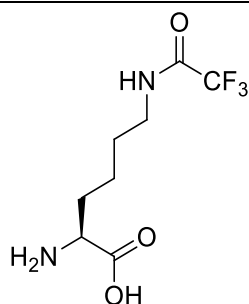


L-hCit

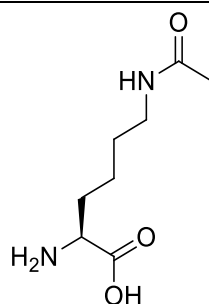


L-Orn

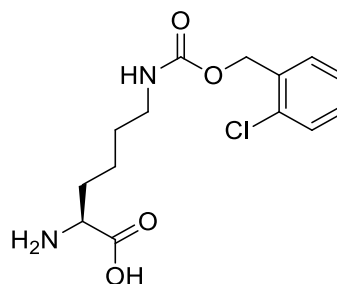
---



L-Lys(TFA)

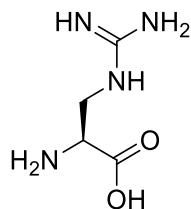


L-Lys(Ac)

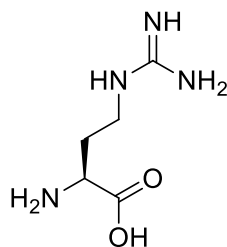


L-Lys(2Cl-Z)

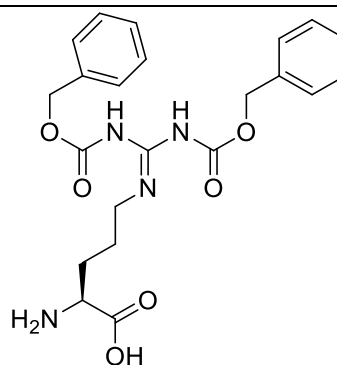
---



L-Agp

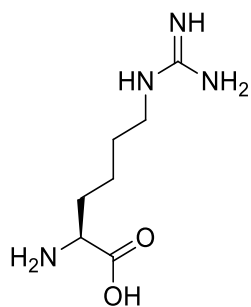


L-Agb

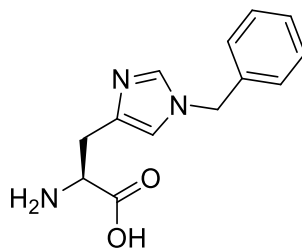


L-Arg(Z)<sub>2</sub>

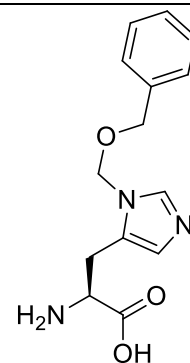
---



L-hArg

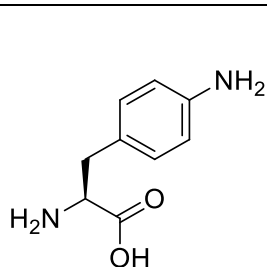


L-His(Bzl)

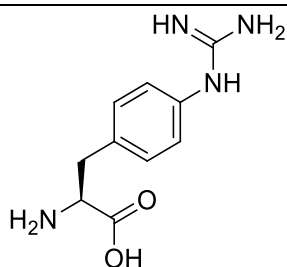


L-His(3-Bom)

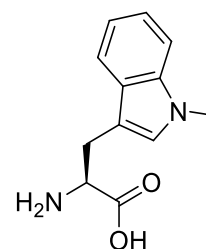
---



L-Phe(4-NH<sub>2</sub>)

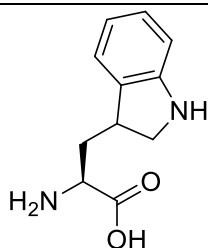


L-Phe(4-guan)

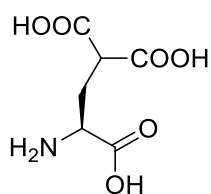


L-Trp(Me)

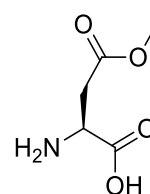
---



L-Dht

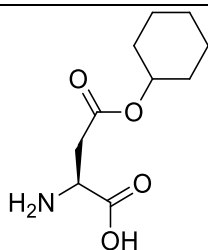


L-Gla

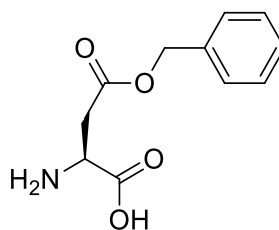


L-Asp(O-Me)

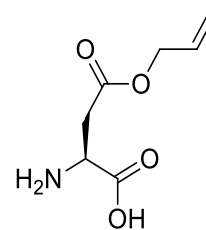
---



L-Asp(O-cHx)

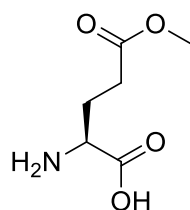


L-Asp(Bzl)

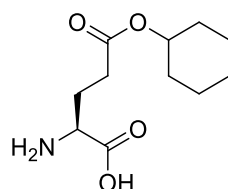


L-Asp(All)

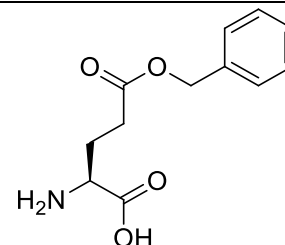
---



L-Glu(O-Me)

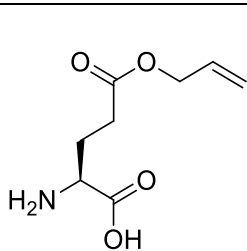


L-Glu(O-cHx)

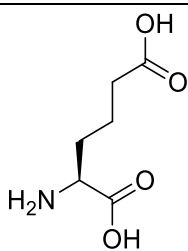


L-Glu(O-Bzl)

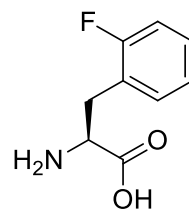
---



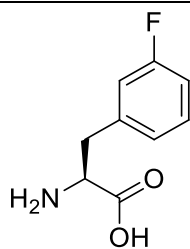
L-Glu(All)



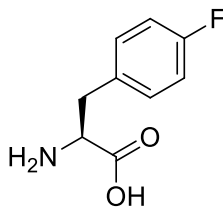
L-Aad



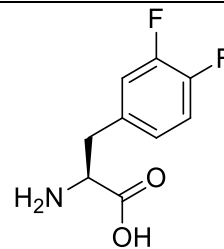
L-Phe(2-F)



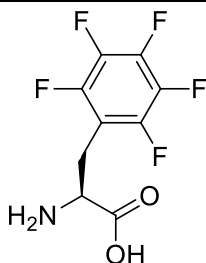
L-Phe(3-F)



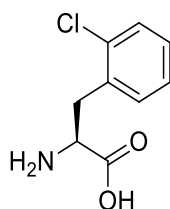
L-Phe(4-F)



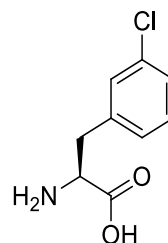
L-Phe(3,4-F<sub>2</sub>)



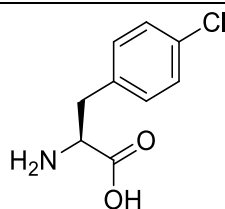
L-Phe(F<sub>5</sub>)



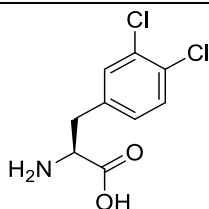
L-Phe(2-Cl)



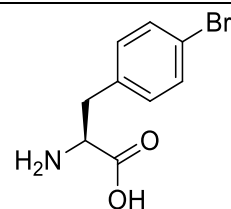
L-Phe(3-Cl)



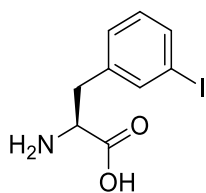
L-Phe(4-Cl)



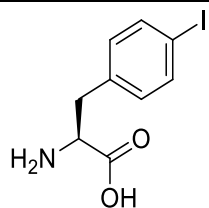
L-Phe(3,4-Cl<sub>2</sub>)



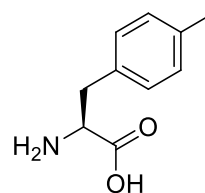
L-Phe(4-Br)



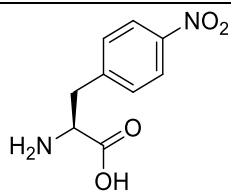
L-Phe(3-I)



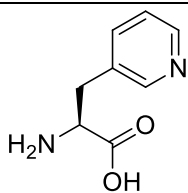
L-Phe(4-I)



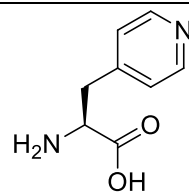
L-Phe(4-Me)



L-Phe(4-NO<sub>2</sub>)



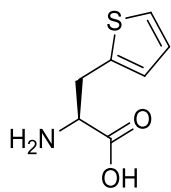
L-3-Pal



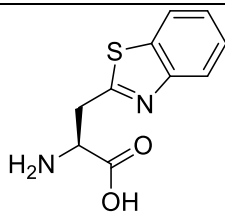
L-4-Pal

---

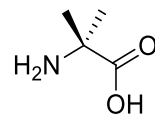




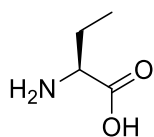
L-Ala(2-th)



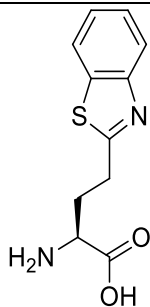
L-Ala(Bth)



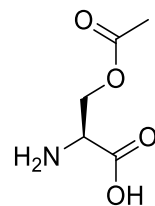
Aib



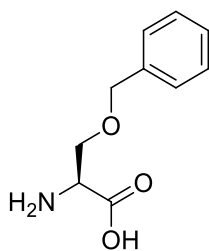
L-Abu



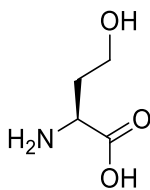
L-Abu(Bth)



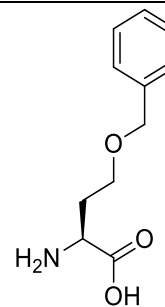
L-Ser(Ac)



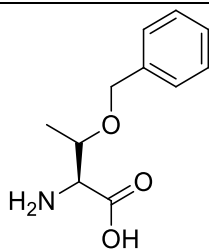
L-Ser(Bzl)



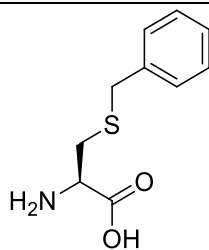
L-hSer



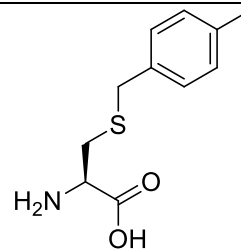
L-hSer(Bzl)



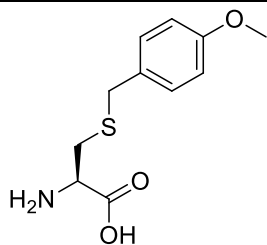
L-Thr(Bzl)



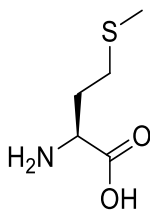
L-Cys(Bzl)



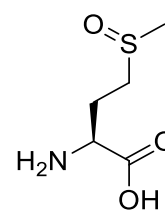
L-Cys(MeBzl)



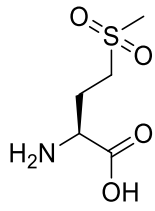
L-Cys(4-MeOBzl)



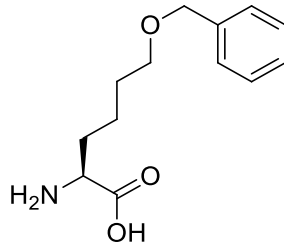
L-Met



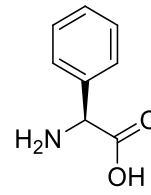
L-Met(O)



L-Met(O<sub>2</sub>)

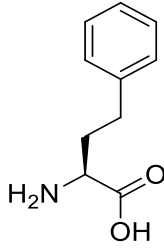


L-Nle(6-OBzl)

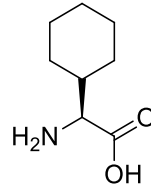


L-Phg

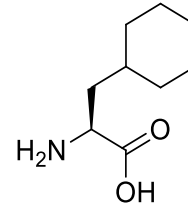
---



L-hPhe

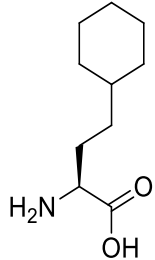


L-Chg

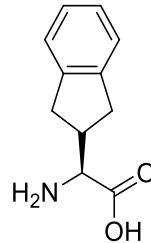


L-Cha

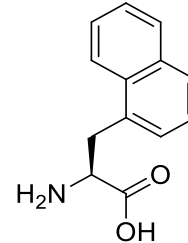
---



L-hCha

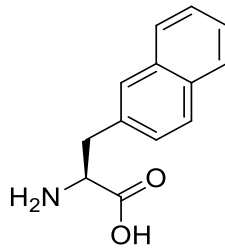


L-Igl

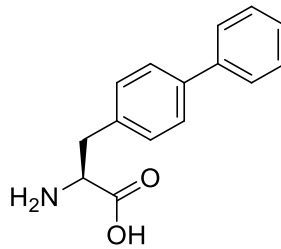


L-1-Nal

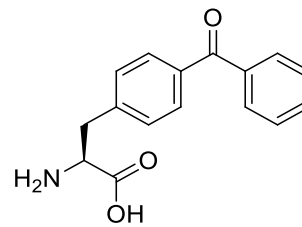
---



L-2-Nal

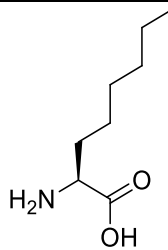


L-Bip

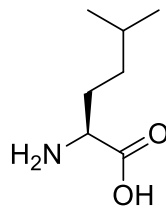


L-Bpa

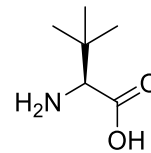
---



L-2-Aoc

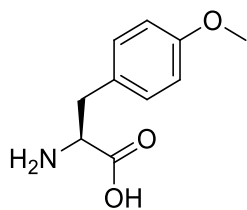


L-hLeu

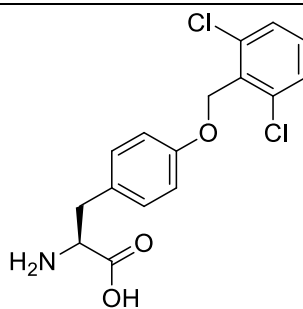


L-Tle

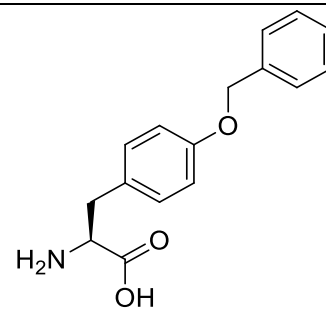
---



L-Tyr(Me)

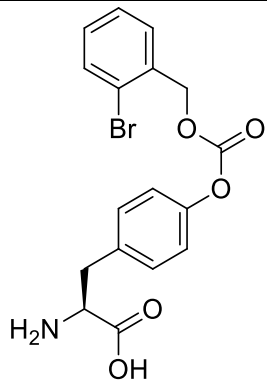


L-(2,6-Cl<sub>2</sub>-Bzl)

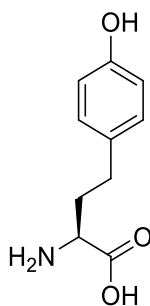


L-Tyr(Bzl)

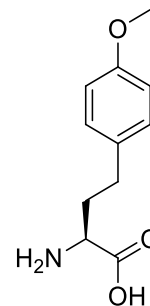
---



L-Tyr(2-Br-Z)

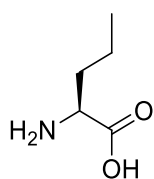


L-hTyr

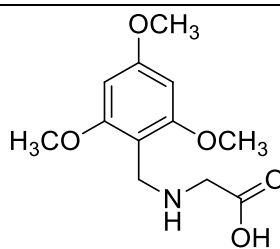


L-hTyr(Me)

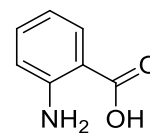
---



L-Nva

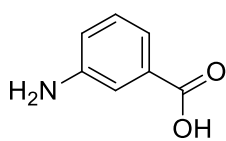


TmbGly

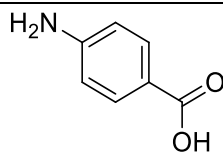


2-Abz

---



3-Abz



4-Abz

---

## 7. Wykaz stosowanych skrótów

ABP – marker chemiczny

Ac – grupa acetylowa

ACC – kwas 7-aminokumaryno-4-octowy

AcOEt – octan etylu

6-ahx – kwas 6-aminoheksanowy

biot – biotylna

Boc – grupa *tert*-butoksykarbonylowa

DCM – dichlorometan

DICI – *N,N'*-diizopropylkarbodiimid

DIPEA – *N,N*-diizopropylloetyloamina

Dmb – grupa 2,4-dimetoksybenzylowa

DMF – *N,N*-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DTT – D,L-ditiotreitol

DUBs – enzymy deubikwitynujące

Et<sub>2</sub>O – eter dietylowy

Fmoc – grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa

Gn\*HCl – chlorowoderek guanidyny

HATU – heksafluorofosforan *O*-(7-azabenzotriazol-1-ylo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy

HBTU – heksafluorofosforan *N,N,N',N'*-tetrametylo-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-ylo)uroniowy

HOBT – 1-hydroksybenzotriazol

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HRMS – wysokorozdzielcza spektrometria mas

HyCoSuL – hybrydowa kombinatoryczna biblioteka substratów

$k_{\text{kat}}$  – liczba obrotów enzymu. Dla enzymów z jednym miejscem aktywnym stała szybkości reakcji przekształcania kompleksu enzym-substrat w produkt wyrażana w s<sup>-1</sup>

$k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$  – stała specyficzności wyrażana w M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

$K_{\text{M}}$  – stała Michaelisa wyrażana w mol/dm<sup>3</sup>

$k_{\text{obs}}/I$  – drugorzędowa stała szybkości reakcji inhibicji w warunkach reakcji pseudopierwszorzędowej wyrażona w M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas

MPAA – kwas 4-merkaptofenyloctowy

pip – piperydyna

RFU/s – jednostki względnego przyrostu fluorescencji na sekundę

SDS – dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – elektroforeza żelowa białek w żelu poliakrylamidowym

TBS-T – sól fizjologiczna buforowana Tris z dodatkiem Tween 20

*t*Bu – grupa *tert*-butylowa

*t*BuSH – 2-metylopropano-2-tiol

TCEP – chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny

TFA – kwas trifluorooctowy

TIPS – triizopropylsilan

Ub – ubikwityna

VA-044 – chlorowodorek 2,2'-azobis-2-(2-imidazolin-2-yl)propanowy

VME – ester winylowo-metylowy

## 8. Dorobek naukowy i aktywność dodatkowa

### Artykuły i rozdziały w monografiach:

1. **M. Żmudziński**, O. Malon, M. Poręba, M. Drąg, *Imaging of proteases using activity-based probes*. Current Opinion in Chemical Biology, 2023, 74, 102299, s. 1-12.
2. S.A. Chen, E. Arutyunova, J. Lu, M.B. Khan, W. Rut, **M. Żmudziński**, S. Shahbaz, J. Iyyathurai, E.W. Moussa, Z. Turner, B. Bai, T. Lamer, J.A. Nieman, J.C. Vederas, O. Julien, M. Drąg, S. Elahi, H.S. Young, M.J. Lemieux, *SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> protease variants of concern display altered viral substrate and cell host target galectin-8 processing but retain sensitivity toward antivirals*. ACS Central Science, 2023, 9(4), s. 696–708.
3. W. Rut, **M. Żmudziński**, M. Drąg, *Design and synthesis of ubiquitin-based chemical tools with unnatural amino acids for selective detection of deubiquitinases*. [w:] *Deubiquitinases: methods and protocols*. red. J.A. Maupin-Furlow, M.J. Edelman, Nowy Jork: Humana Press, 2023, s. 59-78.
4. A.P. Perlińska, A. Stasiulewicz, M.L. Nguyen, K. Świdzka, **M. Żmudziński**, A.W. Maksymiuk, M. Drąg, J. Sulkowska, *Amino acid variants of SARS-CoV-2 papain-like protease have impact on drug binding*. PLoS Computational Biology, 2022, 18(8), e1010667.
5. D.J. Strub, M. Talma, M. Strub, W. Rut, **M. Żmudziński**, W. Brud, J. Neyts, L. Vangeel, L. Zhang, X. Sun, Z. Lv, D. Nayak, S.K. Olsen, R. Hilgenfeld, D. Jochmans, M. Drąg, *Evaluation of the anti-SARS-CoV-2 properties of essential oils and aromatic extracts*. Scientific Reports, 2022, 12, 14230, s. 1-14.
6. I. Nawrot-Hadzik, **M. Żmudziński**, A. Matkowski, R. Preissner, M. Kęsik-Brodacka, J. Hadzik, M. Drąg, R. Abel, *Reynoutria Rhizomes as a Natural Source of SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> Inhibitors—Molecular Docking and In Vitro Study*. Pharmaceuticals, 2021, 14(8), 742, s. 1-19.
7. W. Rut, K. Groborz, L. Zhang, X. Sun, **M. Żmudziński**, B. Pawlik, X. Wang, D. Jochmans, J. Neyts, W. Młynarski, R. Hilgenfeld, M. Drąg, *SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging*. Nature Chemical Biology, 2021, 17, s. 222-228.
8. W. Rut, Z. Lv, **M. Żmudziński**, S. Patchett, D. Nayak, S.J. Snipas, F. El Oualid, T.T. Huang, M. Békés, M. Drąg, S.K. Olsen, *Activity profiling and crystal structures of*

*inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design.* Science Advances, 2020, 6(42), eabd4596.

9. W. Rut, **M. Żmudziński**, S.J. Snipas, M. Békés, T.T. Huang, M. Drąg, *Engineered unnatural ubiquitin for optimal detection of deubiquitinating enzymes.* Chemical Science, 2020, 11, 6058-6069.

#### **Wystąpienia konferencyjne:**

1. Autor komunikatu ustnego: **M. Żmudziński**, W. Rut, S.J. Snipas, M. Békés, T.T. Huang, M. Drąg, *C-terminal modified ubiquitin derivatives as novel selective activity-based probes for deubiquitinating enzymes.* 40th Winter School on Proteases and Their Inhibitors, 2023, Tiers am Rosengarten, Włochy
2. Autor komunikatu ustnego: **M. Żmudziński**, W. Rut, S.J. Snipas, M. Békés, T.T. Huang, M. Drąg, *Engineered unnatural ubiquitin for optimal detection of deubiquitinating enzymes.* 37th Winter School on Proteases and Their Inhibitors, 2020, Tiers am Rosengarten, Włochy
3. Autor komunikatu ustnego: **M. Żmudziński**, W. Rut, M. Drąg, *Strategy of ubiquitin derivatives synthesis for DUBs investigation.* XVII Ogólnopolskie Seminarium "Na pograniczu chemii i biologii", 2019, Jastrzębia Góra, Polska
4. Autor komunikatu ustnego: **M. Żmudziński**, W. Rut, M. Drąg, *Synthesis strategy of ubiquitin derivatives for investigation of DUBs.* 36th Winter School on Proteases and Their Inhibitors, 2019, Tiers am Rosengarten, Włochy
5. Autor komunikatu ustnego: **M. Żmudziński**, W. Rut, M. Drąg, *Fluorogenic, peptidic substrates in investigation of human 20s proteasome  $\beta 5$  subunit substrate specificity.* XII Copernican International Young Scientists Conference, 2018, Toruń, Polska

#### **Nagrody, wyróżnienia i granty:**

1. Stypendium z Funduszu stypendialnego Politechniki Wrocławskiej w roku akademickim 2022/2023
2. Stypendium naukowe Rektora dla najlepszych doktorantów Politechniki Wrocławskiej, edycja: 2017, 2020
3. Stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych, edycja: 2017, 2020, 2021
4. Zdobywca nagrody Super Diament Wrocławia przyznanej podczas 43. Wrocławskiej Księgi Pamięci

5. I miejsce za najlepsze prezentacje ustne na konferencji XVII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii” 2019, Jastrzębia Góra
6. 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 – 29.06.2023)



## 9. Piśmiennictwo

1. G.P. Moss. *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*. 17/02/2022 [dostęp dnia: 31/03/2022]; Dostęp online: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>.
2. N.D. Rawlings, et al., *The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database*. *Nucleic Acids Res*, 2018. **46**(D1): s. D624-D632.
3. J.G. Perez-Silva, et al., *The Degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(D1): s. D351-355.
4. N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman, *Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(44): s. 38321-38328.
5. C. Lopez-Otin, J.S. Bond, *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): s. 30433-30437.
6. B. Turk, *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(9): s. 785-799.
7. J.E. Frampton, D.H. Peters, *Ramipril*. *Drugs*, 1995. **49**(3): s. 440-466.
8. C. Jensen, P. Herold, H.R. Brunner, *Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(5): s. 399-410.
9. C.G. Smith, J.R. Vane, *The discovery of captopril*. *FASEB J*, 2003. **17**(8): s. 788-789.
10. P.C. Kam, N. Kaur, C.L. Thong, *Direct thrombin inhibitors: pharmacology and clinical relevance*. *Anaesthesia*, 2005. **60**(6): s. 565-574.
11. C.H. Yeh, J.C. Fredenburgh, J.I. Weitz, *Oral direct factor Xa inhibitors*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): s. 1069-1078.
12. V. Gupta, S. Kalra, *Choosing a gliptin*. *Indian J Endocrinol Metab*, 2011. **15**(4): s. 298-308.
13. P. Saavedra-Garcia, F. Martini, H.W. Auner, *Proteasome inhibition in multiple myeloma: lessons for other cancers*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020. **318**(3): s. C451-C462.
14. D.R. Owen, et al., *An oral SARS-CoV-2 M(pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19*. *Science*, 2021. **374**(6575): s. 1586-1593.
15. Z. Lv, Y. Chu, Y. Wang, *HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity*. *HIV AIDS (Auckl)*, 2015. **7**: s. 95-104.
16. A. Ascione, *Boceprevir in chronic hepatitis C infection: a perspective review*. *Ther Adv Chronic Dis*, 2012. **3**(3): s. 113-121.
17. M. Poreba, et al., *Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(9): s. 1482-1492.
18. M. Poreba, et al., *Unnatural amino acids increase activity and specificity of synthetic substrates for human and malarial cathepsin C*. *Amino Acids*, 2014. **46**(4): s. 931-943.
19. C.G. Buss, et al., *Protease activity sensors noninvasively classify bacterial infections and antibiotic responses*. *EBioMedicine*, 2018. **38**: s. 248-256.
20. H.Y. Hu, et al., *In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014. **53**(29): s. 7669-7673.
21. J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*. 2011, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.

22. M. Verdoes, et al., *Improved quenched fluorescent probe for imaging of cysteine cathepsin activity*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(39): s. 14726-14730.
23. E. Segal, et al., *Detection of intestinal cancer by local, topical application of a quenched fluorescence probe for cysteine cathepsins*. Chem Biol, 2015. **22**(1): s. 148-158.
24. M. Drag, et al., *Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes)*. Biochem J, 2008. **415**(3): s. 367-375.
25. D.S. Hewings, et al., *Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights*. FEBS J, 2017. **284**(10): s. 1555-1576.
26. S. Vijay-kumar, C.E. Bugg, W.J. Cook, *Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution*. Journal of Molecular Biology, 1987. **194**(3): s. 531-544.
27. G. Goldstein, et al., *Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(1): s. 11-15.
28. A. Hershko, et al., *Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): s. 1783-1786.
29. A. Ciechanover, et al., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): s. 1365-1368.
30. *The Nobel Prize in Chemistry 2004*. [dostęp dnia: 02.04.2022]; Dostęp online: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2004/summary/>.
31. C.P. Grou, et al., *The de novo synthesis of ubiquitin: identification of deubiquitinases acting on ubiquitin precursors*. Sci Rep, 2015. **5**: s. 12836.
32. A.G. van der Veen, H.L. Ploegh, *Ubiquitin-like proteins*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: s. 323-357.
33. A. Hershko, A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: s. 425-479.
34. B.A. Schulman, J.W. Harper, *Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): s. 319-331.
35. L. Buetow, D.T. Huang, *Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(10): s. 626-642.
36. D. Komander, M. Rape, *The ubiquitin code*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: s. 203-229.
37. G.S. McDowell, A. Philpott, *Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(8): s. 1833-1842.
38. J.S. Thrower, et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. EMBO J, 2000. **19**(1): s. 94-102.
39. K.E. Wickliffe, et al., *K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(11): s. 656-663.
40. O. Braten, et al., *Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(32): s. E4639-4647.
41. K. Haglund, et al., *Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): s. 461-466.
42. J.H. Vissers, et al., *The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs*. Cell Div, 2008. **3**: s. 8.

43. A.P. VanDemark, et al., *Molecular Insights into Polyubiquitin Chain Assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer*. Cell, 2001. **105**(6): s. 711-720.
44. T. Kirisako, et al., *A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains*. EMBO J, 2006. **25**(20): s. 4877-4887.
45. F. Tokunaga, K. Iwai, *LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses*. Microbes Infect, 2012. **14**(7-8): s. 563-572.
46. L. Herhaus, I. Dikic, *Expanding the ubiquitin code through post-translational modification*. EMBO Rep, 2015. **16**(9): s. 1071-1083.
47. D.A. Perez Berrocal, et al., *Hybrid Chains: A Collaboration of Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modifiers Introducing Cross-Functionality to the Ubiquitin Code*. Front Chem, 2019. **7**: s. 931.
48. C.M. Guzzo, M.J. Matunis, *Expanding SUMO and ubiquitin-mediated signaling through hybrid SUMO-ubiquitin chains and their receptors*. Cell Cycle, 2013. **12**(7): s. 1015-1017.
49. D. Kwasna, et al., *Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability*. Mol Cell, 2018. **70**(1): s. 150-164 e156.
50. P. Haahr, et al., *ZUFSP Deubiquitylates K63-Linked Polyubiquitin Chains to Promote Genome Stability*. Mol Cell, 2018. **70**(1): s. 165-174 e166.
51. J.A. Harrigan, et al., *Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(1): s. 57-78.
52. A. Pal, N.J. Donato, *Ubiquitin-specific proteases as therapeutic targets for the treatment of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(5): s. 461.
53. C. Rong, et al., *Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolases and Human Malignancies: The Novel Prognostic and Therapeutic Implications for Head and Neck Cancer*. Front Oncol, 2020. **10**: s. 592501.
54. C. Zeng, et al., *Machado-Joseph Deubiquitinases: From Cellular Functions to Potential Therapy Targets*. Front Pharmacol, 2020. **11**: s. 1311.
55. A.L. Carvalho, A. Silva, S. Macedo-Ribeiro, *Polyglutamine-Independent Features in Ataxin-3 Aggregation and Pathogenesis of Machado-Joseph Disease*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1049**: s. 275-288.
56. T.E.T. Mevissen, D. Komander, *Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: s. 159-192.
57. S.A. Abdul Rehman, et al., *MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes*. Mol Cell, 2016. **63**(1): s. 146-155.
58. Y. Guo, et al., *Structural and functional characterization of ubiquitin variant inhibitors for the JAMM-family deubiquitinases STAMBIP and STAMBPL1*. J Biol Chem, 2021. **297**(4): s. 101107.
59. D. Komander, M.J. Clague, S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): s. 550-563.
60. E. Koulich, X. Li, G.N. DeMartino, *Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(3): s. 1072-1082.
61. H. Tran, et al., *Trabid, a new positive regulator of Wnt-induced transcription with preference for binding and cleaving K63-linked ubiquitin chains*. Genes Dev, 2008. **22**(4): s. 528-542.
62. T. Csizmadia, P. Low, *The Role of Deubiquitinating Enzymes in the Various Forms of Autophagy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(12).

63. M. Berthouze, et al., *The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization*. EMBO J, 2009. **28**(12): s. 1684-1696.
64. B. Hasdemir, et al., *Endosomal deubiquitinating enzymes control ubiquitination and down-regulation of protease-activated receptor 2*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): s. 28453-28466.
65. M. Li, et al., *Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization*. Nature, 2002. **416**(6881): s. 648-653.
66. Z. Du, et al., *DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination*. Sci Signal, 2010. **3**(146): s. ra80.
67. M.J. Clague, J.M. Coulson, S. Urbe, *Cellular functions of the DUBs*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): s. 277-286.
68. A.F. Schubert, et al., *Identification and characterization of diverse OTU deubiquitinases in bacteria*. EMBO J, 2020. **39**(15): s. e105127.
69. B.A. Bailey-Elkin, et al., *Structure and Function of Viral Deubiquitinating Enzymes*. J Mol Biol, 2017. **429**(22): s. 3441-3470.
70. Y.C. Perng, D.J. Lenschow, *ISG15 in antiviral immunity and beyond*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(7): s. 423-439.
71. A.Y. Amerik, M. Hochstrasser, *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): s. 189-207.
72. C. Ndubaku, V. Tsui, *Inhibiting the deubiquitinating enzymes (DUBs)*. J Med Chem, 2015. **58**(4): s. 1581-1595.
73. P. D'Arcy, X. Wang, S. Linder, *Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy*. Pharmacol Ther, 2015. **147**: s. 32-54.
74. K.H. Lim, J.Y. Joo, K.H. Baek, *The potential roles of deubiquitinating enzymes in brain diseases*. Ageing Res Rev, 2020. **61**: s. 101088.
75. Z. Shen, et al., *Design of SARS-CoV-2 PLpro Inhibitors for COVID-19 Antiviral Therapy Leveraging Binding Cooperativity*. J Med Chem, 2022. **65**(4): s. 2940-2955.
76. J.C. Powers, et al., *Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases*. Chem Rev, 2002. **102**(12): s. 4639-4750.
77. C.T. Wallington-Beddoe, et al., *Resistance to proteasome inhibitors and other targeted therapies in myeloma*. Br J Haematol, 2018. **182**(1): s. 11-28.
78. Y. Song, et al., *Deubiquitylating Enzyme Rpn11/POH1/PSMD14 As Therapeutic Target in Multiple Myeloma*. Blood, 2016. **128**(22): s. 4469-4469.
79. Z. Tian, et al., *A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance*. Blood, 2014. **123**(5): s. 706-716.
80. J. Hurst-Kennedy, L.S. Chin, L. Li, *Ubiquitin C-terminal hydrolase II in tumorigenesis*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: s. 123706.
81. M. Mondal, et al., *UCHL1 as a novel target in breast cancer: emerging insights from cell and chemical biology*. Br J Cancer, 2022. **126**(1): s. 24-33.
82. N. Panyain, et al., *Discovery of a Potent and Selective Covalent Inhibitor and Activity-Based Probe for the Deubiquitylating Enzyme UCHL1, with Antifibrotic Activity*. J Am Chem Soc, 2020. **142**(28): s. 12020-12026.
83. N.J. Schauer, et al., *Advances in Discovering Deubiquitinating Enzyme (DUB) Inhibitors*. J Med Chem, 2020. **63**(6): s. 2731-2750.
84. E.K. Rowinsky, et al., *Phase I study of the protein deubiquitinase inhibitor VLX1570 in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma*. Invest New Drugs, 2020. **38**(5): s. 1448-1453.

85. J.R. Riordan, *CFTR function and prospects for therapy*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: s. 701-726.
86. N.J. Henning, et al., *Deubiquitinase-targeting chimeras for targeted protein stabilization*. Nat Chem Biol, 2022. **18**(4): s. 412-421.
87. M. Schapira, et al., *Targeted protein degradation: expanding the toolbox*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(12): s. 949-963.
88. D.A. Boudreaux, et al., *Contribution of active site glutamine to rate enhancement in ubiquitin C-terminal hydrolases*. FEBS J, 2012. **279**(6): s. 1106-1118.
89. T. Yao, et al., *Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): s. 994-1002.
90. F.I. Andersson, et al., *Untangling the folding mechanism of the 5(2)-knotted protein UCH-L3*. FEBS J, 2009. **276**(9): s. 2625-2635.
91. E.M. Frickel, et al., *Apicomplexan UCHL3 retains dual specificity for ubiquitin and Nedd8 throughout evolution*. Cell Microbiol, 2007. **9**(6): s. 1601-1610.
92. R. Setsuie, et al., *Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3*. Neurochem Int, 2009. **54**(5-6): s. 314-321.
93. C.N. Larsen, B.A. Krantz, K.D. Wilkinson, *Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases*. Biochemistry, 1998. **37**(10): s. 3358-3368.
94. M. Wang, et al., *Ubiquitin Carboxy-Terminal HydrolaseL3 Correlates with Human Sperm Count, Motility and Fertilization*. PLoS One, 2016. **11**(10): s. e0165198.
95. Y. Sano, et al., *Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice*. Am J Pathol, 2006. **169**(1): s. 132-141.
96. M. Suzuki, R. Setsuie, K. Wada, *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase l3 promotes insulin signaling and adipogenesis*. Endocrinology, 2009. **150**(12): s. 5230-5239.
97. R. Setsuie, et al., *Skeletal muscles of Uchl3 knockout mice show polyubiquitinated protein accumulation and stress responses*. Neurochem Int, 2010. **56**(8): s. 911-918.
98. J.Y. Kim, J.M. Lee, J.Y. Cho, *Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 regulates Smad1 ubiquitination and osteoblast differentiation*. FEBS Lett, 2011. **585**(8): s. 1121-1126.
99. F.J. Dennissen, et al., *Mutant ubiquitin (UBB+1) associated with neurodegenerative disorders is hydrolyzed by ubiquitin C-terminal hydrolase L3 (UCH-L3)*. FEBS Lett, 2011. **585**(16): s. 2568-2574.
100. U. Rolen, et al., *Activity profiling of deubiquitinating enzymes in cervical carcinoma biopsies and cell lines*. Mol Carcinog, 2006. **45**(4): s. 260-269.
101. Y. Miyoshi, et al., *High expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 and -L3 mRNA predicts early recurrence in patients with invasive breast cancer*. Cancer Sci, 2006. **97**(6): s. 523-529.
102. M.H. Zhang, et al., *UCHL3 promotes ovarian cancer progression by stabilizing TRAF2 to activate the NF-kappaB pathway*. Oncogene, 2020. **39**(2): s. 322-333.
103. Z. Song, et al., *UCHL3 promotes pancreatic cancer progression and chemoresistance through FOXM1 stabilization*. Am J Cancer Res., 2019. **9**(9): s. 1970-1981.
104. H.M. Song, J.E. Lee, J.H. Kim, *Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 regulates EMT process and cancer metastasis in prostate cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **452**(3): s. 722-727.
105. S.C. Johnston, et al., *Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution*. EMBO J, 1997. **16**(13): s. 3787-3796.
106. WHO. *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*. 2019 [dostęp dnia: 08.05.2022]; Dostęp online: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)).



107. E. de Wit, et al., *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(8): s. 523-534.
108. ECDC. *Geographical distribution of confirmed MERS-CoV cases by reporting country from April 2012 to 3 May 2022*. 2022 [dostęp dnia: 8.05.2022]; Dostęp online: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-confirmed-mers-cov-cases-reporting-country-april-2012-1>.
109. J. Lei, Y. Kusov, R. Hilgenfeld, *Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein*. Antiviral Res, 2018. **149**: s. 58-74.
110. K. Ratia, et al., *Coronavirus Papain-like Peptidases*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edn*. 2013. p. 2195-2199.
111. Y.M. Baez-Santos, et al., *Catalytic function and substrate specificity of the papain-like protease domain of nsp3 from the Middle East respiratory syndrome coronavirus*. J Virol, 2014. **88**(21): s. 12511-12527.
112. J. Lei, et al., *Crystal structure of the papain-like protease of MERS coronavirus reveals unusual, potentially druggable active-site features*. Antiviral Res, 2014. **109**: s. 72-82.
113. B.A. Bailey-Elkin, et al., *Crystal structure of the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) papain-like protease bound to ubiquitin facilitates targeted disruption of deubiquitinating activity to demonstrate its role in innate immune suppression*. J Biol Chem, 2014. **289**(50): s. 34667-34682.
114. X. Yang, et al., *Proteolytic processing, deubiquitinase and interferon antagonist activities of Middle East respiratory syndrome coronavirus papain-like protease*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 3): s. 614-626.
115. A.M. Mielech, et al., *MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities*. Virology, 2014. **450-451**: s. 64-70.
116. H. Lee, et al., *Inhibitor recognition specificity of MERS-CoV papain-like protease may differ from that of SARS-CoV*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(6): s. 1456-1465.
117. S. Yuan, et al., *Targeting papain-like protease for broad-spectrum coronavirus inhibition*. Protein Cell, 2022.
118. K.W. Cheng, et al., *Thiopurine analogs and mycophenolic acid synergistically inhibit the papain-like protease of Middle East respiratory syndrome coronavirus*. Antiviral Res, 2015. **115**: s. 9-16.
119. M.H. Lin, et al., *Disulfiram can inhibit MERS and SARS coronavirus papain-like proteases via different modes*. Antiviral Res, 2018. **150**: s. 155-163.
120. I. Schechter, A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **27**(2): s. 157-162.
121. M. Békés, et al., *SARS hCoV papain-like protease is a unique Lys48 linkage-specific di-distributive deubiquitinating enzyme*. Biochem J, 2015. **468**(2): s. 215-226.
122. D.A. Boudreaux, et al., *Ubiquitin vinyl methyl ester binding orients the misaligned active site of the ubiquitin hydrolase UCHL1 into productive conformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): s. 9117-9122.
123. J.M. Winget, T. Mayor, *The diversity of ubiquitin recognition: hot spots and varied specificity*. Mol Cell, 2010. **38**(5): s. 627-635.
124. S.A. Abdul Rehman, et al., *Mechanism of activation and regulation of deubiquitinase activity in MINDY1 and MINDY2*. Mol Cell, 2021. **81**(20): s. 4176-4190 e4176.
125. R.B. Merrifield, *Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1985. **24**(10): s. 799-810.
126. Á. Furka, *Combinatorial chemistry: 20 years on....* Drug Discovery Today, 2002. **7**(1): s. 1-4.

127. J.M. Ostresh, et al., *Peptide libraries: determination of relative reaction rates of protected amino acids in competitive couplings*. Biopolymers, 1994. **34**(12): s. 1681-1689.
128. E.L. Schneider, C.S. Craik, *Positional scanning synthetic combinatorial libraries for substrate profiling*. Methods Mol Biol, 2009. **539**: s. 59-78.
129. Y. Choe, et al., *Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): s. 12824-12832.
130. P. Kasperkiewicz, et al., *Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(7): s. 2518-2523.
131. M. Poreba, G.S. Salvesen, M. Drag, *Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity*. Nat Protoc, 2017. **12**(10): s. 2189-2214.
132. S. Modrzycka, et al., *Parallel imaging of coagulation pathway proteases activated protein C, thrombin, and factor Xa in human plasma*. Chemical Science, 2022.
133. W. Rut, et al., *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 Res, 2020. **175**: s. 104731.
134. B.M. Babin, et al., *Leveraging Peptide Substrate Libraries to Design Inhibitors of Bacterial Lon Protease*. ACS Chem Biol, 2019. **14**(11): s. 2453-2462.
135. J.R. Lakowicz, *Quenching of Fluorescence*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006, Springer: Boston, MA. p. 277-330.
136. M. Poreba, et al., *Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families*. Sci Rep, 2017. **7**: s. 43135.
137. S. Chen, J.J. Yim, M. Bogyo, *Synthetic and biological approaches to map substrate specificities of proteases*. Biol Chem, 2019. **401**(1): s. 165-182.
138. P. Kasperkiewicz, et al., *Determination of extended substrate specificity of the MALTI as a strategy for the design of potent substrates and activity-based probes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): s. 15998.
139. M. Wysocka, et al., *Design and synthesis of new substrates of HtrA2 protease*. Anal Biochem, 2015. **475**: s. 44-52.
140. S.S. Cotrin, et al., *Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B*. Analytical Biochemistry, 2004. **335**(2): s. 244-252.
141. P.A. Bersanetti, et al., *Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides for defining substrate specificity of the angiotensin I-converting enzyme and development of selective C-domain substrates*. Biochemistry, 2004. **43**(50): s. 15729-15736.
142. W. Rut, et al., *Selective Substrates and Activity-Based Probes for Imaging of the Human Constitutive 20S Proteasome in Cells and Blood Samples*. J Med Chem, 2018. **61**(12): s. 5222-5234.
143. M. Vizovisek, et al., *Current trends and challenges in proteomic identification of protease substrates*. Biochimie, 2016. **122**: s. 77-87.
144. O. Schilling, C.M. Overall, *Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(6): s. 685-694.

145. O. Kleifeld, et al., *Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates*. Nat Protoc, 2011. **6**(10): s. 1578-1611.
146. R. Vidmar, et al., *Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity switch of legumain*. EMBO J, 2017. **36**(16): s. 2455-2465.
147. A.J. O'Donoghue, et al., *Global identification of peptidase specificity by multiplex substrate profiling*. Nat Methods, 2012. **9**(11): s. 1095-1100.
148. H. Li, et al., *Structure- and function-based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors*. Nature, 2016. **530**(7589): s. 233-236.
149. A.J. O'Donoghue, et al., *Destructin-1 is a collagen-degrading endopeptidase secreted by Pseudogymnoascus destructans, the causative agent of white-nose syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(24): s. 7478-7483.
150. D.J. Matthews, J.A. Wells, *Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display*. Science, 1993. **260**(5111): s. 1113-1117.
151. D. Deperthes, *Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity*. Biol Chem, 2002. **383**(7-8): s. 1107-1112.
152. M. Poreba, M. Drag, *Current strategies for probing substrate specificity of proteases*. Curr Med Chem, 2010. **17**(33): s. 3968-3995.
153. C.A. Kretz, et al., *High throughput protease profiling comprehensively defines active site specificity for thrombin and ADAMTS13*. Sci Rep, 2018. **8**(1): s. 2788.
154. M. Gallwitz, et al., *The extended cleavage specificity of human thrombin*. PLoS One, 2012. **7**(2): s. e31756.
155. Z.Q. Beck, et al., *Identification of efficiently cleaved substrates for HIV-1 protease using a phage display library and use in inhibitor development*. Virology, 2000. **274**(2): s. 391-401.
156. F. El Oualid, et al., *Chemical synthesis of ubiquitin, ubiquitin-based probes, and diubiquitin*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(52): s. 10149-10153.
157. K.S. Kumar, et al., *Total chemical synthesis of di-ubiquitin chains*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(48): s. 9126-9131.
158. R. Yang, et al., *Native chemical ubiquitination using a genetically incorporated azidonorleucine*. Chem Commun (Camb), 2014. **50**(59): s. 7971-7974.
159. S. Virdee, et al., *Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(10): s. 750-757.
160. K.S. Kumar, et al., *Total chemical synthesis of a 304 amino acid K48-linked tetraubiquitin protein*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(27): s. 6137-6141.
161. M.A. Michel, D. Komander, P.R. Elliott, *Enzymatic Assembly of Ubiquitin Chains*. Methods Mol Biol, 2018. **1844**: s. 73-84.
162. T.E. Mevissen, et al., *OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis*. Cell, 2013. **154**(1): s. 169-184.
163. A.C. Faesen, et al., *The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types*. Chem Biol, 2011. **18**(12): s. 1550-1561.
164. W. Rut, et al., *Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design*. Sci Adv, 2020. **6**(42).
165. T. Klemm, et al., *Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2*. EMBO J, 2020. **39**(18): s. e106275.
166. V. Turk, et al., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): s. 68-88.



167. M. Poreba, et al., *Multiplexed Probing of Proteolytic Enzymes Using Mass Cytometry-Compatible Activity-Based Probes*. J Am Chem Soc, 2020. **142**(39): s. 16704-16715.
168. L.E. Sanman, M. Bogyo, *Activity-based profiling of proteases*. Annu Rev Biochem, 2014. **83**: s. 249-273.
169. M. Poreba, et al., *Counter Selection Substrate Library Strategy for Developing Specific Protease Substrates and Probes*. Cell Chem Biol, 2016. **23**(8): s. 1023-1035.
170. L.E. Edgington-Mitchell, M. Bogyo, M. Verdoes, *Live Cell Imaging and Profiling of Cysteine Cathepsin Activity Using a Quenched Activity-Based Probe*. Methods Mol Biol, 2017. **1491**: s. 145-159.
171. A. Borodovsky, et al., *Small-molecule inhibitors and probes for ubiquitin- and ubiquitin-like-specific proteases*. Chembiochem, 2005. **6**(2): s. 287-291.
172. A. Borodovsky, et al., *A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14*. EMBO J, 2001. **20**(18): s. 5187-5196.
173. A. Borodovsky, et al., *Chemistry-Based Functional Proteomics Reveals Novel Members of the Deubiquitinating Enzyme Family*. Chemistry & Biology, 2002. **9**(10): s. 1149-1159.
174. R. Ekkebus, et al., *On terminal alkynes that can react with active-site cysteine nucleophiles in proteases*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(8): s. 2867-2870.
175. M. Gorka, H.M. Magnussen, Y. Kulathu, *Chemical biology tools to study Deubiquitinases and Ubl proteases*. Semin Cell Dev Biol, 2022.
176. J.F. McGouran, et al., *Fluorescence-based active site probes for profiling deubiquitinating enzymes*. Org Biomol Chem, 2012. **10**(17): s. 3379-3383.
177. J.A. Ward, et al., *Quantitative Chemical Proteomic Profiling of Ubiquitin Specific Proteases in Intact Cancer Cells*. ACS Chem Biol, 2016. **11**(12): s. 3268-3272.
178. W. Gui, et al., *Cell-Permeable Activity-Based Ubiquitin Probes Enable Intracellular Profiling of Human Deubiquitinases*. J Am Chem Soc, 2018. **140**(39): s. 12424-12433.
179. D.S. Hameed, et al., *Development of Ubiquitin-Based Probe for Metalloprotease Deubiquitinases*. Angew Chem Int Ed Engl, 2019. **58**(41): s. 14477-14482.
180. J.F. McGouran, et al., *Deubiquitinating enzyme specificity for ubiquitin chain topology profiled by di-ubiquitin activity probes*. Chem Biol, 2013. **20**(12): s. 1447-1455.
181. N. Haj-Yahya, et al., *Dehydroalanine-based diubiquitin activity probes*. Org Lett, 2014. **16**(2): s. 540-543.
182. M.P. Mulder, et al., *A native chemical ligation handle that enables the synthesis of advanced activity-based probes: diubiquitin as a case study*. Chembiochem, 2014. **15**(7): s. 946-949.
183. A. Ernst, et al., *A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system*. Science, 2013. **339**(6119): s. 590-595.
184. L. Gjonaj, et al., *USP7: combining tools towards selectivity*. Chem Commun (Camb), 2019. **55**(35): s. 5075-5078.
185. C.S. Hewitt, et al., *Development of Ubiquitin Variants with Selectivity for Ubiquitin C-Terminal Hydrolase Deubiquitinases*. Biochemistry, 2020. **59**(37): s. 3447-3462.
186. C.S. Hewitt, C. Das, D.P. Flaherty, *Rational Development and Characterization of a Ubiquitin Variant with Selectivity for Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L3*. Biomolecules, 2022. **12**(1).
187. W. Zhang, et al., *Potent and selective inhibition of pathogenic viruses by engineered ubiquitin variants*. PLoS Pathog, 2017. **13**(5): s. e1006372.

188. L. Gjonaj, et al., *Development of a DUB-selective fluorogenic substrate*. Chem Sci, 2019. **10**(44): s. 10290-10296.
189. K.D. Wilkinson, et al., *Synthesis and characterization of ubiquitin ethyl ester, a new substrate for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase*. Biochemistry, 1986. **25**(21): s. 6644-6649.
190. A. Hershko, I.A. Rose, *Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): s. 1829-1833.
191. Y.T. Li, et al., *New semi-synthesis of ubiquitin C-terminal conjugate with 7-amino-4-methylcoumarin*. J Pept Sci, 2014. **20**(2): s. 102-107.
192. K. Martinez-Fonts, A. Matouschek, *A Rapid and Versatile Method for Generating Proteins with Defined Ubiquitin Chains*. Biochemistry, 2016. **55**(12): s. 1898-1908.
193. R. Behrendt, P. White, J. Offer, *Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis*. J Pept Sci, 2016. **22**(1): s. 4-27.
194. R. Ramage, J. Green, O.M. Ogunjobi, *Solid phase peptide synthesis of ubiquitin*. Tetrahedron Letters, 1989. **30**(16): s. 2149-2152.
195. V. Cardona, et al., *Application of Dmb-Dipeptides in the Fmoc SPPS of Difficult and Aspartimide-Prone Sequences*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2008. **14**(4): s. 285-292.
196. P.E. Dawson, et al., *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. Science, 1994. **266**(5186): s. 776-779.
197. S.S. Kulkarni, et al., *Rapid and efficient protein synthesis through expansion of the native chemical ligation concept*. Nature Reviews Chemistry, 2018. **2**(4).
198. Y.-T. Li, et al., *Ubiquitin 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin as an improved fluorogenic substrate for deubiquitinating enzymes*. Tetrahedron, 2016. **72**(27-28): s. 4085-4090.
199. J. Liang, et al., *Chemical synthesis of Ub-AMC via ligation of peptide hydrazides*. Science China Chemistry, 2013. **56**(9): s. 1301-1306.
200. Y.C. Huang, et al., *Synthesis of L- and D-Ubiquitin by One-Pot Ligation and Metal-Free Desulfurization*. Chemistry – A European Journal, 2016. **22**(22): s. 7623-7628.
201. D. Bang, et al., *Total Chemical Synthesis and X-ray Crystal Structure of a Protein Diastereomer: [D-Gln 35]Ubiquitin*. Angewandte Chemie, 2005. **117**(25): s. 3920-3924.
202. S. Bondalapati, M. Jbara, A. Brik, *Expanding the chemical toolbox for the synthesis of large and uniquely modified proteins*. Nat Chem, 2016. **8**(5): s. 407-418.
203. L.Z. Yan, P.E. Dawson, *Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(4): s. 526-533.
204. Q. Wan, S.J. Danishefsky, *Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(48): s. 9248-9252.
205. J.S. Zheng, et al., *Chemical synthesis of proteins using peptide hydrazides as thioester surrogates*. Nat Protoc, 2013. **8**(12): s. 2483-2495.
206. Y.-C. Huang, et al., *Facile synthesis of C-terminal peptide hydrazide and thioester of NY-ESO-1 (A39-A68) from an Fmoc-hydrazine 2-chlorotrityl chloride resin*. Tetrahedron, 2014. **70**(18): s. 2951-2955.
207. K.S. Ajish Kumar, et al., *Highly efficient and chemoselective peptide ubiquitylation*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(43): s. 8090-8094.
208. M.J. Clague, S. Urbe, D. Komander, *Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(6): s. 338-352.

209. J.L. Harris, et al., *Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): s. 7754-7759.
210. D.J. Maly, et al., *Expedient solid-phase synthesis of fluorogenic protease substrates using the 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC) fluorophore*. J Org Chem, 2002. **67**(3): s. 910-915.
211. M. Drag, et al., *Activity profiling of human deSUMOylating enzymes (SENPs) with synthetic substrates suggests an unexpected specificity of two newly characterized members of the family*. Biochem J, 2008. **409**(2): s. 461-469.
212. Z. Feng, B. Xu, *Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches*. Biomol Concepts, 2016. **7**(3): s. 179-187.
213. E. Vedrenne, et al., *Dramatic Effect of Boron-Based Lewis Acids in Cross-Metathesis Reactions*. Synlett, 2005(4): s. 670-672.
214. M. Uhlen, et al., *Proteomics. Tissue-based map of the human proteome*. Science, 2015. **347**(6220): s. 1260419.
215. W. Rut, et al., *Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease*. Antiviral Res, 2017. **139**: s. 88-94.