

Załącznik 3 do postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

**„Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych
za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych”**

Dr inż. Wioletta Rut

**Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania
Politechnika Wroclawska**

Wrocław, 2023

1. Imię i nazwisko: Wioletta Rut
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

17.01.2018 - Doktor nauk chemicznych w dyscyplinie Chemia, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wroclaw, **dyplom z wyróżnieniem.**

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Zastosowanie naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w otrzymywaniu aktywnych i specyficznych markerów dla proteaz cysteinowych i treoninowych”

Promotor: prof. dr hab. Marcin Drąg

3.07.2013 - Magister inżynier biotechnologii (specjalność: biologia molekularna i biokataliza), Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska, Wroclaw, **dyplom z wyróżnieniem.**

Tytuł pracy magisterskiej: „Określanie specyficzności substratowej legumainy przy użyciu substratów fluorogenicznych”

Promotor: dr hab. Marcin Drąg, prof. PWr

30.01.2012 - Inżynier biotechnologii (specjalność: analiza i oczyszczanie produktów biotechnologicznych), Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, Rzeszów, **dyplom z wyróżnieniem.**

Tytuł pracy inżynierskiej: „Oligoeterole z roztworów melaminy w wyższych hydroksymetylowych pochodnych ketonu etylowo-metylowego”

Promotor: dr inż. Dorota Głowacz-Czerwonka

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

1.10.2021 – obecnie: Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, stanowisko: **adiunkt badawczo-dydaktyczny**

1.04.2018-30.09.2021: Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, stanowisko: **asystent naukowy**

1.05.2016 – 15.03.2018: Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Zakład Chemii Bioorganicznej, stanowisko: **asystent naukowy**

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Na moje osiągnięcie naukowe pt. „**Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych**” składa się cykl sześciu spójnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR) o łącznym Impact Factor **50,419** i sumarycznej liczbie cytowań tych prac (bez autocytowań) **443**.

Cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (kolejność chronologiczna):

H1: Rut W., Zhang L., Kasperkiewicz P., Poręba M., Hilgenfeld R., Drag M. ✉, „Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease”, **Antiviral Research**, 2017, 139, 88-94, “✉” – autor korespondencyjny.

(IF = **4,307**; punkty MNiSW **140**; cytowania **33**)

H2: Rut W. ✉, Groborz K., Zhang L., Modrzycka S., Poreba M., Hilgenfeld R., Drag M. ✉, „Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate dengue from Zika and West Nile viruses”, **Antiviral Research**, 2020, 175, 104731, “✉” – autor korespondencyjny.

(IF = **5,970**; punkty MNiSW **140**; cytowania **6**)

H3: Rut W. ✉, Żmudziński M., Snipas S.J., Bekes M., Huang T.T., Drag M. ✉, „Engineered unnatural ubiquitin for optimal detection of deubiquitinating enzymes”, **Chemical Science**, 2020, 11(23), 6058-6069, “✉” – autor korespondencyjny.

(IF = **9,825**; punkty MNiSW **200**; cytowania **10**)

H4: Rut W. ✉*, Lv Z. *, Zmudzinski M., Patchett S., Nayak D., Snipas S., Oualid F.E., Huang T.T. ✉, Bekes M. ✉, Drag M. ✉, Olsen S.K. ✉, „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), 1-13, “✉” – autor korespondencyjny, “*” – równy udział w pracy.

(IF = **14,143**; punkty MNiSW **200**; cytowania **276**)

H5: Rut W. ✉, Groborz K., Zhang L., Sun X., Zmudzinski M., Pawlik B., Wang X., Jochmans D., Neyts J., Mlynarski W., Hilgenfeld R., Drag M. ✉, „SARS-CoV-2 Mpro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging”, **Nature Chemical Biology**, 2021, 17, 222-228, “✉” – autor korespondencyjny.

(IF = **16,174**; punkty MNiSW **200**; cytowania **118**)

H6: Rut W. ✉, Żmudziński M., Drag M., „Design and Synthesis of Ubiquitin-Based Chemical Tools with Unnatural Amino Acids for Selective Detection of Deubiquitinases”, **Methods in Molecular Biology**, 2023, 2591, 59-78, “✉” – autor korespondencyjny.

(IF = **brak**; punkty MNiSW **70**; cytowania **0**)

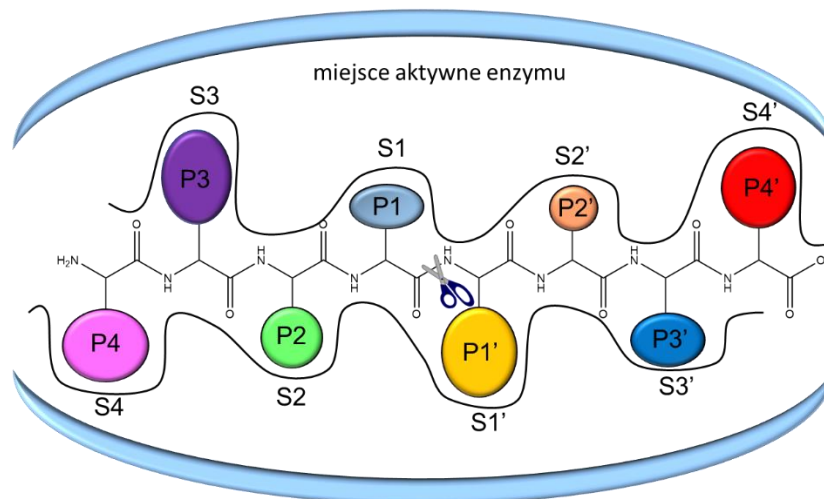
- Impact Factor podano zgodnie z rokiem opublikowania pracy.
- Punktację MNiSW podano zgodnie z dokumentem z dnia 9 lutego 2021 roku.
- Ilość cytowań podano według bazy Web of Science (stan bazy na dzień 21.04.2023) bez autocytowań (wykluczono te prace cytujące, w których pojawia się chociaż jeden z autorów pracy cytowanej). Analiza cytowań została przygotowana przez dział informacji naukowej - sekcja naukometrii biblioteki Politechniki Wrocławskiej.

WSTĘP

1. Enzymy proteolityczne

Enzymy proteolityczne, określane również jako proteazy lub peptydazy, odpowiedzialne są za degradację białek na mniejsze fragmenty poprzez hydrolizę wiązań peptydowych [1, 2]. Proteazy pełnią ważną funkcję w wielu procesach biologicznych m.in. replikacji i transkrypcji DNA, proliferacji i różnicowaniu komórek, angiogenezie, neurogenezie, procesie koagulacji krwi, przebudowie tkanek, prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego oraz apoptozie [2-4]. Enzymy te niezbędne są również w procesie replikacji i rozprzestrzeniania się wirusów, bakterii i pasożytów, a co za tym idzie odpowiedzialne są za efektywną transmisję

choroby wywołanej przez te patogeny [2, 3, 5, 6]. Ze względu na nieodwracalny charakter proteolizy, aktywność enzymów proteolitycznych musi być ściśle regulowana. Większość proteaz jest syntezowana i magazynowana w postaci nieaktywnego prekursora – zymogenu, który musi być aktywowany, zazwyczaj poprzez proteolizę lub zmianę konformacji [7]. Proces aktywacji jest przestrzennie i czasowo kontrolowany przez różne mechanizmy. Na przykład katepsyny są aktywowane w sposób zależny od pH, kiedy dotrą do lizosomu [2]. Aktywacja proteaz może być również regulowana poprzez tworzenie kompleksów białkowych, przez asocjację proteolitycznych podjednostek, tak jak w przypadku proteasomu, przez kofaktory oraz endo- lub egzogenne inhibitory [8]. Biorąc pod uwagę wysoki poziom regulacji potranslacyjnych proteaz, kluczowych informacji niezbędnych w zrozumieniu biologicznych funkcji tych enzymów, dostarcza bezpośredni pomiar ich aktywności proteolitycznej, a nie tradycyjne analizy transkryptomyczne lub proteomiczne. Badania proteomiczne dostarczają informacji o ogólnym poziomie ekspresji enzymów, nie uwzględniając poziomu ich aktywności. Zrozumienie roli proteaz zaangażowanych zarówno w procesy fizjologiczne jak i patofizjologiczne ma zasadnicze znaczenie podczas projektowania i poszukiwania leków oraz diagnostyki chorób. Wiele ośrodków naukowych zajmuje się poszukiwaniem selektywnych związków umożliwiających monitorowanie aktywności wybranych enzymów proteolitycznych. Głównym wyzwaniem w projektowaniu tego typu związków jest nakładająca się specyficzność substratowa proteaz (komplementarność substratu z architekturą centrum aktywnego enzymów) [3, 9]. Oznacza to, że enzymy należące do danej grupy rozpoznają podobne substraty, a narzędzia chemiczne (inhibitory, markery chemiczne) projektowane w oparciu o sekwencje peptydowe tych substratów są rozpoznawane przez kilka enzymów, uniemożliwiając tym samym monitorowanie aktywności tylko jednej, wybranej proteazy [10]. Specyficzność substratowa wynika z budowy tzw. kieszeni wiążących znajdujących się w miejscu aktywnym enzymów (**Rys. 1**) [11]. Aminokwasy tworzące daną kieszeń oddziałują z łańcuchami bocznymi aminokwasów w strukturze substratu. Aminokwasy na N-końcu substratu (pozycje Pn, ..., P4, P3, P2, P1) wiążą się do kieszeni Sn, ..., S4, S3, S2, S1, natomiast aminokwasy na C-końcu substratu (P1', P2', ..., Pn') wiążą się do kieszeni S1', S2', ..., Sn'. Hydroliza wiązania peptydowego zachodzi zawsze pomiędzy aminokwasami w pozycjach P1 i P1' (konwencja wprowadzona przez Bergera i Schechtera w 1967 roku) (**Rys. 1**) [11]. Większość proteaz hydrolizuje białka wewnątrz łańcuch polipeptydowego (endoproteazy), istnieją również takie, które rozpoznają aminokwasy na N- lub C-końcu substratów, uwalniając jeden lub dwa aminokwasy (tzw. egzopeptydazy).



Rysunek 1. Schemat wiązania substratu w miejscu aktywnym proteaz.

2. Proteazy wirusowe

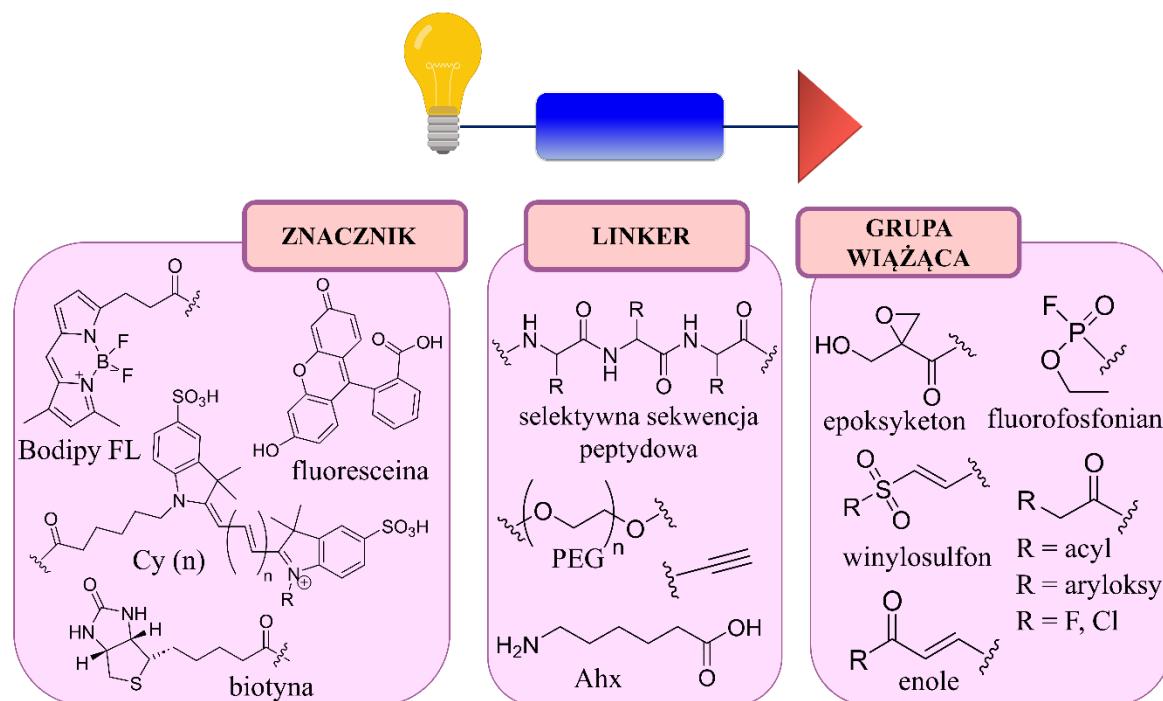
Ważną grupę enzymów proteolitycznych z medycznego punktu widzenia stanowią proteazy wirusowe kodowane w genomie renowirusów, flawiwirusów, koronawirusów i herpeswirusów [5]. Wirusowe białka ekspresjonowane są w postaci poliprotein zawierających jedną lub kilka domen o aktywności proteolitycznej, które uwalniane są w sposób autokatalityczny. Następnie uwolnione proteazy hydrolizują pozostałą poliproteinę uwalniając funkcjonalne białka niezbędne w procesie składania nowych cząstek wirusa (wirionów) [12, 13]. Hamowanie aktywności wirusowych proteaz prowadzi do blokowania replikacji wirusa, a tym samym hamuje rozwój infekcji wirusowej [14]. Inhibitory proteaz wirusowych stały się ważną klasą leków przeciwwirusowych oraz jedną ze skutecznych strategii terapeutycznych w walce z tymi patogenami. Do klinicznie ważnych przykładów inhibitorów proteaz wirusowych należą: inhibitory proteaz ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV) [15], wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) [16] oraz koronawirusa SARS-CoV-2 [17]. Ponadto inhibitory proteaz wirusowych stosowane są razem z lekami przeciwwirusowymi o innym mechanizmie działania, co zwiększa skuteczność terapii oraz zmniejsza ryzyko wystąpienia mutantów lekoopornych [5]. Istotnym wyzwaniem w projektowaniu związków hamujących aktywność proteaz wirusowych jest ich selektywność względem docelowej proteazy, a tym samym ograniczenie możliwości wstąpienia niepożądanych efektów ubocznych poprzez krzyżową reaktywność z ludzkimi enzymami. Wszystkie inhibitory proteaz wirusowych obecnie stosowane klinicznie wiążą się z miejscem aktywnym enzymu, co ogranicza możliwość ich zastosowania jako leków w przypadku proteaz z niespokrewnionych gatunków wirusów, wykazujących inny mechanizm

działania. Przykładem tego jest próba zastosowania inhibitorów proteazy HIV w leczeniu COVID-19 [18-20]. Obie proteazy wirusa SARS-CoV-2 różnią się specyficznością oraz wykazują inny mechanizm działania niż proteaza wirusa HIV, dlatego badania te zakończyły się niepowodzeniem. W przypadku wirusowych proteaz nie tylko inhibitory miejsca aktywnego, ale także modulatory allosteryczne mogą otworzyć drzwi do nowych możliwości terapeutycznych. Coraz więcej badań koncentruje się na identyfikacji inhibitorów proteaz, które oddziałują w miejscu allosterycznym lub hamują oddziaływanie między domenami białek, których połączenie jest wymagane do osiągnięcia aktywności katalitycznej proteazy. Wykorzystanie tej strategii w poszukiwaniu inhibitorów jako potencjalnych leków jest szczególnie ważne w przypadku proteaz, które preferują reszty zasadowe w pozycjach P1 i P2 w strukturze substratów, takich jak proteazy flawiwirusów. Ze względu na tę specyficzność substratową wiele inhibitorów projektowanych w oparciu o sekwencje substratów może być stosowanych tylko w badaniach *in vitro* [21, 22]. Do tej pory w literaturze opisano kilka przykładów inhibitorów ukierunkowanych na miejsce allosteryczne, które wykazują znaczącą aktywność w testach komórkowych i badaniach *in vivo* względem proteaz flawiwirusów, a tym samym stanowią obiecujący punkt wyjścia do dalszej optymalizacji ich struktury [23, 24].

3. Markery chemiczne dla proteaz

Oczywistym jest, iż tylko aktywne proteazy mogą przekształcać substraty w produkty i w ten sposób indukować późniejsze efekty biologiczne. Bezpośrednie monitorowanie aktywności enzymatycznej w komórkach oraz warunkach *in vivo* możliwe jest dzięki wykorzystaniu markerów chemicznych (ang. *activity-based probes*, *ABPs*). Pod koniec lat 90 XX wieku Benjamin F. Cravatt i Matthew Bogoy opracowali nową technikę proteomiczną nazwaną *Activity-based protein profiling* (ABPP) lub *Activity-based proteomics*, która wykorzystuje małowcząsteczkowe związki chemiczne – markery chemiczne do poznania i zrozumienia roli enzymów w układach biologicznych [25, 26]. Technika ta w krótkim czasie stała się jedną z wiodących technik w proteomice, wypełniając luki i ograniczenia innych podejść proteomicznych [27]. Ze względu na budowę możemy wyróżnić dwa główne typy markerów chemicznych: markery chemiczne działające jak inhibitory oraz markery chemiczne działające jak substraty. W przypadku markerów pierwszego typu w ich strukturze możemy wyróżnić trzy podstawowe elementy: (1) reaktywną grupę wiążącą, która kowalencyjnie wiąże się w miejscu aktywnym enzymu; (2) linker - najczęściej zawierający sekwencję peptydową, która warunkuje selektywność markera chemicznego względem docelowej proteazy lub grupy proteaz; (3)

znacznik umożliwiającą detekcję kompleksu enzym-marker chemiczny (**Rys. 2**). Każdy z trzech elementów markera chemicznego projektowany jest pod konkretny enzym proteolityczny lub grupę enzymów oraz wybraną metodę detekcji [27].



Rysunek 2. Struktura markera chemicznego.

Dla większości proteaz serynowych, cysteinowych oraz treoninowych **reaktywną grupę wiążącą** stanowi grupa elektrofilowa, która tworzy wiązanie kowalencyjne z grupą nukleofilową w centrum aktywnym enzymu. Wiele różnych grup elektrofilowych zostało wykorzystanych podczas syntezy markerów chemicznych, a na ich wybór wpływała łatwość otrzymania na drodze syntezy chemicznej, biodostępność oraz pożądana reaktywność [28, 29]. Natomiast w przypadku proteaz aspartylowych i metaloproteaz reaktywną grupę wiążącą stanowią linkery sieciujące aktywowane światłem (np. benzofenon). W wyniku naświetlenia światłem UV, fotosieciujące linkery wytwarzają rodnikowe związki pośrednie, które reagują z pobliskimi atomami tworząc wiązanie kowalencyjne. Wadą tego typu markerów chemicznych jest ich zdolność wiązania się zarówno z aktywną, jak i nieaktywną formą enzymu [30-32]. Problem ten został częściowo rozwiązany poprzez wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych w strukturze markera chemicznego. Przykładowo, marker projektowany dla metaloproteaz macierzy pozakomórkowej (ang. *Matrix metalloproteinases*, MMPs), które w formie aktywnej katalitycznie chelatuja jon metalu w centrum aktywnym, zawierał grupę chelatującą metal [30, 31].

Drugim elementem strukturalnym markera chemicznego jest **linker**, którego podstawowym zadaniem jest separacja grupy wiążącej od znacznika w celu zmniejszenia zawady sterycznej pomiędzy obiema grupami oraz zwiększenie dostępności markera chemicznego. Najczęściej funkcję linkera pełni kwas 6-aminoheksanowy lub glikol polietylenowy [27]. Linker spełnia również drugą, bardzo ważną funkcję, a mianowicie jako sekwencja peptydowa warunkuje selektywność markera chemicznego. W przypadków większości ABPs linker stanowi krótka sekwencja peptydowa, odpowiadająca sekwencji optymalnego substratu docelowej proteazy [27]. W literaturze opisane są również markery chemiczne, w których funkcję linkera pełni domena białkowa lub całe białko (np. ABPs dla enzymów deubikwitynujących zawierają całą sekwencję ubikwityny – białka rozpoznawanego przez tę grupę proteaz) [33]. Optymalne sekwencje peptydowe projektowane są z zużyciem wielu metod zarówno chemicznych (z wykorzystaniem bibliotek substratów - metoda PS-SCL (ang. *Positional Scanning Substrate Combinatorial Library*) lub bibliotek inhibitorów) [34], jak i biologicznych (z wykorzystaniem bakteriofagów – metoda prezentacji fagowej ang. *phage display*) [35, 36], czy też proteomicznych (technika PICS (ang. *Proteomic Identification of protease Cleavage Sites*) [37, 38]. Duże wyzwanie w projektowaniu sekwencji peptydowych selektywnych względem docelowej proteazy stanowi nakładająca się specyficzność substratowa blisko spokrewnionych proteaz. Rozwiązaniem tego problemu jest wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów (powstałych na drodze syntezy chemicznej) w sekwencji peptydowej markerów chemicznych. Metoda syntezy bibliotek substratów zawierających naturalne i nienaturalne aminokwasy i jej zastosowanie w profilowaniu proteaz zostały opracowane w zespole prof. Marcina Drąga (ang. *Hybrid combinatorial substrate library*, HyCoSuL) [39, 40].

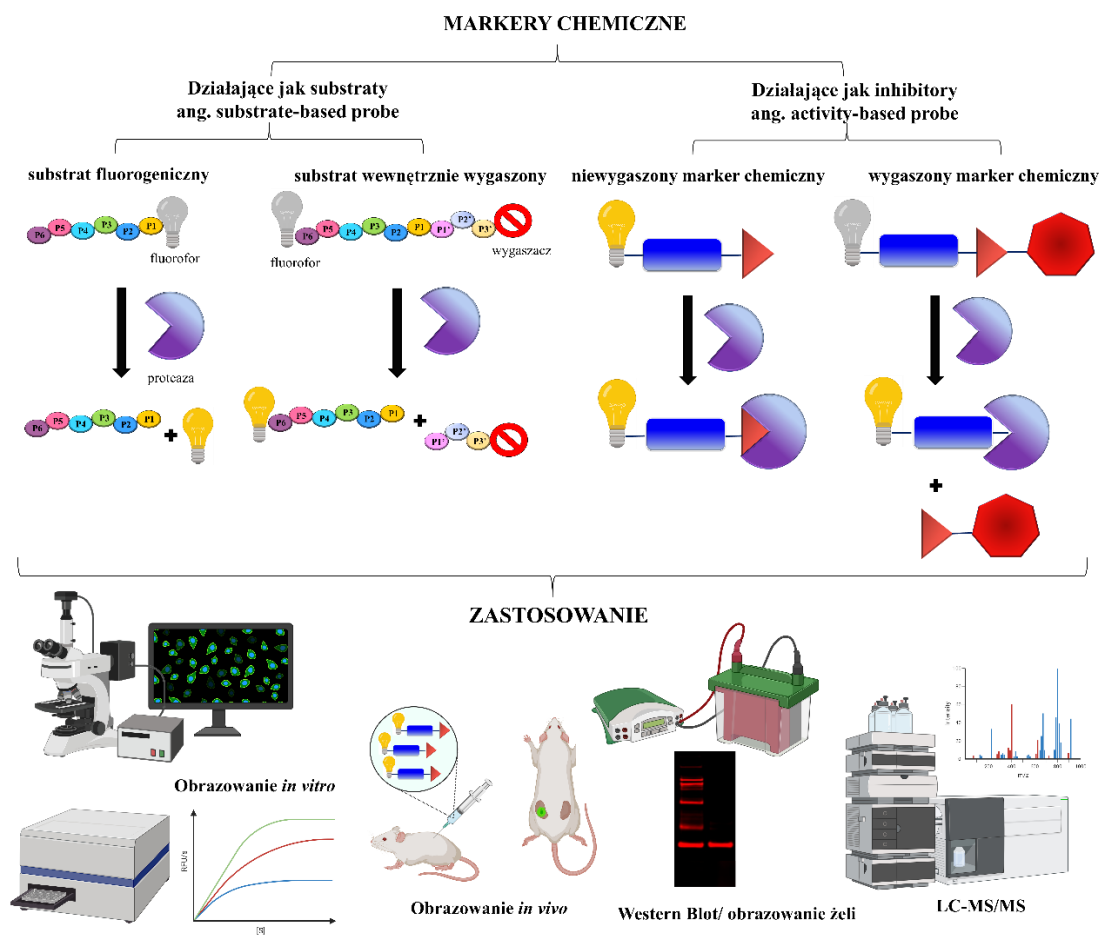
Trzeci element markera chemicznego umożliwiający wizualizację kompleksu marker chemiczny–enzym stanowi **znacznik**. Jako pierwsze znaczniki stosowane były radioizotopy, jednak ze względu na liczne wady markerów chemicznych znakowanych radioizotopem (ograniczona trwałość wynikająca z czasu półtrwania radioizotopu, specjalne warunki przygotowania i wymagania laboratoryjne odnośnie bezpieczeństwa pracy) są one obecnie rzadko stosowane [27, 41, 42]. Punktem przełomowym w projektowaniu markerów chemicznych i ich aplikacji w układach biologicznych było zastosowanie znaczników fluorescencyjnych [27, 43, 44]. Obecnie dostępna jest szeroka gama fluoroforów, których wybór zależy od ich właściwości chemicznych i spektralnych oraz ceny. Przykładowo fluoresceina i rodamina są podatne na fotowysyblanie i nie powinny być używane w eksperymentach, które wymagają dłuższego czasu obrazowania, ale są niedrogie. Natomiast BODIPY i barwniki cyjaninowe należą do fotostabilnych fluoroforów charakteryzujących się

wysoką wydajnością kwantową fluorescencji oraz są przepuszczalne przez błony komórkowe, ale ich główną wadą jest wysoka cena [28]. Inną grupę znaczników reprezentuje biotyna, która bardzo często obecna jest w strukturze markerów chemicznych. Biotyna wykazuje silne powinowactwo do awidyny oraz streptawidyny umożliwiając tym samym detekcję bardzo małej ilości enzymu. Ponadto kompleks biotyna-awidyna/streptawidyna jest stabilny i nie ulega rozpadowi pod wpływem zmieniających się warunków np. pH. Wadą tego znacznika jest słaba przepuszczalność komórkowa, co ogranicza jego zastosowanie do badań na lizatach komórkowych [28]. Rozwiązaniem tego problemu było zastosowanie reakcji cykloaddycji alkinu z azydkiem, katalizowanej Cu(I) (CuAAC, tzw. reakcja „click chemistry”). W technice tej komórki inkubowano z przepuszczalnym przez błonę fragmentem markera chemicznego z grupą azydkową, bez biotyny. Następnie przygotowano lizat komórkowy, który poddano reakcji cykloaddycji z biotyną zawierającą grupę alkinową. W wyniku tej reakcji powstawał stabilny produkt triazolowy, umożliwiający detekcję kompleksu marker chemiczny-enzym [45].

Główną zaletą profilowania opartego na aktywności enzymatycznej za pomocą markerów chemicznych jest tworzenie przez nie trwałego kompleksu z enzymem, co umożliwia bezpośrednią izolację i identyfikację docelowej proteazy. Dzięki takiemu połączeniu markery chemiczne mają wiele zastosowań, m.in. wykorzystywane są do identyfikacji nowych proteaz, lokalizacji proteaz w komórkach, do oceny selektywności nowych inhibitorów/leków oraz poznania i zrozumienia funkcji enzymów w układach biologicznych (**Rys. 3**) [46-48].

Poza opisanymi powyżej markerami chemicznymi, które działają jak inhibitory trwale wiążąc się z enzymem w miejscu aktywnym, istnieje jeszcze druga grupa markerów chemicznych działających jak substraty – ang. *substrate-based probes* [46]. Markery te składają się z dwóch elementów: (1) sekwencji peptydowej rozpoznawanej przez docelowy enzym oraz (2) grupy reporterowej, która generuje mierzalny sygnał po hydrolizie substratu. Sekwencja peptydowa projektowana jest w oparciu o znane sekwencje naturalnych substratów proteazy lub na podstawie profilu specyficzności substratowej otrzymanego z syntetycznych bibliotek (metoda PS-SCL lub HyCoSuL). Najprostszym przykładem markera chemicznego opartego na substracie jest peptyd z przyłączonym fluoroforem na C-końcu (ACC - kwas 7-aminokumaryno-4-octowy) lub chromoforem (*p*-nitroaniliną) [49, 50]. W przypadku tego typu markerów chemicznych sekwencja peptydowa wiązana jest tylko po stronie nieprimowanej miejsca aktywnego, ponieważ w pozycji P1' znajduje się znacznik. Innym rodzajem markera chemicznego opartego na substracie jest tzw. marker wewnętrznie wygaszany, który zawiera sekwencję peptydową wiążącą się po obu stronach hydrolizowanego wiązania peptydowego

w centrum aktywnym (w kieszeniach primowanych i nieprimowanych) [46, 49]. Na jednym końcu sekwencji peptydowej umieszczony jest donor fluorescencji, a na drugim akceptor tzw. wygaszacz fluorescencji. Po hydrolizie markera chemicznego przez proteazę następuje rozdzielanie pary donor/akceptor i przyrost fluorescencji może być mierzony za pomocą spektrofluorymetru, mikroskopu fluorescencyjnego, czy też podczas obrazowania *in vivo* (**Rys. 3**). Oprócz syntetycznych markerów wewnątrznie wygaszanych opracowano również genetycznie kodowane markery poprzez ekspresję sekwencji peptydowej oflankowanej przez parę FRET białek fluorescencyjnych (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) [51]. Markery chemiczne oparte na substratach znajdują szerokie zastosowanie w badaniach przesiewowych inhibitorów (ang. *High-Throughput screening*, HTS) oraz profilowaniu specyficzności substratowej proteaz [46, 49]. Główną wadą opisanych markerów chemicznych jest trudność w określeniu aktywności konkretnej proteazy podczas pomiarów hydrolizy w układach biologicznych. Kolejnym ograniczeniem użycia markera chemicznego opartego na substracie jest jego dyfuzja po hydrolizie z dala od docelowej proteazy, co uniemożliwia określenie dokładnie lokalizacji subkomórkowej enzymu [27]. Niemniej jednak główną zaletą obu typów markerów chemicznych jest detekcja tylko aktywnej formy enzymu proteolitycznego, co odróżnia je od przeciwciał. W zależności od typu markera chemicznego i użytego znacznika możliwe jest obrazowanie aktywności proteaz za pomocą różnych metod: mikroskopii fluorescencyjnej lub konfokalnej, metody SDS-PAGE i Western Blot, techniki LCMS/MS czy też z użyciem czytników fluorescencji w badaniach kinetycznych (**Rys. 3**). W części „Badania własne” niniejszej rozprawy habilitacyjnej, stosowanie pojęcia markera chemicznego będzie tożsame z markerem, który trwale wiąże się do miejsca aktywnego proteazy (markery działające jak inhibitory), gdyż ten typ markerów chemicznych stanowi przedmiot niniejszej rozprawy habilitacyjnej.



Rysunek 3. Typy markerów chemicznych i ich zastosowanie.

4. Obrazowanie aktywności proteaz za pomocą markerów chemicznych

Poznanie mechanizmów aktywacji enzymów proteolitycznych umożliwi opracowanie metod pozwalających na sztuczne modulowanie ich aktywności. Możliwość manipulowania aktywnością proteaz pozwala na mapowanie ich funkcji biologicznych, co jest szczególnie przydatne klinicznie ze względu na nieprawidłową aktywność enzymów proteolitycznych w wielu stanach patologicznych [2]. Obecnie wiadomo, że proteazy zaangażowane są we wszystkie stadia chorób nowotworowych, począwszy od rozwoju choroby poprzez progresję aż do powstania przerzutów. Istnieje silna korelacja pomiędzy poziomem aktywności proteaz a ich wpływem na rozwój choroby nowotworowej, obejmująca zarówno nadmierną aktywność enzymów proteolitycznych jak i ich niewystarczającą aktywność [2, 52, 53]. Obniżona aktywność proteaz wynika z zaburzeń w procesie aktywacji tych enzymów, czego skutkiem jest niewystarczający poziom aktywnych proteaz wymagany do degradacji komórek nowotworowych. Dobrym przykładem obrazującym wpływ obniżonej aktywności proteaz na rozwój nowotworu jest proces programowej śmierci komórki czyli apoptozy. Apoptoza jest

procesem inicjowanym i przeprowadzanym przez kaspazy. Dlatego aktywacja kaskady kaspaz w komórkach nowotworowych stanowi jedną z obiecujących strategii terapeutycznych w zapobieganiu rozwojowi nowotworu [54, 55]. W innych przypadkach progresja choroby nowotworowej powiązana jest z nadekspresją lub nadmierną aktywnością enzymów proteolitycznych, gdzie hamowanie ich aktywności stanowi jedną ze skutecznych metod leczenia, czego przykładem jest inhibicja aktywności proteasomu w komórkach nowotworowych. Proteasom to białkowy, wielcząsteczkowy kompleks enzymatyczny odpowiedzialny za utrzymanie białkowej homeostazy poprzez degradację nieprawidłowo sfałdowanych, uszkodzonych lub niefunkcjonalnych białek komórkowych [56]. Hamowanie aktywności proteasomu prowadzi do śmierci komórki. W badaniach przedklinicznych wykazano, iż proliferujące komórki nowotworowe były bardziej wrażliwe na hamowanie funkcji proteasomu niż komórki zdrowe [57, 58]. Ponadto blokowanie aktywności proteasomu zwiększa podatność komórek nowotworowych na środki przeciwnowotworowe [59-62]. Trzy inhibitory proteasomu Bortezomib, Carfilzomib oraz Ixazomib zostały zaakceptowane jako leki i są obecnie stosowane w terapii szpiczaka mnogiego (nowotwór układu krwiotwórczego) [63-67].

Oprócz tego, iż proteazy reprezentują ważny cel terapeutyczny w leczeniu wielu chorób, są również potencjalnymi biomarkerami do celów diagnostycznych. Przykładowo, enzymy proteolityczne są idealnymi biomarkerami chorób zapalnych, ponieważ są one wydzielane z aktywowanych komórek odpornościowych [68]. Zwiększona aktywność proteaz powiązana jest z wieloma procesami charakterystycznymi dla kancerogenezy (np. angiogenezą, przebudową tkanek, czy śmiercią komórki), w związku z tym enzymy te należą do ważnych biomarkerów chorób nowotworowych [69]. Dzięki zastosowaniu markerów chemicznych do selektywnej detekcji konkretnego enzymu będącego biomarkerem raka możliwe jest rozróżnienie tkanek zdrowych od zmienionych chorobowo. Podczas tradycyjnej operacji chirurgicznej wraz z tkanką nowotworową usuwany jest również nadmiar tkanki zdrowej lub dochodzi do niecałkowitego usunięcia tkanki zmienionej chorobowo i konieczna jest ponowna operacja. Wykorzystując markery chemiczne do detekcji enzymów proteolitycznych, będących biomarkerami nowotworów, możliwe jest rozróżnienie komórek rakowych na tle zdrowej tkanki [70]. W badaniach klinicznych potwierdzono przydatność wewnątrznie wygaszonego markera chemicznego - LUM015 jako fluorescencyjnego związku kontrastowego podczas operacji pacjentów z różnymi guzami litymi. W strukturze markera pomiędzy donorem fluorescencji (Cy5), a wygaszaczem fluorescencji (QSY21) umieszczono sekwencję peptydową, rozpoznawaną przez cysteinowe katepsyny. Marker chemiczny podawany był 40

pacjentkom z rakiem piersi na kilka godzin przed operacją oraz po lumpektomii. Czulość LUM015 w wykrywaniu guza wynosiła 84% [71]. U innych pacjentów użycie LUM015 pozwoliło uniknąć usunięcia zdrowych tkanek podczas operacji chirurgicznej guza. Niewątpliwą zaletą markera LUM015 była wysoka czulość, co podkreśla jego użyteczność kliniczną jako narzędzie diagnostyczne, jednak niska specyficzność (wynosząca 73%) doprowadziła do usunięcia nadmiaru tkanki zdrowej w miejscu zabiegu [71]. W celu zmniejszenia sygnału tła pochodzącego od zdrowych tkanek grupa Bogyo wykorzystwała sposób działania cyfrowej bramki logicznej „AND-gate” podczas projektowania markera chemicznego [72]. Termin „AND-gate” odnosi się nie tylko do cyfrowej bramki logicznej powszechnie stosowanej w informatyce, ale opisuje również zachowanie układów molekularnych, które wymagają dwóch ortogonalnych sygnałów wejściowych, aby wygenerować jeden sygnał wyjściowy. Zastosowanie logiki „AND-gate” w projektowaniu markerów chemicznych polega na umieszczeniu fluoroforu pomiędzy dwoma wygaszaczami fluorescencji, które są połączone z fluoroforem za pomocą sekwencji peptydowej rozpoznawanej przez różne enzymy. Poprzez wybór sekwencji peptydowych rozpoznawanych przez enzymy, których zwiększony poziom aktywności obserwowany jest w mikrośrodowisku guza, natomiast nigdy w zdrowych tkankach (w przypadku obu enzymów), możliwe jest wygenerowanie dużego sygnału w obrębie guza stanowiącego kontrast na tle zdrowej tkanki. Sygnał pochodzący od fluoroforu generowany jest tylko w sytuacji, gdy obie sekwencje peptydowe zostaną zhydrolizowane przez proteazy. Zaprojektowany marker chemiczny (DEATH-CAT) zawierał sekwencje rozpoznawane przez kaspazę-3 oraz cysteinowe katepsyny [72]. Zwiększony poziom aktywności obu enzymów obserwowany jest w mikrośrodowisku guza [73]. Badania z użyciem opisanego markera DEATH-CAT w obrazowaniu mysich modeli nowotworów, ujawniły jego wysoką selektywność względem tkanek nowotworowych, redukcję sygnału tła i zwiększenie ogólnego kontrastu, co jest szczególnie istotne podczas detekcji małych guzów w różnych tkankach [72]. Zastosowanie markerów chemicznych do monitorowania aktywności proteaz jest szczególnie użyteczne w przypadku proteaz wirusowych, gdzie związki te stanowią skuteczne narzędzie nie tylko do identyfikacji komórek zakażonych wirusem, ale również w badaniach przesiewowych inhibitorów. Standardowo w takich badaniach wykorzystywane są substraty fluorogeniczne, których użycie umożliwia prosty odczyt w celu szybkiej identyfikacji potencjalnego inhibitora [74-76]. Jednak warunki testów *in vitro* nie odzwierciedlają warunków *in vivo*, dlatego związki zidentyfikowane jako skuteczne inhibitory proteaz w badaniach *in vitro* mogą wykazywać niższą siłę hamowania, mniejszą selektywność lub być nieaktywne w testach komórkowych. Wiele związków zidentyfikowanych jako potencjalne inhibitory proteazy NS2B-NS3

flawiwirusów [77] [23, 78] oraz proteaz SARS-CoV-2 [79-81] w testach z użyciem rekombinowanych enzymów, okazały się nieskuteczne w testach komórkowych. Badania przeprowadzane na żywych komórkach dostarczają dokładniejszych informacji na temat skuteczności, stabilności, toksyczności i selektywności inhibitorów. Dlatego potrzebne są nowe metody umożliwiające kompleksową i dokładną analizę potencjalnych inhibitorów proteaz. W przypadku proteaz wirusowych istotne ograniczenie w opracowaniu nowych leków przeciwwirusowych stanowi wymóg poziomu bezpieczeństwa biologicznego laboratorium (BSL-3) do oceny skuteczności inhibitorów w zainfekowanych liniach komórkowych, co znacznie ogranicza liczbę związków, które można przetestować. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie markerów chemicznych do oceny skuteczności inhibitorów proteaz wirusowych w testach komórkowych wykonywanych w laboratorium klasy 2 (BSL-2). Cheng Y. i współpracownicy opracowali marker chemiczny działający jako substrat do jednoczesnej detekcji obu proteaz wirusa SARS-CoV-2 [82]. Marker ten zawierał dwie sekwencje peptydowe – jedną rozpoznawaną przez proteazę PL^{pro} z fluoroforem Cy5 oraz drugą, rozpoznawaną przez M^{pro} z fluoroforem Cy3. Pomiedzy sekwencjami umieszczony został wygaszacz fluorescencji (BHQ-2 – ang. *black hole quencher-2*). Skuteczność markera w detekcji aktywności obu proteaz została oceniona w testach komórkowych z użyciem komórek transfekowanych plazmidem kodującym SARS-CoV-2 M^{pro} i PL^{pro} oraz komórek zainfekowanych wirusem SARS-CoV-2. Uzyskane wyniki pokazały, iż opracowany marker chemiczny może zostać wykorzystany do obrazowania wewnątrzkomórkowej aktywności obu proteaz oraz oceny skuteczności inhibitorów tych enzymów zarówno w komórkach zakażonych wirusem SARS-CoV-2 jak i transfekowanych plazmidem [82]. Kolejnym przykładem testu komórkowego opracowanego do identyfikacji potencjalnych inhibitorów proteaz wirusowych z użyciem markera chemicznego w laboratorium BSL-2 jest test FlipGFP [83-85]. Test ten opiera się na ekspresji białka zielonej fluorescencji (GFP) w postaci dwóch podjednostek: 10 i 11 β-nici w konformacji niekompatybilnej z resztą beczki beta GFP (β1-9). Nici β10-β11 połączone są linkerem zawierającym sekwencję peptydową rozpoznawaną przez proteazy wirusa SARS-CoV-2 (FlipGFP-PL^{pro} i FlipGFP-M^{pro}). W obecności odpowiedniej proteazy linker zostaje zhydrolizowany, co umożliwia reorientację β11 i utworzenie antyrównoległej struktury z β10. Po samoorganizacji GFP β10-11 z β1-9 następuje indukcja sygnału zielonej fluorescencji. Test ten został już wcześniej zaprojektowany do pomiaru aktywności kaspaz w komórkach apoptotycznych w warunkach *in vitro* i *in vivo* [86, 87]. W celu oceny skuteczności testów FlipGFP-PL^{pro} i FlipGFP-M^{pro} w badaniach przesiewowych potencjalnych inhibitorów proteaz SARS-CoV-2 w laboratorium BSL-2 wykonano badania z wykorzystaniem

znanych inhibitorów (GC376 - inhibitor M^{pro} i GRL0617 - inhibitor PL^{pro}). Wyniki testu FlipGFP były zgodne z wynikami uzyskanymi w testach aktywności przeciwwirusowej inhibitorów, co potwierdza jego użyteczność w identyfikacji potencjalnych leków [83, 85]. Wykorzystanie markerów chemicznych do oceny skuteczności inhibitorów proteaz wirusowych w laboratoriach BSL-2 powinno znacznie przyspieszyć proces opracowywania nowych leków przeciwwirusowych poprzez szybką eliminację związków cytotoksycznych, nieselektywnych oraz nieprzepuszczalnych przez błony komórkowe.

BADANIA WŁASNE

Prowadzone przeze mnie badania naukowe, których rezultaty stanowią przedmiot niniejszej rozprawy habilitacyjnej, koncentrują się na poszukiwaniu nowych, selektywnych narzędzi chemicznych (substratów, inhibitorów i markerów chemicznych) umożliwiających monitorowanie aktywności proteaz wirusowych. Pierwsza część moich badań polegała na opracowaniu selektywnych związków chemicznych wykorzystując opracowaną w grupie prof. Marcina Drąga technologię HyCoSuL. Dzięki zastosowaniu nienaturalnych aminokwasów w sekwencji peptydowej możliwe jest projektowanie związków selektywnych względem docelowego enzymu, czego potwierdzeniem są wyniki badań prowadzonych przeze mnie w trakcie studiów doktoranckich. Celem mojej rozprawy doktorskiej było otrzymanie selektywnych substratów fluorogenicznych dla każdej z trzech podjednostek katalitycznych proteasomu 20S. Proteasom 20S jest białkowym kompleksem enzymatycznym, który wykazuje trzy aktywności katalityczne, dlatego istotne było opracowanie substratów selektywnych względem każdej z nich w celu określenia roli poszczególnej aktywności proteasomu w stanach normalnych i patologicznych. Wiedza i doświadczenie w profilowaniu specyficzności substratowej proteaz oraz syntezie peptydów, zdobyte w trakcie studiów doktoranckich, pozwoliły mi na realizację kolejnych projektów badawczych będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej. Warto podkreślić, iż oprócz projektowania związków zawierających krótkie sekwencje peptydowe, prowadziłam badania obejmujące modyfikacje całych białek – projektowanie i synteza związków opartych na strukturze ubikwityny. Selektywne narzędzia chemiczne zaprojektowane i syntetyzowane w pierwszym etapie moich badań wykorzystałam do obrazowania aktywności proteaz wirusowych w układach biologicznych. Zatem niniejsza rozprawa habilitacyjna jest rezultatem interdyscyplinarnych badań łączących wiedzę z zakresu chemii organicznej (synteza peptydów, inhibitorów i markerów chemicznych), biochemii (kinetyka reakcji enzymatycznych, wizualizacja białek), biologii molekularnej (hodowle

komórkowe) oraz mikroskopii konfokalnej. Nadrzędnym celem moich badań było wykorzystanie selektywnych narzędzi chemicznych do obrazowania aktywności proteaz wirusa SARS-CoV-2. Badania te były szczególnie istotne z uwagi na brak skutecznych metod leczenia chorych zakażonych koronawirusem po wybuchu pandemii. Projektowanie skutecznych leków przeciwko koronawirusowi wymagało wiedzy na temat budowy, sposobu wnikania wirusa do komórki i jego cyklu replikacyjnego. Badania z użyciem opracowanych przeze mnie narzędzi chemicznych ujawniły, iż proteazy SARS-CoV-2 M^{pro} i PL^{pro} wykazują bardzo podobną specyficzność substratową jak proteazy z poprzedniego wirusa SARS-CoV, co oznacza iż wyniki badań otrzymane w pracy nad proteazami z SARS-CoV mogą być bezpośrednio wykorzystane w pracy nad SARS-CoV-2. Testy na komórkach zakażonych wirusem SARS-CoV-2 dowiodły, iż zaprojektowany przeze mnie peptydowy inhibitor proteazy M^{pro} wykazuje bardzo podobną skuteczność w hamowaniu namnażania się wirusa jak znany lek przeciwwirusowy – remdesivir i, co ważne, jest mniej toksyczny dla komórek. Badania te pokazały, iż jedną ze stosowanych terapii przeciwwirusowych może być hamowanie wirusowej proteazy SARS-CoV-2 M^{pro}. Ponadto opracowane związki mogą zostać również wykorzystane do optymalizacji struktury leków projektowanych do walki z COVID-19 oraz jako narzędzia diagnostyczne. Zaprojektowane substraty (zaraz po opublikowaniu ich struktury) wykorzystywane były w wielu ośrodkach badawczych w tzw. retargetowaniu leków czyli poszukiwaniu nowych zastosowań dla znanych już inhibitorów i leków jako potencjalnych związków hamujących aktywność proteaz SARS-CoV-2. Użycie substratów fluorogenicznych znacznie przyspiesza i ułatwia wykonywanie tego typu badań. Uzyskane wyniki badań spotkały się z dużym zainteresowaniem nie tylko ze strony środowiska naukowego, ale również z szerokim zainteresowaniem społecznym i medialnym. W lipcu 2020 i styczniu 2021 r. została podpisana umowa pomiędzy Politechniką Wrocławską a japońską firmą Peptide Institute, Inc. dotycząca sprzedaży opracowanych przeze mnie substratów fluorogenicznych i inhibitora do badania proteazy SARS-CoV-2 M^{pro}.

Cykl sześciu spójnych tematycznie artykułów naukowych opisujących moje osiągnięcie naukowe pt. „Obrazowanie aktywności proteaz wirusowych za pomocą selektywnych narzędzi chemicznych” podzieliłam na dwie części: pierwsza z nich dotyczy opracowania selektywnych narzędzi chemicznych do monitorowania proteaz wykazujących aktywność deubikwytynującą (ludzkich i wirusowych), a druga proteaz wirusowych.

Enzymy deubikwitynujące

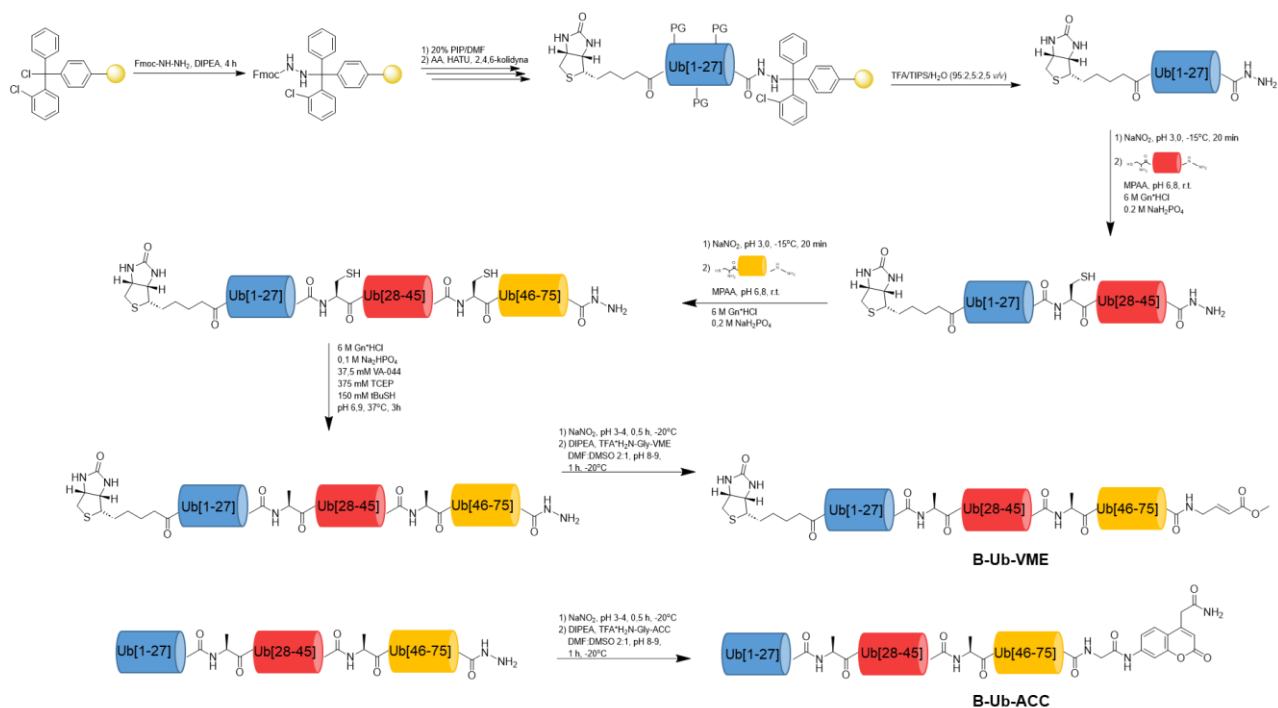
H3: Rut W., Żmudziński M., Snipas S.J., Bekes M., Huang T.T., Drag M., Engineered unnatural ubiquitin for optimal detection of deubiquitinating enzymes, *Chemical Science*, 2020, 11(23), 6058-6069.

W publikacji tej opisałam wyniki badań dotyczących opracowania selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających monitorowanie aktywności enzymów deubikwitynujących (ang. *deubiquitinating enzymes*, DUBs). Badania te były finansowane z dwóch grantów: Preludium, którego byłam kierownikiem i TEAM, w którym byłam wykonawcą.

Kluczową rolę w utrzymaniu białkowej, wewnątrzkomórkowej homeostazy odgrywa nielizosomalny układ ubikwityna–proteasom. Deregulacja działania tego układu prowadzi do szeregu patologicznych zmian w organizmie, w tym do nowotworzenia, infekcji wirusowych oraz chorób neurodegeneracyjnych [88]. Jedną ze stosowanych strategii terapeutycznych jest inhibicja aktywności proteasomu [89]. Alternatywny cel terapeutyczny układu ubikwityna–proteasom stanowią enzymy deubikwitynujące, odpowiedzialne za specyficzne usuwanie ubikwityny (Ub) z jej białkowych koniugatów. W genomie człowieka kodowanych jest około 100 DUBs podzielonych na sześć podklas na podstawie podobieństwa sekwencji i mechanizmu działania. Większość enzymów deubikwitynujących (pięć z sześciu podklas) to proteazy cysteinowe, natomiast tylko jedna podklasa reprezentuje małą grupę metaloproteaz [90, 91]. Liczne badania naukowe wskazują enzymy deubikwitynujące jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu chorób wirusowych, neurodegeneracyjnych oraz nowotworów. Przykładowo zwiększony poziom USP2 (ang. *Ubiquitin-specific protease 2*) zaobserwowany w przypadku nowotworu piersi związany jest z niską przeżywalnością chorych. Ponadto komórki nowotworowe w przypadku TNBC (ang. *Triple Negative Breast Cancer*), w których poziom ekspresji USP2 jest wysoki wykazują zwiększoną zdolność do migracji i inwazji [92]. Nadekspresja UCH-L1 (ang. *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*) występuje w przypadku zmian przerzutowych raka płuc. UCH-L1 uważany jest także za białko zaangażowane w chorobę Parkinsona, lecz niewiele wiadomo na temat jego działania [93]. Wynika to z braku selektywnych narzędzi chemicznych do badania tej grupy enzymów, co pozwoliłoby na określenie ich roli w stanach patologicznych, a także stanowiło strukturę wiodącą w kontekście projektowania leków. DUBs są wysoce specyficzne względem ubikwityny, dlatego najczęściej stosowane narzędzia chemiczne do badania aktywności DUBs zawierają całą cząsteczkę ubikwityny sprzężoną ze znacznikiem fluorescencyjnym (Ub-AMC [94] lub Ub-ACC [95]) lub

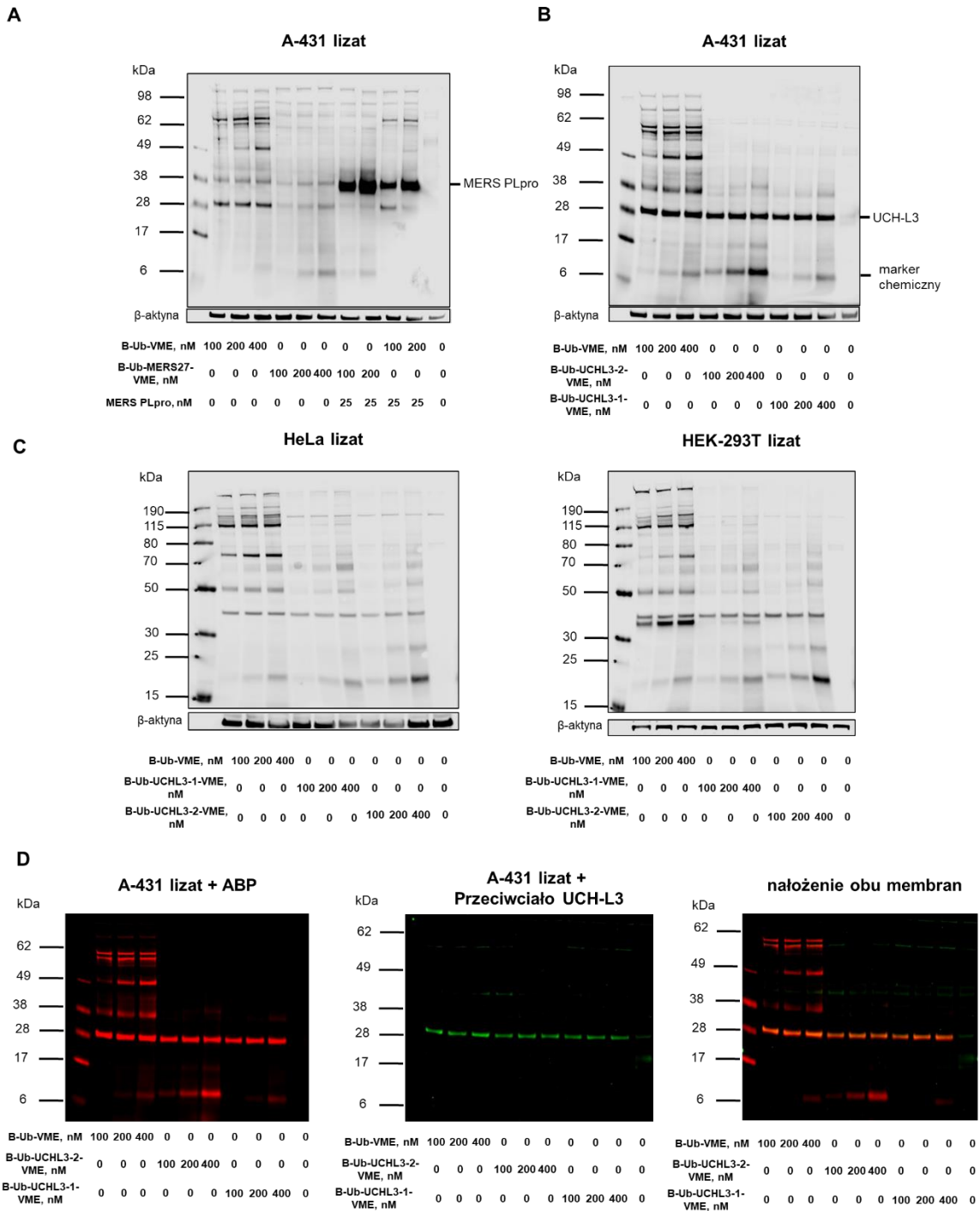
reaktywną grupą wiążącą (Ub-VME, Ub-VS [33, 96]) działające jako inhibitory. Narzędzia te, wykazujące szerokie spektrum działania, są bardzo użyteczne w profilowaniu aktywności DUBs. Jednakże, substraty i markery chemiczne rozpoznawane tylko przez jeden DUB lub wąską grupę enzymów deubikwitynujących umożliwiłyby dokładniejsze zbadanie tej grupy proteaz. Do tej pory selektywność narzędzi chemicznych opartych na strukturze Ub względem pojedynczych DUBs lub wąskiej grupy DUBs została osiągnięta poprzez: (1) zastosowanie różnych C-końcowych reaktywnych grup elektrofilowych [96, 97]; (2) modyfikację długości łańcucha peptydowego ubikwityny [98]; (3) syntezę łańcuchów poliubikwitynowych o różnej topologii połączeń [99] oraz (4) wprowadzenie mutacji w wybranych miejscach w sekwencji Ub [100, 101]. Analiza preferencji substratowej DUBs za pomocą biblioteki substratów fluorogenicznych zawierającej tylko naturalne aminokwasy wykazała, iż enzymy te rozpoznają w pozycjach P4 i P3 oprócz kanonicznej leucyny i argininy (C-końcowy motyw ubikwityny - LRGG), również inne aminokwasy [102]. Wyniki te sugerują, iż pogłębiona analiza kieszeni wiążących w centrum aktywnym DUBs może doprowadzić do opracowania nowych narzędzi chemicznych selektywnych względem DUBs. Analiza ta możliwa jest dzięki zastosowaniu nienaturalnych aminokwasów w miejscu kanonicznych reszt LRGG, znajdujących się w C-końcowym fragmencie ubikwityny. Do tej pory prowadzone przeze mnie badania obejmowały wprowadzanie nienaturalnych aminokwasów w strukturę związków zawierających tylko krótkie, tetrapeptydowe sekwencje, ale nigdy w sekwencję całych białek takich jak ubikwityna. Nasza hipoteza badawcza zakładała, iż możliwe jest otrzymanie selektywnych i aktywnych narzędzi chemicznych opartych na strukturze ubikwityny poprzez wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów w C-końcowym motywie ubikwityny. W celu weryfikacji naszej hipotezy badawczej wybraliśmy dwa enzymy deubikwitynujące, które stanowią ważny cel terapeutyczny: ludzki enzym UCH-L3 (ang. *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L3*) oraz wirusową proteazę MERS-CoV PL^{pro} (ang. *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus papain-like protease*) [103-105]. W pierwszym etapie badań wspólnie z mgr. inż. Mikołajem Żmudzińskim określiliśmy profil preferencji substratowej tych dwóch DUBs w pozycjach P4-P2 za pomocą kombinatorycznej i zdefiniowanej biblioteki substratów fluorogenicznych. Analiza otrzymanych preferencji substratowych ujawniła, iż: (1) DUBs wykazują bardzo wąską specyficzność substratową w pozycji P2 (MERS-CoV PL^{pro} rozpoznawał tylko glicynę, natomiast UCH-L3 oprócz glicyny tylko kilka aminokwasów alifatycznych) co wynika z budowy ich kieszeni wiążącej S2; (2) w pozycji P3 ludzki enzym preferuje aminokwasy zasadowe, a hydrofobowe rozpoznaje w mniejszym stopniu w przeciwieństwie do wirusowej proteazy, która preferuje hydrofobowe reszty; (3) w pozycji P4 oba enzymy rozpoznają

hydrofobowe aminokwasy. Na podstawie otrzymanych profili specyficzności substratowej zaprojektowaliśmy optymalne sekwencje tetrapeptydowe wybierając aminokwasy, które nie tylko warunkują selektywność opracowanych związków, ale też są dobrze rozpoznawane przez badany enzym. Spośród zaprojektowanych substratów wybraliśmy trzy sekwencje peptydowe, których analiza kinetyczna potwierdziła selektywność względem wybranych DUBs. Pomimo wprowadzenia nienaturalnych aminokwasów w sekwencji tetrapeptydowych substratów, nie były one efektywnie hydrolizowane przez DUBs. W strukturze enzymów deubikwitynujących można wyróżnić dwa regiony oddziałujące z substratem, wymagane do efektywnej hydrolizy ubikwityny z jej białkowych koniugatów [106]. Pierwszy region (stanowiący drugorzędowe miejsce wiążące) oddziałuje z powierzchnią ubikwityny, natomiast drugi region stanowi centrum aktywne DUB, w którym wiązany jest C-końcowy motyw ubikwityny – sekwencja LRGG. W przypadku wielu DUBs wiązanie ubikwityny przez pierwszy region (oddalony od centrum aktywnego enzymu) prowadzi do dużych zmian konformacyjnych kieszeni wiążących DUB, które są wymagane do efektywnej katalizy substratów [106]. Z powyższych względów zdecydowaliśmy się syntetyzować pochodne ubikwityny zawierające nienaturalne aminokwasy w C-końcowym fragmencie ubikwityny. Wspólnie z mgr. inż. Mikołajem Żmudzińskim opracowaliśmy wydajną metodę syntezy pochodnych ubikwityny (Rys. 4). Sekwencja peptydowa ubikwityny została podzielona na trzy segmenty, z których każdy został zsyntetyzowany oddzielnie za pomocą metody SPPS syntezy peptydowych hydrazydów. Takie podejście umożliwia: (1) wydajną syntezę każdego segmentu peptydowego z dobrą czystością; (2) włączenie nienaturalnych aminokwasów do C-końcowego motywu Ub oraz (3) modyfikację N-końca Ub poprzez wprowadzenie różnych znaczników i linkerów. W kolejnym etapie syntezy trzy segmenty peptydowe zostały połączone w reakcji natywnej chemicznej ligacji (NCL). Następnie reszty cysteinowe, które zostały wprowadzone w sekwencji Ub, aby umożliwić przeprowadzenie reakcji NCL, zostały przekształcone w alaninę w wyniku wolnorodnikowej reakcji desulfuryzacji. W ostatnim etapie, znacznik fluorescencyjny z glicyną został przyłączony, a finalny produkt oczyszczony (Rys. 4).



Rysunek 4. Schemat syntezy pochodnych ubikwityny. Rysunek zaadaptowano z publikacji H3.

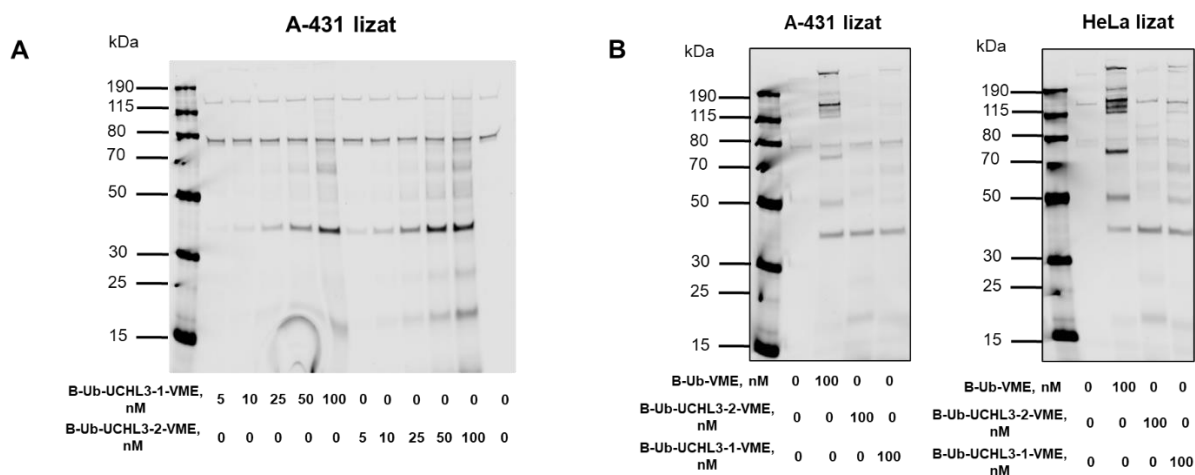
Analiza kinetyczna substratów fluorogenicznych opartych na strukturze ubikwityny zawierających nienaturalne aminokwasy na C-końcu ujawniła, iż są one selektywne względem docelowych DUBs oraz lepiej rozpoznawane niż substrat referencyjny – zawierający sekwencję ubikwityny (Ub-ACC). W ostatnim etapie badań przekształciliśmy substraty fluorogeniczne oparte na strukturze Ub w markery chemiczne poprzez wprowadzenie znacznika – biotyny na N-końcu oraz reaktywnej grupy wiążącej – winylometyloestru (VME) na C-końcu. Markery chemiczne zostały zsyntetyzowane za pomocą tej samej metody co substraty fluorogeniczne. Selektywność markerów chemicznych określiłam w badaniach na rekombinowanych enzymach oraz na lizatach komórkowych. Wybrałam trzy linie komórkowe (HeLa, HEK-293T oraz A-431), które różnią się profilem ekspresji DUBs. Ze względu na brak ekspresji MERS-CoV PL^{pro} w ludzkich komórkach, enzym ten został przeze mnie dodany do lizatów komórkowych. Analiza otrzymanych wyników wykazała, iż zaprojektowane markery chemiczne wykazują wysoką selektywność względem MERS-CoV PL^{pro} oraz UCH-L3 w porównaniu do referencyjnego markera zawierającego sekwencję natywnej cząsteczki Ub (B-Ub-VME), który znakował wiele DUBs obecnych w lizatach komórkowych (**Rys. 5A-C**). Eksperyment z użyciem przeciwciała przeciwko UCH-L3 potwierdził, iż oba zaprojektowane markery chemiczne (B-Ub-UCHL3-1-VME i B-Ub-UCHL3-2-VME) znakują UCH-L3 w lizatach komórkowych (**Rys. 5D**).



Rysunek 5. Selektywność markerów chemicznych względem DUBs. Znakowanie DUBs w lizatach komórkowych przez B-Ub-VME i B-Ub-MERS27-VME (panel A) oraz B-Ub-UCHL3-1-VME i B-Ub-UCHL3-2-VME (panele B-D). Detekcja UCH-L3 w lizacie komórkowym A-431 przy użyciu markerów chemicznych i przeciwciała przeciwko UCH-L3. Lizat komórkowy A-431 inkubowano z trzema różnymi stężeniami ABPs (100, 200 i 400 nM) przez 30 minut w 37°C (panel D). Rysunek zaadaptowano z publikacji H3.

W celu potwierdzenia, iż znakowanie UCH-L3 w lizatach komórkowych jest zależne od markera chemicznego przeprowadziłam eksperyment, w którym lizat komórkowy A-431

inkubowałam z markerami w różnych stężeniach (**Rys. 6A**) oraz eksperyment pull-down (**Rys. 6B**). Lizaty komórkowe najpierw inkubowałam z markerami chemicznymi (lub bez markerów – próbka kontrolna), a następnie ze złożem agarozowym ze streptawidyną. Próbki po inkubacji poddałam elektroforezie i analizie Western Blot (**Rys. 6B**).



Rysunek 6. Znakowanie DUBs w lizatach komórkowych za pomocą markerów chemicznych. Detekcja UCH-L3 w lizacie komórkowym A-431 za pomocą różnych stężeń ABPs (panel A). Eksperyment pull-down z użyciem B-Ub-VME, B-Ub-UCHL3-1-VME i B-Ub-UCHL3-2-VME (panel B). Lizaty A-431 i HeLa inkubowano z ABPs lub bez nich przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie dodano złożę agarozowe ze streptawidyną i próbki inkubowano przez 2,5 godziny w temperaturze 4°C. Próbki analizowano za pomocą elektroforezy żelowej, a następnie Western Blot. Rysunek zaadaptowano z publikacji H3.

Podsumowując, w niniejszej pracy pokazaliśmy, iż możliwe jest otrzymanie selektywnych narzędzi chemicznych opartych na strukturze ubikwityny dla DUBs poprzez modyfikację C-końcowego fragmentu Ub. Wspólnie z mgr. inż. Mikołajem Żmudzińskim opracowałam wydajną metodę syntezy tych związków. Wykonane przeze mnie badania biochemiczne (na rekombinowanych enzymach oraz lizatach komórkowych) potwierdziły użyteczność otrzymanych substratów i markerów chemicznych w obrazowaniu aktywności wybranych DUBs. Ponadto przedstawiona przez nas nowa strategia otrzymywania selektywnych związków chemicznych opartych na strukturze Ub może zostać wykorzystana do projektowania: (1) nowych narzędzi do badania DUBs należących do różnych podklas; (2) bardziej selektywnych narzędzi opartych na łańcuchu poliubikwitynowym o różnej topologii; oraz (3) nowych selektywnych narzędzi chemicznych do badania enzymów rozpoznających podobne do ubikwityny białka (np. SUMO, ISG15 lub Nedd8).

H6: Rut W., Żmudziński M., Drag M., “Design and Synthesis of Ubiquitin-Based Chemical Tools with Unnatural Amino Acids for Selective Detection of Deubiquitinases”, *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2591, 59-78.

Publikacja ta powstała w oparciu o wyniki uzyskane z wcześniejszej pracy opublikowanej w *Chemical Science* (H3). W niniejszej pracy przedstawiłam szczegółowy protokół projektowania i syntezy selektywnych narzędzi chemicznych opartych na strukturze ubikwityny dla enzymów deubikwitynujących. Opisałam (1) protokół identyfikacji selektywnej sekwencji peptydowej za pomocą kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych zawierającej naturalne i nienaturalne aminokwasy (HyCoSuL); (2) szczegółowy protokół syntezy pochodnych ubikwityny (substratów i markerów chemicznych) zawierających selektywną sekwencję peptydową na C-końcu ubikwityny oraz (3) zastosowanie otrzymanych markerów chemicznych do detekcji DUBs w lizatach komórkowych. Warto zaznaczyć, iż na końcu publikacji znajdują się tzw. uwagi (ang. Notes), w których opisałam wskazówki/rady dotyczące rozwiązywania problemów pojawiających się podczas wykonywania opisanych eksperymentów.

Proteazy wirusowe

H1: Rut W., Zhang L., Kasperkiewicz P., Poręba M., Hilgenfeld R., Drağ M., „Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease”, *Antiviral Research*, 2017, 139, 88-94.

Pandemia COVID-19 wywołana wirusem SARS-CoV-2 wyraźnie pokazała jak ważny cel terapeutyczny stanowią proteazy wirusowe. Swoje badania nad aktywnością proteaz wirusowych rozpoczęłam od proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika. Wirus Zika (ZIKV) został po raz pierwszy wyizolowany z komórek małpy rezus i scharakteryzowany przez Dicka w 1947 roku [107]. Wirus ten szybko rozprzestrzenił się w regionach tropikalnych i subtropikalnych Afryki Środkowej oraz Azji Południowej i Południowo-Wschodniej. Od 2007 roku ogniska choroby wywołanej wirusem Zika odnotowano w Afryce, obu Amerykach, Azji i na Pacyfiku. Badania wykazały, iż zakażenie wirusem Zika oprócz łagodnego przebiegu choroby jakim jest wystąpienie takich objawów jak wysypka, gorączka, bóle mięśni, może również powodować poważne zaburzenia neurologiczne, takie jak zespół Guillaina-Barrégo, ostre zapalenie rdzenia kręgowego oraz małopłowie u noworodków [108-112]. Obecnie nie ma specyficznych metod

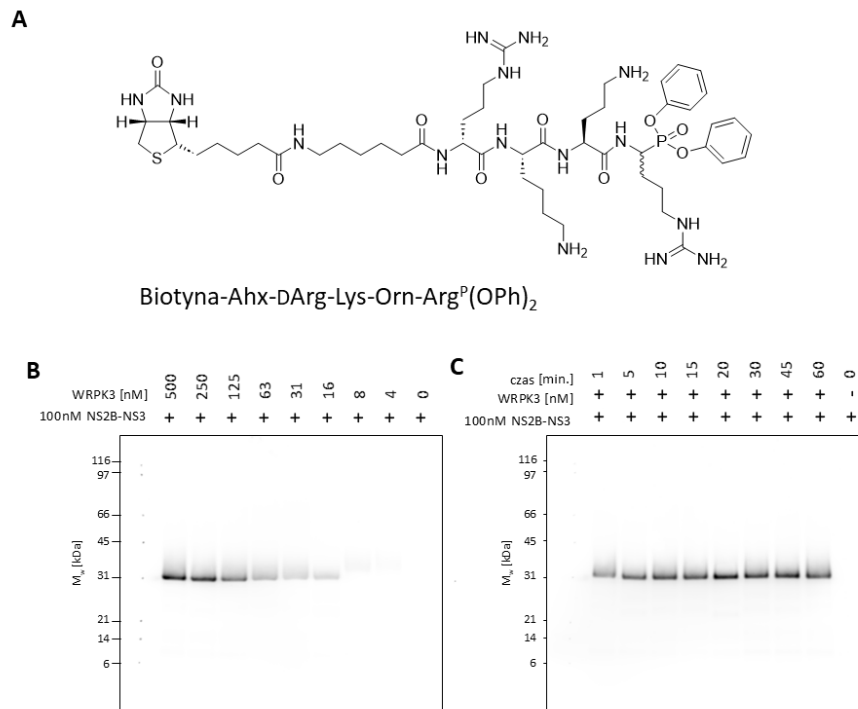
leczenie infekcji/choroby wywołanej zakażeniem ZIKV, nie jest również dostępna szczepionka przeciwko temu wirusowi.

W genomie wirusa Zika kodowana jest poliproteina, która może być hydrolizowana zarówno przez peptydazy sygnałowe gospodarza jak i wirusową proteazę NS2B-NS3, co prowadzi do powstania trzech białek strukturalnych i siedmiu białek niestrukturalnych, niezbędnych w procesie replikacji wirusa i składania wirionów [113, 114]. Ze względu na pełnioną funkcję, proteaza NS2B-NS3 stanowi atrakcyjny cel w projektowaniu leków hamujących namnażanie się wirusa.

W pierwszym etapie badań określiłam profil specyficzności substratowej proteazy NS2B-NS3 w pozycjach P4-P1 za pomocą biblioteki HyCoSuL oraz przy użyciu zdefiniowanej biblioteki P1 (o ogólnej strukturze Ac-Ala-Arg-Leu-P1-ACC, gdzie P1 oznacza naturalny lub nienaturalny aminokwas). Analiza otrzymanego profilu preferencji substratowej ujawniła, iż proteaza ta wykazuje bardzo wąską specyficzność substratową w kieszeniach S3-S1 (preferowane są głównie zasadowe aminokwasy) oraz szeroką specyficzność substratową w kieszeni S4 (rozpoznawane są również aminokwasy o konfiguracji D). Analiza struktury krystalicznej enzymu potwierdziła brak zdefiniowanej kieszeni wiążącej S4, co przekłada się na szeroką specyficzność substratową enzymu w pozycji P4 [115]. Informacje te są szczególnie istotne podczas projektowania selektywnych sekwencji peptydowych, gdyż możliwość wprowadzenia praktycznie dowolnego aminokwasu w pozycji P4 znacznie zwiększa szanse znalezienia selektywnej sekwencji peptydowej, w przypadku gdy pozostałe badane proteazy mają zdefiniowany profil specyficzności substratowej w pozycji P4 i nie rozpoznają wielu aminokwasów.

W kolejnym etapie badań, na podstawie otrzymanego profilu specyficzności substratowej zaprojektowałam i zsyntetyzowałam tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne i określiłam aktywność proteazy NS2B-NS3 względem nich. Badania kinetyczne ujawniły, iż zaprojektowane substraty są bardzo dobrze rozpoznawane przez enzym (k_{kat}/K_M dla najlepszego substratu WR3: Ac-DArg-Lys-Orn-Arg-ACC wynosiło $1\ 100\ 000\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i był on 3,5 krotnie lepiej rozpoznawany niż opracowany we wcześniejszych badaniach substrat (Ac-Nle-Lys-Lys-Arg-ACC). W ostatnim etapie badań przekształciłam najlepszy substrat w marker chemiczny, który w miejscu znacznika fluorogenicznego (ACC) zawierał reaktywną grupę wiążącą – fosfonian difenyłowy oraz biotynę na N-końcu, umożliwiającą detekcję kompleksu enzym–marker (**Rys. 7A**). Pomiar stałej inhibicji drugiego rzędu ($k_{\text{obs}}/I = 2,94 \times 10^6\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) oraz analiza reaktywności markera chemicznego za pomocą techniki Western Blot wykazały bardzo duże powinowactwo markera chemicznego względem NS2B-NS3 (marker

znakował proteazę przy stężeniu równym 16 nM, a kompleks marker chemiczny–enzym był widoczny na membranie już po minucie inkubacji) (**Rys. 7B, C**).



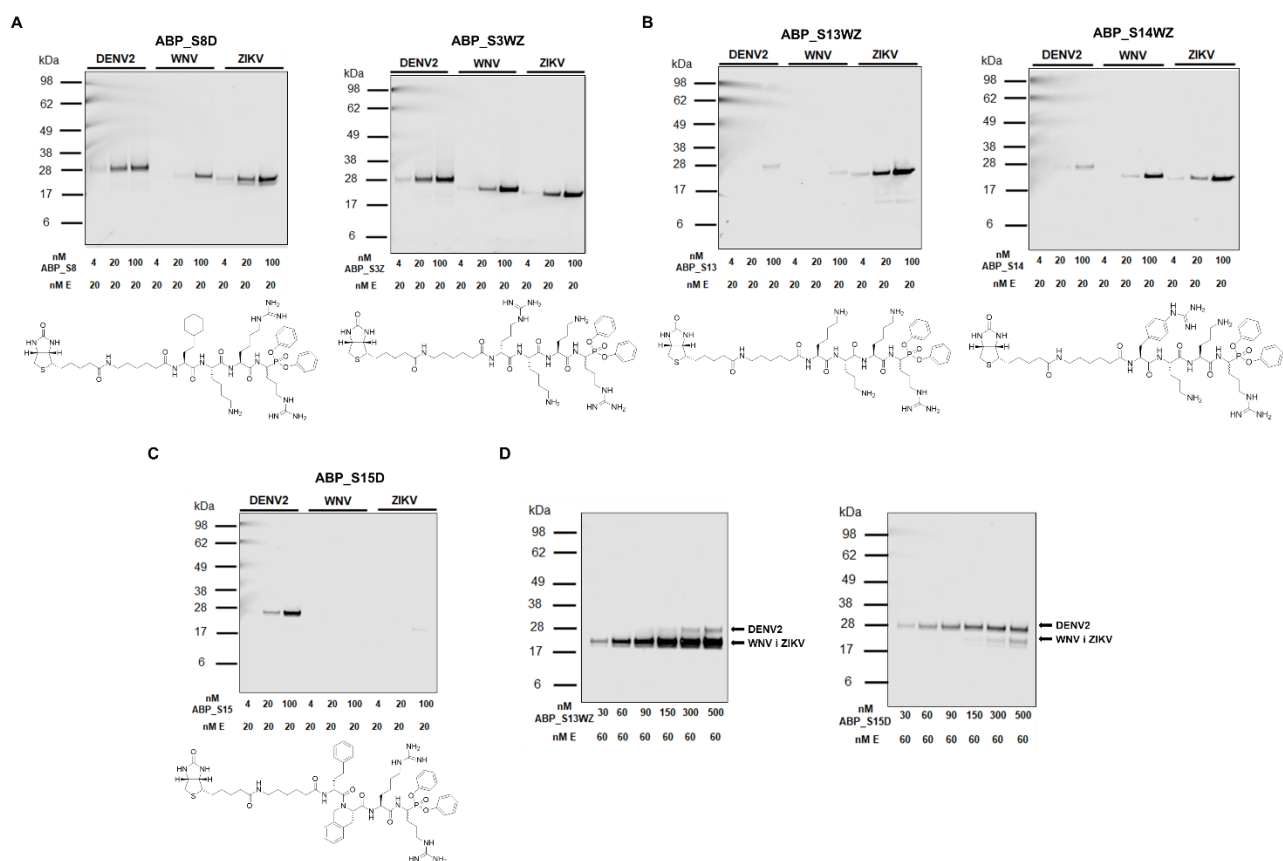
Rysunek 7. Detekcja proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika za pomocą markera chemicznego WRPK3. (Panel A) struktura markera chemicznego. (Panel B) enzym (100 nM) inkubowano z markerem chemicznym w stężeniach od 4 do 500 nM przez 10 minut, a następnie próbki analizowano za pomocą metody SDS-PAGE i Western Blot. (Panel C) enzym (100 nM) inkubowano z markerem chemicznym (100 nM) w czasie od 1 minuty do 60 minut, po czym próbki analizowano za pomocą metody SDS-PAGE i Western Blot. Rysunek zaadaptowano z publikacji H1.

Podsumowując w niniejszej pracy jako pierwsza opracowałam marker chemiczny wykazujący bardzo duże powinowactwo względem proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika. Ponadto opracowany profil specyficzności substratowej może zostać wykorzystany w poszukiwaniu skutecznych inhibitorów jako potencjalnych leków przeciwwirusowych. Publikacja opisująca powyższe wyniki badań została oznaczona na platformie Web of Science jako „highly cited paper”, co świadczy o dużym zainteresowaniu tą tematyką badawczą i otrzymanymi przeze mnie wynikami.

H2: Rut W., Groborz K., Zhang L., Modrzycka S., Poreba M., Hilgenfeld R., Drag M., Profiling of flaviviral NS2B-NS3 protease specificity provides a structural basis for the development of selective chemical tools that differentiate dengue from Zika and West Nile viruses, *Antiviral Research*, 2020, 175, 104731.

W kolejnej mojej pracy dotyczącej wirusowych proteaz zbadalam czy proteazy NS2B-NS3 flawiwirusów (ZIKV, wirusa zachodniego Nilu – ang. West Nile Virus - WNV i wirusa Dengi) wykazują podobną specyficzność substratowa, a tym samym inhibitory oraz leki projektowane dla jednej proteazy NS2B-NS3, mogą być skuteczne w leczeniu zakażeń wywołanych przez pozostałe fawiwirusy. Biorąc pod uwagę, że wszystkie trzy enzymy mają taką samą strukturę przestrzenną, proteazy te mogą posiadać podobny profil specyficzności substratowej, co odzwierciedla struktura ich naturalnych substratów [113]. Jednak, proteazy o tej samej strukturze przestrzennej mogą wykazywać różnice w budowie kieszeni wiążących, co można stwierdzić dzięki pogłębionej analizie biochemicznej. Wykorzystanie naturalnych aminokwasów dostarcza jedynie ograniczonych informacji o architekturze kieszeni wiążących enzymu. Aby uzyskać znacznie szerszy wgląd, potrzebne jest podejście kombinatoryczne z zastosowaniem szerokiego spektrum różnorodnych struktur chemicznych. W pierwszym etapie badań określiłam profil specyficzności substratowej proteaz NS2B-NS3 WNV i DENV2 w pozycjach P4-P1 za pomocą biblioteki HyCoSuL oraz przy użyciu zdefiniowanej biblioteki P1. Analiza profilu specyficzności substratowej trzech wirusowych proteaz ujawniła, iż proteazy NS2B-NS3 WNV i ZIKV wykazują nakładającą się specyficzność substratową, podczas gdy proteaza DENV2 wykazuje szerszy profil specyficzności substratowej (w pozycjach P3 i P4). Na podstawie otrzymanego profilu specyficzności substratowej zaprojektowałam i zsyntetyzowałam tetrapeptydowe substraty fluorogeniczne i określiłam aktywność proteaz NS2B-NS3 względem nich. Badania kinetyczne ujawniły, iż enzymy te wykazują nakładającą się specyficzność substratową, jednak można zauważyć różnice w specyficzności (w pozycjach P2 i P4) między proteazą DENV2, a dwoma pozostałymi (ZIKV i WNV). Dlatego też celem kolejnego etapu badań było zaprojektowanie sekwencji peptydowych pozwalających na rozróżnienie proteazy DENV2 od proteaz NS2B-NS3 WNV i ZIKV. Analiza kinetyczna zaprojektowanych substratów wykazała, iż dwa substraty (S13WZ i S14WZ) były bardzo słabo rozpoznawane przez proteazę NS2B-NS3 DENV2 i wydajnie hydrolizowane przez proteazy NS2B-NS3 ZIKV i WNV oraz substrat S15D był selektywny względem proteazy NS2B-NS3 wirusa Dengi. W kolejnym etapie badań, w celu otrzymania narzędzi chemicznych umożliwiających wizualizację wirusowych proteaz, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam markery chemiczne: dwa markery chemiczne dla proteazy DENV2

(ABP_S8D - Biotyna-6-Ahx-hCha-Lys-hArg-Arg^P(OPh)₂, który zawierał sekwencję peptydową najlepiej rozpoznawaną przez ten enzym i ABP_S15D - Biotyna-6-Ahx-DhPhe-Tic-hArg-Arg^P(OPh)₂, który zawierał selektywną sekwencję peptydową) oraz trzy markery chemiczne dla proteaz WNV i ZIKV (ABP_S3WZ - Biotyna-6-Ahx-DArg-Lys-Orn-Arg^P(OPh)₂, który zawierał jedną z najlepiej rozpoznanych sekwencji peptydowych; ABP_S13WZ - Biotyna-6-Ahx-Lys-Orn-Lys-Arg^P(OPh)₂ i ABP_S14WZ - Biotyna-6-Ahx-Phe(guan)-Orn-Orn-Arg^P(OPh)₂, które zawierały selektywne sekwencje peptydowe względem proteaz ZIKV i WNV).



Rysunek 8. Detekcja wirusowych proteaz NS2B-NS3 za pomocą markerów chemicznych. Proteazy (20 nM) inkubowano z wybranym markerem chemicznym w trzech różnych stężeniach przez 15 minut, a następnie próbki analizowano za pomocą metody Western Blot (panel A, B i C). Ocena selektywności markerów chemicznych (ABP_S13WZ i ABP_S15D) względem wirusowych enzymów proteolitycznych. Trzy proteazy NS2B-NS3 (każda w stężeniu 20 nM) inkubowano z markerem chemicznym, a następnie próbki poddano analizie Western Blot (panel D). Rysunek zaadaptowano z publikacji H2.

Pomiar stałych inhibicji drugiego rzędu (k_{obs}/I) oraz analiza reaktywności/selektywności zaprojektowanych markerów chemicznych za pomocą techniki Western Blot względem trzech wirusowych proteaz wykazały, iż (1) markery chemiczne ABP_S8D i ABP_S3WZ znakowały wszystkie trzy wirusowe proteazy (**Rys. 8A**); (2) związek ABP_S3WZ wykazywał większe

powinowactwo względem proteazy WNV w porównaniu z ABP_S8D; (3) ABP_S14WZ wykazywał większe powinowactwo względem proteaz NS2B-NS3 WNV i ZIKV, ale mniejszą selektywność w porównaniu do ABP_S13WZ (**Rys. 8B**); (4) ABP_S15D był selektywny względem proteazy wirusa Dengi (**Rys. 8C**). W ostatnim etapie badań wykonałam testy konkurencyjne inkubując wszystkie trzy proteazy wirusowe (tzw. koktajl proteaz) z markerem chemicznym ABP_S13WZ lub ABP_S15D (**Rys. 8D**). Marker chemiczny ABP_S13WZ najpierw wiązał się z proteazą NS2B-NS3 ZIKV, następnie WNV i przy 2,5-krotnym nadmiarze markera względem enzymu, z proteazą DENV2. Natomiast związek ABP_S15D był selektywny względem proteazy NS2B-NS3 wirusa Dengi.

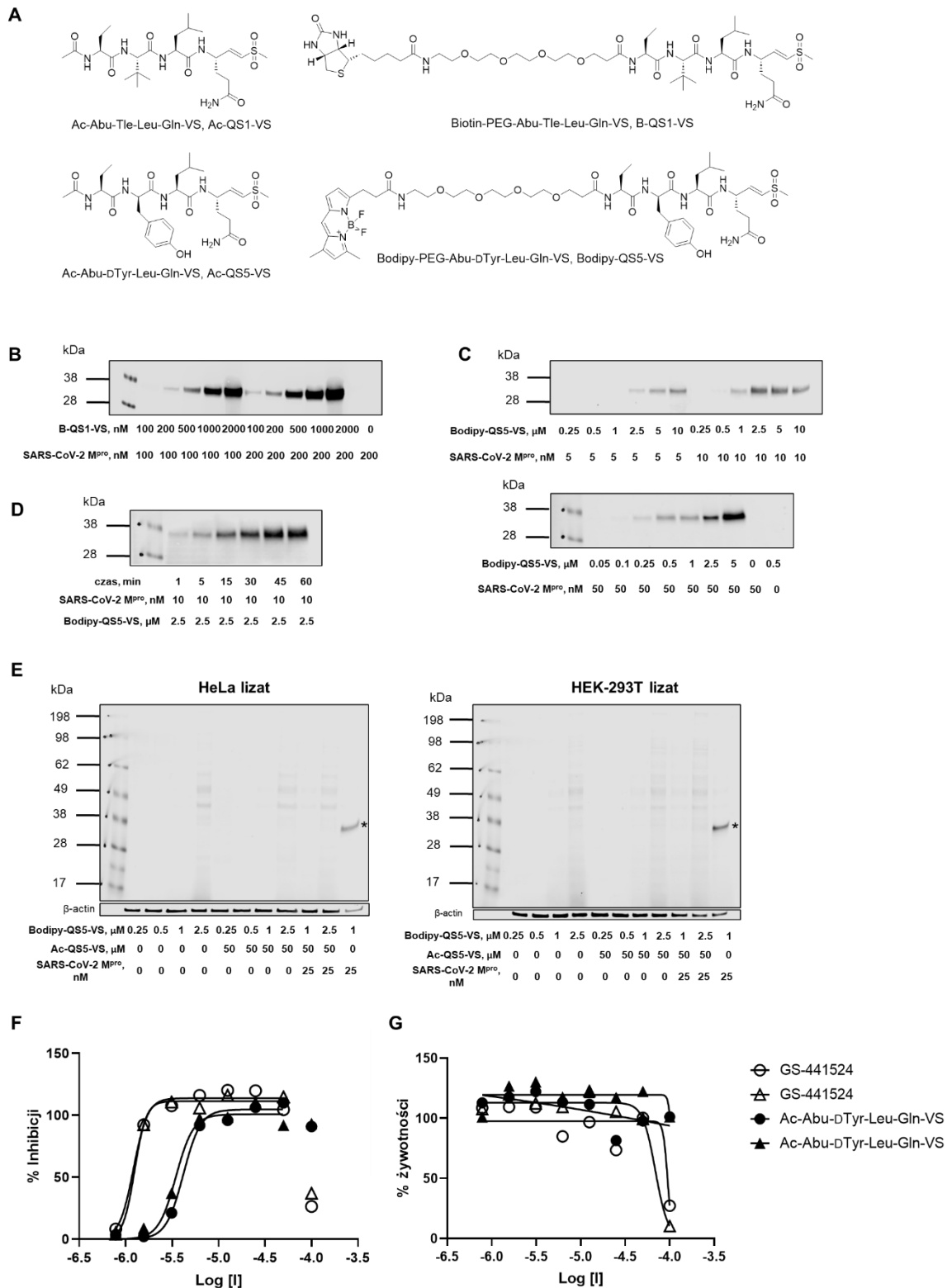
Podsumowując otrzymane przeze mnie wyniki badań ujawniły, iż proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika i Zachodniego Nilu wykazują bardzo podobny profil specyficzności substratowej we wszystkich kieszeniach wiążących, podczas gdy ortolog wirusa Dengi ma nieco inny profil preferencji substratowej w pozycjach P2 i P4. Informacje te pozwoliły na zaprojektowanie selektywnej sekwencji peptydowej, użytej w syntezie substratu i markera chemicznego, umożliwiającej rozróżnienie proteazy NS2B-NS3 wirusa Dengi od pozostałych dwóch badanych proteaz. Ponadto opracowałam narzędzia chemiczne pozwalające na detekcję wszystkich trzech wirusowych proteaz NS2B-NS3. Wzrost liczby zakażeń wirusowych wywołany przez przenoszone przez komary flawiwirusy (ZIKV, WNV i DENV) nie tylko w Azji czy Afryce, ale również w krajach europejskich powoduje, iż konieczne jest opracowanie szybkich i specyficznych testów diagnostycznych oraz skutecznych leków przeciwwirusowych. Wyniki opisane w niniejszej publikacji zapewniają podstawy strukturalne w projektowaniu inhibitorów, które mogą posłużyć jako struktura wiodąca w pracach nad rozwojem skutecznych leków przeciwwirusowych.

H5: Rut W., Groborz K., Zhang L., Sun X., Zmudzinski M., Pawlik B., Wang X., Jochmans D., Neyts J., Mlynarski W., Hilgenfeld R., Drag M., SARS-CoV-2 Mpro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging, Nature Chemical Biology, 2021, 17, 222-228.

Badania dotyczące proteaz wirusa SARS-CoV-2 rozpoczęłam pod koniec lutego 2020 roku. Wówczas niewiele było wiadomo na temat samego wirusa, który bardzo szybko się rozprzestrzenił doprowadzając do wybuchu pandemii COVID-19 (z ang. *coronavirus disease 2019*). Do typowych objawów zakażenia wirusem SARS-CoV-2 należały kaszel, gorączka, bóle mięśni, głowy, duszności, a w ciężkim przebiegu choroby dochodziło do problemów z oddychaniem, zapalenia płuc, ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej, niewydolności

wielonarządowej, a nawet śmierci [116, 117]. Nie istniały szczepionki, ani leki na COVID-19, dlatego wysiłki naukowców na całym świecie skupione były na identyfikacji molekularnych celów kluczowych dla rozwoju terapii przeciwwirusowej. Jak pokazały nasze badania, których wyniki opublikowaliśmy w czasopiśmie *Nature Chemical Biology*, jednym z takich molekularnych celów terapeutycznych jest wirusowa proteaza SARS-CoV-2 M^{pro} (z ang. *main protease*). SARS-CoV-2 M^{pro} to proteaza cysteinowa, która hydrolizuje wirusową poliproteinę prowadząc do powstania 12 białek niestrukturalnych, w tym zależnej od RNA polimerazy RNA oraz helikazy [118, 119]. Białka te są niezbędne w procesie replikacji wirusa, dlatego zahamowanie aktywności proteazy M^{pro} stanowi jedną z potencjalnych strategii walki z koronawirusem. Ze względu na bliskie pokrewieństwo filogenetyczne nowego wirusa SARS-CoV-2 z wcześniejszym SARS-CoV, który wywołał epidemię w latach 2002-2003, ich proteazy mają wiele wspólnych cech strukturalnych i funkcjonalnych [120-123]. Dzięki współpracy z grupą prof. Rolfa Hilgenfelda z Niemiec otrzymaliśmy te dwie wirusowe proteazy do badań porównawczych. W pierwszym etapie badań określiłam specyficzność substratową proteazy M^{pro} obu wirusów za pomocą HyCoSuL. Otrzymany profil preferencji substratowej ujawnił, iż proteazy obu wirusów wykazują bardzo podobną specyficzność substratową, co sugeruje brak mutacji w miejscu aktywnym proteazy SARS-CoV-2 M^{pro}, a tym samym inhibitory/leki projektowane dla SARS-CoV M^{pro} mogą być bezpośrednio wykorzystane w badaniach nad SARS-CoV-2. Dokładna analiza preferencji substratowej kieszeni wiążących w centrum aktywnym SARS-CoV-2 M^{pro} pozwoliła mi na zaprojektowanie optymalnej sekwencji peptydowej (Abu-DTyr-Leu-Gln, pozycje P4-P1) oraz sekwencji zawierającej najlepiej rozpoznawane aminokwasy (Abu-Tle-Leu-Gln), które użyłam w syntezie inhibitorów (Ac-Abu-DTyr-Leu-Gln-VS, Ac-QS5-VS; Ac-Abu-Tle-Leu-Gln-VS, Ac-QS1-VS) oraz markerów chemicznych (Bodipy-PEG(4)-Abu-DTyr-Leu-Gln-VS, Bodipy-QS5-VS; Cy5-PEG(4)-Abu-Tle-Leu-Gln-VS, Cy5-QS1-VS) (**Rys. 9A**). Aktywność i selektywność związków potwierdziłam w badaniach na rekombinowanych enzymach oraz lizatach komórkowych (linie komórkowe HeLa i HEK-293T) (**Rys. 9B-E**). Grupa prof. Hilgenfelda określiła strukturę krystaliczną proteazy M^{pro} w kompleksie z markerem chemicznym o strukturze biotyna-PEG(4)-Abu-Tle-Leu-Gln-VS potwierdzając tym samym, iż marker chemiczny wiąże się w centrum aktywnym proteazy. Wyniki badań wykonanych w laboratorium prof. Neytsa w Belgii na ludzkich komórkach wątroby (Huh7) zakażonych wirusem SARS-CoV-2 ujawniły, iż zaprojektowany przeze mnie peptydowy inhibitor Ac-QS5-VS wykazuje bardzo podobną siłę hamowania replikacji wirusa ($EC_{50} = 3,7 \mu\text{M}$; $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) jak powszechnie stosowany lek przeciwwirusowy remdesivir ($EC_{50} = 1,15 \mu\text{M}$; $CC_{50} = 87 \mu\text{M}$) i jest od niego mniej toksyczny

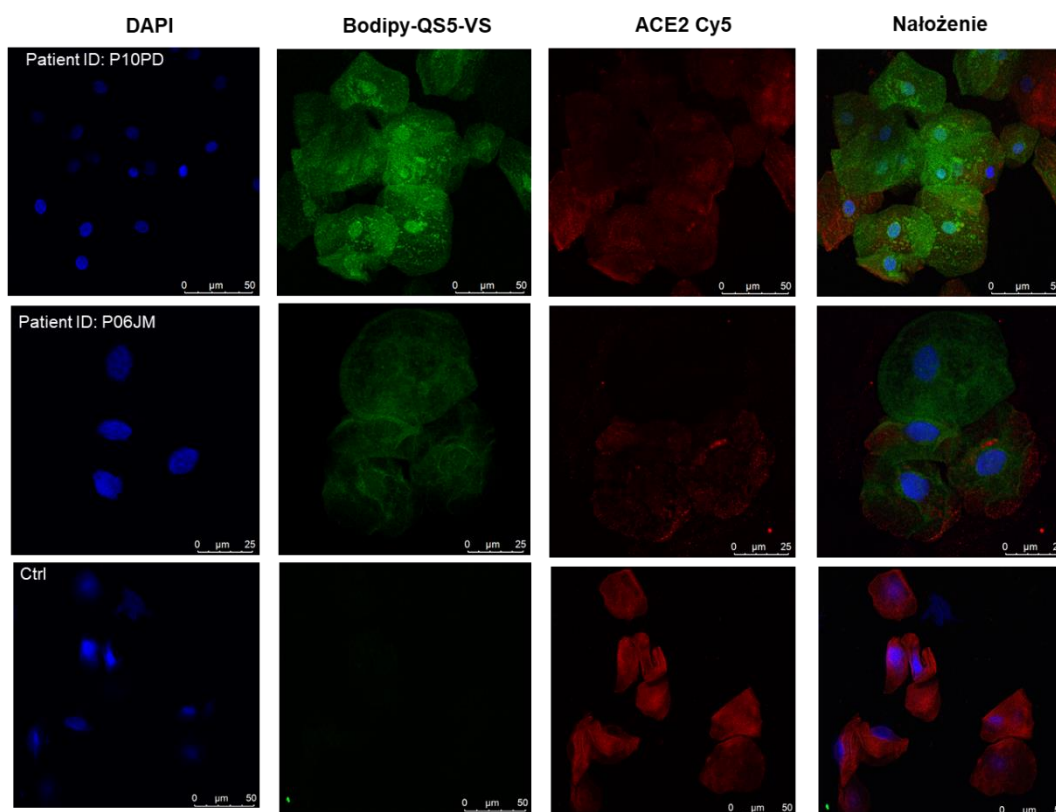
(Rys. 9F, G). Należy zaznaczyć, że oba związki wykazują inny mechanizm działa (remdesivir hamuje wirusową polimerazę RNA zależną od RNA [124]).



Rysunek 9. Detekcja SARS-CoV-2 M^{Pro} za pomocą markerów chemicznych. Struktury inhibitorów i markerów chemicznych (A). Znakowanie SARS-CoV-2 M^{Pro} za pomocą ABPs (B-D). Selektywność

ABPs w lizatach komórkowych ((E), gwiazdką zaznaczono SARS-CoV-2 M^{pro} dodany do lizatów). Aktywność przeciwwirusowa inhibitorów Ac-QS5-VS i remdesiviru na komórkach zakażonych wirusem (F) oraz analiza toksyczności komórkowej (G). Rysunek zaadaptowano z publikacji H5.

W ostatnim etapie badań, we współpracy z grupą prof. Wojciecha Młynarskiego z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, postanowiliśmy sprawdzić czy otrzymany marker chemiczny może zostać użyty do detekcji SARS-CoV-2 M^{pro} w próbkach pacjentów zakażonych wirusem. Próbkę komórek pobranych z nosogardzieli pacjentów chorych na COVID-19 oraz zdrowych (kontrola negatywna) inkubowaliśmy z markerem chemicznym, a następnie przygotowane preparaty analizowaliśmy pod mikroskopem konfokalnym. Wyniki tych badań pokazały, iż dzięki użyciu zaprojektowanego markera chemicznego możliwa jest detekcja proteazy M^{pro} w próbkach chorych na COVID-19 oraz rozróżnienie pacjentów zakażonych wirusem od zdrowych (Rys. 10). Ponadto zaobserwowaliśmy różnice w intensywności sygnałów pochodzących od proteazy M^{pro} w próbkach pacjenta pobranych w pierwszym i piątym dniu po diagnozie, co świadczy o rozwijającej się infekcji wirusowej. Otrzymane wyniki potwierdzają, że zaprojektowany przeze mnie marker chemiczny to doskonałe narzędzie do detekcji tego enzymu oraz może zostać wykorzystany jako narzędzie diagnostyczne.



Rysunek 10. Detekcja SARS-CoV-2 M^{pro} za pomocą Bodipy-QS5-VS w komórkach nabłonka nosogardla pacjentów, u których wynik testu na obecność SARS-CoV-2 był pozytywny (dwa górne

panele, pacjent P10PD, P06JM) i pacjentów zdrowych (próbki kontrolne, dolny panel ctrl). Komórki nabłonkowe pochodzące z wymazów z jamy nosowo-gardłowej wybarwiono markerem Bodipy-QS5-VS, przeciwciałem anti-ACE2 (enzym konwertujący angiotensynę 2) z drugorzędowym przeciwciałem Cy5 oraz DAPI (jądra komórkowe). Rysunek zaadaptowano z publikacji H5.

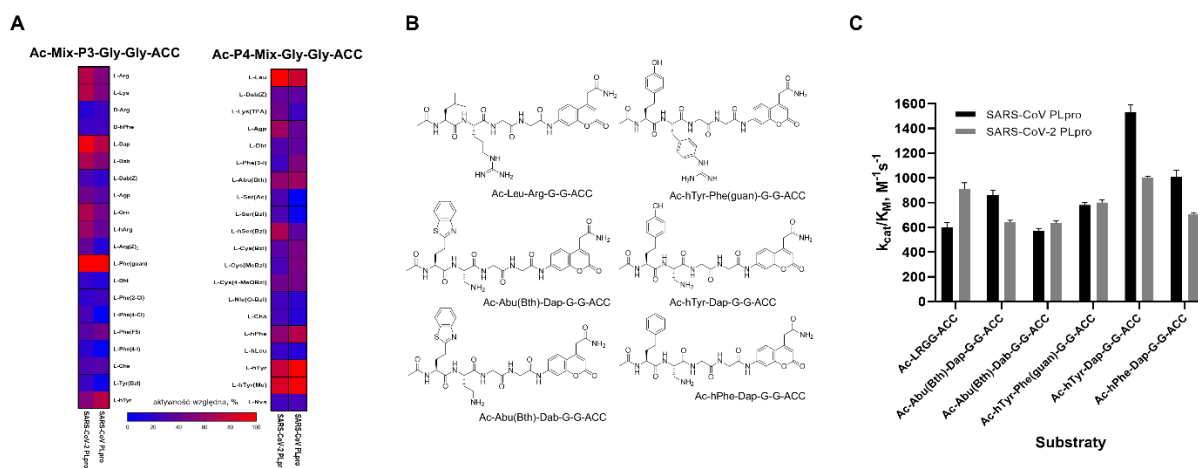
Podsumowując, w niniejszej publikacji dokonaliśmy dokładnej charakterystyki proteazy SARS-CoV-2 M^{pro} zarówno pod względem preferencji substratowej, jak również ukierunkowanego projektowania inhibitorów i markerów chemicznych. Opracowane przeze mnie narzędzia chemiczne mogą zostać wykorzystane do optymalizacji struktury leków przeciw COVID-19, a także w poszukiwaniu nowego przeznaczenia istniejących leków (ang. *drug repurposing*). Zaprojektowane przeze mnie substraty fluorogeniczne wykorzystywane są w wielu ośrodkach badawczych w badaniach przesiewowych znanych już inhibitorów i leków jako potencjalnych związków hamujących aktywność proteazy SARS-CoV-2 M^{pro}. Użycie substratów fluorogenicznych znacznie przyspiesza i ułatwia wykonywanie tego typu badań. Przykładami tego typu zastosowań zaprojektowanych substratów w aktualnej literaturze są artykuły dotyczące poszukiwania inhibitorów proteazy M^{pro} (Breidenbach et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2021, 60, 2; Baker et al. PLoS ONE 2021, 16, e0245962) czy syntezy markera chemicznego (van de Plassche et al. ChemBioChem 2020, 21, 3383), którego struktura oparta jest na sekwencji peptydowej jednego z opracowanych przeze mnie substratów. Ponadto w kilku przeglądach literaturowych odniesiono się do wpływu uzyskanych wyników badań na perspektywiczne terapie ukierunkowane względem COVID-19.

Publikacja opisująca powyższe wyniki badań została na przełomie stycznia i lutego 2023 roku oznaczona na platformie Web of Science jako „highly cited paper”. Ten wysoko cytowany artykuł uzyskał wystarczającą liczbę cytowań, aby znaleźć się w 1% najlepszych artykułów w dziedzinie biologii i biochemii w oparciu o próg wysoko cytowanych publikacji dla dziedziny i roku publikacji.

H4: Rut W., Lv Z., Zmudzinski M., Patchett S., Nayak D., Snipas S., Oualid F.E., Huang T.T., Bekes M., Drag M., Olsen S.K., 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), 1-13.

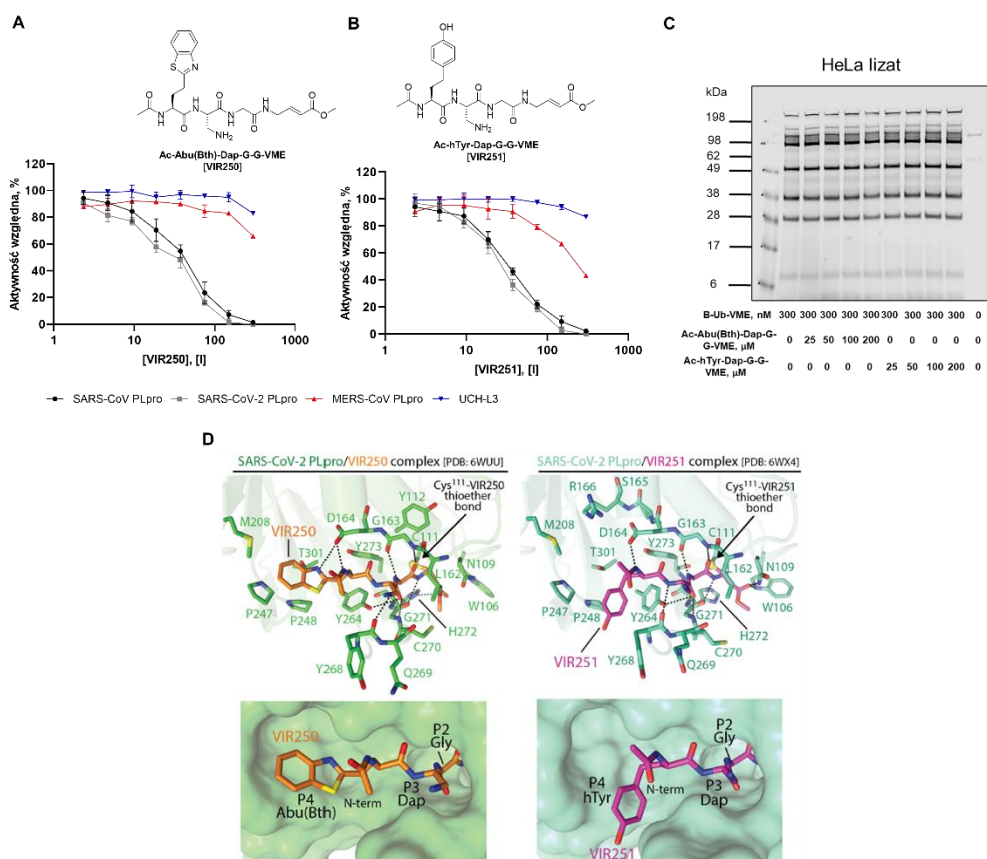
We współpracy z grupą badawczą prof. Shauna Olsena i Tonego Huanga, jako pierwszy zespół naukowy na świecie scharakteryzowaliśmy drugą proteazę wirusa SARS-CoV-2 – papaino-podobną proteazę PL^{pro}. Podobnie jak SARS-CoV-2 M^{pro}, PL^{pro} jest niezbędna w procesie

replikacji koronawirusa. Dodatkowo enzym ten pełni ważną funkcję w zaburzeniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji wirusowej. Badania nad proteazą PL^{pro} poprzedniego wirusa wykazały, iż jest ona zaangażowana w proces hamowania produkcji cytokin i chemokin, które są odpowiedzialne za aktywację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza podczas infekcji wirusowej [103, 125-128]. Dlatego enzym ten stanowi ważny cel molekularny w projektowaniu leków przeciwwirusowych. Pomimo znacznych wysiłków naukowców w poszukiwaniu skutecznych inhibitorów SARS-CoV PL^{pro}, brakuje istotnych informacji na temat skuteczności tych związków w badaniach klinicznych [120, 129, 130]. Nasza hipoteza badawcza zakładała, iż wiedza na temat SARS-CoV PL^{pro}, zdobyta w ciągu ostatnich lat, może zostać natychmiast wykorzystana w badaniach nad obecnym SARS-CoV-2 PL^{pro}, co znacznie przyspieszy rozwój nowych leków przeciwwirusowych. Określenie specyficzności substratowej, struktury i mechanizmu działania proteazy SARS-CoV-2 PL^{pro} znacznie ułatwiłoby opracowanie skutecznych inhibitorów poprzez dostarczenie niezbędnych informacji umożliwiających racjonalne projektowanie i retargetowanie leków, co było głównym celem naszych badań. Za pomocą HyCoSuL określiliśmy pełny profil preferencji substratowej proteazy PL^{pro} obecnego i poprzedniego koronawirusa. Analiza profilu specyficzności substratowej ujawniła, iż oba enzymy rozpoznają tylko Gly w pozycji P2, mają szeroką specyficzność w pozycji P3 i wąski profil preferencji aminokwasowej w pozycji P4. Ponadto architektura kieszeni wiążących w centrum aktywnym obu proteaz jest niemal identyczna, co potwierdza również analiza aminokwasów budujących kieszenie S4-S2 obu enzymów (**Rys. 11A-C**). Jest to krytycznie ważna informacja w aspekcie wykorzystania informacji z badań nad inhibitorami lub retargetowaniem leków prowadzonych w przeszłości dla SARS-CoV PL^{pro} do natychmiastowego zastosowania w badaniach nad SARS-CoV-2 PL^{pro}. Wykorzystując te informacje zaprojektowałam i zsyntetyzowałam kowalencyjne inhibitory (VIR250 i VIR251). Analiza biochemiczna wykazała, iż związki te charakteryzują się dobrą aktywnością i wysoką selektywnością względem wirusowych proteaz PL^{pro} (**Rys. 12A-C**). Jest to cenna informacja w kontekście prowadzenia badań ukierunkowanych na poszukiwanie peptydowych związków przeciwwirusowych względem tego enzymu.



Rysunek 11. Profilowanie aktywności wirusowych proteaz PL^{pro}. Profile specyficzności substratowej proteaz PL^{pro} (wybrane aminokwasy z bibliotek substratów P3 i P4, panel A). Struktura substratów fluorogenicznych (panel B). Stała specyficzności dla tetrapeptydowych substratów fluorogenicznych względem SARS-CoV PL^{pro} i SARS-CoV-2 PL^{pro} (panel C). Rysunek zaadaptowano z publikacji H4.

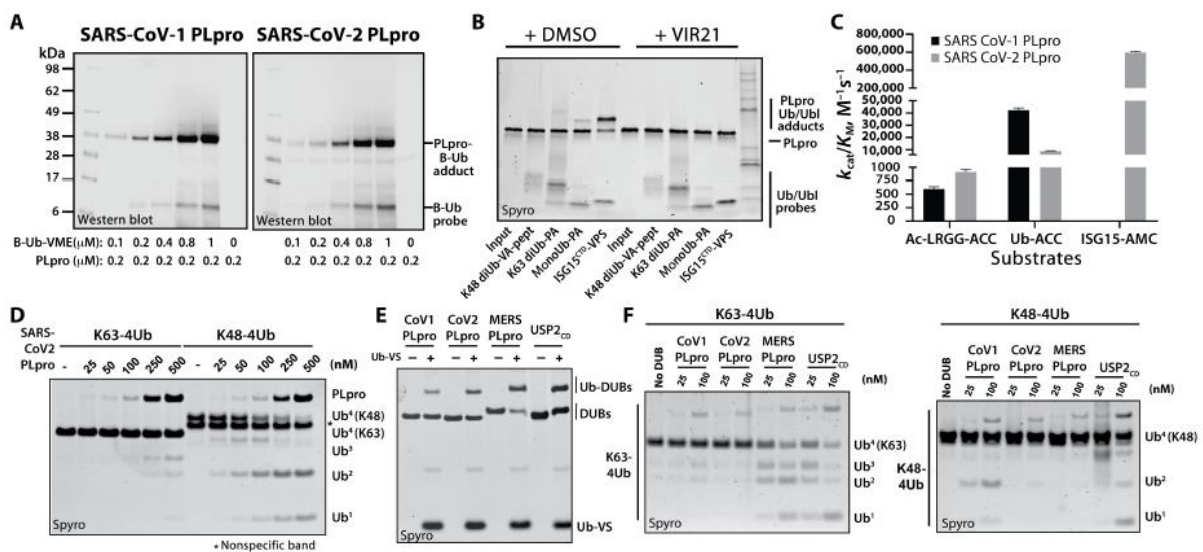
We współpracy z grupą prof. Olsena zostały określone struktury krystaliczne proteazy SARS-CoV-2 PL^{pro} w kompleksie z każdym z zaprojektowanych inhibitorów (**Rys. 12D**). Co ciekawe, aminokwasy w pozycji P4 VIR250 i VIR251 zajmowały przeciwne strony kieszeni wiążącej S4 proteazy, ponadto istniały dodatkowe regiony kieszeni S4, które nie były zaangażowane w interakcje z aminokwasami obu inhibitorów. Uzyskane struktury krystaliczne mogą stanowić podstawę przyszłych badań nad lekami, których celem będzie otrzymanie silniejszych inhibitorów.



Rysunek 12. Charakterystyka inhibitorów SARS-CoV-2 PL^{pro}. Inhibicja DUBs przez VIR250 (A) i VIR251 (B) ([I] = 2,3–300 μ M; stężenie SARS-CoV PL^{pro} 0,3 μ M; stężenie SARS-CoV-2 PL^{pro} 0,1 μ M; stężenie MERS-CoV PL^{pro} 2,5 μ M; stężenie UCH-L3 8 μ M). Ocena selektywności inhibitorów w lizacie komórkowym (C). Lizat komórek HeLa najpierw inkubowano ze wskazanym inhibitorem przez 30 min, a następnie z markerem Biotyna-Ub-VME. Próbkę analizowano za pomocą SDS-PAGE i metodą Western Blot przy użyciu streptawidyny znakowanej Alexa Fluor 647. Struktury krystaliczne SARS-CoV-2 PL^{pro} w kompleksie z inhibitorami (D). Rysunek zaadaptowano z publikacji H4.

SARS-CoV PL^{pro} poza hydrolizą wirusowej poliproteiny wykazuje dwie inne aktywności, a mianowicie katalizuje reakcję uwolnienia ubikwityny (aktywność deubikwitynująca) oraz ubikwityno-podobnego białka ISG15 (ang. *Interferon-induced gene 15*) z komórkowych substratów [131, 132]. Dlatego w ostatnim etapie badań zbadaliśmy aktywność SARS-CoV-2 PL^{pro} względem ubikwityny i białek ubikwityno-podobnych (**Rys. 13A-F**). Analiza biochemiczna wykazała, iż SARS-CoV-2 PL^{pro} wykazuje podobną aktywność względem ISG15 jak SARS-CoV PL^{pro}, natomiast znacznie słabiej rozpoznaje łańcuch poliubikwitynowy połączony resztą K48 (**Rys. 13C-F**). Ponadto SARS-CoV-2 PL^{pro} rozpoznaje substrat Ub-ACC tylko 10 razy lepiej niż tetrapeptydowy substrat, podczas gdy różnica ta dla SARS-CoV PL^{pro} jest 60-krotna (**Rys. 13C**). Wskazuje to na pewne różnice pomiędzy enzymami w miejscu oddziaływania z powierzchnią ubikwityny (ang. *exosite*). Biorąc pod uwagę ważną rolę ubikwityny i białek ubikwityno-podobnych we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na

infekcję wirusową, różnice te mogą mieć wpływ na biologię wirusa. Nasze późniejsze badania wykazały iż, niższa aktywności SARS-CoV-2 PL^{pro} względem ubikwityny w porównaniu do SARS-CoV PL^{pro} wynika z różnic w budowie regionu S1 enzymu odpowiedzialnego za wiązanie ubikwityny (region ten jest konserwatywny z wyjątkiem dwóch reszt aminokwasowych zlokalizowanych w domenie palca PL^{pro}: Val226 i Gln233 w SARS-CoV oraz Thr225 i Lys232 w SARS-CoV-2). Co istotne, wariant gamma koronawirusa powiązany z upośledzaniem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej posiada mutację w regionie S1, która zwiększa aktywność proteazy PL^{pro} względem ubikwityny (publikacja S6, Patchett S. i in., Cell Reports 2021).



Rysunek 13. Aktywność proteaz PL^{pro} względem Ub oraz białek ubikwitno-podobnych. (A) Znakowanie SARS-CoV PL^{pro} i SARS-CoV-2-PL^{pro} za pomocą markera Biotyna-Ub-VME. Rekombinowane enzymy inkubowano ze wskazanymi stężeniami B-Ub-VME przez 45 minut w 37°C, a następnie analizowano metodą SDS-PAGE i Western Blot przy użyciu koniugatu streptawidyny z Alexa Fluor 647. (B) SARS-CoV-2-PL^{pro} najpierw inkubowano z VIR251 lub bez inhibitora przez 30 minut w 37°C, a następnie ze wskazanym markerem chemicznym Ub/Ubl w temperaturze pokojowej przez 2 minuty. Następnie analizowano za pomocą SDS-PAGE. (C) Stała specyficzności dla wybranych substratów względem SARS-CoV PL^{pro} i SARS-CoV-2 PL^{pro}. (D) Wybrane substraty zawierające łańcuchy tetraUb inkubowano z SARS-CoV-2 PL^{pro} przez 30 minut w 37°C, a następnie poddano analizie SDS-PAGE. (E) Znakowanie DUBs za pomocą Ub-VS. Ub-VS inkubowano przez 30 minut w 37°C ze wskazaną proteazą, a następnie poddano analizie SDS-PAGE. (F) Wybrane substraty zawierające łańcuchy tetraUb inkubowano ze wskazaną proteazą i analizowano w taki sam sposób jak w panelu (D). Rysunek zaadaptowano z publikacji H4.

Podsumowując wyniki naszych badań otwierają drogę w kierunku projektowaniu skutecznych inhibitorów proteaz PL^{pro}, nie tylko względem obecnego koronawirusa, ale również koronawirusów, które mogą pojawić się w najbliższej przyszłości. Ponadto publikacja

opisująca powyższe wyniki badań została na przełomie stycznia i lutego 2023 roku oznaczona na platformie Web of Science jako „highly cited paper”. Ten wysoko cytowany artykuł uzyskał wystarczającą liczbę cytowań, aby znaleźć się w 1% najlepszych artykułów w dziedzinie biologii i biochemii w oparciu o próg wysoko cytowanych publikacji dla dziedziny i roku publikacji.

Publikacje uzupełniające:

Mój dorobek naukowy poza publikacjami stanowiącymi moje osiągnięcie habilitacyjne (**H1-H6**) obejmuje również prace **S1-S15**, które nie zostały włączone do osiągnięcia habilitacyjnego z uwagi na mój znacznie mniejszy wkład merytoryczny (wyjątek stanowią prace **S11 i S14**) lub inny cel badawczy (obrazowanie aktywności proteaz innych niż wirusowe) i stanowią uzupełnienie do niniejszej rozprawy habilitacyjnej (wykaz tych prac znajduje się w załączniku „Wykaz osiągnięć naukowych lub artystycznych, stanowiący znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”). Badania opisane w pracach **S1, S2, S4-S6** dotyczą proteaz wirusowych i pokrywają się z zakresem moich badań opisanych w dorobku habilitacyjnym, natomiast pozostałe prace dotyczą obrazowania aktywności proteaz ludzkich i drobnoustrojów, a mianowicie kaspaz i katepsyn – prace **S8-S10, S15**; proteazy FSAP – praca **S11**, proteaz drobnoustrojów chorobotwórczych – prace **S7 i S12**; proteasomu – prace **S3 i S14** oraz pracy przeglądowej na temat kombinatorycznych bibliotek substratów stosowanych do badań proteaz zaangażowanych w choroby nowotworowe – praca **S13**.

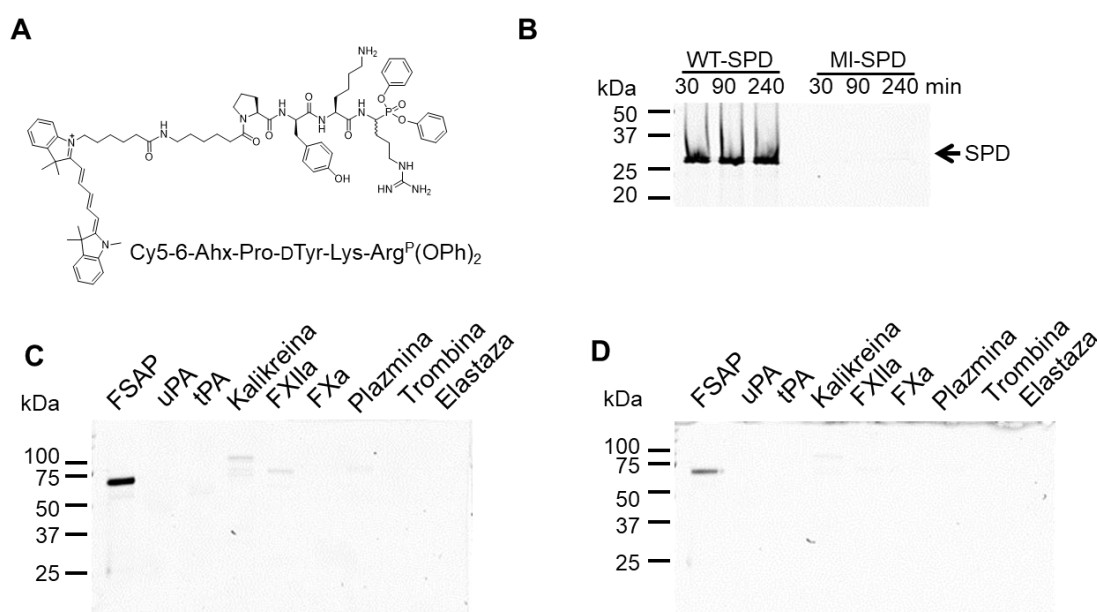
Publikacje **S1, S2, S4-S6** stanowią kontynuację badań nad proteazami wirusa SARS-CoV-2 i są rezultatem współpracy naukowej nawiązanej w trakcie realizacji badań opisanych w publikacjach **H4 i H5**. Opracowane przeze mnie narzędzia chemiczne do obrazowania aktywności proteaz SARS-CoV-2 M^{pro} i PL^{pro} zostały wykorzystane do lepszego zrozumienia biologicznych funkcji tych enzymów (prace **S5 i S6**). Publikacja **S4** dotyczyła poszukiwania nowych inhibitorów proteaz M^{pro} i PL^{pro} wirusa SARS-CoV-2. W pracy tej postanowiliśmy w sposób eksperymentalny odpowiedzieć na pytanie, czy związki zapachowe i smakowe (olejki eteryczne, ekstrakty aromatyczne) mogą stanowić źródło skutecznych inhibitorów proteaz koronawirusa, czy związki te wykazują właściwości przeciwwirusowe. Olejki eteryczne jako związki lotne, poprzez inhalację, mogą stanowić uzupełniającą metodę terapii obok już istniejących strategii terapeutycznych w walce z koronawirusem. W pracy tej syntetyzowałam substraty fluorogeniczne, za pomocą których określiłam siłę hamowania obu proteaz wirusa SARS-CoV-2 przez wybrane olejki eteryczne i ekstrakty. Uzyskane wyniki pokazały, iż olejek

eteryczny wyizolowany z liści mandarynki hamuje aktywność proteazy SARS-CoV-2 PL^{pro}, natomiast benzoesowe rezynoidy Siam i Sumatra hamują aktywność proteazy SARS-CoV-2 M^{pro}. W publikacji **S2** wspólnie z mgr. inż. Mikołajem Żmudzińskim zbadaliśmy wpływ mutacji występujących w strukturze proteazy SARS-CoV-2 M^{pro} wariantów budzących obawy (ang. *variant of concerns*, VOCs) na jej specyficzność substratową. Wykorzystując bibliotekę HyCoSuL określiliśmy specyficzność substratową dziesięciu mutantów proteazy SARS-CoV-2 M^{pro}. Uzyskane profile specyficzności substratowej ujawniły, iż mutanty M^{pro} wykazują podobną specyficzność substratową, a tym samym inhibitory projektowane dla proteazy SARS-CoV-2 M^{pro} będą skuteczne niezależnie od wariantu koronawirusa. W ostatniej pracy dotyczącej proteaz wirusowych (**S1**) wspólnie z mgr. inż. Mikołajem Żmudzińskim zbadaliśmy zdolność pochodnych ebselenu do hamowania aktywności obu proteaz SARS-CoV-2. Opisane w literaturze wyniki badań przeprowadzonych w testach enzymatycznych oraz przeciwwirusowych ujawniły, iż ebselen jest silnym i kowalencyjnym inhibitorem wirusowych proteaz. W związku z tym postanowiliśmy zbadać kolekcję 34 pochodnych ebselenu pod kątem ich skuteczności w hamowaniu proteaz koronawirusa. Zidentyfikowaliśmy trzy inhibitory PL^{pro} i cztery M^{pro}, które wykazywały lepszą siłę hamowania niż ebselen. Ponadto we współpracy z grupą prof. Jemielitego pokazaliśmy, że ebselen i jego pochodne hamują aktywność kolejnego wirusowego białka – N7-metylotransferazy zaangażowanej w modyfikację czapeczki wirusowego RNA. W drugim etapie badań zbadaliśmy aktywność przeciwwirusową 11 pochodnych ebselenu w testach na komórkach zakażonych wirusem. Rezultaty tych badań ujawniły, iż związki te wykazują aktywność przeciwwirusową, cytoprotekcyjną oraz cechuje je niska cytotoksyczność. Podsumowując nasza praca pokazuje, że ebselen, jego pochodne i analogi diselenidowe stanowią obiecującą platformę do rozwoju nowych leków przeciwko wirusowi SARS-CoV-2.

Druga część publikacji stanowiących uzupełnienie do niniejszej rozprawy habilitacyjnej dotyczy obrazowania aktywności ludzkich proteaz i proteaz drobnoustrojów chorobotwórczych. W pracy **S11** opisałam wyniki dotyczące opracowania selektywnych narzędzi chemicznych do monitorowania aktywności proteazy kaskady krzepnięcia krwi – FSAP. FSAP (ang. *factor seven activating protease*) to proteaza serynowa odpowiedzialna za aktywowanie czynnika VII w kaskadzie krzepnięcia krwi. Enzym ten wydzielany jest w formie nieaktywnego zymogenu przez komórki wątroby [133]. Aktywacja enzymu we krwi lub osoczu następuje w wyniku kontaktu z czynnikami jądrowymi takimi jak histony czy nukleosomy uwalniane przez komórki w wyniku apoptozy bądź nekrozy [134]. Pomimo ograniczonej ekspresji w narządach/tkankach, FSAP jest szeroko rozpowszechniony w wielu tkankach, szczególnie

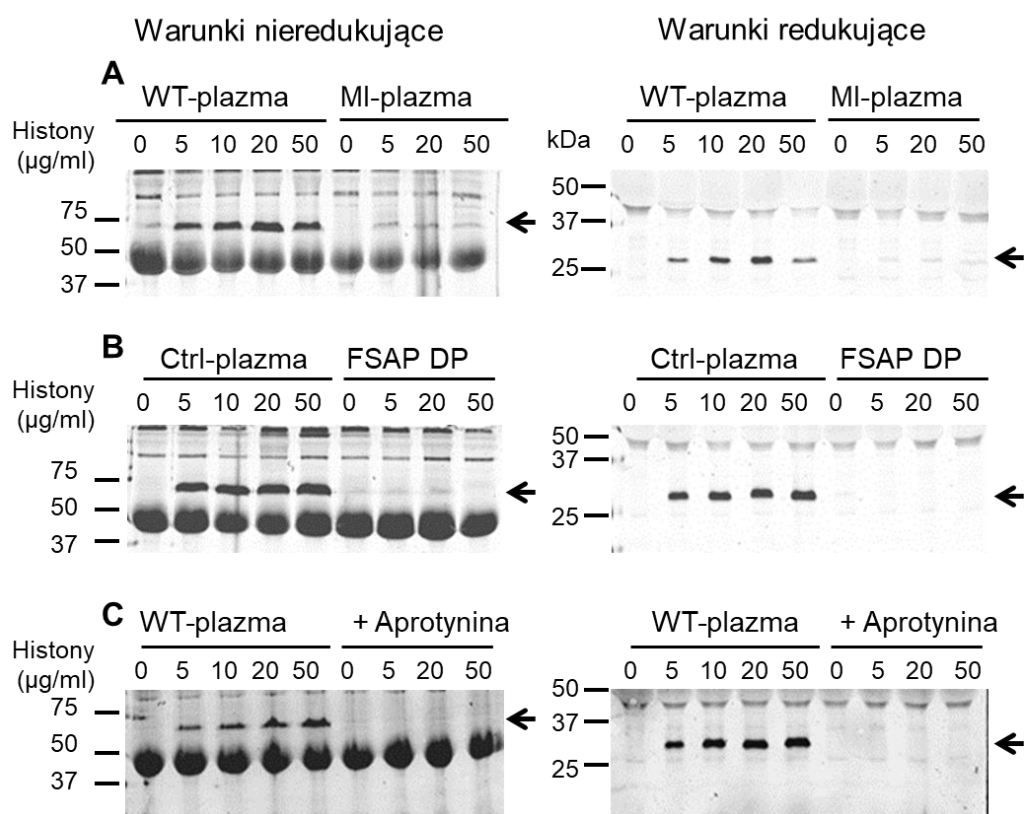
w stanach chorobowych. Badanie przeprowadzone z zużyciem nieaktywnego proteolitycznie polimorfizmu białka FSAP (nazwanego Marburg I), a także badania na myszach z nokautem FSAP wskazują, że FSAP może odgrywać ważną rolę w wielu stanach patofizjologicznych, takich jak zwężenie tętnic szyjnych, udar, zwłóknienie wątroby, czy rak tarczycy, jednak niewiele wiadomo o jego dokładnej funkcji [135-141]. W związku z tym konieczne jest opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających dokładny pomiar aktywności FSAP w osoczu oraz detekcję aktywnego enzymu w tkankach. Ponadto poznanie pełnej specyficzności substratowej enzymu może ułatwić zrozumienie molekularnych mechanizmów związanych z aktywnością FSAP. W 2017 roku Kara i współpracownicy określili specyficzności substratowa FSAP za pomocą biblioteki substratów zawierającej tylko naturalne aminokwasy (metoda PS-SCL) oraz metodą prezentacji fagowej (ang. *phage display*) [142]. Na podstawie otrzymanego profilu specyficzności substratowej zaprojektowali dwa substraty fluorogeniczne (Ac-Ala-Lys-Nle-Arg-AMC, Ac-Ala-Leu-Lys-Arg-AMC), które wykazywały najlepszą selektywność względem FSAP w porównaniu z innymi enzymami kaskady krzepnięcia krwi i fibrynolizy, spośród badanych substratów fluorogenicznych. Sami autorzy badań zasugerowali w pracy, iż konieczna jest dalsza modyfikacja opracowanych sekwencji peptydowych substratów w celu zwiększenia ich selektywności i specyficzności względem FSAP [142]. Zastosowanie nienaturalnych aminokwasów zwiększa możliwość projektowania selektywnych substratów, inhibitorów, czy też markerów chemicznych, czego przykładem jest znalezienie substratów rozróżniających grupę bardzo blisko spokrewnionych strukturalnie kaspaz [143], a także selektywnych względem legumainy [144], oraz poszczególnych ludzkich neutrofilowych proteaz serynowych [145]. Ponadto użycie nienaturalnych aminokwasów prowadzi do otrzymania bardzo aktywnych substratów, co zmniejsza koszty prowadzonych badań (poprzez zmniejszenie ilości enzymu potrzebnego do przeprowadzenia badań). W związku z tym podjęłam próbę opracowania narzędzi chemicznych umożliwiających selektywną detekcję FSAP w układach biologicznych. Zastosowanie biblioteki HyCoSuL umożliwiło mi określenie pełnej specyficzności substratowej FSAP w pozycjach P4-P2. Na podstawie otrzymanego profilu preferencji substratowej zaprojektowałam nowe substraty fluorogeniczne i wykonałam badania kinetyczne w celu oceny aktywności FSAP względem nich. Analiza kinetyczna substratów wykazała, iż wprowadzenie nienaturalnych aminokwasów w sekwencji peptydowej zwiększa aktywność enzymu względem substratów. Co istotne, zaprojektowany przeze mnie substrat (Ac-Pro-DTyr-Lys-Arg-ACC) był nie tylko lepiej rozpoznawany przez FSAP, ale również wykazywał znacznie lepszą selektywność względem FSAP niż otrzymane we wcześniejszych badaniach

substraty (badania selektywności substratów z zużyciem wybranych, rekombinowanych enzymów kaskady krzepnięcia krwi i fibrylizy oraz badania z użyciem osocza zostały wykonane we współpracy z grupą prof. Sandipa Kanse). W kolejnym etapie badań wykorzystalam opracowaną sekwencję peptydową do syntezy markera chemicznego, który w pozycji P1' zawiera fosfonian difenylowy jako reaktywną grupę wiążącą oraz znacznik (cyjaninę 5 oraz biotynę) umożliwiający detekcję kompleksu enzym-marker chemiczny (**Rys. 14A**).



Rysunek 14. Selektywność markera chemicznego względem rekombinowanych enzymów. (A) Struktura markera chemicznego. (B) Detekcja FSAP i MI-SPD za pomocą Cy5-6-Ahx-Pro-DTyr-Lys-Arg^P(OPh)₂. (C, D) Ocena selektywności markera chemicznego względem proteaz kaskady krzepnięcia krwi i fibrylizy. Proteazy inkubowano z markerem chemicznym (C – 200 nM; D – 50 nM) przez 30 minut, a następnie próbki analizowano za pomocą SDS-PAGE.

Badania kinetyczne z użyciem rekombinowanych enzymów oraz badania na ludzkim osoczu wykazały, iż zaprojektowany marker chemiczny: (1) wykazuje duże powinowactwo do FSAP (rekombinowanej domeny SPD-FSAP, FSAP izolowanego z osocza oraz FSAP aktywowanego w osoczu) (**Rys. 14B, 15A-C**); (2) nie wiąże się do nieaktywnej proteolitycznej formy enzymu – MI-FSAP (**Rys. 14B-D**) co tym samym potwierdza wcześniejsze przypuszczenia, iż miejsce aktywne izoformy MI-FSAP ma nieprawidłową konformację; (3) nie znakuje FSAP w próbkach osocza nieaktywowanego histonami, wskazując tym samym na brak aktywnego FSAP w osoczu zdrowego człowieka (**Rys. 15A**); (4) wykazuje wysoką selektywność względem FSAP (w wyższym stężeniu wykazywał niewielką reaktywność względem FXIIa, plazminy i kalikreiny osocza, **Rys. 14 C-D**).



Rysunek 15. Pomiar aktywacji FSAP w osoczu za pomocą markera chemicznego. Próbkę osocza inkubowano z histonami (0, 5, 10, 20, 50 µg/ml), a następnie z markerem chemicznym (500 nM). Próbkę analizowano za pomocą SDS-PAGE w warunkach nieredukujących (lewy panel) lub w warunkach redukujących (prawy panel). (A) Próbkę ludzkiego osocza lub osocze od pacjenta homozygotycznego dla MI-SNP. (B) Ludzkie osocze pozbawione FSAP oraz osocze kontrolne. (C) Ludzkie osocze badane z i bez aprotyniny (50 µg/ml). Strzałki wskazują pozycje dwułańcuchowego FSAP o masie 64 kDa w warunkach nieredukujących i domenę FSAP o masie 28 kDa w warunkach redukujących.

Podsumowując, w opisaney pracy zaprojektowałam i zsyntetyzowałam pierwszy marker chemiczny do detekcji FSAP *in situ*. We współpracy z grupą prof. Kanse potwierdziliśmy selektywność i specyficzność markera chemicznego do znakowania FSAP w próbkach biologicznych. Do nadekspresji FSAP dochodzi w wielu stanach patofizjologicznych jak np. w raku płuc, co sprzyja rozwojowi przerzutów [146]; w raku tarczycy [141], gdzie sprzyja transformacji nowotworowej komórek oraz migracji; immunoreaktywny FSAP obecny jest w ludzkich skrzeplinach wieńcowych czy w blaszkach miażdżycowych naczyń wieńcowych [147, 148]. Z powyższych względów pomiar aktywności FSAP *in situ* z użyciem markera chemicznego może ułatwić lepsze zrozumienie roli FSAP w nowotworach, zakrzepicy, czy miażdżycy.

W pracach **S8-S10 i S15** mój wkład polegał na syntezie selektywnych narzędzi chemicznych do monitorowania aktywności wybranych kaspaz i katepsyn. Natomiast w publikacji **S8** wspólnie z mgr inż. Katarzyną Groborz opracowałyśmy metodę syntezy markerów chemicznych zawierających stabilne izotopy metali do monitorowania aktywności proteaz za pomocą cytometrii masowej. Kolejne prace (**S7 i S12**) dotyczyły profilowania aktywności proteaz drobnoustrojów chorobotwórczych (proteaz SplE z *Staphylococcus aureus* oraz głównej peptydazy aspartylowej 1 (ang. *Major aspartyl peptidase 1* (May1)) wydzielanej przez *Cryptococcus neoformans*) za pomocą zaprojektowanych przeze mnie i zsyntetyzowanych bibliotek substratów fluorogenicznych. W pracy **S14** przedstawiłam wyniki dotyczące opracowania selektywnych związków chemicznych dla każdej z trzech aktywności ludzkiego proteasomu 20S będące przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej. Praca **S3** stanowi kontynuację badań nad aktywnością proteasomu 20S i obejmuje profilowanie specyficzności substratowej proteasomu w kieszeniach primowanych (S1' i S2') celem opracowania inhibitorów i markerów chemicznych, wykazujących lepszą aktywność i selektywność względem tego kompleksu enzymatycznego. Ostatnia z prac (**S13**), stanowiących uzupełnienie do niniejszej rozprawy habilitacyjnej, obejmuje przegląd literaturowy na temat metod biologicznych i chemicznych wykorzystywanych do identyfikacji i racjonalnego projektowania inhibitorów selektywnych względem proteaz zaangażowanych w choroby nowotworowe.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W lipcu 2022 roku odbyłam staż naukowy w Pracowni Neurobiologii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, której kierownikiem jest prof. Leszek Kaczmarek. Podczas stażu prowadziłam badania dotyczące obrazowania aktywności metaloproteinazy macierzowej 9 (MMP-9) w hodowlach pierwotnych hipokampalnych szczurów za pomocą opracowanego przeze mnie wewnętrznie wygaszonego markera chemicznego.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Doświadczenie dydaktyczne

Od 1.10.2021 jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego (wcześniej byłam zatrudniona w projekcie TEAM na etacie tylko naukowym) w związku z tym prowadziłam/prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z następujących przedmiotów: podstawy chemii organicznej (zajęcia laboratoryjne), podstawy chemii organicznej (ćwiczenia), chemia organiczna (zajęcia laboratoryjne), chemia biologiczna (seminarium), chemia produktów naturalnych (zajęcia laboratoryjne), metody analityczne w biotechnologii cz. II (zajęcia laboratoryjne) oraz fluorescence spectroscopy and bioimaging (ćwiczenia). Ponadto od 1.10.2021 jestem członkiem komisji do przeprowadzania egzaminów dyplomowych na studiach I-stopnia inżynierskich i studiach II-stopnia magisterskich na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Pełnię również funkcję **promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim** mgr. inż. Mikołaja Żmudzińskiego (termin obrony zaplanowany na wrzesień 2023), którego promotorem jest prof. Marcin Drąg. Jestem promotorem dwóch prac magisterskich oraz byłam opiekunem merytorycznym czterech prac magisterskich i dwóch prac inżynierskich, których promotorem był prof. Marcin Drąg.

Popularyzacja nauki

W trakcie pandemii COVID-19, z uwagi na tematykę badawczą którą się zajmuje, udzielałam wywiadów na temat możliwych metod walki z koronawirusem SARS-CoV-2 oraz postępu w badaniach prowadzonych nad wirusowymi proteazami (wywiady zostały opublikowane m.in. na stronie EUROIMMUN dla Czytelników bloga EUROIMMUN, na stronie Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, stronie biotechnologia.pl). Za odwagę i determinację w walce z koronawirusem otrzymałam nagrodę **Super Diament Wrocławia** od Prezydenta miasta Wrocławia oraz odznaczenie państwowe za działalność na rzecz zwalczania epidemii SARS-CoV-2 - **Srebrny Krzyż Zasługi**.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Moja praca naukowa była wielokrotnie nagradzana przyznaniem stypendiów i nagród do których należą:

a) **nagrody i stypendia uzyskane po obronie doktoratu:**

- 26.05.2022 **Nagroda im. prof. Binnieckiego** za opracowanie narzędzi chemicznych do projektowania leków, przyznana podczas konferencji ACCORD 2022 Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, Warszawa.
- 19.09.2021 **Super Diament Wrocławia** za odwagę i determinację w walce z koronawirusem we Wrocławiu.
- 9.06.2021 **Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców.**
- 31.08.2020 **Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej.**
- 3.07.2020 Odznaczenie państwowe za działalność na rzecz zwalczania epidemii SARS-CoV-2 - **Srebrny Krzyż Zasługi** za zasługi w działalności na rzecz zwalczania zagrożeń biologicznych oraz w działalności naukowo-badawczej.
- 15.11.2019 **Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej.**
- 25.05.2019 **Stypendium Start 2019 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.**

b) **nagrody i stypendia uzyskane przed obroną doktoratu:**

- 18.10.2017 **Stypendium 17 edycji programu L'Oréal Polska Dla Kobiet i Nauki** we współpracy z Polskim Komitetem ds. UNESCO, Ministerstwem Nauki i Szkolnictwa Wyższego i Polską Akademią Nauk, Warszawa.
- 5.12.2017 **Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej** za rok akademicki 2016/2017.
- 3.09-7.09.2017 **Nagroda za najlepszą prezentację ustną** w kategorii doktorantów wygłoszoną na konferencji 24th Polish Peptide Symposium, Jastrzębia Góra, Polska.
- 2016/2017 **Stypendium naukowe z własnego funduszu stypendialnego Politechniki Wrocławskiej** przyznane w semestrze letnim r.a. 2016/2017.
- 15.11.2016 **Wyróżnienie kapituły im. Maxa Borna** za wybitne osiągnięcia w dziedzinie nauk fizycznych i chemicznych, Wrocław.
- 16.12.2016 **Nagroda JM Rektora Politechniki Wrocławskiej** za rok akademicki 2015/2016.

- 17-21.09.2016 **Travel Award**, XVth International Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portoroz, Słowenia.
- 04-08.10.2015 **Travel Award**, The 9th General Meeting of the International Proteolysis Society, Penang, Malezja.
- 25.02.-01.03.2015 **Nagroda za prezentację ustną** wygłoszoną na konferencji XXXII Winter School on Proteinases and Their Inhibitors, Tiers am Rosengarden, Włochy.
- 2013, 2015, 2016 **Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów** Politechniki Wrocławskiej (trzykrotnie).

8. Literatura do autoreferatu:

1. Moffitt, K.L., S.L. Martin, and B. Walker, *Proteases implicated in apoptosis: old and new*. J Pharm Pharmacol, 2010. **62**(5): p. 563-76.
2. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 785-99.
3. Drag, M. and G.S. Salvesen, *Emerging principles in protease-based drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(9): p. 690-701.
4. Eatemadi, A., et al., *Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment*. Biomed Pharmacother, 2017. **86**: p. 221-231.
5. Majerova, T. and J. Konvalinka, *Viral proteases as therapeutic targets*. Mol Aspects Med, 2022. **88**: p. 101159.
6. Agbowuro, A.A., et al., *Proteases and protease inhibitors in infectious diseases*. Med Res Rev, 2018. **38**(4): p. 1295-1331.
7. Deu, E., M. Verdoes, and M. Bogyo, *New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(1): p. 9-16.
8. Verdoes, M. and S.H. Verhelst, *Detection of protease activity in cells and animals*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1864**(1): p. 130-42.
9. McStay, G.P., G.S. Salvesen, and D.R. Green, *Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 322-31.
10. Berger, A.B., K.B. Sexton, and M. Bogyo, *Commonly used caspase inhibitors designed based on substrate specificity profiles lack selectivity*. Cell Res, 2006. **16**(12): p. 961-3.
11. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **27**(2): p. 157-62.
12. Yost, S.A. and J. Marcotrigiano, *Viral precursor polyproteins: keys of regulation from replication to maturation*. Curr Opin Virol, 2013. **3**(2): p. 137-42.
13. Heidner, H., *Virus Replication*. Fenner's Veterinary Virology, 5th Edition, 2017: p. 17-45.
14. Tsu, B.V., et al., *Running With Scissors: Evolutionary Conflicts Between Viral Proteases and the Host Immune System*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 769543.
15. Ghosh, A.K., H.L. Osswald, and G. Prato, *Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS*. J Med Chem, 2016. **59**(11): p. 5172-208.

16. de Leuw, P. and C. Stephan, *Protease inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection*. *GMS Infect Dis*, 2017. **5**: p. Doc08.
17. Owen, D.R., et al., *An oral SARS-CoV-2 M(pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19*. *Science*, 2021. **374**(6575): p. 1586-1593.
18. Cao, B., et al., *A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(19): p. 1787-1799.
19. Lecronier, M., et al., *Comparison of hydroxychloroquine, lopinavir/ritonavir, and standard of care in critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia: an opportunistic retrospective analysis*. *Crit Care*, 2020. **24**(1): p. 418.
20. Arabi, Y.M., et al., *Lopinavir-ritonavir and hydroxychloroquine for critically ill patients with COVID-19: REMAP-CAP randomized controlled trial*. *Intensive Care Med*, 2021. **47**(8): p. 867-886.
21. Nitsche, C., *Strategies Towards Protease Inhibitors for Emerging Flaviviruses*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1062**: p. 175-186.
22. Nitsche, C., *Proteases from dengue, West Nile and Zika viruses as drug targets*. *Biophys Rev*, 2019. **11**(2): p. 157-165.
23. Millies, B., et al., *Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases*. *J Med Chem*, 2019. **62**(24): p. 11359-11382.
24. Yao, Y., et al., *Discovery, X-ray Crystallography and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease*. *J Am Chem Soc*, 2019. **141**(17): p. 6832-6836.
25. Liu, Y., M.P. Patricelli, and B.F. Cravatt, *Activity-based protein profiling: the serine hydrolases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 14694-9.
26. Greenbaum, D., et al., *Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools*. *Chem Biol*, 2000. **7**(8): p. 569-81.
27. Sanman, L.E. and M. Bogoy, *Activity-based profiling of proteases*. *Annu Rev Biochem*, 2014. **83**: p. 249-73.
28. Fonovic, M. and M. Bogoy, *Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases*. *Expert Rev Proteomics*, 2008. **5**(5): p. 721-30.
29. Powers, J.C., et al., *Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases*. *Chem Rev*, 2002. **102**(12): p. 4639-750.
30. Saghatelian, A., et al., *Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(27): p. 10000-5.
31. Chan, E.W., et al., *Developing photoactive affinity probes for proteomic profiling: hydroxamate-based probes for metalloproteases*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(44): p. 14435-46.
32. Weihofen, A., et al., *Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease*. *Science*, 2002. **296**(5576): p. 2215-8.
33. Hewings, D.S., et al., *Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights*. *Febs Journal*, 2017. **284**(10): p. 1555-1576.
34. Thornberry, N.A., et al., *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(29): p. 17907-11.
35. Smith, M.M., L. Shi, and M. Navre, *Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(12): p. 6440-9.
36. Matthews, D.J. and J.A. Wells, *Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display*. *Science*, 1993. **260**(5111): p. 1113-7.

37. auf dem Keller, U. and O. Schilling, *Proteomic techniques and activity-based probes for the system-wide study of proteolysis*. *Biochimie*, 2010. **92**(11): p. 1705-14.
38. Schilling, O. and C.M. Overall, *Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(6): p. 685-94.
39. Kasperkiewicz, P., 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): p. 2518-23.
40. Poreba, M., et al., *Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(9): p. 1482-92.
41. Bogyo, M., et al., *Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(13): p. 6629-34.
42. Kessler, B.M., et al., *Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits*. *Chem Biol*, 2001. **8**(9): p. 913-29.
43. Verdoes, M., et al., *A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes in vitro and in vivo*. *Chem Biol*, 2006. **13**(11): p. 1217-26.
44. Patricelli, M.P., et al., *Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes*. *Proteomics*, 2001. **1**(9): p. 1067-71.
45. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
46. Edgington, L.E., M. Verdoes, and M. Bogyo, *Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes*. *Curr Opin Chem Biol*, 2011. **15**(6): p. 798-805.
47. Fang, H., et al., *Recent advances in activity-based probes (ABPs) and affinity-based probes (AfBPs) for profiling of enzymes*. *Chem Sci*, 2021. **12**(24): p. 8288-8310.
48. Muir, R.K., M. Guerra, and M.M. Bogyo, *Activity-Based Diagnostics: Recent Advances in the Development of Probes for Use with Diverse Detection Modalities*. *ACS Chem Biol*, 2022. **17**(2): p. 281-291.
49. Poreba, M. and M. Drag, *Current strategies for probing substrate specificity of proteases*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(33): p. 3968-95.
50. Harris, J.L., 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): p. 7754-9.
51. Tyas, L., et al., *Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer*. *EMBO Rep*, 2000. **1**(3): p. 266-70.
52. Song, R., et al., *Proteases and Their Modulators in Cancer Therapy: Challenges and Opportunities*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021. **64**(6): p. 2851-2877.
53. Eatemadi, A., et al., *Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017. **86**: p. 221-231.
54. Shalini, S., et al., *Old, new and emerging functions of caspases*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(4): p. 526-39.
55. Reed, J.C., *Apoptosis-based therapies*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(2): p. 111-21.
56. Orłowski, M. and S. Wilk, *Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **383**(1): p. 1-16.

57. Masdehors, P., et al., *Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin*. Br J Haematol, 1999. **105**(3): p. 752-7.
58. Delic, J., et al., *The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF-alpha-initiated apoptosis*. Br J Cancer, 1998. **77**(7): p. 1103-7.
59. Ma, M.H., et al., *Proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma cells to chemotherapeutic agents and overcomes chemo-resistance through inhibition of the NF-kappa B pathway*. Blood, 2001. **98**(11): p. 473a-473a.
60. Shah, S.A., et al., *26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer*. Journal of Cellular Biochemistry, 2001. **82**(1): p. 110-122.
61. Shah, S.A., et al., *26S proteasome inhibition overcomes NF-kappa B-induced chemoresistance in human pancreatic cancer*. British Journal of Surgery, 2001. **88**: p. 13-13.
62. Hideshima, T., et al., *The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells*. Cancer Research, 2001. **61**(7): p. 3071-3076.
63. Adams, J., et al., *Potent and selective inhibitors of the proteasome: Dipeptidyl boronic acids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998. **8**(4): p. 333-338.
64. Adams, J., *Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer*. Current Opinion in Chemical Biology, 2002. **6**(4): p. 493-500.
65. Muchtar, E., M.A. Gertz, and H. Magen, *A practical review on carfilzomib in multiple myeloma*. European Journal of Haematology, 2016. **96**(6): p. 564-577.
66. Kupperman, E., et al., *Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer (vol 70, pg 1970, 2010)*. Cancer Research, 2010. **70**(9).
67. Kumar, S.K., et al., *Phase 2 trial of ixazomib in patients with relapsed multiple myeloma not refractory to bortezomib*. Blood Cancer Journal, 2015. **5**.
68. Pejler, G., et al., *Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease*. Blood, 2010. **115**(24): p. 4981-90.
69. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
70. Garland, M., J.J. Yim, and M. Bogoy, *A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application*. Cell Chem Biol, 2016. **23**(1): p. 122-136.
71. Smith, B.L., et al., *Feasibility Study of a Novel Protease-Activated Fluorescent Imaging System for Real-Time, Intraoperative Detection of Residual Breast Cancer in Breast Conserving Surgery*. Ann Surg Oncol, 2020. **27**(6): p. 1854-1861.
72. Widen, J.C., et al., *AND-gate contrast agents for enhanced fluorescence-guided surgery*. Nat Biomed Eng, 2021. **5**(3): p. 264-277.
73. Huang, Q., et al., *Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy*. Nat Med, 2011. **17**(7): p. 860-6.
74. Ihssen, J., et al., *Fluorogenic in vitro activity assay for the main protease M(pro) from SARS-CoV-2 and its adaptation to the identification of inhibitors*. STAR Protoc, 2021. **2**(3): p. 100793.
75. Goddard, J.P. and J.L. Reymond, *Enzyme assays for high-throughput screening*. Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 314-22.
76. Poreba, M., et al., *Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43135.

77. Abrams, R.P.M., et al., *Therapeutic candidates for the Zika virus identified by a high-throughput screen for Zika protease inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(49): p. 31365-31375.
78. Knyazhanskaya, E., M.C. Morais, and K.H. Choi, *Flavivirus enzymes and their inhibitors*. Enzymes, 2021. **49**: p. 265-303.
79. Steuten, K., et al., *Challenges for Targeting SARS-CoV-2 Proteases as a Therapeutic Strategy for COVID-19*. ACS Infect Dis, 2021. **7**(6): p. 1457-1468.
80. Ma, C., et al., *Validation and invalidation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays*. Acta Pharm Sin B, 2022. **12**(4): p. 1636-1651.
81. Ma, C. and J. Wang, *Validation and Invalidation of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitors*. ACS Pharmacol Transl Sci, 2022. **5**(2): p. 102-109.
82. Cheng, Y., et al., *A Dual-Color Fluorescent Probe Allows Simultaneous Imaging of Main and Papain-like Proteases of SARS-CoV-2-Infected Cells for Accurate Detection and Rapid Inhibitor Screening*. Angew Chem Int Ed Engl, 2022. **61**(9): p. e202113617.
83. Froggatt, H.M., B.E. Heaton, and N.S. Heaton, *Development of a Fluorescence-Based, High-Throughput SARS-CoV-2 3CL(pro) Reporter Assay*. J Virol, 2020. **94**(22).
84. Rothan, H.A. and T.C. Teoh, *Cell-Based High-Throughput Screening Protocol for Discovering Antiviral Inhibitors Against SARS-COV-2 Main Protease (3CLpro)*. Mol Biotechnol, 2021. **63**(3): p. 240-248.
85. Ma, C., et al., *Discovery of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitors through a Combination of High-Throughput Screening and a FlipGFP-Based Reporter Assay*. ACS Cent Sci, 2021. **7**(7): p. 1245-1260.
86. To, T.L., et al., *Rational Design of a GFP-Based Fluorogenic Caspase Reporter for Imaging Apoptosis In Vivo*. Cell Chem Biol, 2016. **23**(7): p. 875-882.
87. Zhang, Q., et al., *Designing a Green Fluorogenic Protease Reporter by Flipping a Beta Strand of GFP for Imaging Apoptosis in Animals*. J Am Chem Soc, 2019. **141**(11): p. 4526-4530.
88. Ciechanover, A., *The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life*. Embo Journal, 1998. **17**(24): p. 7151-7160.
89. Chauhan, D., et al., *Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma*. Molecular Cancer Therapeutics, 2005. **4**(4): p. 686-692.
90. Amerik, A.Y. and M. Hochstrasser, *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2004. **1695**(1-3): p. 189-207.
91. Eletr, Z.M. and K.D. Wilkinson, *Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2014. **1843**(1): p. 114-128.
92. Qu, Q., et al., *USP2 promotes cell migration and invasion in triple negative breast cancer cell lines*. Tumor Biology, 2015. **36**(7): p. 5415-5423.
93. Kim, H.J., et al., *N-Terminal Truncated UCH-L1 Prevents Parkinson's Disease Associated Damage*. Plos One, 2014. **9**(6).
94. Dang, L.C., F.D. Melandri, and R.L. Stein, *Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes*. Biochemistry, 1998. **37**(7): p. 1868-1879.
95. Li, Y.T., et al., *Ubiquitin 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin as an improved fluorogenic substrate for deubiquitinating enzymes*. Tetrahedron, 2016. **72**(27-28): p. 4085-4090.
96. Borodovsky, A., et al., *Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme*. Chemistry & Biology, 2002. **9**(10): p. 1149-1159.

97. Love, K.R., et al., *Ubiquitin C-terminal electrophiles are activity-based probes for identification and mechanistic study of ubiquitin conjugating machinery*. ACS Chem Biol, 2009. **4**(4): p. 275-87.
98. Borodovsky, A., et al., *Small-molecule inhibitors and probes for ubiquitin- and ubiquitin-like-specific proteases*. Chembiochem, 2005. **6**(2): p. 287-91.
99. Iphofer, A., et al., *Profiling Ubiquitin Linkage Specificities of Deubiquitinating Enzymes with Branched Ubiquitin Isopeptide Probes*. Chembiochem, 2012. **13**(10): p. 1416-1420.
100. Gjonaj, L., et al., *USP7: combining tools towards selectivity*. Chemical Communications, 2019. **55**(35): p. 5075-5078.
101. Gjonaj, L., et al., *Development of a DUB-selective fluorogenic substrate*. Chemical Science, 2019. **10**(44): p. 10290-10296.
102. Drag, M., et al., *Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes)*. Biochemical Journal, 2008. **415**: p. 367-375.
103. Mielech, A.M., et al., *MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities*. Virology, 2014. **450**: p. 64-70.
104. Song, Z.W., et al., *A novel UCHL3 inhibitor, perifosine, enhances PARP inhibitor cytotoxicity through inhibition of homologous recombination-mediated DNA double strand break repair*. Cell Death & Disease, 2019. **10**.
105. Song, Z.W., et al., *UCHL3 promotes pancreatic cancer progression and chemoresistance through FOXM1 stabilization*. American Journal of Cancer Research, 2019. **9**(9): p. 1970-1981.
106. Soboleva, T.A. and R.T. Baker, *Deubiquitinating enzymes: Their functions and substrate specificity*. Current Protein & Peptide Science, 2004. **5**(3): p. 191-200.
107. Dick, G.W.A., S.F. Kitchen, and A.J. Haddow, *Zika Virus .1. Isolations and Serological Specificity*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1952. **46**(5): p. 509-520.
108. Fontanet, A., et al., *Association between Guillain-Barre syndrome and Zika virus infection Reply*. Lancet, 2016. **387**(10038): p. 2600-2600.
109. Rasmussen, S.A., et al., *Zika Virus and Birth Defects - Reviewing the Evidence for Causality*. New England Journal of Medicine, 2016. **374**(20): p. 1981-1987.
110. Chen, L.H. and D.H. Hamer, *Zika Virus: Rapid Spread in the Western Hemisphere*. Annals of Internal Medicine, 2016. **164**(9): p. 613-+.
111. Bogoch, I.I., et al., *Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil*. Lancet, 2016. **387**(10016): p. 335-336.
112. Korhonen, E.M., et al., *Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015*. Eurosurveillance, 2016. **21**(2): p. 2-5.
113. Li, Z., J. Zhang, and H.M. Li, *Flavivirus NS2B/NS3 Protease: Structure, Function, and Inhibition*. Viral Proteases and Their Inhibitors, 2017: p. 163-188.
114. Lei, J., et al., *Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor*. Science, 2016. **353**(6298): p. 503-505.
115. Lei, J., et al., *Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor*. Science, 2016. **353**(6298): p. 503-5.
116. Cao, M., et al., *Clinical Features of Patients Infected with the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) in Shanghai, China*. medRxiv, 2020.
117. Huang, D., et al., *Clinical features of severe patients infected with 2019 novel coronavirus: a systematic review and meta-analysis*. Ann Transl Med, 2020. **8**(9): p. 576.

118. Zhang, L., et al., *Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved alpha-ketoamide inhibitors*. Science, 2020. **368**(6489): p. 409-412.
119. Pillaiyar, T., et al., *An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy*. J Med Chem, 2016. **59**(14): p. 6595-628.
120. Hilgenfeld, R., *From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design*. FEBS J, 2014. **281**(18): p. 4085-96.
121. Wu, F., et al., *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 265-269.
122. Wu, A., et al., *Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China*. Cell Host Microbe, 2020. **27**(3): p. 325-328.
123. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
124. Malin, J.J., et al., *Remdesivir against COVID-19 and Other Viral Diseases*. Clin Microbiol Rev, 2020. **34**(1).
125. Calistri, A., et al., *The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection*. Cells, 2014. **3**(2): p. 386-417.
126. Devaraj, S.G., et al., *Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32208-21.
127. Clementz, M.A., et al., *Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4619-29.
128. Frieman, M., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6689-705.
129. Ratia, K., et al., *A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16119-24.
130. Lin, M.H., et al., *Disulfiram can inhibit MERS and SARS coronavirus papain-like proteases via different modes*. Antiviral Res, 2018. **150**: p. 155-163.
131. Barretto, N., et al., *Deubiquitinating activity of the SARS-CoV papain-like protease*. Adv Exp Med Biol, 2006. **581**: p. 37-41.
132. Lindner, H.A., et al., *Selectivity in ISG15 and ubiquitin recognition by the SARS coronavirus papain-like protease*. Arch Biochem Biophys, 2007. **466**(1): p. 8-14.
133. Leiting, S., et al., *Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) Inhibits the Expression of Factor VII-activating Protease (FSAP) in Hepatocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(40): p. 21020-+.
134. Yamamichi, S., et al., *Extracellular histone induces plasma hyaluronan-binding protein (factor VII activating protease) activation in vivo*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **409**(3): p. 483-488.
135. Willeit, J., et al., *Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease - A prominent risk predictor of carotid stenosis*. Circulation, 2003. **107**(5): p. 667-670.
136. Trompet, S., et al., *Factor VII Activating Protease Polymorphism (G534E) Is Associated with Increased Risk for Stroke and Mortality*. Stroke Research and Treatment, 2011. **2011**.
137. Joshi, A.U., et al., *Deficiency of Factor VII activating protease alters the outcome of ischemic stroke in mice*. European Journal of Neuroscience, 2015. **41**(7): p. 963-973.
138. Wasmuth, H.E., et al., *The Marburg I Variant (G534E) of the Factor VII-Activating Protease Determines Liver Fibrosis in Hepatitis C Infection by Reduced Proteolysis of Platelet-Derived Growth Factor BB*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 775-780.

139. Borkham-Kamphorst, E., et al., *Factor VII activating protease (FSAP) exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in liver fibrosis in mice and men*. Journal of Hepatology, 2013. **58**(1): p. 104-111.
140. Ngeow, J. and C. Eng, *HABP2 in Familial Nonmedullary Thyroid Cancer: Will the Real Mutation Please Stand Up?* Jnci-Journal of the National Cancer Institute, 2016. **108**(6).
141. Gara, S.K., et al., *Germline HABP2 Mutation Causing Familial Nonmedullary Thyroid Cancer*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(5): p. 448-455.
142. Kara, E., et al., *Analysis of the substrate specificity of Factor VII activating protease (FSAP) and design of specific and sensitive peptide substrates*. Thrombosis and Haemostasis, 2017. **117**(9): p. 1750-1760.
143. Poreba, M., et al., *Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates*. Cell Death and Differentiation, 2014. **21**(9): p. 1482-1492.
144. Poreba, M., et al., *Counter Selection Substrate Library Strategy for Developing Specific Protease Substrates and Probes*. Cell Chemical Biology, 2016. **23**(8): p. 1023-1035.
145. Kasperkiewicz, P., et al., *Toolbox of Fluorescent Probes for Parallel Imaging Reveals Uneven Location of Serine Proteases in Neutrophils*. Journal of the American Chemical Society, 2017. **139**(29): p. 10115-10125.
146. Mirzapioazova, T., et al., *HABP2 is a novel regulator of hyaluronan-mediated human lung cancer progression*. Frontiers in Oncology, 2015. **5**.
147. Grasso, S., et al., *Interaction of factor VII activating protease (FSAP) with neutrophil extracellular traps (NETs)*. Thromb Res, 2018. **161**: p. 36-42.
148. Kanse, S.M., et al., *Factor VII-activating protease (FSAP): vascular functions and role in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 286-9.