



Politechnika Wroclawska

Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania

Wydział Chemiczny

Politechnika Wroclawska

mgr inż. Radosław Gładysz

ROZPRAWA DOKTORSKA

Badanie rozszerzonego profilu specyficzności ludzkich
proteasomów

Promotor pracy: Prof. dr hab. Marcin Drąg

Wrocław 2024

*Składam serdeczne podziękowanie
Mojemu Promotorowi, **Prof. dr hab. Marcinowi Drągowi** za
możliwość realizacji pracy doktorskiej pod swoją opieką oraz interesującą
tematykę badawczą;*

Dr inż. Wioletcie Rut
za poświęcony czas, nieocenioną pomoc i całą przekazaną wiedzę;

Justynie, Sylwii i Mikołajowi
za okazane wsparcie i wspólne spędzone chwile;

Przyjaciółom i Kolegom z zespołu
za zapewnienie miłej atmosfery w pracy i nawiązane przyjaźnie.

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję Rodzicom i Bratu

SPIS TREŚCI

1. Wstęp teoretyczny	10
1.1 Wprowadzenie	10
1.2. System ubikwityna-proteasom	12
1.3. Proteasom 26S.....	13
1.3.1. Budowa proteasomu 26S	13
1.3.2. Specyficzność substratowa proteasomu 26S	15
1.3.3. Substraty proteasomu 26S	26
1.3.3.1. Substraty selektywne wobec podjednostki β 1.....	26
1.3.3.2. Substraty selektywne wobec podjednostki β 2.....	28
1.3.3.3. Substraty selektywne wobec podjednostki β 5.....	30
1.3.4. Inhibitory proteasomu.....	31
1.4. Immunoproteasom.....	33
1.4.1. Budowa immunoproteasomu	33
1.4.2. Specyficzność substratowa immunoproteasomu	34
1.4.3. Substraty immunoproteasomu	35
1.4.4. Inhibitory immunoproteasomu	36
1.4.4.1. Inhibitory podjednostki β 1i	36
1.4.4.2. Inhibitory podjednostki β 2i	38
1.4.4.3. Inhibitory podjednostki β 5i	38
2. Cel pracy	40
3. Badania własne.....	42
3.1. Określenie specyficzności substratowej immunoproteasomu w pozycjach P4-P2	42
3.1.1. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P2.....	43
3.1.2. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P3.....	46
3.1.3. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P4.....	50
3.2. Projektowanie i synteza bibliotek substratów fluorogenicznych do badania specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P5 i P6. 55	
3.3. Określenie specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P5 i P6	58

3.3.1	Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P5	58
3.3.2.	Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P6	61
3.3.3.	Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P5	64
3.3.4.	Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P6	67
3.4.	Projektowanie i synteza bibliotek substratów typu IQF do badania specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P1' i P2'	70
3.5.	Określenie specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P1' i P2'	72
3.5.1.	Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P1'	72
3.5.2.	Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P2'	76
3.5.3.	Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P1'	80
3.5.4.	Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P2'	84
3.6.	Określenie wpływu długości łańcucha peptydowego substratu na aktywność proteasomu 20S i immunoproteasomu	88
3.7.	Synteza selektywnych substratów dla podjednostki β 1i immunoproteasomu.....	94
3.8.	Badania kinetyczne selektywnych substratów dla podjednostki β 1i immunoproteasomu	94
3.9.	Projektowanie i synteza specyficznego inhibitora dla podjednostki β 1i immunoproteasomu	96
3.10.	Badania kinetyczne specyficznego inhibitora dla podjednostki β 1i immunoproteasomu	99
4.	Podsumowanie i wnioski końcowe	101
5.	Część eksperymentalna	105
5.1.	Synteza znacznika fluorescyjnego Fmoc-ACC-OH	105
5.2.	Synteza bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych P5 i P6	108
5.3.	Badania kinetyczne bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych P2-P4 oraz P5 i P6.....	114
5.4.	Synteza bibliotek substratów peptydowych typu IQF P1' i P2'	114
5.5.	Badania kinetyczne bibliotek substratów peptydowych typu IQF P1' i P2'	146
5.6.	Badanie wpływu długości łańcucha peptydowego na aktywność proteasomu 20S i immunoproteasomu	147

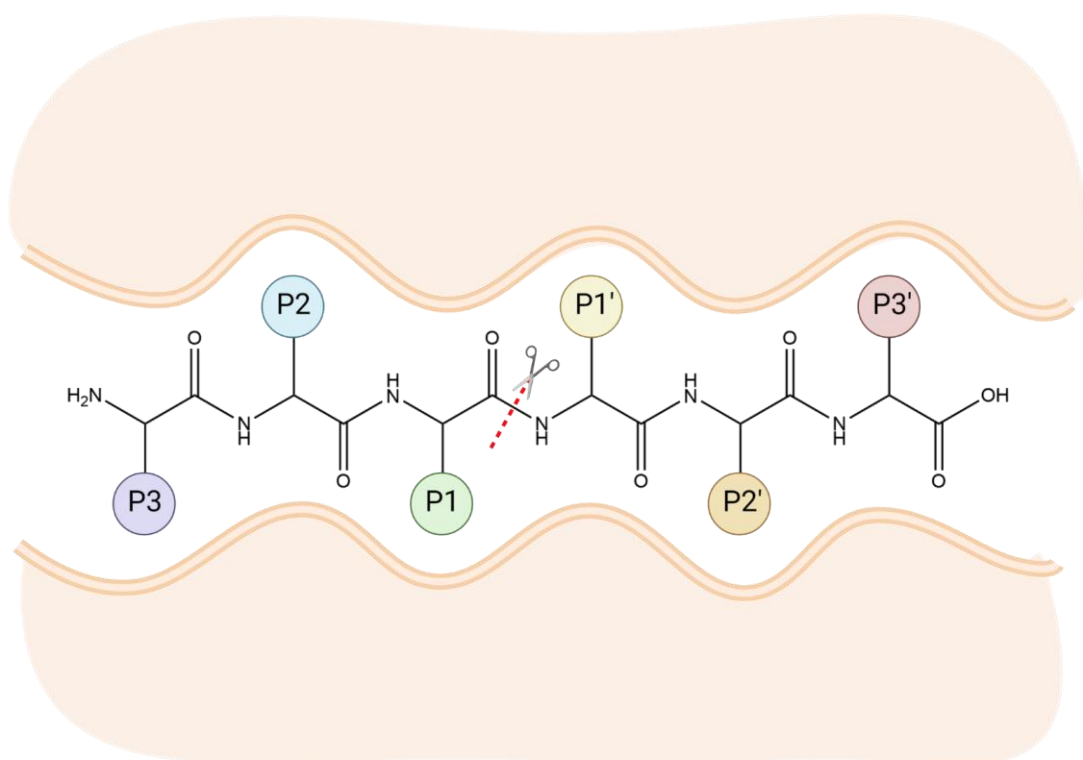
5.7. Synteza inhibitora specyficznego dla podjednostki β 1i ludzkiego immunoproteasomu	147
5.8. Badania kinetyczne specyficznego dla podjednostki β 1i ludzkiego immunoproteasomu	150
6. Struktury aminokwasów użytych do syntezy bibliotek substratów	151
7. Dorobek naukowy	158
8. Literatura	159

1. Wstęp teoretyczny

1.1 Wprowadzenie

Enzymy proteolityczne, znane również jako proteazy lub peptydazy są podklasą hydrolaz odpowiedzialną za hydrolizę wiązania peptydowego [1]. Ze względu na swoją funkcję uczestniczą one w wielu istotnych procesach biologicznych, między innymi: apoptozie, kaskadzie krzepnięcia krwi, odpowiedzi immunologicznej czy wewnątrzkomórkowej degradacji białek [2-5]. W przeciwieństwie do innych modyfikacji post-translacyjnych, hydroliza białek i peptydów jest reakcją nieodwracalną, co w konsekwencji wymaga ścisłej kontroli aktywności enzymów proteolitycznych [6]. Ta z kolei może nastąpić poprzez kilka mechanizmów, m.in. regulację ekspresji genów, syntezę nieaktywnych form proteaz zwanych zymogenami lub zahamowanie aktywności za pomocą endogennych inhibitorów [7, 8]. Wszelkie zaburzenia w funkcjonowaniu proteaz mogą prowadzić do rozwoju stanów patofizjologicznych, takich jak: nowotworów, chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych [9-11]. Z tego też względu stały się one istotnym i obiecującym celem terapeutycznym we współczesnej medycynie [12-15].

W zależności od mechanizmu, według którego zachodzi katalizowana reakcja hydrolizy, proteazy można podzielić na: proteazy aspartylowe, glutaminowe i metaloproteazy oraz proteazy cysteinowe, serynowe i treoninowe [16]. Pierwsze trzy w procesie hydrolizy jako nukleofil wykorzystują aktywowaną cząsteczkę wody, natomiast wśród następnych trzech nukleofilem jest grupa hydroksylowa (proteazy serynowe i treoninowe) lub tiolowa (proteazy cysteinowe) reszty aminokwasowej zlokalizowanej w centrum aktywnym [17, 18]. Pod koniec lat 70 XX wieku Schechter oraz Berger opisali budowę centrum aktywnego papainy, która stała się uniwersalnym modelem stosowanym w badaniach specyficzności substratowej proteaz (Rysunek 1). Zgodnie z tym modelem centrum aktywne enzymu proteolitycznego posiada specjalne kieszenie, do których wiążą się reszty aminokwasowe łańcucha peptydowego (lub białkowego). Aminokwasy znajdujące się na N-końcu substratu oznaczają się jako: P_n, ..., P₂, P₁, a aminokwasy znajdujące się na C-końcu jako: P₁', P₂', ..., P_n'. Kieszenie wiążące poszczególne reszty oznaczają się odpowiednio jako S_n, ..., S₂, S₁ oraz S₁', S₂', ..., S_n. Hydroliza wiązania peptydowego zawsze następuje pomiędzy aminokwasami P₁ oraz P₁' [19].



Rysunek 1. Schemat wiązania i hydrolizy substratu w centrum aktywnym proteazy.

Jako specyficzność substratową należy rozumieć komplementarność sekwencji peptydowej substratu z architekturą miejsca aktywnego enzymu [20]. Niektóre proteazy są zdolne rozpoznawać szeroką gamę substratów, podczas gdy inne ograniczają się do jednego lub kilku [21]. Ponadto, specyficzność substratowa wybranych grup proteaz może się wzajemnie pokrywać, co utrudnia projektowanie związków selektywnych (substratów, inhibitorów) względem tylko jednego enzymu [22-24]. Jednym ze sposobów na rozwiązanie tego problemu jest zastosowanie nienaturalnych pochodnych aminokwasowych, które ze względu na swoją dużą liczbę oraz różnorodny charakter chemiczny znacząco zwiększają szansę na otrzymanie sekwencji peptydowej specyficznej wobec wybranego enzymu [25]. Przykładowo takie rozwiązanie pozwoliło na otrzymanie związków selektywnych wobec poszczególnych kaspaz oraz czynników krzepnięcia krwi [26-28].

Niniejsza rozprawa doktorska jest poświęcona określeniu rozszerzonych profili specyficzności substratowej ludzkiego proteasomu konstytutywnego oraz ludzkiego immunoproteasomu z wykorzystaniem bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych

zawierających w swej strukturze zarówno naturalne jak i nienaturalne pochodne aminokwasowe.

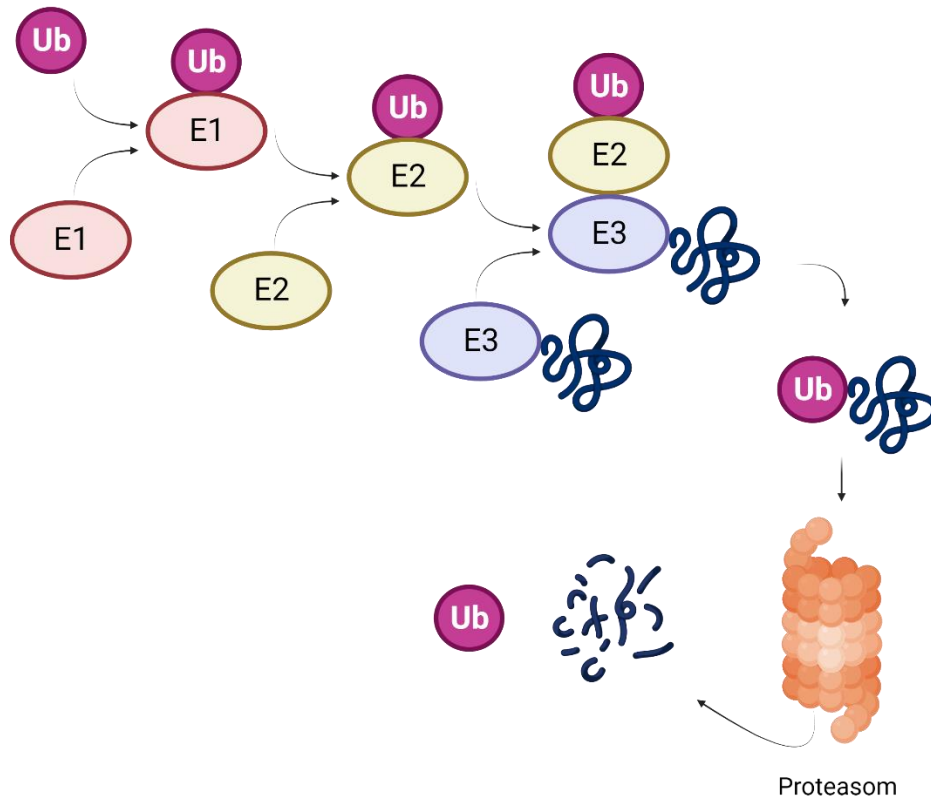
1.2. System ubikwityna-proteasom

Wewnątrzkomórkowy poziom białek zależy zarówno od szybkości ich syntezy jak i degradacji, a równowaga pomiędzy tymi dwoma procesami jest niezwykle istotna w utrzymaniu homeostazy [29]. Początkowo uważano, że degradacja białek zachodzi wyłącznie w lizosomach, jednak w roku 1977 Etlinger i Goldberg odkryli kolejną ścieżkę degradacji, która jest zależna od ATP i zachodzi w retikulocytach nieposiadających lizosomów [30]. Dalsze badania nad tym procesem doprowadziły do odkrycia systemu ubikwityna-proteasom (UPS), który jest odpowiedzialny za rozkład od 80 do 90% wszystkich białek komórkowych [31, 32]. Naukowcy zaangażowani w pracę nad UPS zostali nagrodzeni w 2004 roku Nagrodą Nobla w Dziedzinie Chemii [33].

Proteasom 26S jest wielkocząsteczkowym kompleksem enzymatycznym bezpośrednio odpowiedzialnym za proteolizę źle złożonych bądź uszkodzonych białek [34]. Ze względu na swoją strukturę i obecność trzech różnych centrów aktywnych posiada on szeroką specyficzność substratową, która umożliwia hydrolizę wielu sekwencji aminokwasowych [35]. Ubikwityna jest małowielkocząsteczkowym białkiem złożonym z 76 reszt aminokwasowych, którego rolą jest oznaczanie białek mających ulec degradacji przez proteasom w procesie zwanym ubikwitynacją [36].

Ubikwitynacja polega na stworzeniu wiązania izopeptydowego pomiędzy C-końcówką glicyną ubikwityny, a grupą ϵ -aminową wybranego białka. Proces ten następuje w kaskadzie reakcji z udziałem trzech różnych enzymów (Rysunek 2). W pierwszym etapie enzym E1 (enzym aktywujący) wiąże się z ubikwityną poprzez wiązanie tioestrowe [36]. Następnie aktywowana ubikwityna zostaje przeniesiona na enzym E2 (enzym koniugujący) w wyniku reakcji transestryfikacji. Ostatni etap polega na połączeniu substratu przeznaczonego do degradacji z ubikwityną. Następuje to przy udziale enzymu E3 – ligazy ubikwitynowej. Cały proces ubikwitynacji jest powtarzany aż do momentu uzyskania odpowiednio długiego łańcucha poliubikwitynowego, który następnie jest rozpoznawany przez proteasom 26S [36]. Jako ostatnie ze składników kaskady ubikwitynacji, enzymy E3 są odpowiedzialne za rozpoznanie jak największej liczby substratów białkowych. W konsekwencji są one

najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupą zaangażowaną w tym procesie. Szacuje się, że u ludzi występuje od 600 do 700 genów kodujących ligazy E3, co stanowi 5% całego genomu [37].



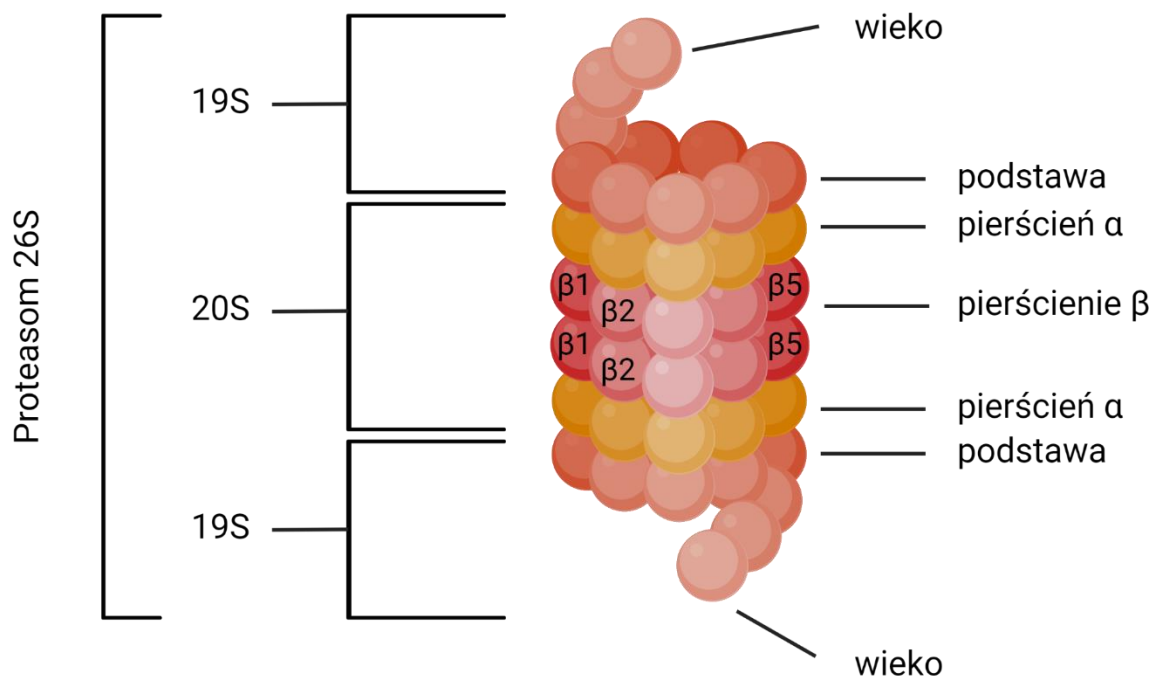
Rysunek 2. Schemat działania układu ubikwityna-proteasom.

1.3. Proteasom 26S

1.3.1. Budowa proteasomu 26S

Proteasom 26S, zwany również proteasomem konstytutywnym jest niezwykle wyrafinowanym kompleksem enzymatycznym odpowiedzialnym za pozalizosomalną degradację białek. Składa się z on wewnętrznej podjednostki katalitycznej - proteasomu 20S oraz dwóch zewnętrznych podjednostek regulatorowych - proteasomów 19S (Rysunek 3) [38]. Każda podjednostka regulatorowa składa się z tzw. podstawy i wieka. Wieko zbudowane jest z dziesięciu białek (Rpn3, Rpn 5, Rpn6, Rpn 7, Rpn 8, Rpn 9, Rpn 11, Rpn 12 and Rpn 15) i jest

ono odpowiedzialne za deubikwitynację substratów przeznaczonych do degradacji. Podstawa podjednostki 19S zawiera sześć homologicznych ATPaz (adenozynotrifosfotaz) oznaczanych jako: Rpt1-Rpt6 oraz cztery białka: Rpn1, Rpn2, Rpn10 and Rpn13 [35]. Jej funkcją jest rozwijanie łańcucha białkowego i kierowanie do wewnątrz podjednostki katalitycznej. Proteasom 20S zbudowany jest z czterech heptamerycznych pierścieni nałożonych na siebie, które tworzą cylindryczny kształt. Każdy z zewnętrznych pierścieni zawiera siedem podjednostek α , natomiast wewnętrzne posiadają siedem podjednostek β [39]. Podjednostki α pełnią funkcję strukturalną, a trzy z siedmiu podjednostek β wykazują aktywność katalityczną. Podjednostka $\beta 1$ wykazuje aktywność kaspazo-podobną, co oznacza, że hydrolizuje wiązanie peptydowe po aminokwasach kwasowych (Asp, Glu). Podjednostka $\beta 2$ posiada aktywność trypsyno-podobną i rozpoznaje w pozycji P1 resztę aminokwasową argininy. Podjednostka $\beta 5$ odpowiada za aktywność chymotrypsyno-podobną i hydrolizuje wiązanie peptydowe po resztach hydrofobowych (Phe, Leu, Ala) [40]. Tak dobrany zestaw podjednostek katalitycznych zapewnia proteasomowi szeroką specyficzną substratową i możliwość degradacji wielu sekwencji aminokwasowych.



Rysunek 3. Schemat budowy proteasomu 26S.

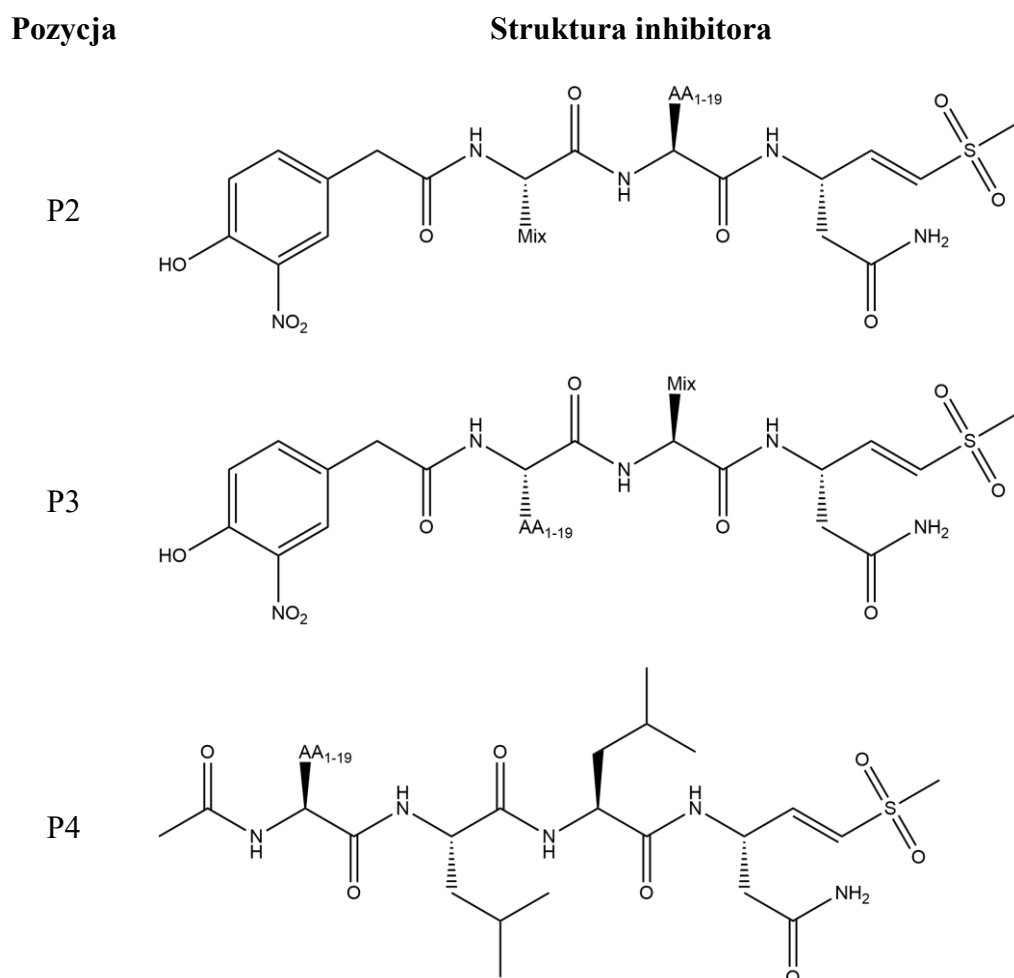
1.3.2. Specyficzność substratowa proteasomu 26S

Wraz z odkryciem proteasomu 26S oraz jego potencjału jako celu terapeutycznego wzrosło zainteresowanie nad określeniem specyficzności substratowej tego enzymu, bowiem pełni on istotną rolę w rozwoju szpiczaka mnogiego [41-43]. Pierwszy zatwierdzony przez Amerykański Urząd ds. Spraw Żywności i Leków preparat przeznaczony do leczenia tego nowotworu jest inhibitorem proteasomu 26S (Bortezomib) [44]. Nie działa on jednak selektywnie i powoduje znaczne efekty uboczne, w związku z czym każda następna generacja leków jest opracowywana pod kątem zwiększenia specyficzności względem wybranych podjednostek katalitycznych [45, 46].

Jednym z dostępnych narzędzi służących do określania specyficzności substratowej proteaz są biblioteki peptydowych substratów fluorogenicznych. Zazwyczaj zawierają one substraty tri- bądź tetrapeptydowe, a badania z ich wykorzystaniem ograniczają się do determinacji preferencji substratowej w pozycjach P4-P1. Poza częścią peptydową zaprojektowane substraty zawierają również fluorofor umiejscowiony w pozycji P1'. Najczęściej stosowanymi fluoroforami do badań na specyficznością substratową proteaz są: 7-amino-4-metylokumaryna (AMC), 2-naftyloamina (NA), 4-metoksy-2-naftyloamina (MNA) oraz kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (ACC) [47, 48].

Pomimo swej początkowej przydatności w zrozumieniu specyficzności substratowej proteasomu, badania z wykorzystaniem fluorogenicznych substratów nie pozwoliły na jednoznaczne określenie różnic pomiędzy poszczególnymi podjednostkami katalitycznymi. Dodatkowo wyniki otrzymane w warunkach *in vitro* nie mogły służyć do opisu specyficzności substratowej proteasomu w warunkach *in vivo*. Zastosowanie biblioteki inhibitorów pozwoliło na globalną analizę kieszeni wiążących poszczególnych podjednostek katalitycznych [49]. Biblioteka składała się z 3 podbibliotek (Rysunek 4). Pierwsze dwie zawierały tripeptydowe inhibitory z grupą winylosulfonową (VS) w pozycji P1', asparaginą w pozycji P1, jednym z 19 wybranych aminokwasów w jednej z kolejnych pozycji oraz równomolową mieszaniną (Mix) 18 naturalnych aminokwasów i norleucyny w następnej (z pominięciem cysteiny i metioniny). Trzecia podbiblioteka składała się z inhibitorów tetrapeptydowych, które również zawierały ugrupowanie winylosulfonowe, zdefiniowaną sekwencję P3-P1 (Leu-Leu-Asn) oraz jeden z 19 wybranych aminokwasów w pozycji P4. Do zaprojektowania powyższej biblioteki zostały wykorzystane naturalne aminokwasy. Cysteina

oraz metionina zostały pominięte ze względu na ryzyko ich utlenienia. Ponadto metionina została zastąpiona swoim analogiem – norleucyną. Otrzymane w ten sposób profile specyficzności pozwoliły na zaprojektowanie związków, które wykazywały selektywność względem wybranych podjednostek [49].



Rysunek 4. Struktura biblioteki inhibitorów peptydowych wykorzystanej do określenia profilu specyficzności proteasomu. **Mix** – równomolowa mieszanina 19 naturalnych aminokwasów (z wyłączeniem cysteiny i metioniną zastąpioną norleucyną); **AA1-19** – jeden z wybranych naturalnych aminokwasów (z wyłączeniem cysteiny i metioniną zastąpioną norleucyną).

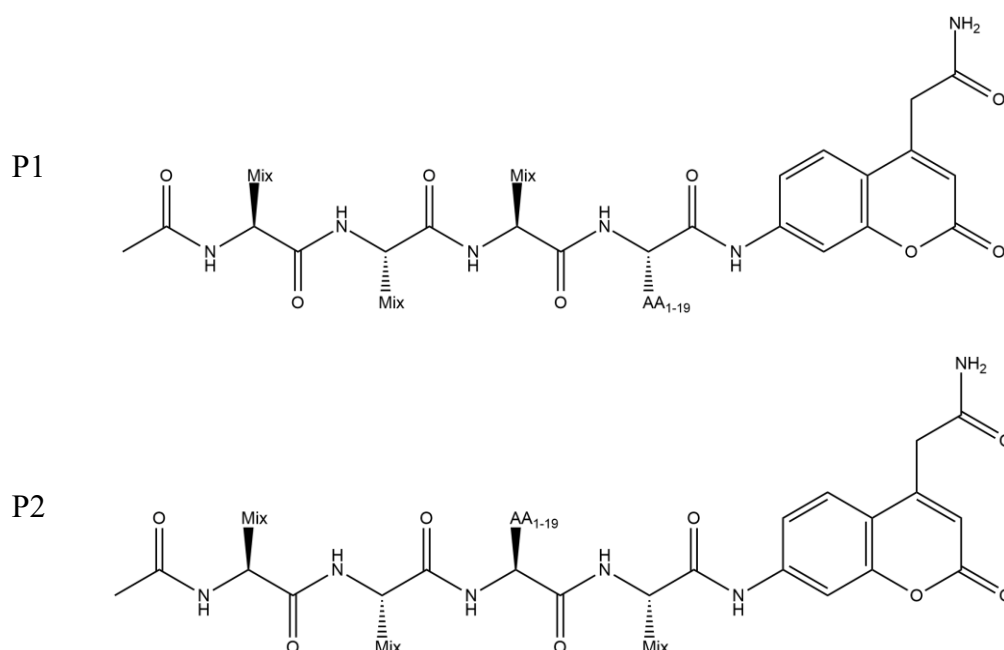
Pomimo swoich początkowych zalet, przedstawiona biblioteka inhibitorów posiadała pewne ograniczenia. Choć pozwoliła na określenie preferencji substratowych w pozycjach P4-P2, to pomijała indywidualne preferencje każdej podjednostki w pozycji P1. Dodatkowo zastosowanie kowalencyjnych inhibitorów dostarczało informacji wyłącznie o początkowym etapie rozkładu substratu, nie uwzględniając etapu deacylacji i uwolnienia produktu hydrolizy.

Zastosowanie metodologii z wykorzystaniem pozycyjnego skanowania kombinatorycznych bibliotek substratów (ang. Positional Scanning Substrate Combinatorial Library, PS-SCL) umożliwiło na lepsze zbadanie profilu specyficzności proteasomu w pozycjach P1-P4 oraz kompleksów proteasomu z podjednostkami regulatorowymi REG α/β oraz REG γ [50]. W opisanych badaniach zsyntezowano dwie biblioteki typu PS-SCL (Rysunek 5). Pierwsza składała się z substratów tetrapeptydowych, które zawierały jedną zdefiniowaną pozycję, zaś trzy pozostałe stanowiły równomolową mieszaninę 19 aminokwasów (naturalne aminokwasy z pominięciem cysteiny i zastąpieniem metioniny norleucyną) oraz kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (ACC) w pozycji P1'. W drugiej bibliotece substraty zawierały dwie zdefiniowane pozycje i dwie składające się z równomolowych mieszanin 19 aminokwasów. Zastosowanie ACC w strukturze związków umożliwiło ich syntezę na podłożu stałym oraz mierzenie prędkości hydrolizy substratów w zależności od przyrostu intensywności fluorescencji.

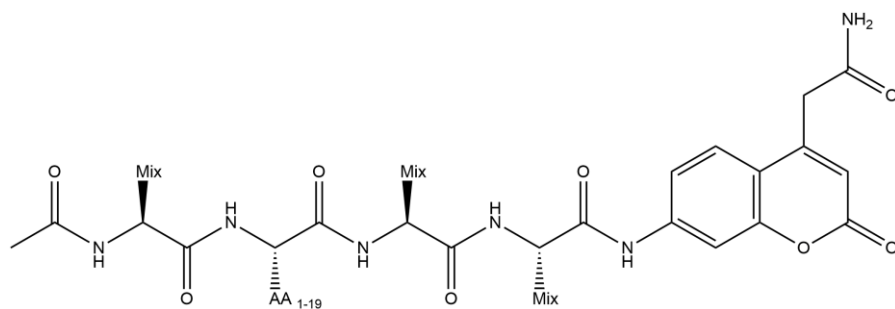
Biblioteka 1

Pozycja

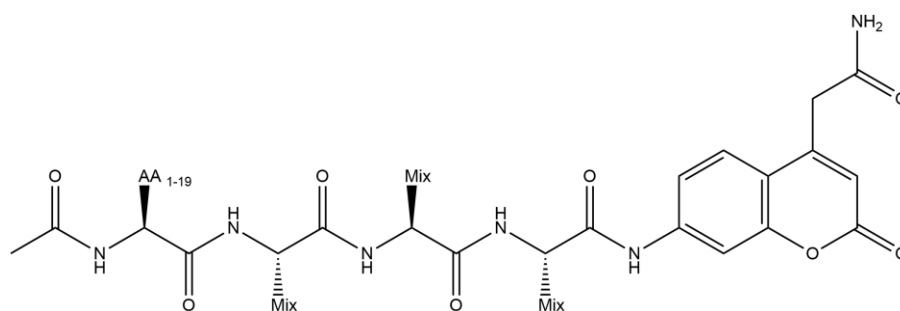
Struktura substratu



P3



P4

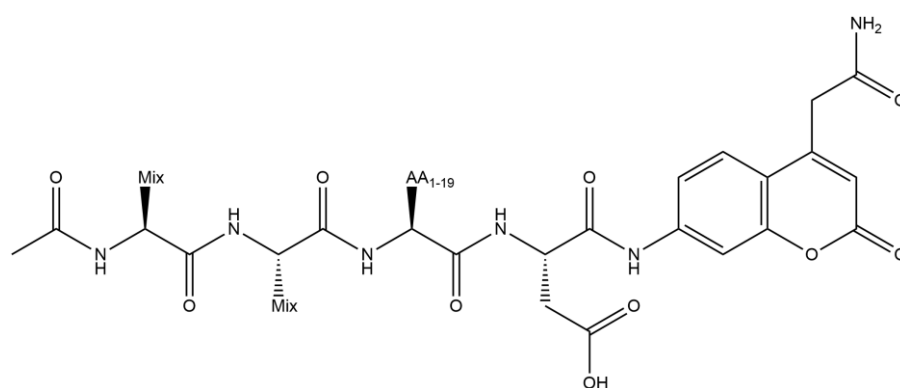


Biblioteka 2

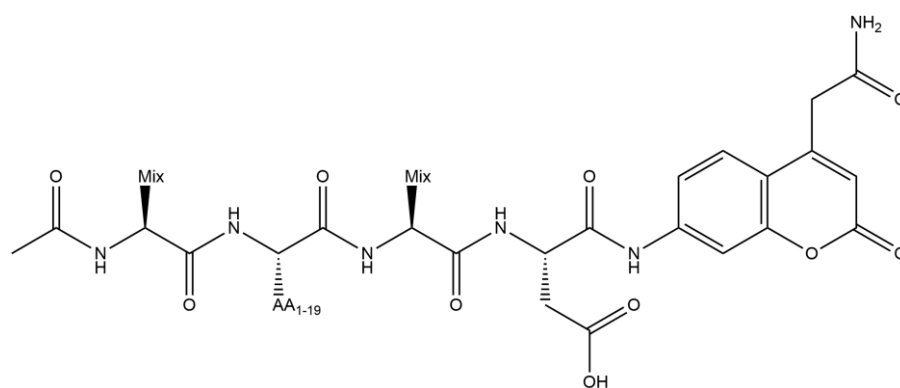
Pozycja

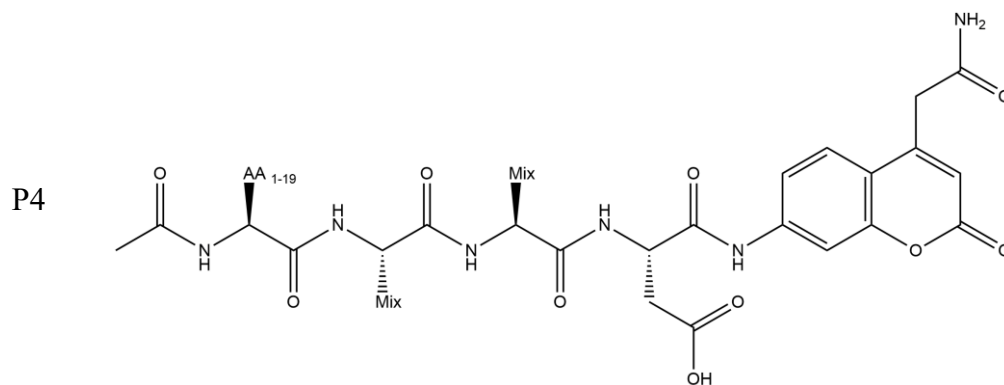
Struktura substratu

P2



P3





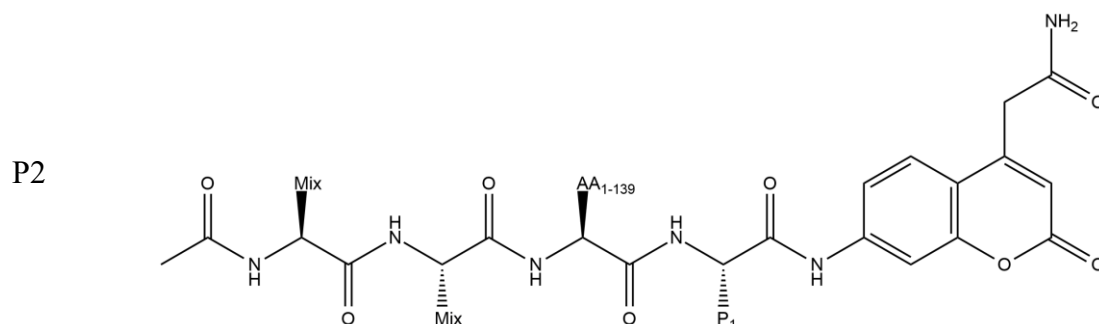
Rysunek 5. Biblioteki wykorzystane do określenia profili specyficzności proteasomu i jego kompleksów z podjednostkami regulatorowymi REG α/β oraz REG γ . **Mix** – równomolowa mieszanina 19 aminokwasów (z wyłączeniem cysteiny i metioniną zastąpioną norleucyną); **AA₁₋₁₉** – jeden z wybranych naturalnych aminokwasów (z wyłączeniem cysteiny i metioniną zastąpioną norleucyną).

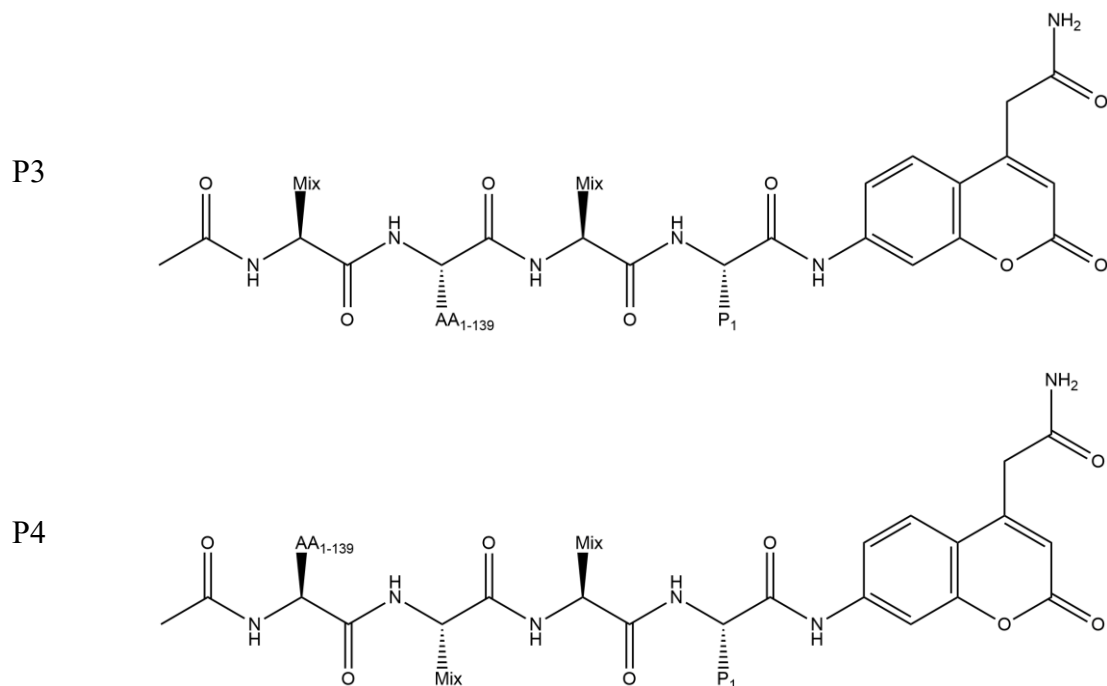
Otrzymane wyniki wykazały znaczące różnice preferencji substratowych proteasomu w zależności od obecności podjednostek regulatorowych. Wolny proteasom 20S preferował w pozycji P1 aminokwasy alifatyczne takie jak: alanina i leucyna, natomiast nie rozpoznawał proliny. Obecność podjednostki REG α/β dodatkowo zwiększała aktywność wobec aminokwasów kwasowych, zasadowych, polarnych i aromatycznych. Kompleks z podjednostką REG γ wykazał najwęższą preferencję substratową, która ograniczała się do aminokwasów zasadowych. Profile specyficzności w pozycji P2 okazały się podobne dla wszystkich form, natomiast znacząco różne w pozycjach P3 i P4. Kompleks REG α/β wykazał szeroki zakres preferencji, a REG γ ograniczał się do aminokwasów zasadowych [50]. Biblioteka zawierająca dwie zdeterminowane pozycje w strukturze substratów pozwoliła na określenie profili specyficzności dla indywidualnych podjednostek katalitycznych. Podjednostka β 1 wykazuje wąską specyficzność w pozycjach P4-P2. W obecności podjednostek regulatorowych REG α/β oraz REG γ wykazuje ona preferencje dla aminokwasów aromatycznych lub o dużym łańcuchu alifatycznym w pozycji P2; dla proliny, alaniny lub dużych aminokwasów alifatycznych w pozycji P3 i szeroką specyficzność w pozycji P4. Podjednostka β 2 wykazała największe różnice pomiędzy kompleksami REG α/β oraz REG γ . Kompleks REG γ preferuje aminokwasy zasadowe w każdej pozycji, zwłaszcza P2 i P3. W przypadku kompleksu REG α/β specyficzność wobec aminokwasów zasadowych jest utrzymana dla pozycji P3, natomiast jest znacząco zmniejszona dla pozycji P2 i P4. W przeciwieństwie do podjednostki β 1, β 2 nie preferuje proliny w pozycji P3. Podjednostka β 5

β2) oraz *L*-Ala (dla podjednostki β5). Otrzymane wyniki pokazały, że w pozycji P2 podjednostka kaspazo-podobna preferuje aminokwasy hydrofobowe takie jak: *L*-Trp, *L*-Nle, *L*-Phe, *L*-hLeu, *L*-2-Aoc, *L*-Lys(2-Cl-Z) oraz pochodne tyrozyny *L*-hTyr, *L*-hTyr(Me). Podjednostka trypsyno-podobna preferowała w tym miejscu metioninę oraz jej pochodne (*L*-Met, *L*-Met(O), *L*-Met(O)₂ oraz *L*-Hyp(Bzl) i *L*-Gln. Podjednostka chymotrypsyno-podobna rozpoznawała równie dobrze aminokwasy hydrofobowe i zasadowe (*L*-2-Aoc, *L*-Met, *L*-Met(O)₂, *L*-Cha, *L*-Hyp(Bzl) oraz *L*-Oic, *L*-Orn, *L*-Dap, *L*-Lys, *L*-Arg). W pozycji P3 podjednostka kaspazo-podobna rozpoznawała kilka aminokwasów hydrofobowych (*L*-Pro, *L*-2-Abu, *L*-Nva, *L*-Leu, *L*-Nle). Podjednostka trypsyno-podobna rozpoznawała większość wykorzystanych w badaniach aminokwasów z wyjątkiem reszt kwasowych, D-aminokwasów oraz proliny wraz z jej pochodnymi (najbardziej preferowane: *L*-2-Abu, *L*-hSer, *L*-Met, *L*-hArg, *L*-Phe(guan), *L*-Val, *L*-Arg, *L*-Thr). Podjednostka chymotrypsyno-podobna najlepiej rozpoznawała w tej pozycji reszty hydrofobowe (*L*-2-Nal, *L*-hPhe, *L*-Phe(4-I), *L*-Phe(4-Cl), *L*-Chg, *L*-Cha, *L*-2-Aoc, *L*-Phe(NH₂)). W pozycji P4 podjednostka kaspazo-podobna wykazała dość wąską specyficzność, składającą się głównie z pozytywnie naładowanych aminokwasów (*L*-hArg, *L*-Phe(guan), *L*-Arg, *L*-Lys). W przeciwieństwie do niej, podjednostka trypsyno-podobna wykazała szeroką preferencję, rozpoznając nawet D-aminokwasy. Podjednostka chymotrypsyno-podobna rozpoznawała dużą część aminokwasów hydrofobowych [52].

Pozycja

Struktura substratów





Rysunek 7. Struktura substratów bibliotek wykorzystanych do określenia preferencji substratowej proteasomu w pozycjach P2-P4. **P1** – *L*-Asp, *L*-Arg lub *L*-Ala; **A₁₋₁₃₉** – jeden ze 139 naturalnych i nienaturalnych aminokwasów wykorzystanych do badań; **Mix** – równomolowa mieszanina 19 naturalnych aminokwasów (z wyłączeniem cysteiny i metioniną zastąpioną norleucyną).

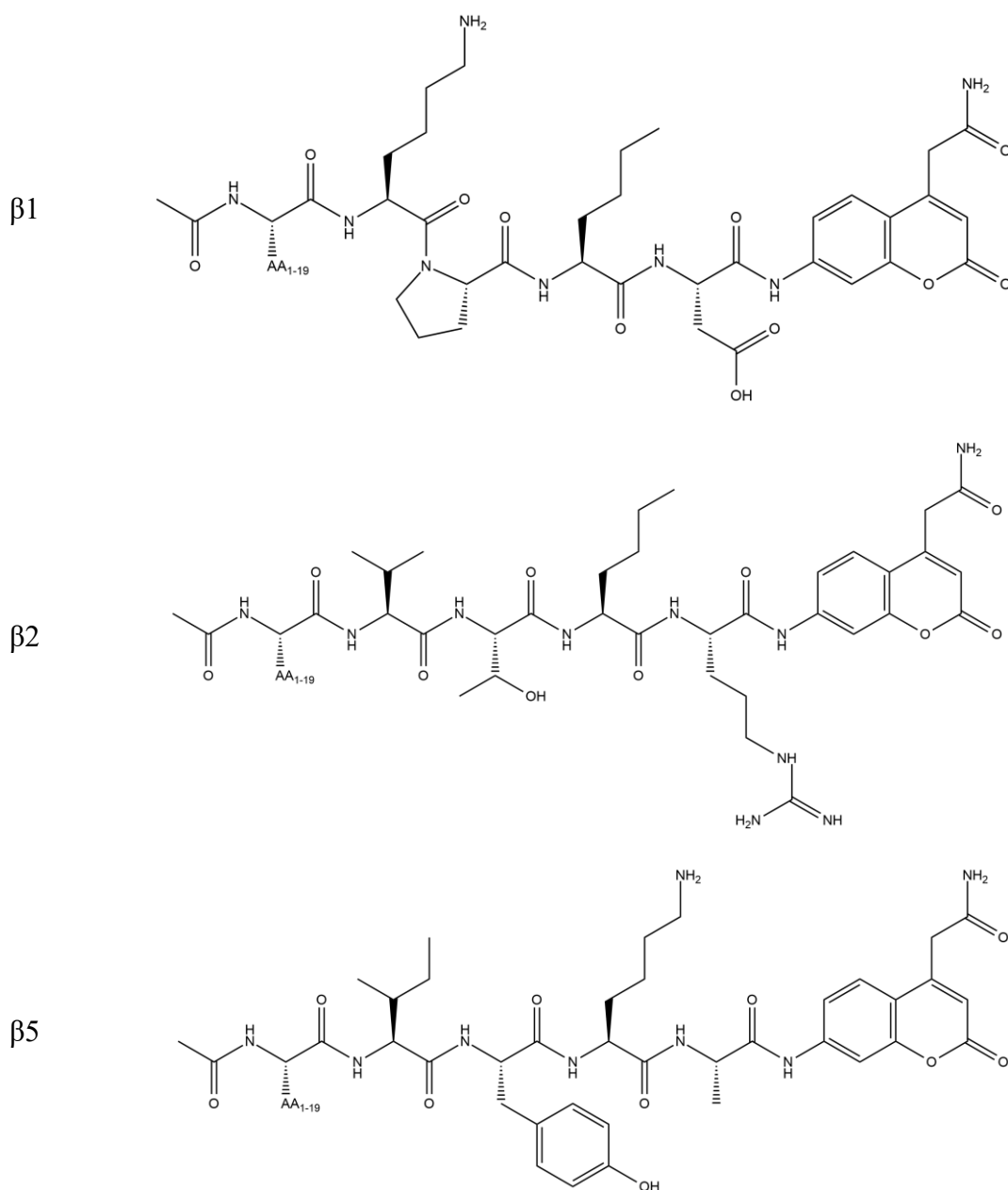
Do tej pory niewiele badań zostało poświęconych preferencji substratowej proteasomu dla kieszeni S5, S6 oraz po stronie primowanej. Rut i współpracownicy określili profil specyficzności w pozycjach P5 i P6 z wykorzystaniem technologii HyCoSuL. Posłużyły do tego dwie biblioteki (odpowiednio penta- i heksapeptydowe), które w pozycji P5 i P6 posiadały jeden z 18 naturalnych aminokwasów oraz norleucynę (cysteina i metionina zostały pominięte) (Rysunek 8) [53]. Podjednostka kaspazo-podobna wykazała szeroką preferencję substratową w pozycji P5, natomiast w pozycji P6 preferowała pozytywnie naładowane aminokwasy (*L*-Arg, *L*-Lys). Podjednostka trypsyno-podobna preferowała zasadowe aminokwasy w pozycji P5 i wykazała szeroki zakres preferencji w pozycji P6. Podjednostka chymotrypsyno-podobna w obu pozycjach rozpoznawała reszty alifatyczne i hydrofobowe. Kolejną część badań stanowiło sprawdzenie zależności pomiędzy długością łańcucha peptydowego substratu, a aktywnością katalityczną enzymu. W tym celu dla każdej z podjednostek zsyntezowano związki zawierające od dwóch do sześciu reszt aminokwasowych. Podjednostki kaspazo- oraz chymotrypsyno-podobne wykazały największą aktywność względem substratów heksapeptydowych, podczas

gdy trypsyno-podobna preferowała pentapeptydy. Jednocześnie wszystkie trzy podjednostki wykazywały dobrą aktywność względem substratów tetrapeptydowych [53].

Biblioteka P5

Podjednostka

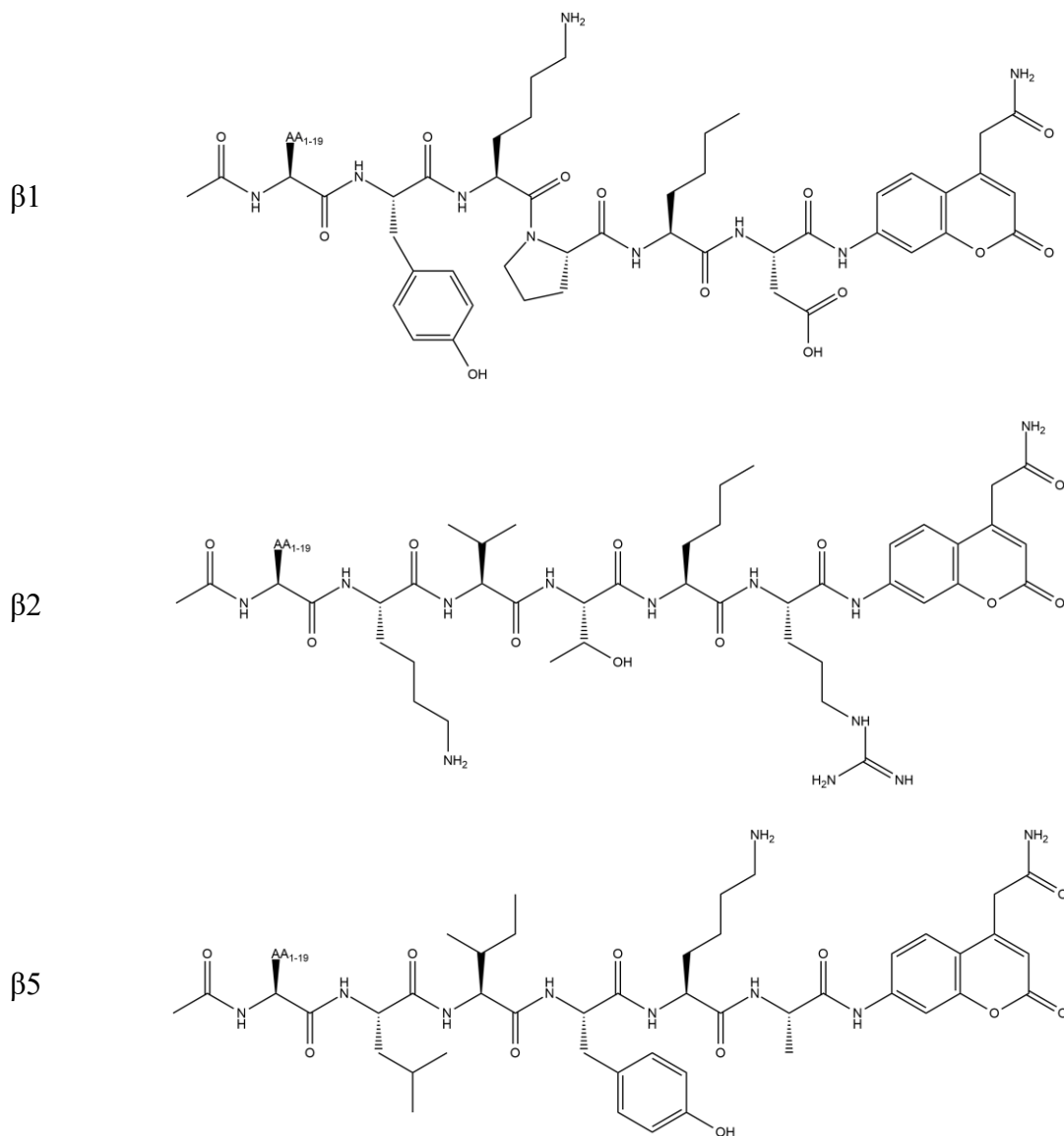
Struktura substratów



Biblioteka P6

Podjednostka

Struktura substratów



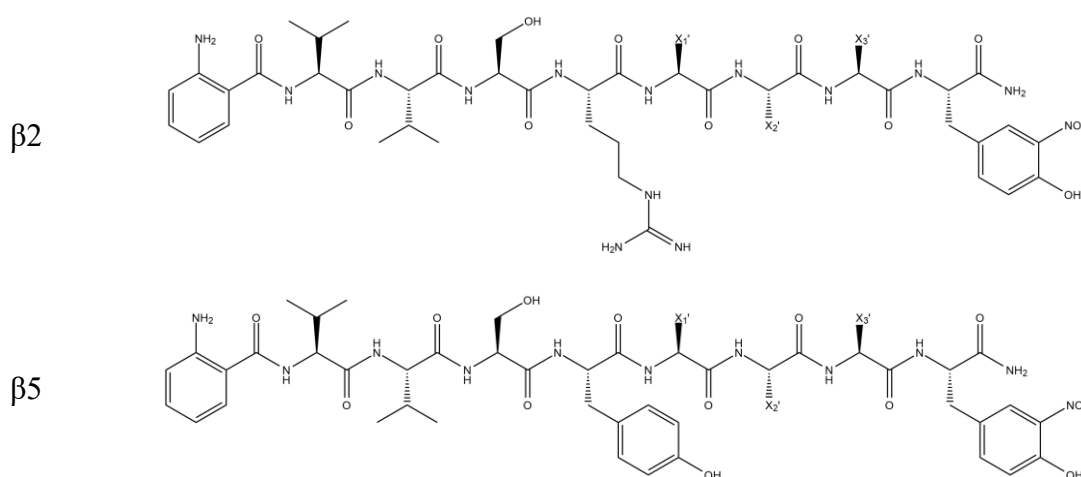
Rysunek 8. Struktura bibliotek substratów wykorzystanych do określenia profilu specyficzności proteasomu z pozycjach P5 i P6. AA₁₋₁₉ – jeden z wybranych naturalnych aminokwasów (z wyłączeniem cysteiny i metioniną zastąpioną norleucyną).

Gruba i współpracownicy w dwóch swoich pracach wykorzystali biblioteki wewnętrznie wygaszanych fluorescencyjnych substratów (ang. Internally Quenched Fluorescent Substrates, IQF) w celu określenia preferencji substratowych dla podjednostek trypsyno- i chymotrypsyno-podobnej [54, 55]. Związki te zawierają w swojej strukturze parę

wyników wybrano najlepiej rozpoznawane aminokwasy w pozycjach P4-P2 i zaprojektowano biblioteki o ogólnej sekwencji: ABZ-Val-Val-Ser-Arg-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (podjednostka trypsyno-podobna) oraz ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (podjednostka chymotrypsyno-podobna) (Rysunek 10). Kwas 2-aminobenzoowy (ABZ) jest w tym przypadku donorem fluorescencji, a 3-nitro-*L*-tyrozyna jej akceptorem. W pozycjach X₁'; X₂' i X₃' umieszczono jeden z 19 naturalnych aminokwasów (z pominięciem cysteiny) i służyły one do określenia profilu specyficzności odpowiednio w pozycjach P1', P2' i P3'. Podjednostka trypsyno-podobna najlepiej rozpoznawała: w pozycji P1' - *L*-Ser i Gly; w pozycji P2' - *L*-Leu i *L*-Met; i w pozycji P3' - Gly, *L*-Gln, *L*-Leu i *L*-Met. Podjednostka chymotrypsyno-podobna najlepiej rozpoznawała: w pozycji P1' – *L*-Ala; w pozycji P2' – *L*-Leu, *L*-Met; i w pozycji P3' – Gly, *L*-Ala, *L*-Trp [54, 55].

Podjednostka

Struktura substratu



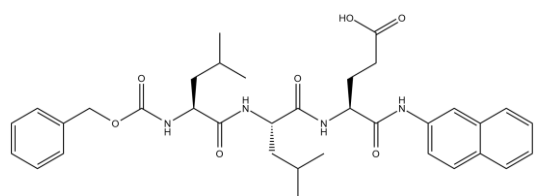
Rysunek 10. Struktury bibliotek wykorzystanych do określenia profilu specyficzności jednostek trypsyno- i chymotrypsyno-podobnej w pozycjach P1', P2' i P3'. X₁', X₂', X₃' – jeden z 19 proteinogennych aminokwasów (cysteina została pominięta).

1.3.3. Substraty proteasomu 26S

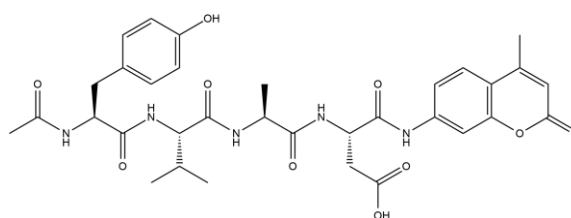
1.3.3.1. Substraty selektywne wobec podjednostki $\beta 1$

Jednym z najwcześniej stosowanych w badaniach nad aktywnością kaspazo-podobną był substrat peptydowy Z-Leu-Leu-Glu-NA (Rysunek 11). Związek ten był jednak

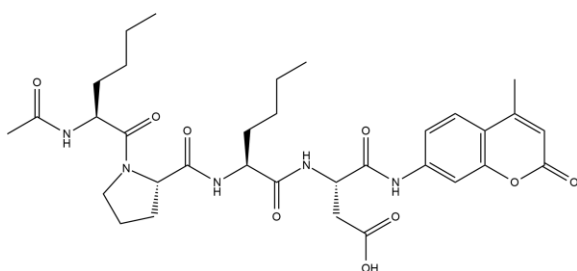
hydrolizowany w dwóch miejscach – pomiędzy resztą glutaminową i 2-natfityloaminą (NA) oraz pomiędzy resztami leucynową i glutaminową. Ponadto zastosowana jako fluorofor NA wykazuje rakotwórcze działanie i daje słabszy sygnał fluorescencji niż AMC. Jednocześnie zamiana fluoroforu na AMC spowodowała 600-krotny spadek prędkości hydrolizy substratu [57]. Innym standardem stosowanym do badania aktywności kaspazo-podobnej jest związek o sekwencji: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC, który jest hydrolizowany ponad 50-krotnie szybciej niż Z-Leu-Leu-Glu-AMC, ale znacznie wolniej niż pozostałe związki stosowane do badania aktywności trypsyno- i chymotrypsyno-podobnej [57]. Kisselev ze współpracownikami w trakcie swoich badań opracował dwa substraty selektywne wobec podjednostki kaspazo-podobnej. Związki o strukturach: Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC oraz Ac-Gly-Pro-Leu-Asp-AMC były szybciej hydrolizowane niż standard Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC, ale ze względu na wysoką wartość stałej Michaelisa-Menten (K_M) dla tych związków nie można było określić dokładnych wartości maksymalnej prędkości hydrolizy (V_{max}) [57]. Wcześniej opisane badania Rut i współpracowników nad specyficznością substratową proteasomu również doprowadziły do powstania zestawu selektywnych substratów. Dwa związki o sekwencjach Ac-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-ACC oraz Ac-hArg-Pro-Abu-Asp-ACC wykazywały selektywność wobec podjednostki kaspazo-podobnej przy stężeniu $5\mu\text{M}$, z czego drugi substrat utrzymywał ją również przy stężeniu $100\mu\text{M}$ [52].



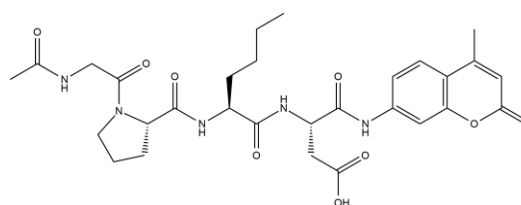
Z-Leu-Leu-Glu-NA



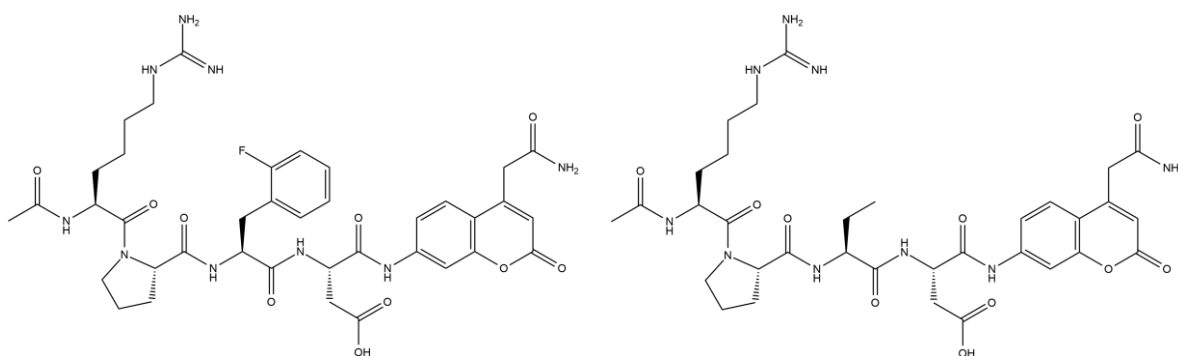
Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC



Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC



Ac-Gly-Pro-Nle-Asp-AMC



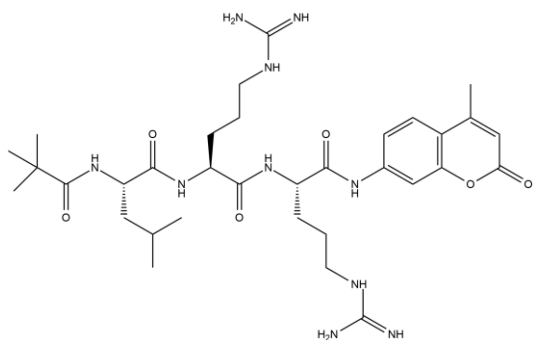
Ac-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-ACC

Ac-hArg-Pro-Abu-Asp-ACC

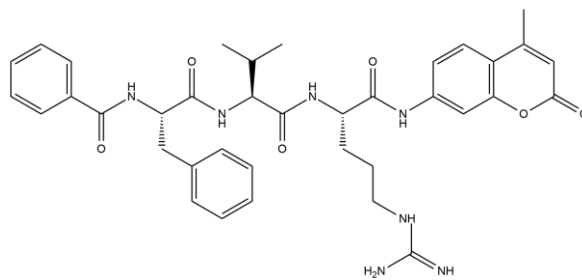
Rysunek 11. Substraty peptydowe stosowane do mierzenia aktywności kaspazo-podobnej proteasomu.

1.3.3.2. Substraty selektywne wobec podjednostki $\beta 2$

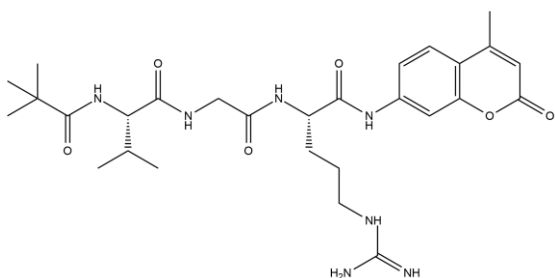
Istnieje kilka komercyjnych substratów stosowanych do pomiarów aktywności trypsyno-podobnej proteasomu: Boc-Leu-Arg-Arg-AMC, Bz-Phe-Val-Arg-AMC, Boc-Val-Gly-Arg-AMC i Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC (Rysunek 12). Wykazują one jednak dość wysoką wartość K_M dla proteasomu ($>0,5$ mM) oraz niewielką aktywność w niskich stężeniach, co wywołało konieczność opracowania nowych sekwencji [44]. Na podstawie informacji zebranych z profili specyficzności opracowanych przez Bogyo i Harris powstał substrat Ac-Arg-Leu-Arg-AMC. Wykazuje on znacznie niższą wartość K_M (78 μ M) i jest wyłącznie hydrolizowany pomiędzy arginina w pozycji P1, a fluoroforem AMC [44,46]. Podobnie jak w przypadku podjednostki kaspazo-podobnej, badania z wykorzystaniem nienaturalnych aminokwasów poskutkowały dwoma selektywnymi substratami: Ac- β -Ala-Met(O)₂-Thr-Arg-ACC oraz Ac-*D*-Arg-hSer-Thr-Arg-ACC [49]. Ponadto opisane zostały również dwa substrat typu IQF o sekwencjach: ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂ i ABZ-Val-Val-Ser-GNF-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂, które wykazały wysoką selektywność wobec aktywności trypsyno-podobnej [51].



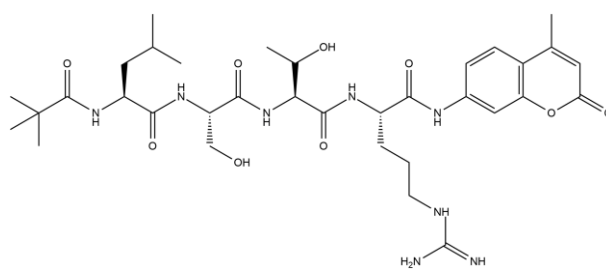
Boc-Leu-Arg-Arg-AMC



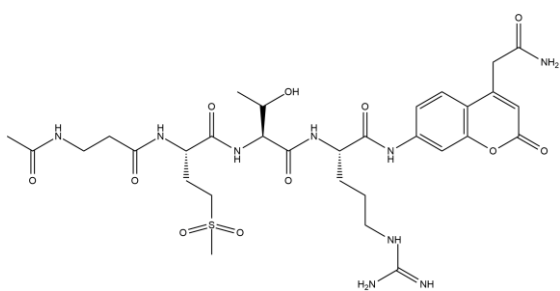
Bz-Phe-Val-Arg-AMC



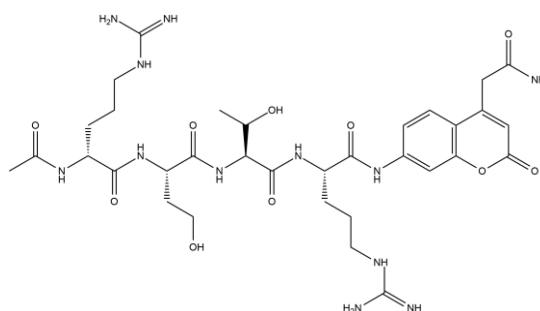
Boc-Val-Gly-Arg-AMC



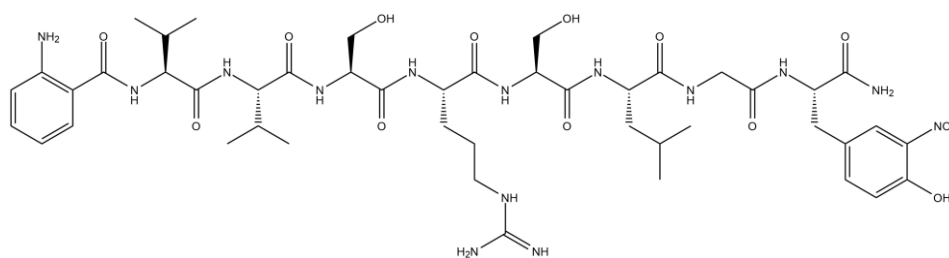
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC



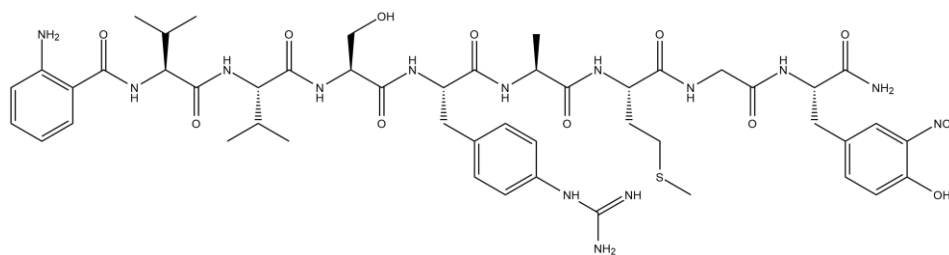
Ac- β -Ala-Met(O)₂-Thr-Arg-ACC



Ac-D-Arg-hSer-Thr-Arg-ACC



ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂

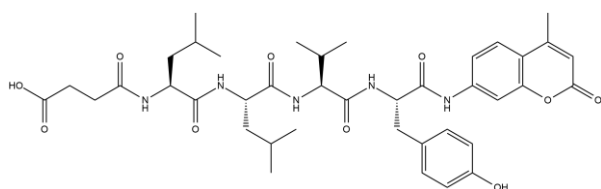


ABZ-Val-Val-Ser-GNF-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂

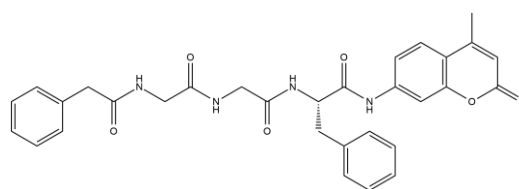
Rysunek 12. Substraty peptydowe stosowane do mierzenia aktywności trypsyno-podobnej proteasomu.

1.3.3.3. Substraty selektywne wobec podjednostki β5

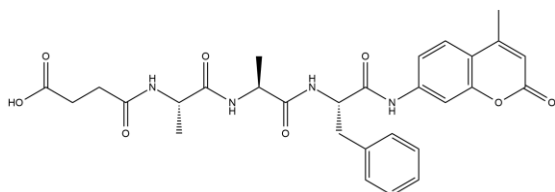
Aktywność chymotrypsyno-podobna proteasomu może być monitorowana za pomocą komercyjnych substratów: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Z-Gly-Gly-Phe-AMC, Suc-Ala-Ala-Phe-AMC oraz Ac-Trp-Leu-Ala-AMC [47, 58]. Gruba wraz ze współpracownikami opracowała substrat typu IQF o sekwencji ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂, który wykazuje wysoką selektywność wobec podjednostki chymotrypsyno-podobnej i pozwala na detekcję proteasomu w stężeniach do 0,5 pM [52].



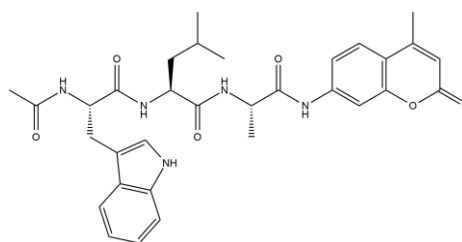
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC



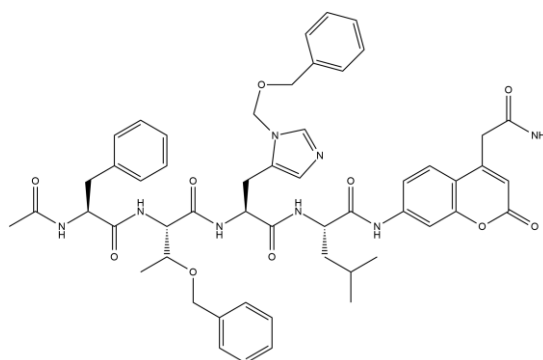
Z-Gly-Gly-Phe-AMC



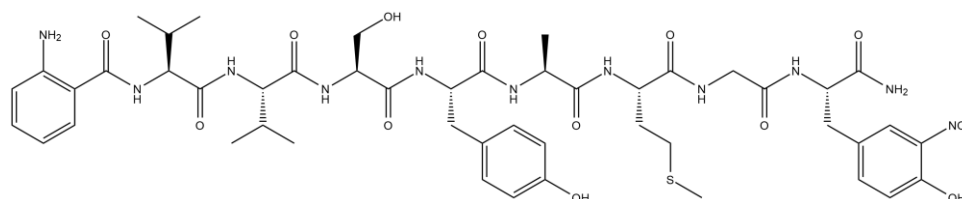
Suc-Ala-Ala-Phe-AMC



Ac-Trp-Leu-Ala-AMC



Ac-Phe-Thr(Bzl)-His(3-Bom)-Leu-ACC



ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Rysunek 13. Substraty peptydowe stosowane do mierzenia aktywności chymotrypsyno-podobnej proteasomu.

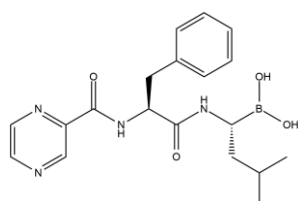
1.3.4. Inhibitory proteasomu

Początkowo inhibitory proteasomu były projektowane jako związki, które miały zapobiegać kacheksji nowotworowej [59, 60]. Z czasem jednak badania przedkliniczne wykazały, że małowczątkowe inhibitory posiadają zdolność wywoływania apoptozy w hodowanych liniach komórkowych i mysich modelach raka, co skierowało uwagę naukowców na ich potencjał jako chemioterapeutyków [61]. Pierwszym związkiem, który został z powodzeniem zastosowany klinicznie jest Bortezomib (Rysunek 14) [62]. Z chemicznego punktu widzenia jest on dipeptydową pochodną kwasu boronowego, która w odwracalny sposób wiąże się z proteasomem 26S. Przede wszystkim odpowiada on za inhibicję aktywności chymotrypsyno-podobnej, jednak oddziałuje również z podjednostkami kaspazo- i trypsyno-podobną [58]. Choć początkowo Bortezomib wykazał świetnie działanie w terapii szpiczaka mnogiego to pewna część pacjentów okazała się być oporna na jego działanie, a u niemal wszystkich następował nawrót nowotworu. Ponadto przyjmowanie zwiększonych dawek leku oraz długotrwała terapia prowadziły do rozwoju neuropatii

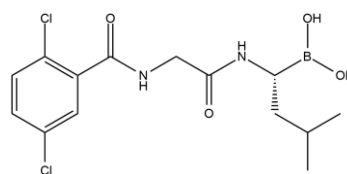
obwodowej. Niemniej pierwsze pozytywne wyniki kliniczne posłużyły do opracowania nowej generacji inhibitorów proteasomu o zwiększonej skuteczności i bezpieczeństwie [63].

Karfilzomib jest inhibitorem drugiej generacji, który również został zatwierdzony jako lek w terapii nowotworów hematologicznych [64]. Jest to tetrapeptydowy epoksyketon będący analogiem epoksymicyny, który kowalencyjnie wiąże się z N-końcową resztą treoninową podjednostek katalitycznych proteasomu. W porównaniu do Bortezomibu wykazuje on zwiększoną selektywność wobec podjednostki $\beta 5$ oraz mniejszą neurotoksyczność. Choć odsetek osób, u których rozwijała się neuropatia obwodowa był niższy to u części stosujących karfilzomib nastąpiły powikłania sercowo-naczyniowe, w tym nadciśnienie i niewydolność serca [65].

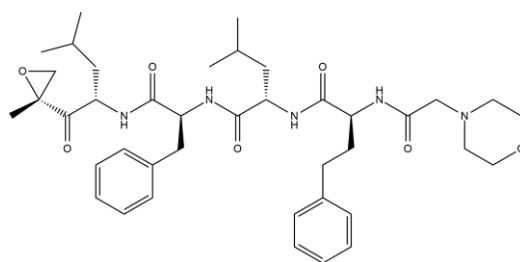
Iksazomib jest inhibitorem proteasomu najnowszej generacji zatwierdzonym jako chemioterapeutyk. W listopadzie 2015 r. amerykańska Agencja Żywności i Leków dopuściła Iksazomib do stosowania w skojarzeniu z Lenalidomidem i Deksametazonem w leczeniu pacjentów ze szpiczakiem mnogim, którzy przeszli przynajmniej jedną wcześniejszą terapię [66]. Pod względem chemicznym jest on peptydową pochodną kwasu boronowego, która w odwracalny sposób wiąże się głównie z podjednostką $\beta 5$ proteasomu [67]. W przeciwieństwie do swoich poprzedników, Iksazomib jest podawany raz na tydzień w formie doustnych tabletek, co znacząco poprawia komfort samej terapii [68].



Bortezomib



Iksazomib



Karfilzomib

Rysunek 14. Wzory strukturalne Bortezomibu, Karfilzomibu i Iksazomibu.

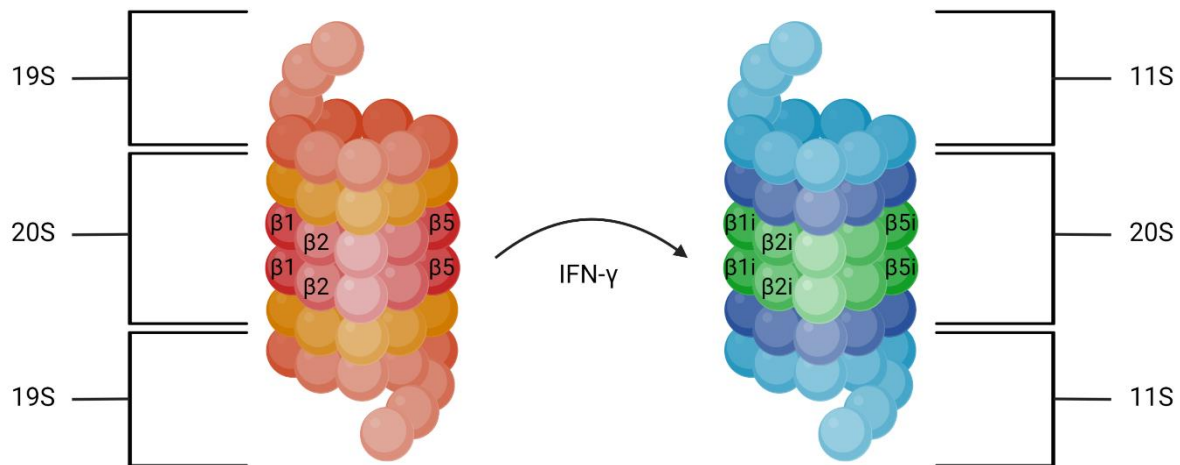
1.4. Immunoproteasom

1.4.1. Budowa immunoproteasomu

Immunoproteasom jest izoformą proteasomu konstytutywnego ekspresjonowaną w komórkach odpornościowych [69]. Jego główną rolą jest przetwarzanie antygenów przekazywanych do prezentacji na cząsteczkach głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC I) w celu aktywacji limfocytów T CD8⁺. Ze względu na swoją funkcję immunoproteasom jest kluczowym czynnikiem w przebiegu infekcji wirusowych oraz patogenezie chorób o podłożu autoimmunologicznym, neurodegeneracyjnym i nowotworów [70, 71]. W ostatnich latach stał on się obiecującym celem terapeutycznym i coraz więcej badań jest poświęconych jego roli w stanach chorobowych oraz poszukiwaniu selektywnych substratów i inhibitorów oddziałujących z jego podjednostkami katalitycznymi [72-75].

Immunoproteasom powstaje wskutek wymiany konstytutywnych podjednostek katalitycznych proteasomu – $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$ na ich indukowalne odpowiedniki – $\beta 1i$, $\beta 2i$ oraz $\beta 5i$ (Rysunek 15). Zamiana następuje wskutek indukcji regulacyjnej przez cytokiny zapalne takie jak: interferon- γ (IFN- γ) lub czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α) [76]. Konwersja proteasomu konstytutywnego na immunoproteasom jest niezwykle istotna, ponieważ zapewnia zmianę aktywności katalitycznej. W trakcie prezentacji antygenowej immunoproteasom wytwarza więcej peptydów z resztami hydrofobowymi ze względu na zwiększoną aktywność chymotrypsyno-podobną. Te zaś lepiej dopasowują się do cząsteczek MHC I, co skuteczniej uwrażliwia krążące limfocyty efektorowe [77]. Ponadto w strukturze immunoproteasomu

zewewnętrzne podjednostki regulatorowe 19S zostają zastąpione przez mniejsze kompleksy 11S, które nie dokują ubikwitynowanych białek [78].



Rysunek 15. Schemat złożenia i budowy immunoproteasomu.

1.4.2. Specyficzność substratowa immunoproteasomu

W przeciwieństwie do proteasomu 26S, specyficzność substratowa immunoproteasomu została głównie określona na podstawie badań krystalograficznych i porównaniu struktury podjednostek konstytutywnych z ich indukowanymi odpowiednikami. Huber wraz ze współpracownikami dokonała analizy wyizolowanych mysich proteasomów oraz ich kompleksów z inhibitorem PR-957 [79].

Porównanie podjednostek $\beta 1$ i $\beta 1i$ wykazało kilka znaczących różnic wpływających na różnice w ich specyficzności substratowej. Zamiana treoniny na walinę w pozycji 20, treoniny na fenyloalaninę w pozycji 31, argininy na leucynę w pozycji 45 i tyrozyny na alaninę w pozycji 52 zwiększyła hydrofobowy charakter kieszeni S1 podjednostki $\beta 1i$. Dodatkowo odmienna konformacja metioniny w pozycji 45 sprawia, że kieszeń jest mniejsza. W konsekwencji preferuje ona rozgałęzione i hydrofobowe aminokwasy jak leucyna, izoleucyna czy walina w pozycji P1 i wykazuje aktywność elastazo-podobną zamiast chymotrypsyno-podobnej. Ponadto zamiana treoniny na alaninę w pozycji 22, alaniny na walinę w pozycji 27

w podjednostce $\beta 1i$ oraz tyrozyny na histydynę w pozycji 114 sąsiadującej z nią podjednostki $\beta 2i$ wspólnie zmniejszają i polaryzują kieszeń S3 tej pierwszej [75].

Analiza struktur podjednostek $\beta 2$ oraz $\beta 2i$ wykazała, że ich miejsca wiążące substrat są niemal identyczne (występuje jedynie zamiana kwasu asparaginowego na glutaminowy w pozycji 53). Do tej pory zasadność substytucji podjednostki $\beta 2$ nie została dokładnie wyjaśniona, a dodatkowe funkcje podjednostki $\beta 2i$ nieokreślone [75].

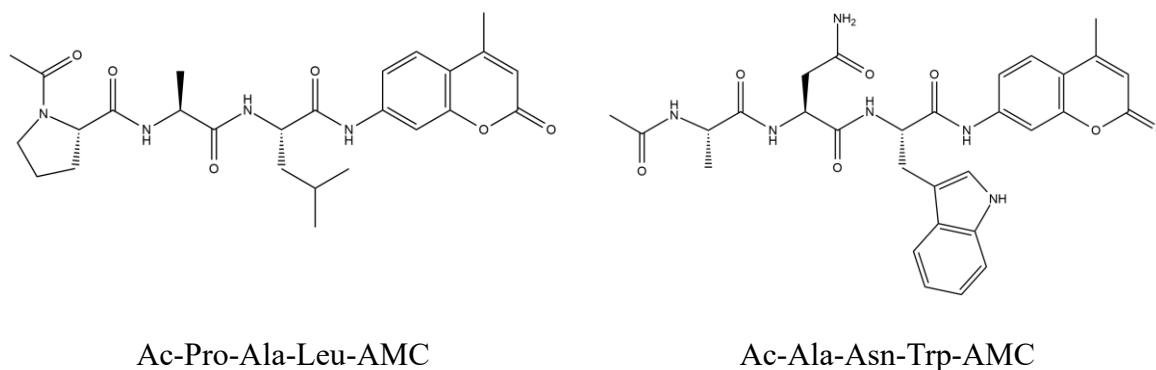
Porównanie podjednostek $\beta 5$ i $\beta 5i$ wykazało, że ich kieszenie S1 odpowiedzialne za ich chymotrpsyno-podobną aktywność pozostają niezmiennie. Kieszeń S2 podjednostki $\beta 5i$ jest płytsza ze względu na obecność cysteiny w pozycji 48 (podjednostka $\beta 5$ posiada w tym miejscu glicynę). Zamiana alaniny na serynę w pozycji 27 kieszeni S3 sprawia, że wykazuje ona bardziej hydrofobowy charakter w odniesieniu do konstytutywnego odpowiednika [75].

Winter wraz ze współpracownikami dokonali analizy porównawczej specyficzności substratowej proteasomu konstytutywnego i immunoproteasomu wykorzystując w tym celu wielokrotne profilowanie substratów za pomocą spektrometrii mas (ang. Multiplex Substrate Profiling by Mass Spectrometry, MSP-MS) [80, 81]. Badanie to wykorzystało równomolową mieszaninę specjalnie zaprojektowanych 228 substratów peptydowych składających się z czternastu reszt aminokwasowych. Po odpowiednim czasie inkubacji z enzymami produkty hydrolizy zostały zidentyfikowane za pomocą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (ang. liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MC/MS). Analiza statystyczna wykazała znaczące różnice między profilami specyficzności obu form proteasomu. Immunoproteasom wykazał większą preferencję substratową dla dużych, hydrofobowych reszt aminokwasowych takich jak tryptofan w pozycji P1. Proteasom konstytutywny wykazał zwiększoną preferencję dla reszt zasadowych jak arginina oraz małych i polarnych aminokwasów jak seryna, treonina, glutamina, glicyna i alanina [76]. Należy podkreślić, że badanie to określiło globalną specyficzność substratową obu bez enzymów, bez uwzględnienia indywidualnych preferencji poszczególnych podjednostek katalitycznych.

1.4.3. Substraty immunoproteasomu

Ze względu na zbliżoną specyficzność obu enzymów, komercyjne substraty zawierające sekwencje aminokwasowe dedykowane do mierzenia aktywności katalitycznej proteasomu konstytutywnego mogą być z powodzeniem stosowane wobec immunoproteasomu [82].

Ponadto dostępne są dwa substraty o sekwencjach Ac-Pro-Ala-Leu-AMC i Ac-Ala-Asn-Trp-AMC stworzone do monitorowania aktywności odpowiednio podjednostki $\beta 1i$ oraz $\beta 5i$ (Rysunek 16) [83, 84].



Rysunek 16. Substraty dedykowane do monitorowania aktywności podjednostek $\beta 1i$ oraz $\beta 5i$.

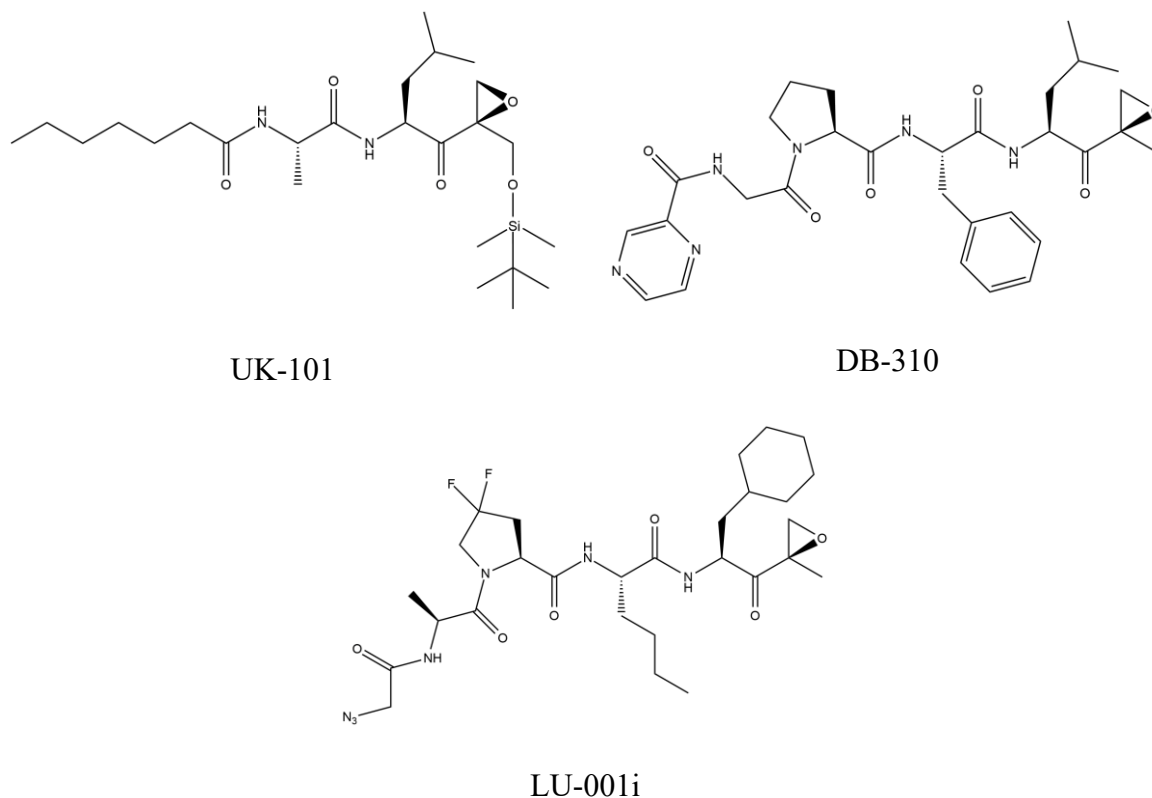
1.4.4. Inhibitory immunoproteasomu

1.4.4.1. Inhibitory podjednostki $\beta 1i$

Inhibitorem pierwszej generacji, wykazującym selektywność wobec podjednostki $\beta 1i$ jest związek o nazwie UK-101 (Rysunek 17) [85]. Pod względem chemicznym jest on syntetycznym analogiem dihydroeponemycyny, będącej naturalnym inhibitorem aktywności proteasomalnej. Zamiana reszty serynowej na alaninową w pozycji P2 oraz dołączenie ugrupowania tert-butyldimetylosililowego do C-końcowej grupy hydroksylowej skutkowało zwiększeniem selektywności wobec podjednostki $\beta 1i$. Inhibitor UK-101 wykazał również aktywność biologiczną wobec komórek raka prostaty PC3. W wyższych stężeniach indukował on apoptozę i hamował wzrost guza w mysim modelu ksenoprzeszczepu [81].

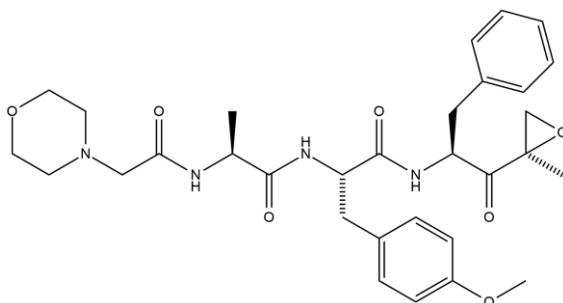
Związek DB-310 jest analogiem opisanego inhibitora YU102 [86]. Zastąpienie N-końcowej grupy acetylowej ugrupowaniem pirazyno-2-karboksyamidowym znacząco zwiększyło jego selektywność względem podjednostki $\beta 1i$. Testy na mysich modelach wykazały, że terapia DB-310 znacząco obniżyła poziom cytokiny IL- 1α , która odgrywa kluczową rolę w progresji choroby Alzheimera oraz załagodziła zaburzenia poznawcze u badanych osobników [82].

Kolejnym inhibitorem podjednostki $\beta 1$ jest tetrapeptydowy epoksyketon o strukturze N3Gly-Ala-Pro(4,4-F₂)-Nle-ChaEK, nazwany LU-001i [87]. Podobnie jak w przypadku DB-310, struktura YU-102 posłużyła jako podstawa do opracowania nowego związku. Zamiana fenyloalaniny na cykloheksyloalaninę w pozycji P1 znacząco zwiększyła selektywność wobec podjednostki $\beta 1$. Podobnie zamiana proliny w pozycji P3 na jej fluorowaną pochodną zwiększyła selektywność związku nie zmieniając przy tym siły jego oddziaływania. Badania na lizatach komórek Raji wykazały, że LU-001i wykazuje ponad 250-krotnie większą preferencję wobec podjednostki $\beta 1$ względem $\beta 1$ [83].



Rysunek 17. Struktury inhibitorów podjednostki $\beta 1$.

Badania na mysich modelach dotkniętych reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazały, że związek ten blokuje produkcję cytokin, obniża poziom autoprzeciwciał w surowicy i zmniejsza stan zapalny [85].



ONX-914

Rysunek 19. Struktura inhibitora podjednostki $\beta 5i$.

2. Cel pracy

Ludzki proteasom konstytutywny i immunoproteasom odgrywają kluczową rolę w procesie degradacji białek oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej [90, 91]. Wszelkie zaburzenia w funkcjonowaniu tych enzymów mogą prowadzić do rozwoju stanów patologicznych takich jak: choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne i autoimmunologiczne [92-94]. Jedną z obiecujących strategii terapeutycznych jest hamowanie aktywności proteosomów. Obecnie dostępne są trzy terapeutyki oparte na inhibitorach proteasomu 20S, jednak stale prowadzone są badania nad opracowaniem nowych związków o lepszej selektywności. Jedną z metod umożliwiających zwiększenie selektywności związków nowych generacji może być wydłużenie łańcucha peptydowego o dodatkowe pozycje – P6, P5, P1' i P2'. W tym celu niezbędne jest jednak określenie profilu specyficzności substratowej w kieszeniach S6, S5, S1' oraz S2' każdej podjednostki katalitycznej proteasomu 20S i immunoproteasomu.

Celem pracy było określenie specyficzności substratowej ludzkiego immunoproteasomu w kieszeniach S6-S2' oraz S1'-S2', a także proteasomu 20S w pozycji S6-S5 i S1'-S2'. W tym celu zaprojektowano i zsyntezowano zestawy bibliotek peptydowych typu HyCoSuL oraz IQF, z wykorzystaniem których utworzono matryce specyficzności substratowej dla podjednostek katalitycznych $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ oraz $\beta 1i$, $\beta 2i$ i $\beta 5i$.

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką prof. dra hab. Marcina Dąga. Badania zostały sfinansowane z grantu Opus Narodowego Centrum Nauki pt. „Zintegrowana platforma skринingowa do wyznaczania rozszerzonej specyficzności substratowej ludzkich proteosomów” (2017/25/B/ST5/00215). Realizacja powyższych celów badawczych obejmowała:

1. Określenie specyficzności substratowej trzech podjednostek katalitycznych ludzkiego immunoproteasomu w kieszeniach S4-S2.
2. Zaprojektowanie i syntezę hybrydowych bibliotek peptydowych substratów fluorogenicznych służących do określenia specyficzności substratowej poszczególnych podjednostek katalitycznych proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S5 i S6.
3. Określenie specyficzności substratowej każdej aktywności katalitycznej proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S5 oraz S6.

4. Zaprojektowanie i syntezę zdefiniowanych bibliotek substratów typu IQF zawierających naturalne i nienaturalne aminokwasy w pozycjach P1' i P2' dla obu proteasomów.
5. Określenie specyficzności substratowej każdej aktywności katalitycznej proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S1' oraz S2'.

3. Badania własne

3.1. Określenie specyficzności substratowej immunoproteasomu w pozycjach P4-P2

Celem tej części pracy było określenie preferencji substratowych poszczególnych podjednostek katalitycznych ludzkiego immunoproteasomu w kieszeniach S4-S2. Zostały wykorzystane do tego hybrydowe biblioteki substratów fluorogenicznych zsyntezowane w laboratorium prof. dr hab. Marcina Drąga przez dr hab. inż. Marcina Porębę, dr hab. inż. Paulinę Kasperkiewicz-Wasilewską oraz dr inż. Tomasza Janiszewskiego. Każda z bibliotek składała się z tetrapeptydowych substratów, które zawierały w pozycji P1' znacznik fluorescencyjny - kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (ACC), jeden z trzech naturalnych aminokwasów w pozycji P1 (Leu dla podjednostki $\beta 1i$, Arg dla podjednostki $\beta 2i$ oraz Phe dla podjednostki $\beta 5i$) oraz acetylowany N-koniec. Każda z bibliotek składała się z trzech podbibliotek o następującej strukturze: Ac-Mix-Mix-P2-P1-ACC; Ac-Mix-P3-Mix-P1-ACC i Ac-P4-Mix-Mix-P1-ACC (Tabela 1).

Tabela 1. Struktury hybrydowych bibliotek substratów fluorogenicznych wykorzystanych do określenia specyficzności substratowej podjednostek immunoproteasomu w pozycjach P4-P2.

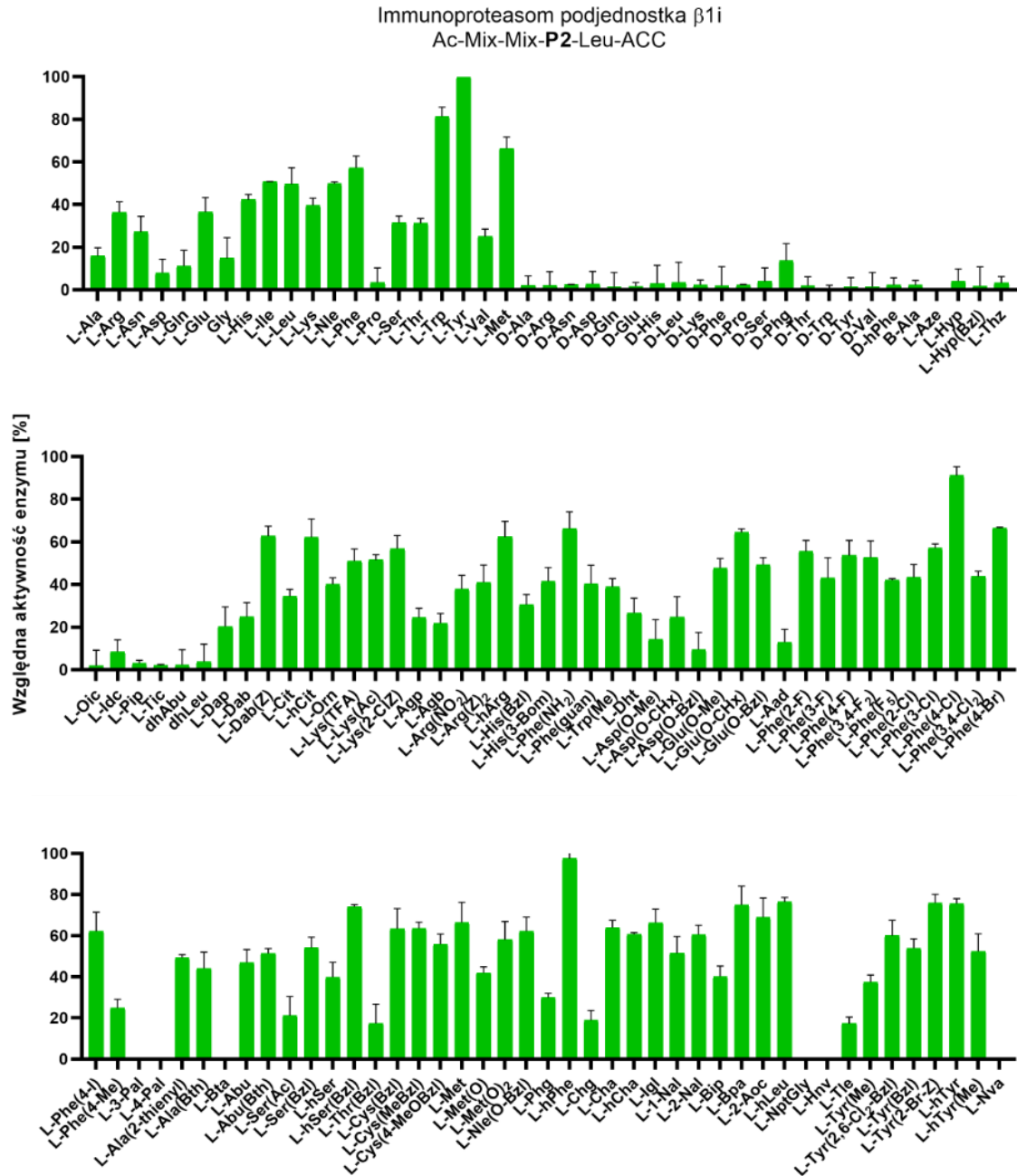
Biblioteka	Podbiblioteki	Badana podjednostka
Ac-P4-P3-P2-Leu-ACC	Ac-Mix-Mix-P2-Leu-ACC	$\beta 1i$
	Ac-Mix-P3-Mix-Leu-ACC	
	Ac-P4-Mix-Mix-Leu-ACC	
Ac-P4-P3-P2-Arg-ACC	Ac-Mix-Mix-P2-Arg-ACC	$\beta 2i$
	Ac-Mix-P3-Mix-Arg-ACC	
	Ac-P4-Mix-Mix-Arg-ACC	
Ac-P4-P3-P2-Phe-ACC	Ac-Mix-Mix-P2-Phe-ACC	$\beta 5i$
	Ac-Mix-P3-Mix-Phe-ACC	
	Ac-P4-Mix-Mix-Phe-ACC	

Badana pozycja (P4, P3 i P2) zawierała 19 naturalnych aminokwasów (z pominięciem cysteiny) oraz 109 nienaturalnych aminokwasów. Mix oznaczał równomolową mieszaninę 18 naturalnych aminokwasów i norleucyny (cysteina i metionina zostały pominięte ze względu na

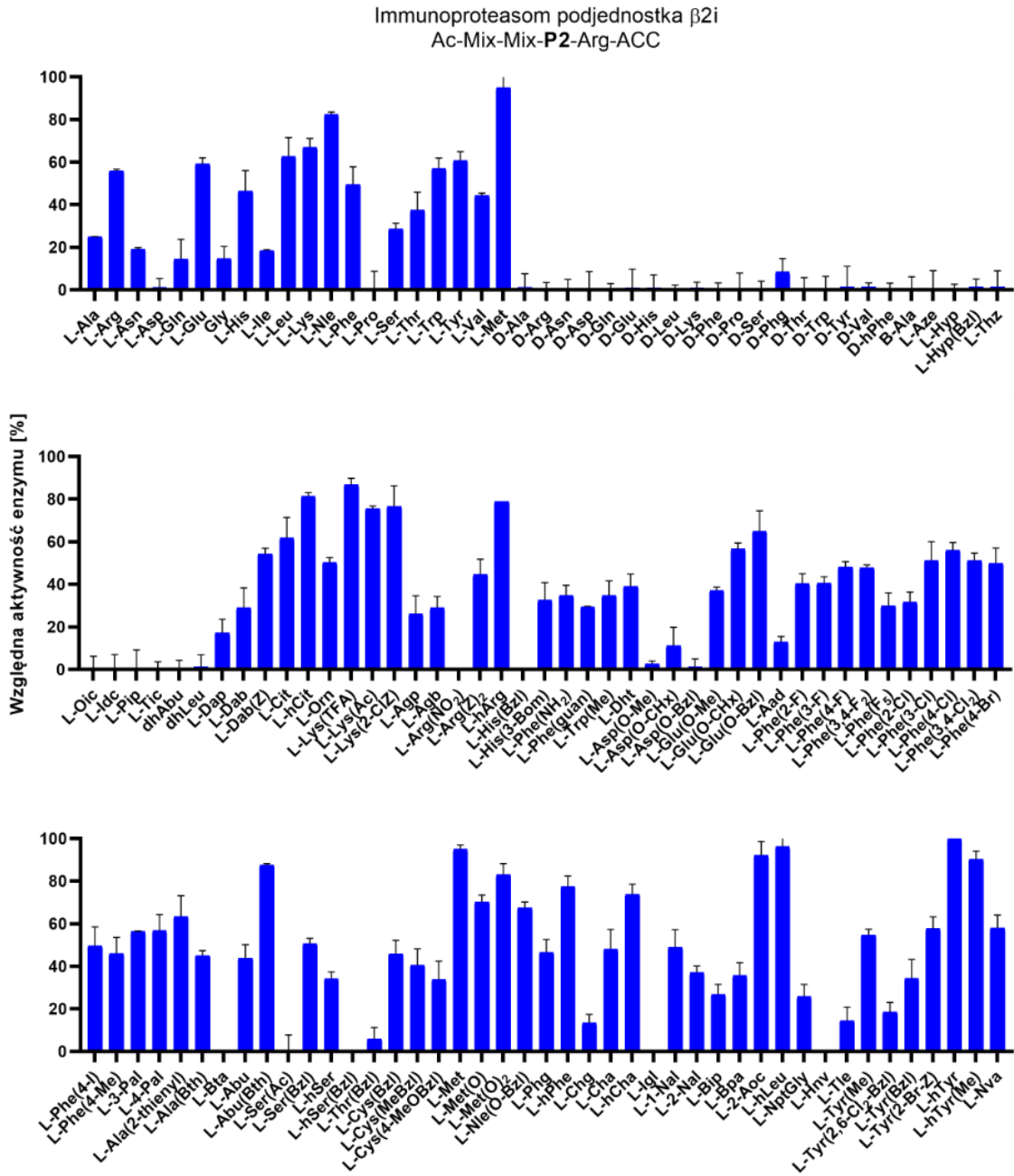
ryzyko utlenienia podczas syntezy). Zróżnicowana struktura łańcuchów bocznych nienaturalnych aminokwasów pozwala na dokładne określenie preferencji substratowych każdej z badanych kieszeni wiążących w centrum aktywnym proteazy. Do określenia specyficzności substratowej immunoproteasomu w pozycjach P4-P2 wykorzystano enzym w stężeniu 1,5 nM oraz biblioteki substratów w stężeniu 5 μ M. Pomiary przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, a uśrednione wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych, na których oś OX przedstawia aminokwasy, a oś OY względną aktywność enzymu wyrażoną w procentach, gdzie 100% to aktywność wobec najlepiej rozpoznawanego substratu (Rysunki 20-28).

3.1.1. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P2

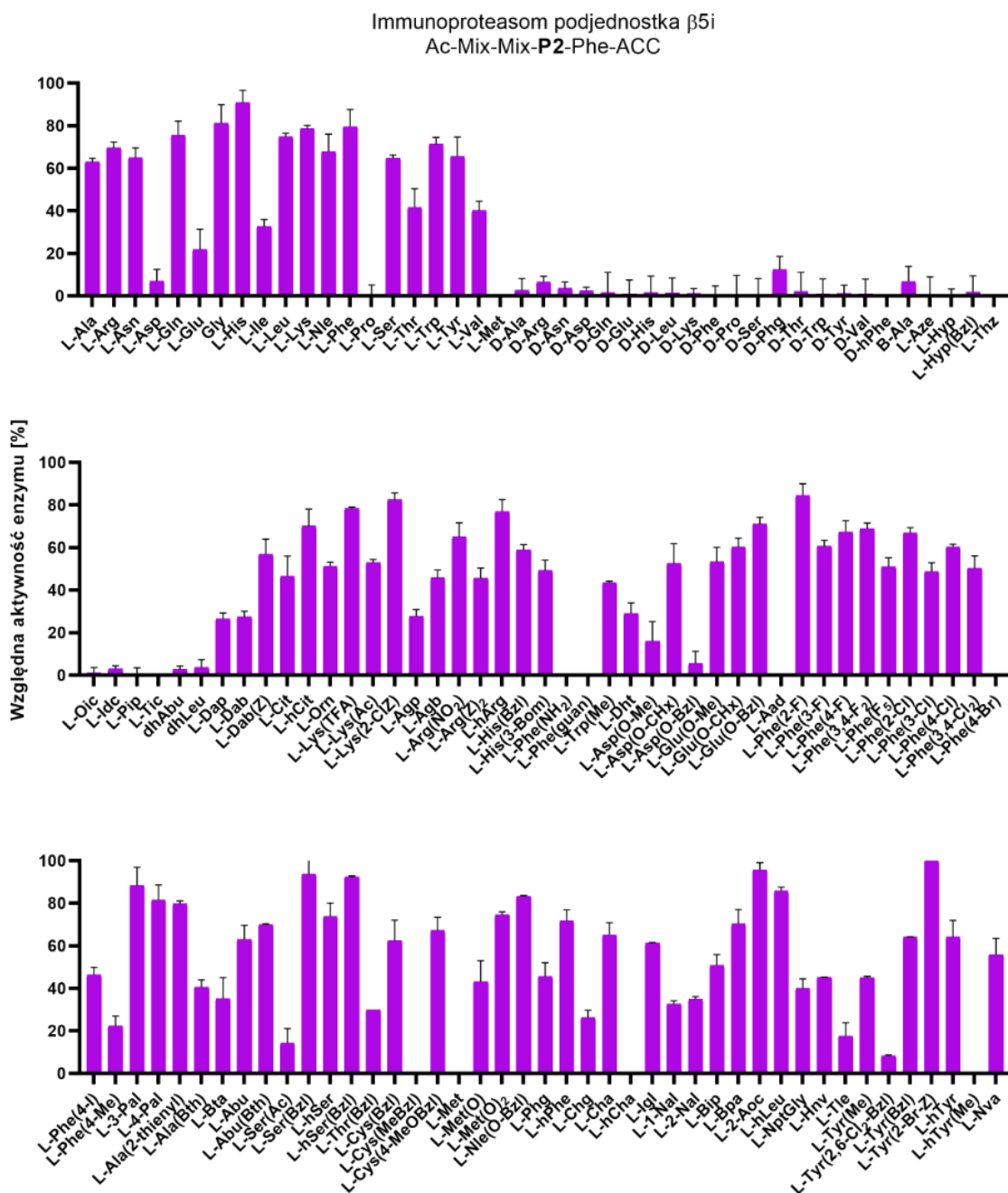
Podjednostka β 1i immunoproteasomu w pozycji P2 najlepiej rozpoznaje aromatyczne, hydrofobowe reszty aminokwasowe, takie jak: L-Tyr (100%), L-hPhe (97,5%), L-Phe(4-Cl) (91,2%) czy L-Trp (81,4%). Aminokwasy posiadające alifatyczny łańcuch boczny są także dobrze rozpoznawane, między innymi: L-hLeu (76,5%), L-2-Aoc (68,9%) i L-Met (66,4%). Podjednostka β 2i preferuje zarówno aromatyczne jak i alifatyczne reszty aminokwasowe, takie jak: L-hTyr (100%), L-hLeu (96,2%) i L-Met (95%). Podjednostka ta dobrze rozpoznaje również alifatyczne łańcuchy boczne o zasadowym charakterze, takie jak: L-hArg (78,8%) czy L-Lys (67%). Wśród najlepiej rozpoznawanych przez podjednostkę β 5i aminokwasów znalazły się: duże, rozgałęzione i hydrofobowe reszty aminokwasowe, takie jak: L-Tyr(2-Br-Z) (100%), L-Ser(Bzl) (93,7%) i L-hSer(Bzl) (92,4%) oraz reszty o zasadowym charakterze: L-His (91%) i L-Lys (78,7%). Żadna z podjednostek katalitycznych immunoproteasomu nie rozpoznaje w pozycji P2 proliny i jej pochodnych oraz D-aminokwasów.



Rysunek 20. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu w pozycji P2.



Rysunek 21. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P2.

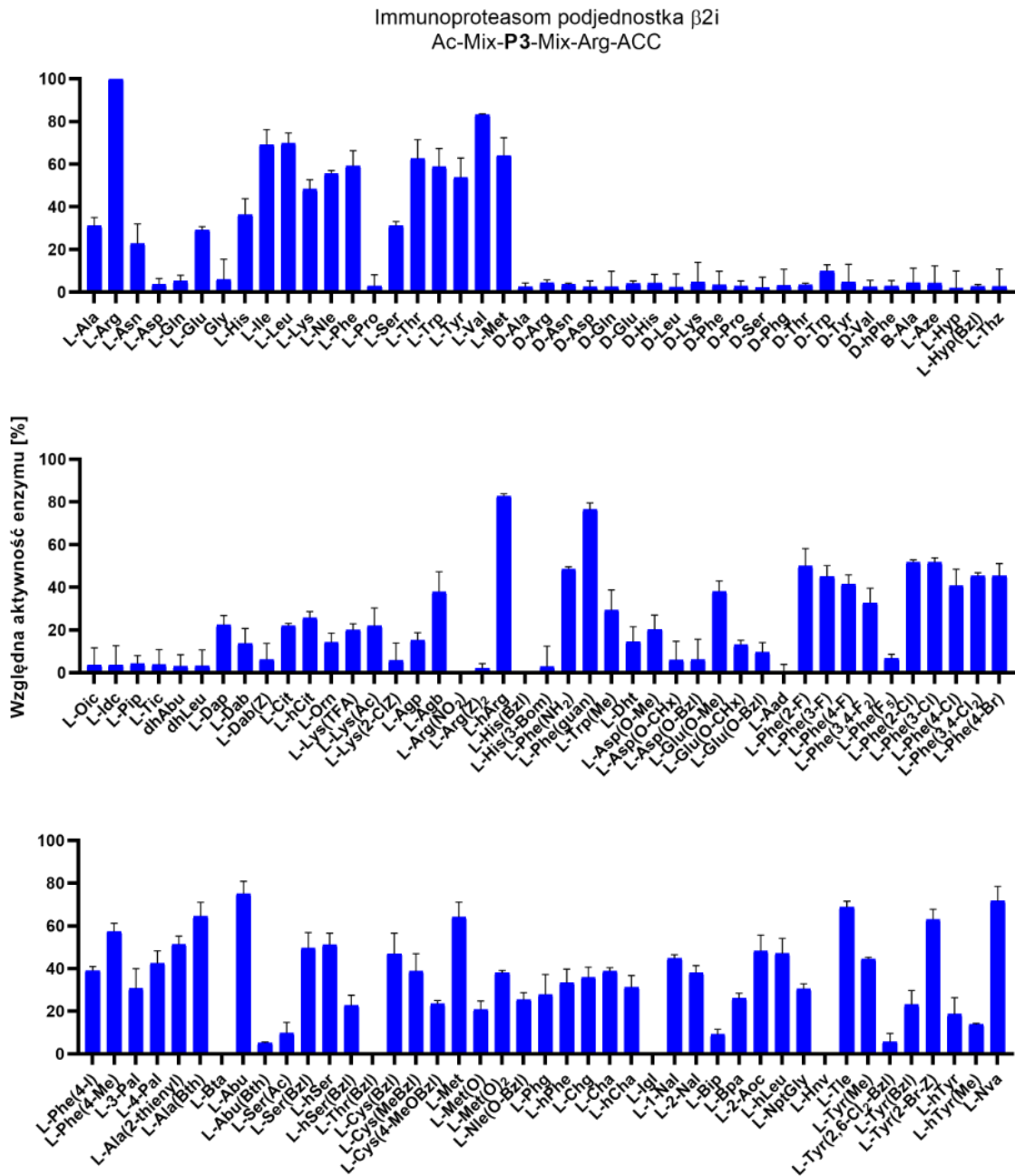


Rysunek 22. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P2.

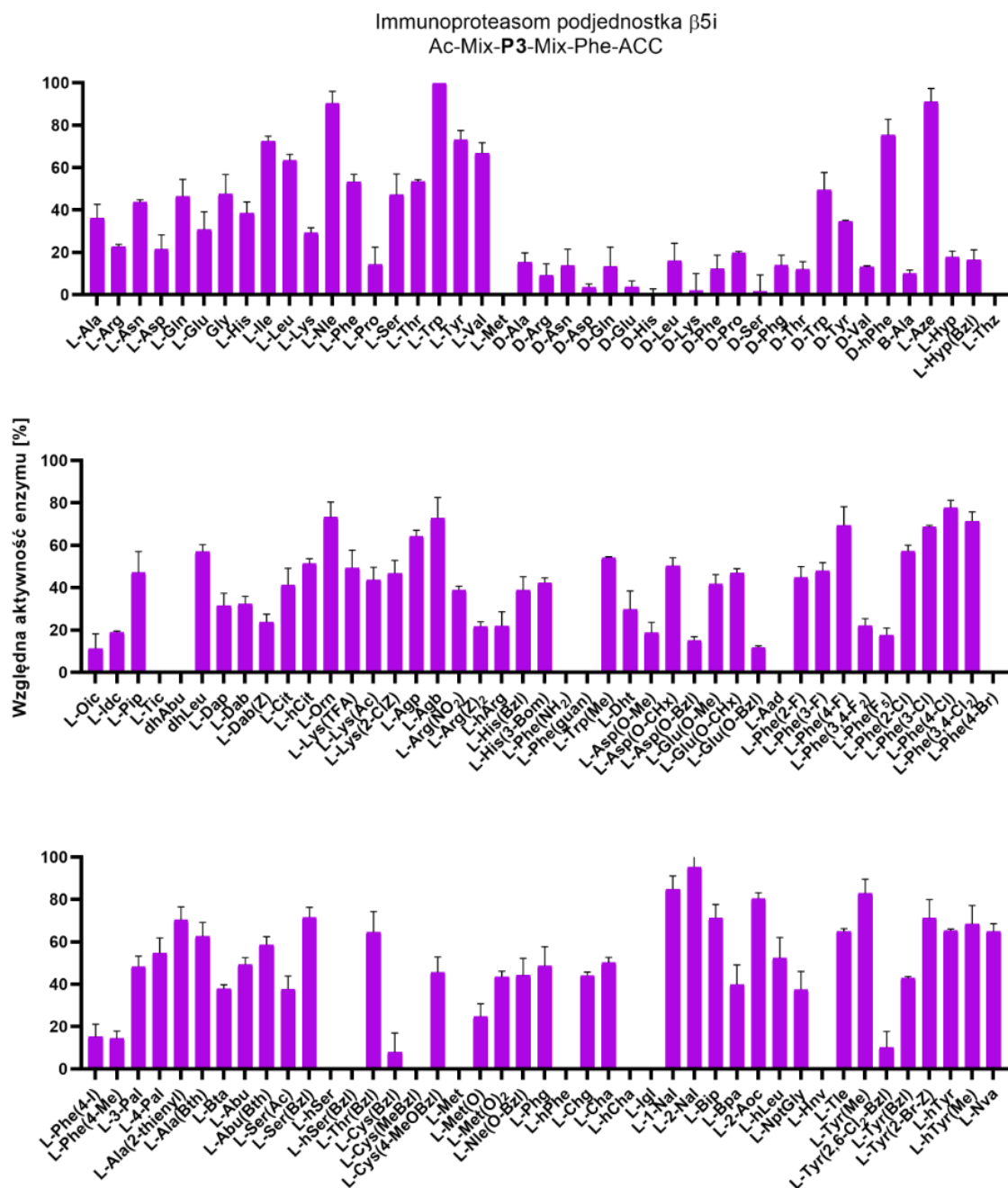
3.1.2. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P3

Podjednostka $\beta 1i$ w pozycji P3 preferuje przede wszystkim duże, aromatyczne i hydrofobowe reszty aminokwasowe. Najlepiej rozpoznawanymi są: L-hPhe (100%), L-Glu(O-Chx) (95,5%), L-Phe(3,4-Cl₂) (92,4%) i L-Phe(4-Br) (86,2%). Podjednostka $\beta 2i$ w tej pozycji preferuje aminokwasy o charakterze zasadowym zawierające w strukturze łańcucha bocznego

grupę guanidynową: L-Arg (100%), L-hArg (82,7%), L-Phe(guan) (76,5%). Podjednostka trypsyno-podobna w tej pozycji rozpoznaje również reszty zawierające krótkie łańcuchy alifatyczne (zarówno liniowe jak i rozgałęzione), takie jak: L-Val (83,1%), L-Abu (75%), L-Nva (71,7%), L-Leu (69,9%) oraz L-Ile (69,2%). Zarówno podjednostka $\beta 1i$ jak i $\beta 2i$ nie rozpoznają D-aminokwasów oraz proliny i jej pochodnych. Podjednostka $\beta 5i$ w pozycji P3 rozpoznaje reszty o zróżnicowanym charakterze chemicznym. Najlepiej rozpoznawanymi aminokwasami są: L-Trp (100%) i L-2-Nal (95,3%), posiadające w strukturze łańcucha bocznego odpowiednio grupę indolową i naftylową. Następnymi preferowanymi aminokwasami są (będąca pochodną proliny) azetydyna (91%) oraz norleucyna (90,4%).



Rysunek 24. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P3.

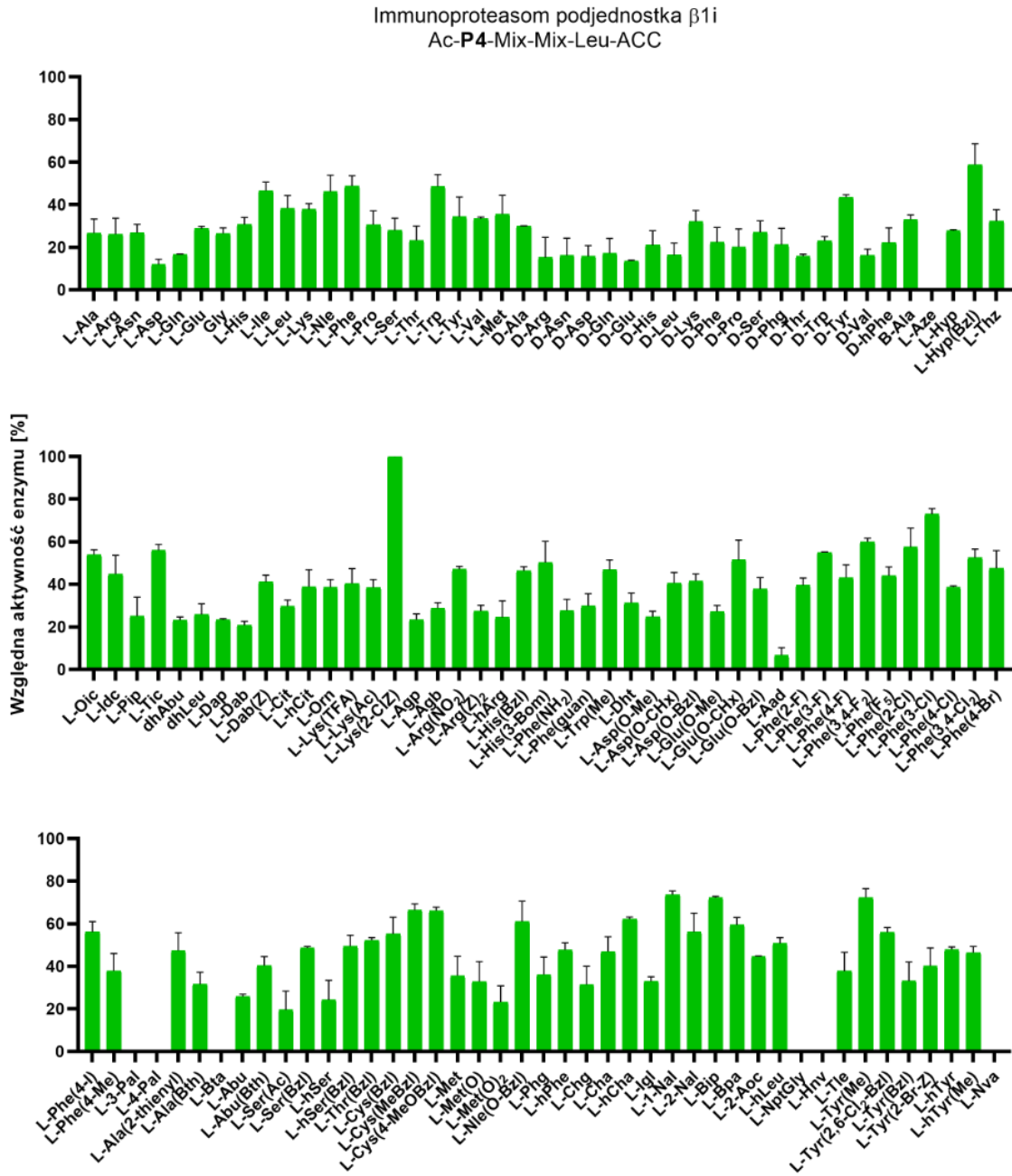


Rysunek 25. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P3.

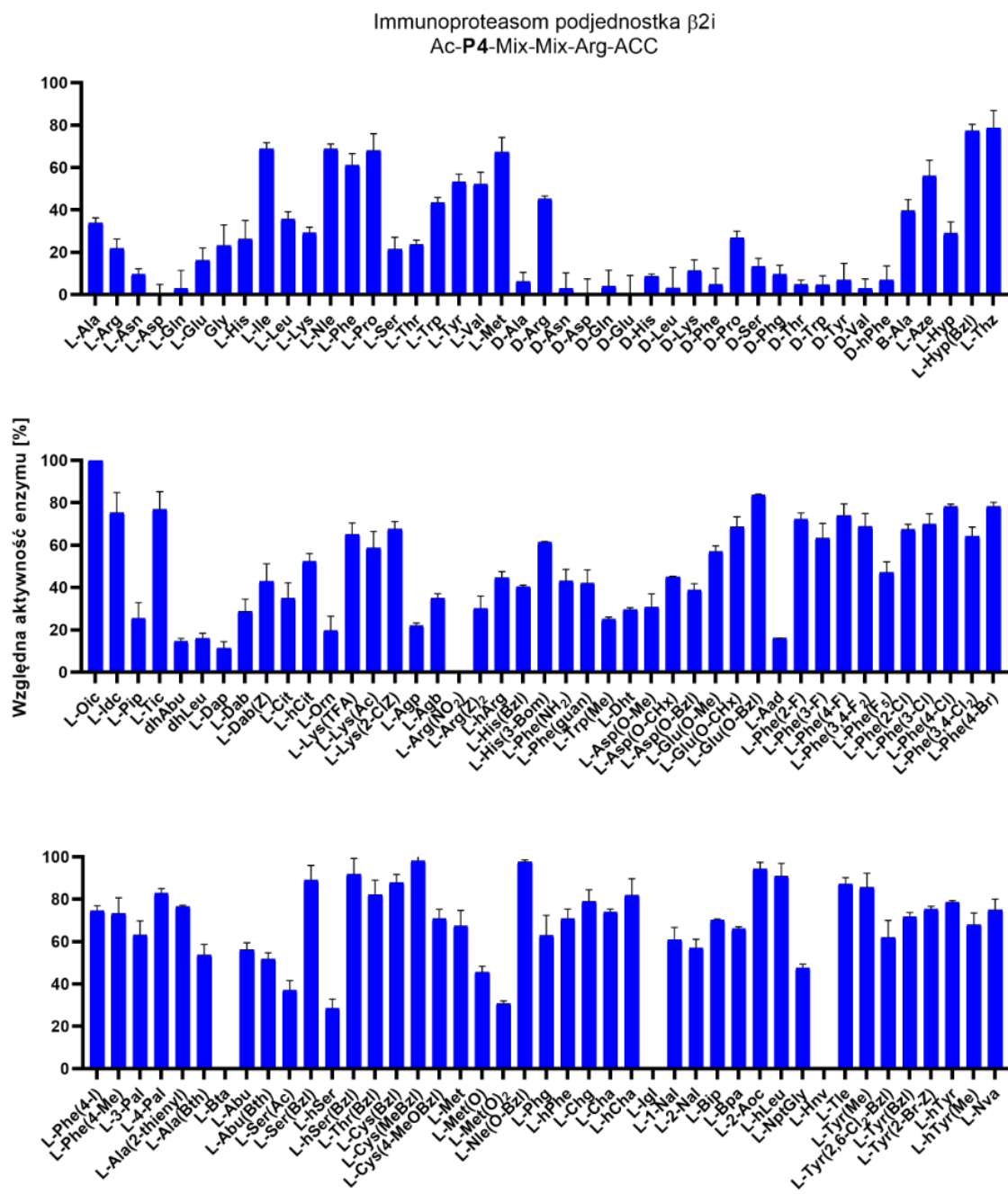
3.1.3. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P4

Podjednostka $\beta 1i$ w pozycji P4 preferuje duże i hydrofobowe reszty aminokwasowe, takie jak: L-Lys(2-Cl-Z) (100%), a następnie L-1-Nal (71,73%), L-Phe(3-Cl) (72,96%), L-Tyr(Me) (72,28%) i L-Bip (72,26%). Podjednostka $\beta 2i$ w pozycji P4 ma szeroki profil specyficzności. Pierwszą preferowaną grupą są pochodne proliny: L-Oic (100%), L-Thz

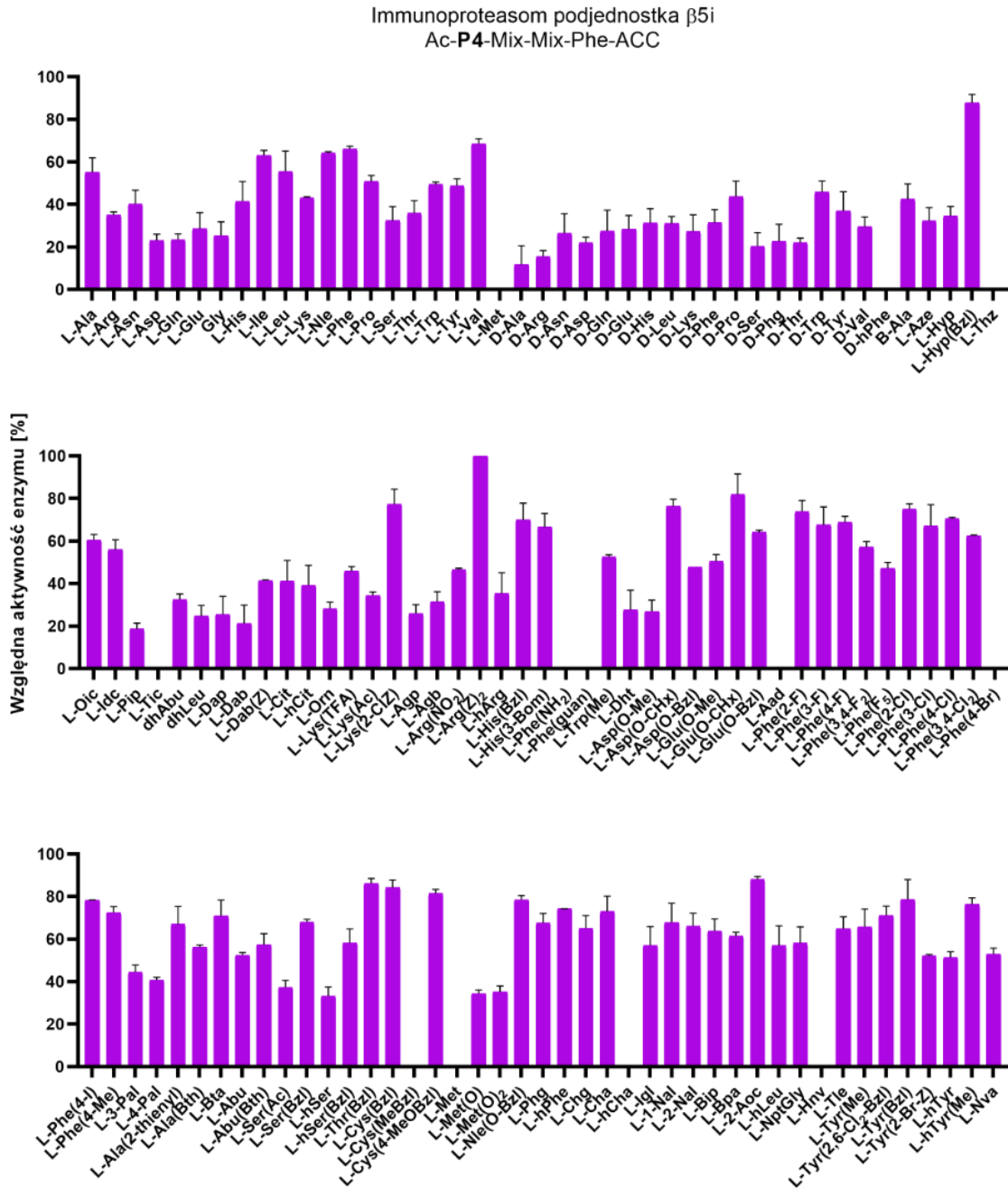
(78,70%), L-Hyp(Bzl) (77,32%), L-Tic (76,97%) i L-Idc (75,30%). Następnie hydrofobowe pochodne aminokwasowe zawierające w swojej strukturze ugrupowanie aromatyczne, takie jak: L-Cys(MeBzl) (98,26%), L-Nle(O-Bzl) (97,59%), L-hSer(Bzl) (91,79%), L-Ser(Bzl) (89,10%) i L-Cys(Bzl) (87,96%). Wybrane pochodne alifatyczne (L-2-Aoc (94,31%), L-hLeu (90,95%), L-Tle (87,20%) oraz cykliczne (L-hCha (81,93%) i L-Chg (79,13%)) są również dobrze rozpoznawane. Podjednostka $\beta 5i$ w pozycji P4 najlepiej rozpoznaje hydrofobowe i aromatyczne aminokwasy, takie jak: L-Arg(Z)₂ (100%), L-Hyp(Bzl) (87,87%), L-Thr(Bzl) (86,25%), L-Cys(Bzl) (84,18%), L-Glu(O-Chx) (81,89%) i L-Cys(4-MeOBzl) (81,84%).



Rysunek 26. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu w pozycji P4.



Rysunek 27. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P4.



Rysunek 28. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P4.

3.2. Projektowanie i synteza bibliotek substratów fluorogenicznych do badania specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P5 i P6

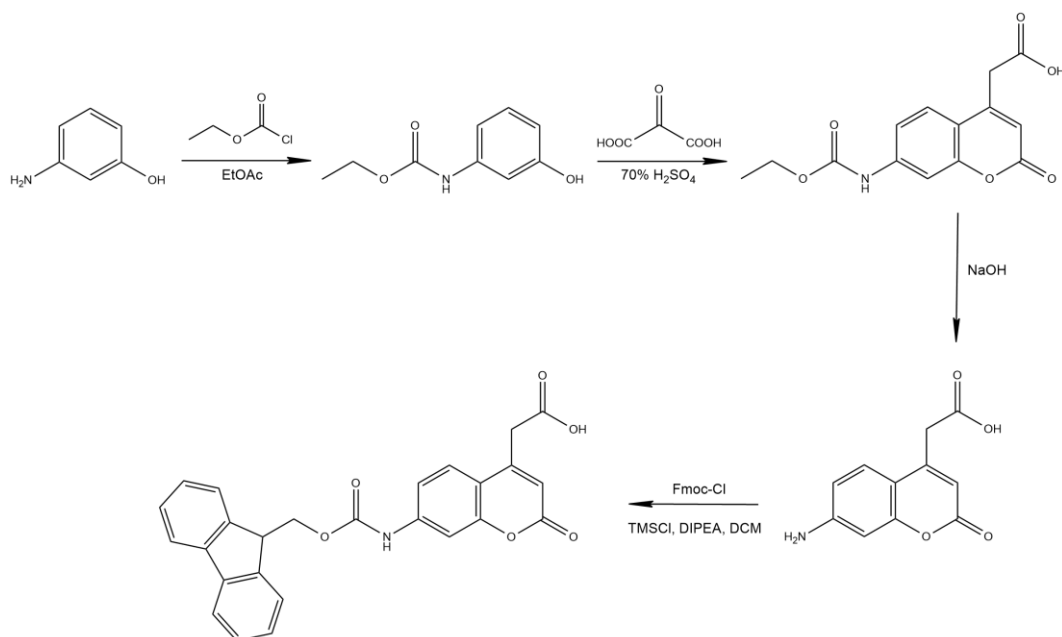
Proteasom 20S i immunoproteasom wykazują trzy różne aktywności katalityczne, w związku z czym koniecznym było zaprojektowanie i synteza dedykowanych bibliotek dla każdej z nich w celu określenia preferencji substratowych w kieszeniach S5 oraz S6. Ze względu na zbliżoną architekturę i aktywność podjednostek $\beta 2$ i $\beta 2i$ oraz $\beta 5$ i $\beta 5i$ do określenia ich profili specyficzności w pozycjach P5 i P6 wykorzystano te same biblioteki. Podjednostki $\beta 1$ i $\beta 1i$ wykazują znacznie odmienne preferencje substratowe w pozycjach P4-P1, w związku z czym każda z nich wymagała osobnych bibliotek do określenia profilu specyficzności dla kieszeni S5 oraz S6.

Zaprojektowano i zsyntetyzowano cztery biblioteki HyCoSuL dedykowane czterem różnym aktywnościom katalitycznym, które składały się z dwóch podbibliotek (Tabela 2). Każda z nich zawierała w pozycji P1' fluorofor: kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (ACC) oraz zdefiniowaną sekwencję w pozycjach P4-P1. Następnie, w zależności od badanej kieszeni, w pozycji P5 lub P6 została umieszczona równomolowa mieszanina 18 naturalnych aminokwasów i norleucyny (z pominięciem cysteiny i metioniny) lub jeden z wcześniej wybranych 98 aminokwasów, które reprezentują szeroki wachlarz różnorodnych struktur chemicznych. Wszystkie substraty posiadają również N-końcową grupę acetylową. Naturalne sekwencje aminokwasowe P4-P2 dla bibliotek dedykowanych podjednostkom $\beta 1$, $\beta 2/\beta 2i$ oraz $\beta 5/\beta 5i$ zostały wybrane na podstawie profili specyficzności substratowej proteasomu 20S otrzymanych przez dr inż. Wioletę Rut [49]. Sekwencja dla biblioteki $\beta 1i$ została opracowana zgodnie z otrzymanymi wcześniej wynikami preferencji substratowej immunoproteasomu w pozycjach P4-P2.

Tabela 2. Struktury podbibliotek wykorzystanych do określenia profili specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P5 i P6.

Podjednostka	Pozycja	Struktura podbiblioteki
$\beta 1$	P5	Ac-Mix-P5-Lys-Pro-Nle-Asp-ACC
	P6	Ac-P6-Mix-Lys-Pro-Nle-Asp-ACC
$\beta 1i$	P5	Ac-Mix-P5-Phe-His-Glu-Leu-ACC
	P6	Ac-P6-Mix-Phe-His-Glu-Leu-ACC
$\beta 2/\beta 2i$	P5	Ac-Mix-P5-Val-Thr-Nle-Arg-ACC
	P6	Ac-P6-Mix-Val-Thr-Nle-Arg-ACC
$\beta 5/\beta 5i$	P5	Ac-Mix-P5-Ile-Tyr-Lys-Ala-ACC
	P6	Ac-P6-Mix-Ile-Tyr-Lys-Ala-ACC

Syntezę bibliotek rozpoczęto od syntezy znacznika fluorescencyjnego Fmoc-ACC-OH, wykorzystując w tym celu zmodyfikowany protokół przedstawiony przez Maly'ego i współpracowników, który obejmował 4 etapy (Rysunek 29) [45]. W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję 3-aminofenolu z chloromrówczanem etylu otrzymując (3-hydroksyfenilo)karbaminian etylu. W drugim etapie produkt poddano reakcji z kwasem 1,3-acetonodikarboksylowym, otrzymując kwas 7-N-(etoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowy. Następnie otrzymany związek poddano hydrolizie zasadowej, co doprowadziło do powstania kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego. Ostatni etap polegał na zabezpieczeniu wolnej grupy aminowej ugrupowaniem ochronnym Fmoc. W tym celu produkt otrzymany w poprzednim etapie poddano reakcji z chloromrówczanem 9-fluorenylometylu.



Rysunek 29. Schemat syntezy Fmoc-ACC-OH.

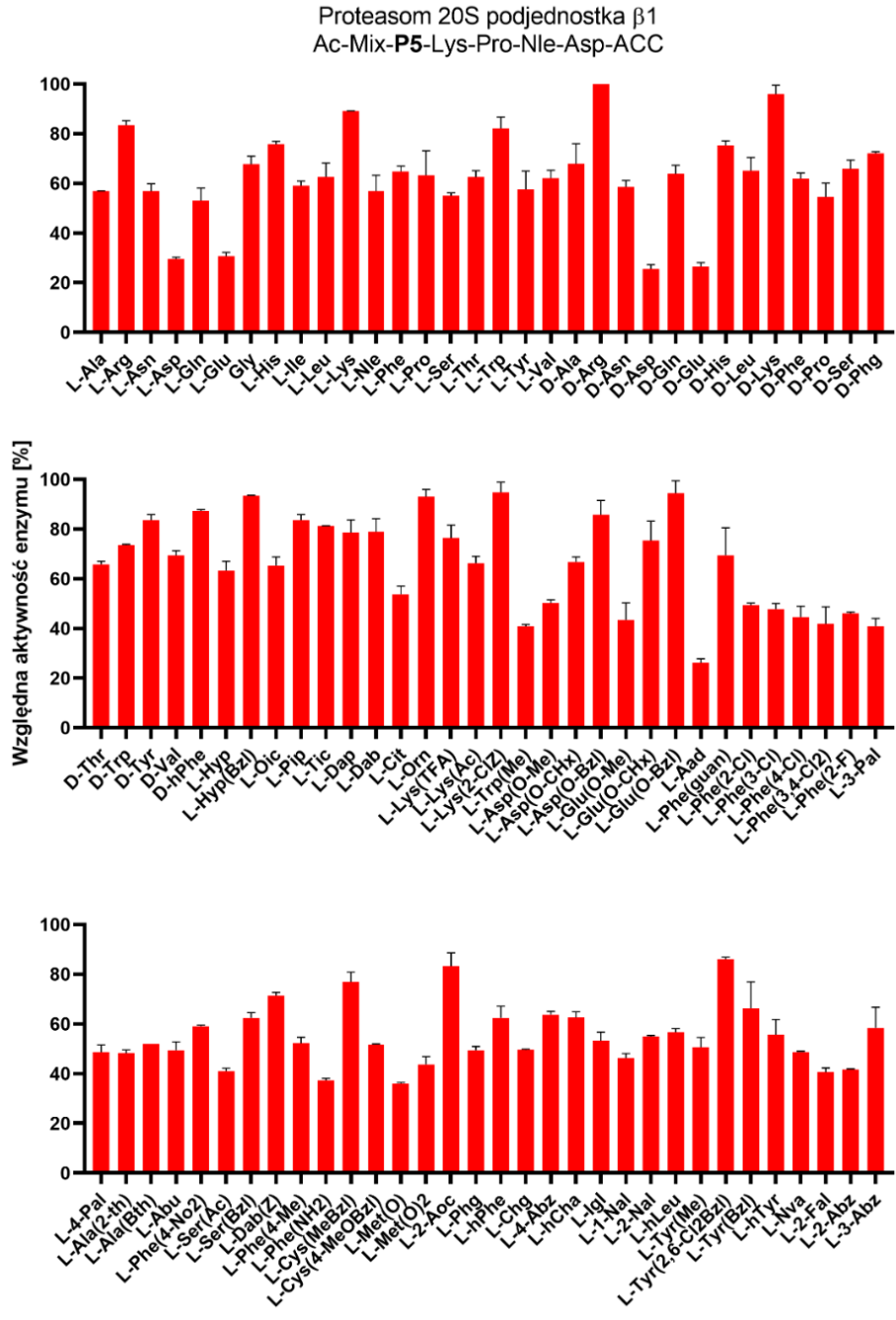
Każdą z bibliotek zsyntetyzowano w analogiczny sposób wykorzystując metodę syntezy na podłożu stałym. W tym celu wykorzystano opisany w literaturze protokół [48]. Do żywicy Amide Rink AM (stopień podstawienia 0,74 mmol/g) przyłączono Fmoc-ACC-OH z wykorzystaniem HATU oraz 2,4,6-trimetylopirydyny. Po przyłączeniu fluoroforu usunięto grupę ochronną Fmoc z wykorzystaniem 20% roztworu piperdyny w *N,N'*-dimetyloformamidzie (DMF), a następnie przyłączono odpowiedni aminokwas w pozycjach P4-P1. Przygotowaną w ten sposób żywicę wysuszone i podzielono na 98 porcji, które umieszczono w półautomatycznym aparacie do syntezy równoległej. W pozycji P5 przyłączono równomolową mieszaninę 19 aminokwasów z wykorzystaniem HOBt i *N,N'*-diizopropylkarbodiimidu (DICl) i usunięto grupę Fmoc. W kolejnym etapie w pozycji P6 przyłączono jeden z wybranych 98 aminokwasów z wykorzystaniem HATU oraz 2,4,6-trimetylopirydyny. W przypadku podbibliotek dedykowanych badaniu specyficzności substratowej w pozycji P5 najpierw przyłączono jeden z 98 aminokwasów, a następnie równomolową mieszaninę 18 naturalnych aminokwasów i norleucyny w pozycji P6. Do N-końcowej grupy aminowej przyłączono grupę acetylową i żywicę wysuszone. W ostatnim etapie peptydy uwolniono z podłoża stałego za pomocą mieszaniny: TFA/TIPS/H₂O w stosunku 95:2,5:2,5 wytrącono w zimnym eterze dietylowym i zliofilizowano. Tak przygotowane substraty rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w temperaturze -80°C. Do określenia specyficzności substratowej enzymów w pozycjach P5 i P6 wykorzystano proteasom 20S w stężeniu 0,5 nM i immunoproteasom w stężeniu 1,5 nM oraz biblioteki

substratów w stężeniu 5 μ M. Pomiar przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, a uśrednione wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych, na których oś OX przedstawia aminokwasy, a oś OY względną aktywność enzymu wyrażoną w procentach, gdzie 100% to aktywność wobec najlepiej rozpoznawanego substratu (Rysunki 30-41).

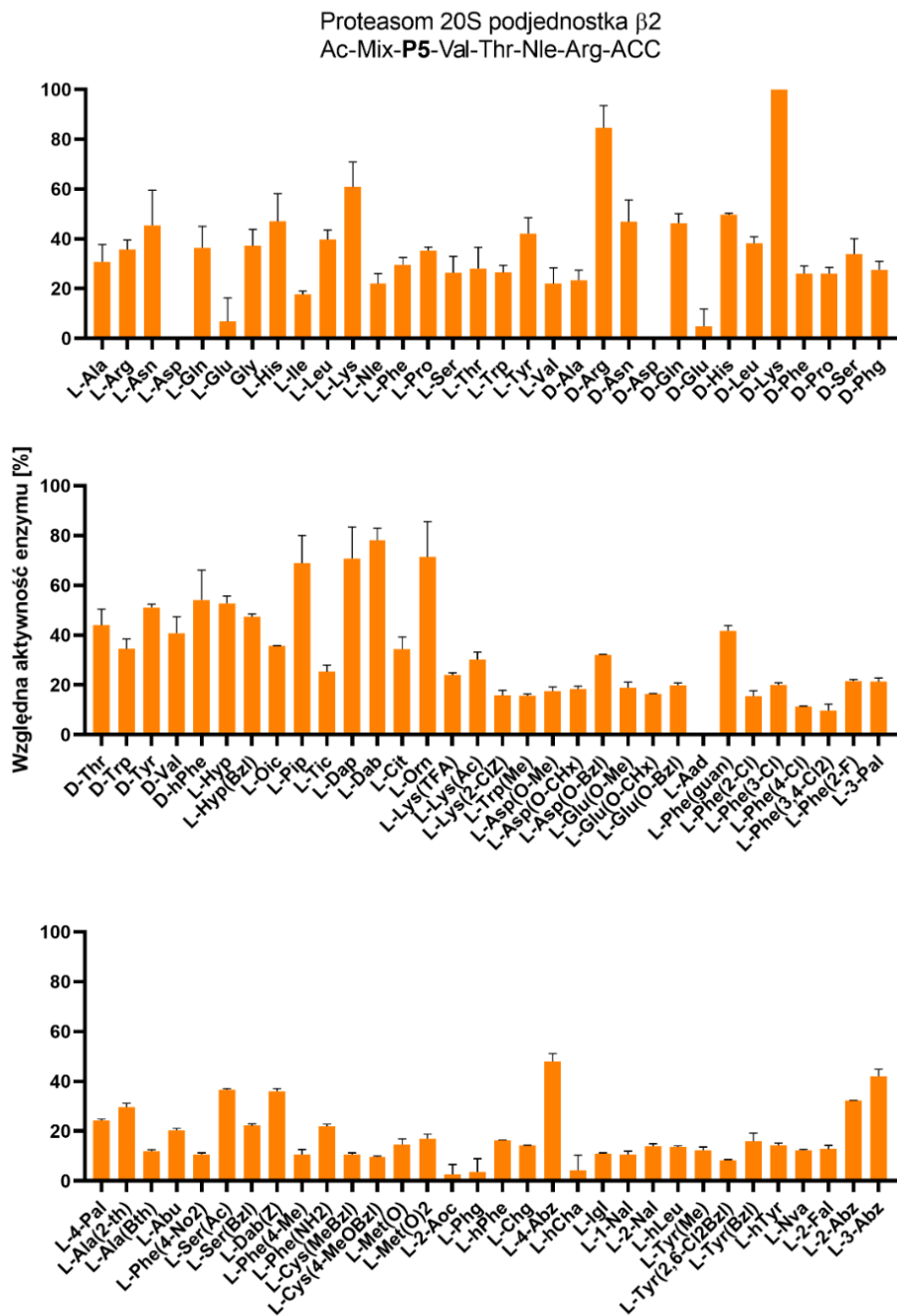
3.3. Określenie specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P5 i P6

3.3.1 Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P5

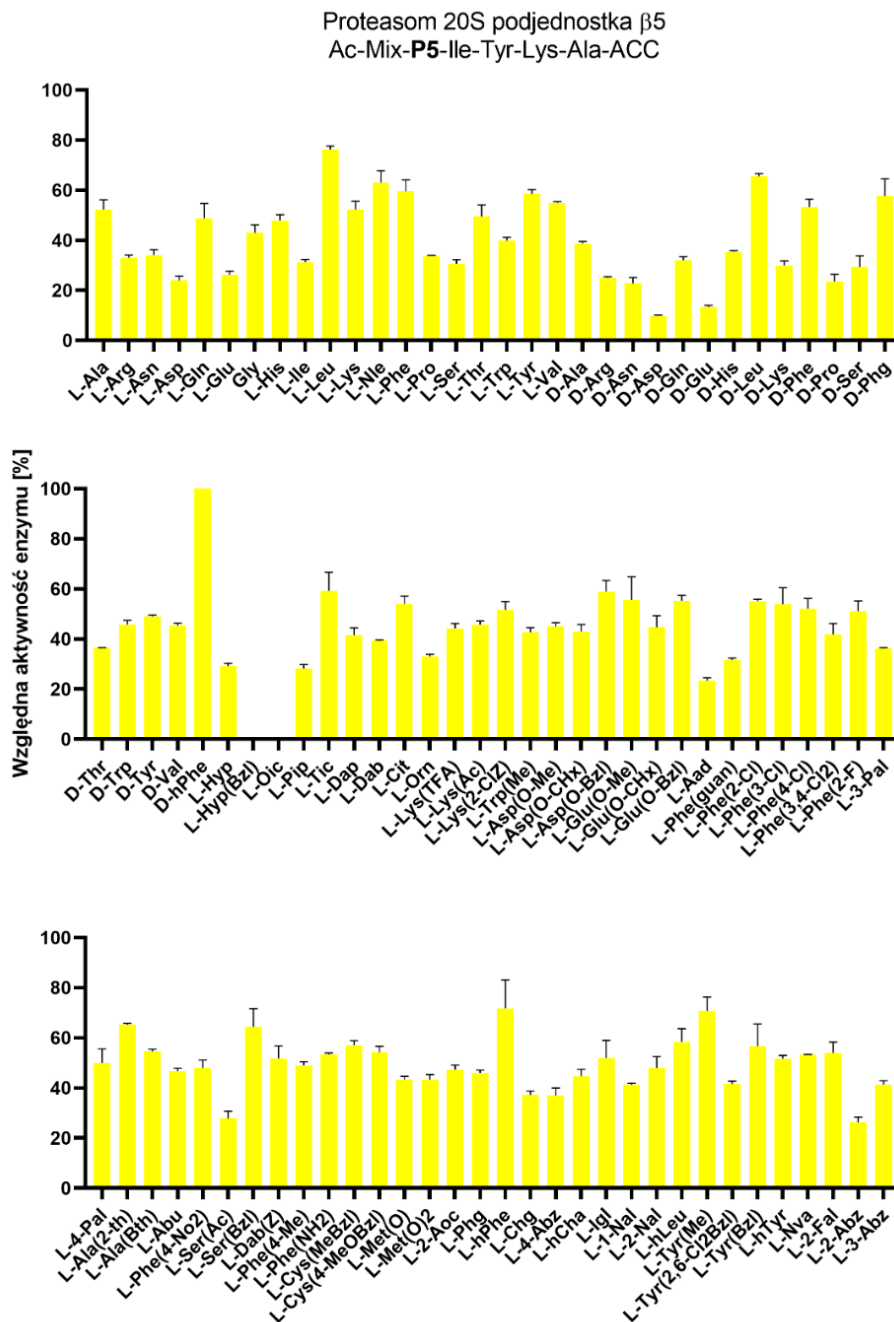
Podjednostka β 1 proteasomu 20S wykazuje bardzo szeroki profil preferencji substratowej w pozycji P5. Rozpoznaje ona zarówno L- jak i D-aminokwasy o różnym charakterze chemicznym. Wśród preferowanych reszt aminokwasowych znajdują się: zasadowe - D-Arg (100%), D-Lys (95,98%), L-Orn (95,11%) oraz aromatyczne i hydrofobowe: L-Lys(2-Cl-Z) (94,78%), L-Glu(O-Bzl) (94,49%), L-Tyr(2,6-Cl₂-Bzl) (86,13%). Podjednostka β 2 w tej pozycji rozpoznaje znacznie węższą grupę reszt aminokwasowych. Najlepiej rozpoznawanymi aminokwasami są: D-Lys (100%), D-Arg (84,64%) i L-Dab (78,06%). Podjednostka β 5, podobnie jak pozostałe podjednostki proteasomu 20S, również najlepiej rozpoznaje w pozycji P5 D-aminokwas – D-hPhe (100%), a następnie alifatyczne i aromatyczne hydrofobowe aminokwasy, takie jak: L-Leu (76,33%), L-hPhe (71,83%) i D-Leu (65,51%).



Rysunek 30. Profil specyficzności substratowej podjednostki β 1 proteasomu 20S w pozycji P5.



Rysunek 31. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2$ proteasomu 20S w pozycji P5.

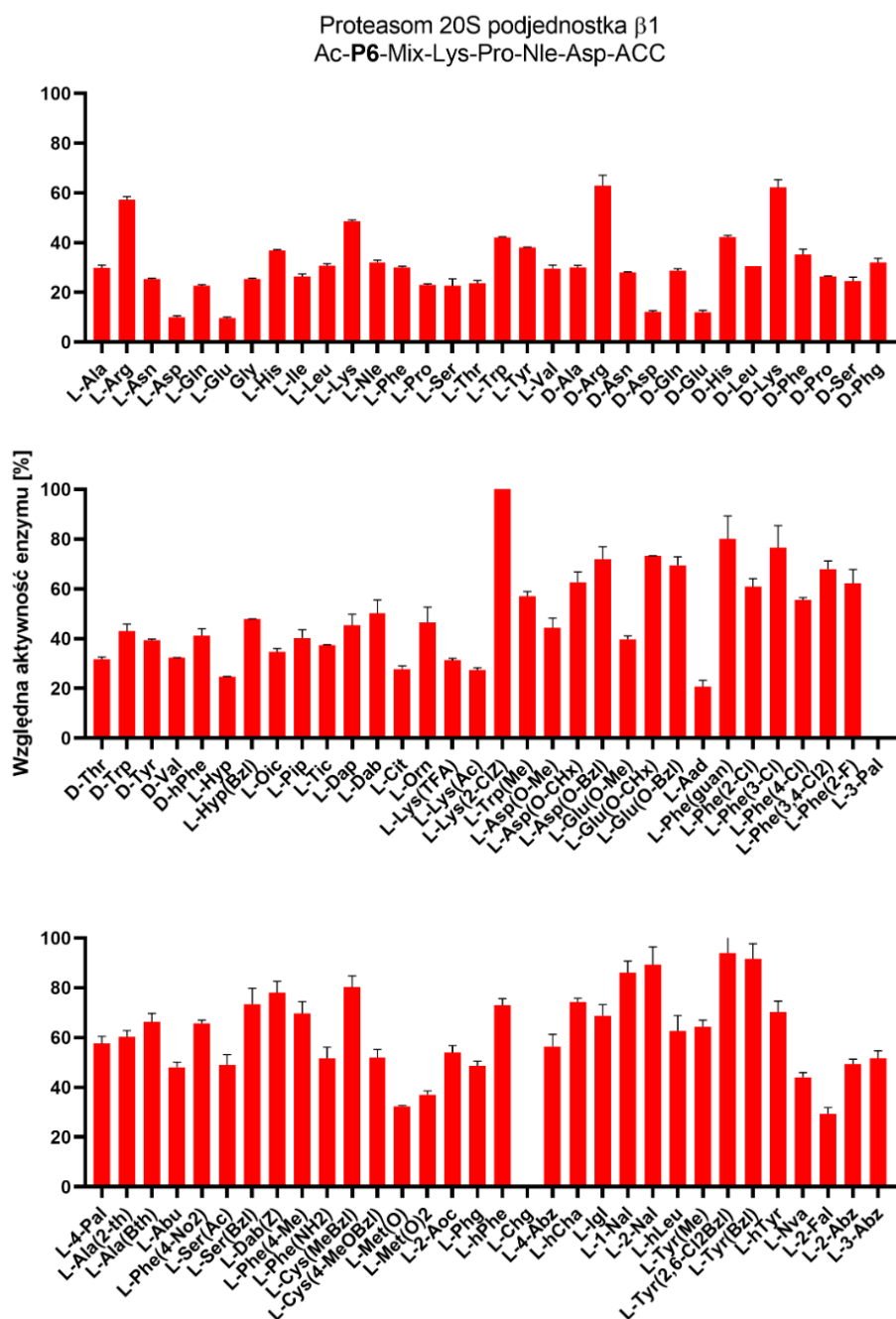


Rysunek 32. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5$ proteasomu 20S w pozycji P5.

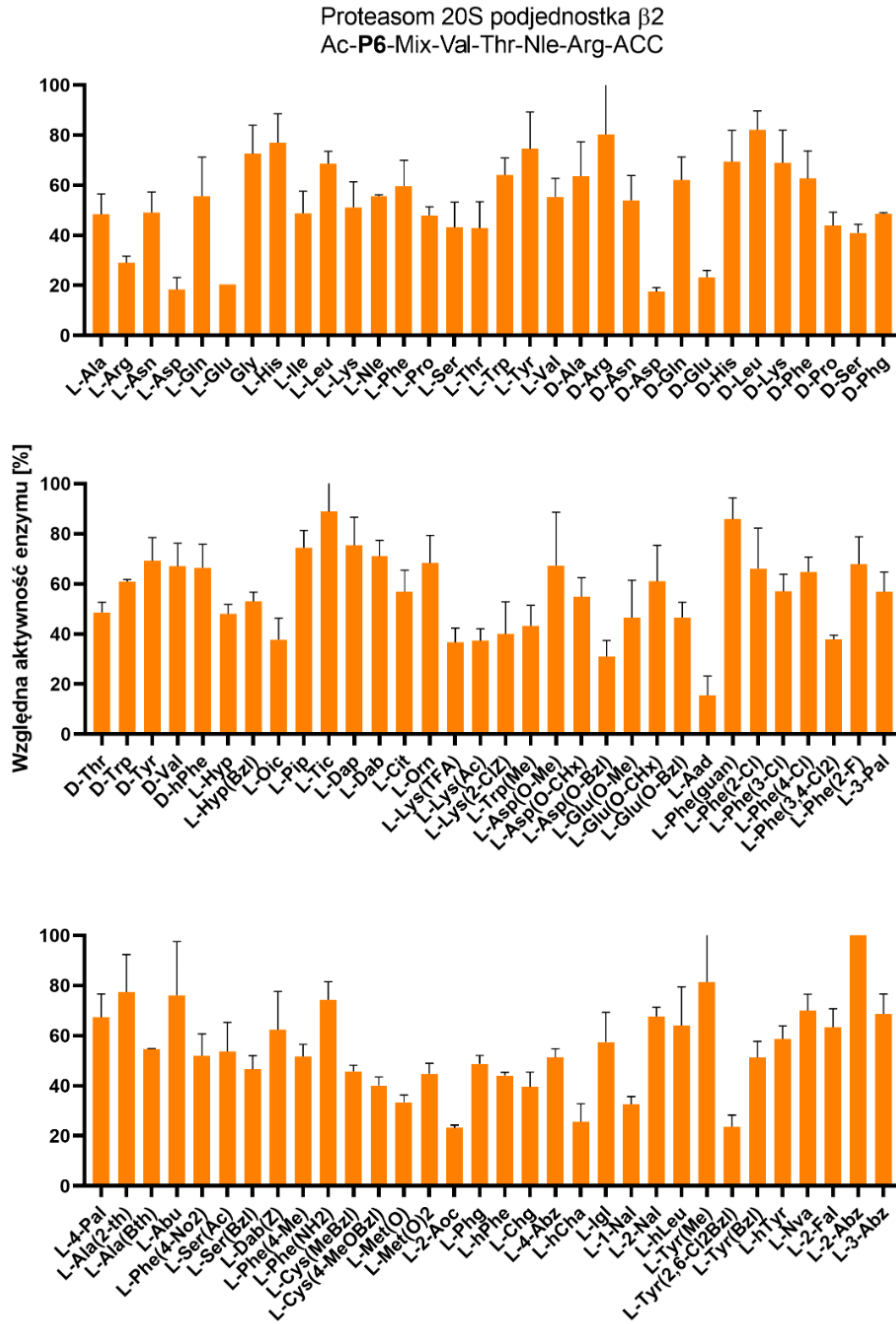
3.3.2. Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P6

Podjednostka $\beta 1$ proteasomu 20S w pozycji P6 preferuje głównie aromatyczne i hydrofobowe reszty aminokwasowe. Najlepiej rozpoznawanymi są: L-Lys(2-Cl-Z) (100%), L-Tyr(2,6-Cl₂-Bzl) (93,95%) i L-Tyr(Bzl) (91,45%). Podjednostka $\beta 2$ w tej pozycji wykazuje szeroką specyficzność substratową. Najlepiej rozpoznawanymi aminokwasami są aromatyczne

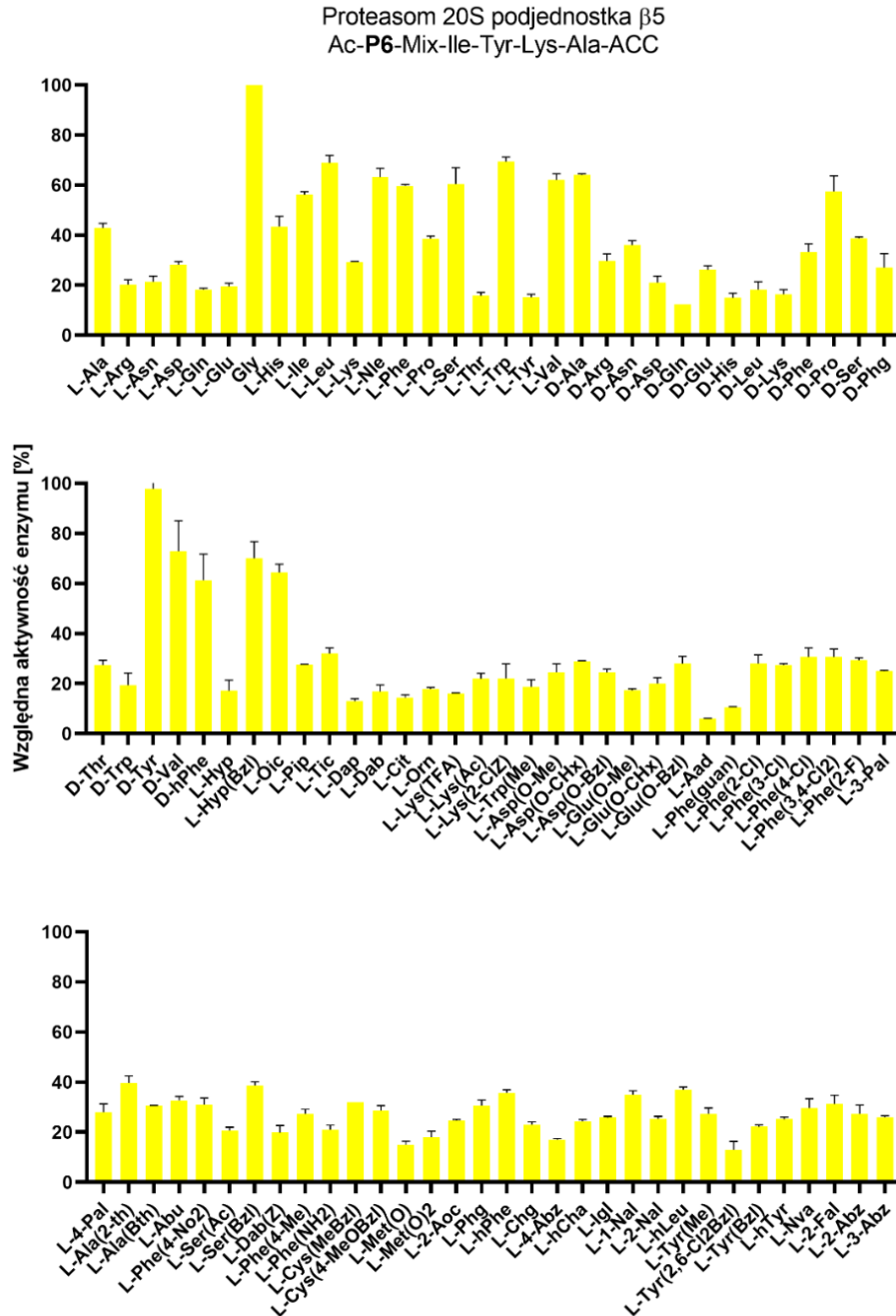
po pochodne, takie jak: L-2-Abz (100%), L-Tic (88,88%) i L-Phe(guan) (85,85%), lecz D-aminokwasy oraz reszty zasadowe są również przez nią dobrze rozpoznawane: D-Leu (81,16%), D-Arg (80,27%) i L-His (76,93%). Podjednostka $\beta 5$ wykazuje znacznie węższą specyficzność substratową, a najlepiej rozpoznawanymi przez nią aminokwasami są: Gly (100%) oraz D-Tyr (97,79%).



Rysunek 33. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1$ proteasomu w pozycji P6.



Rysunek 34. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2$ proteasomu 20S w pozycji P6.

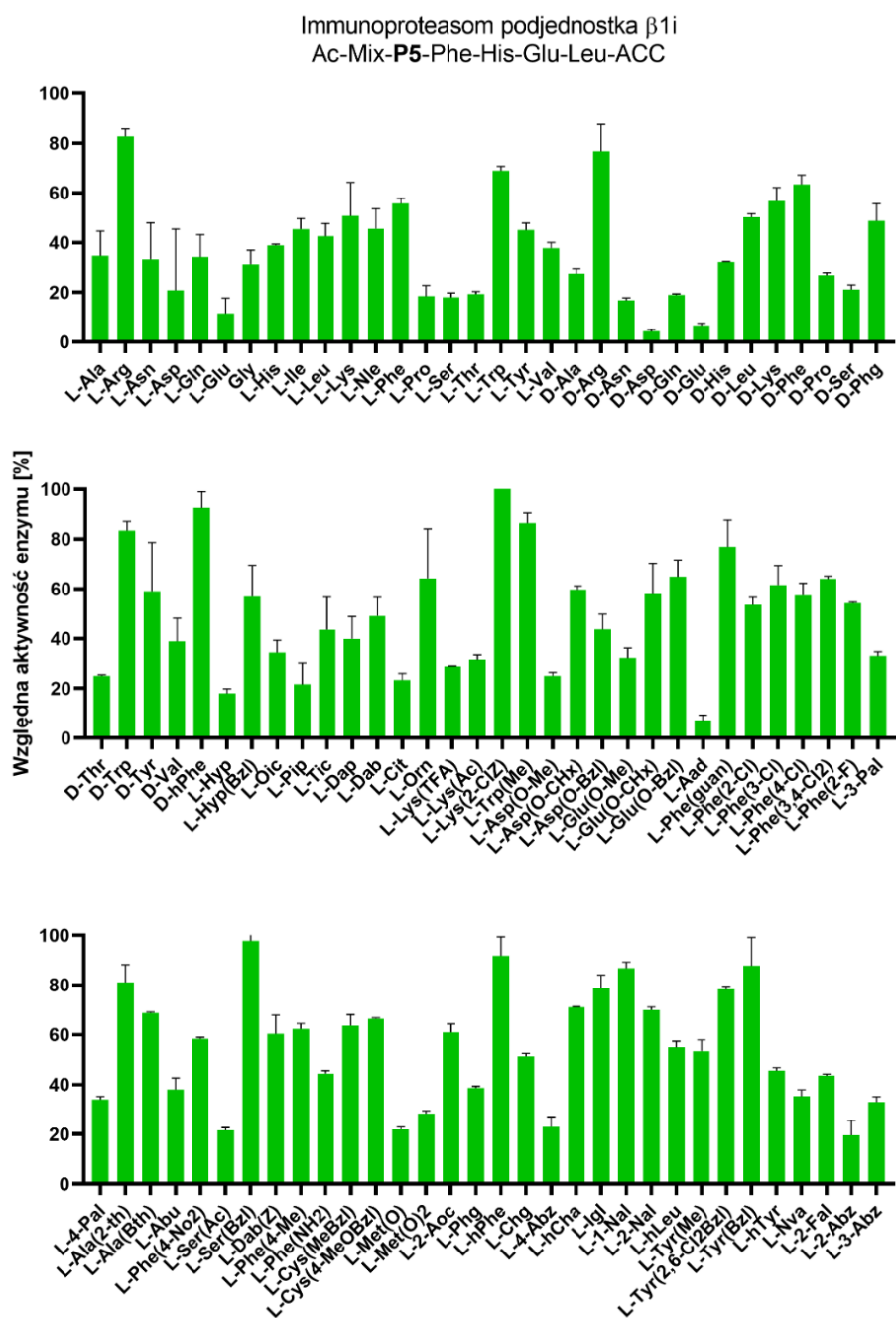


Rysunek 35. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5$ proteasomu 20S w pozycji P6.

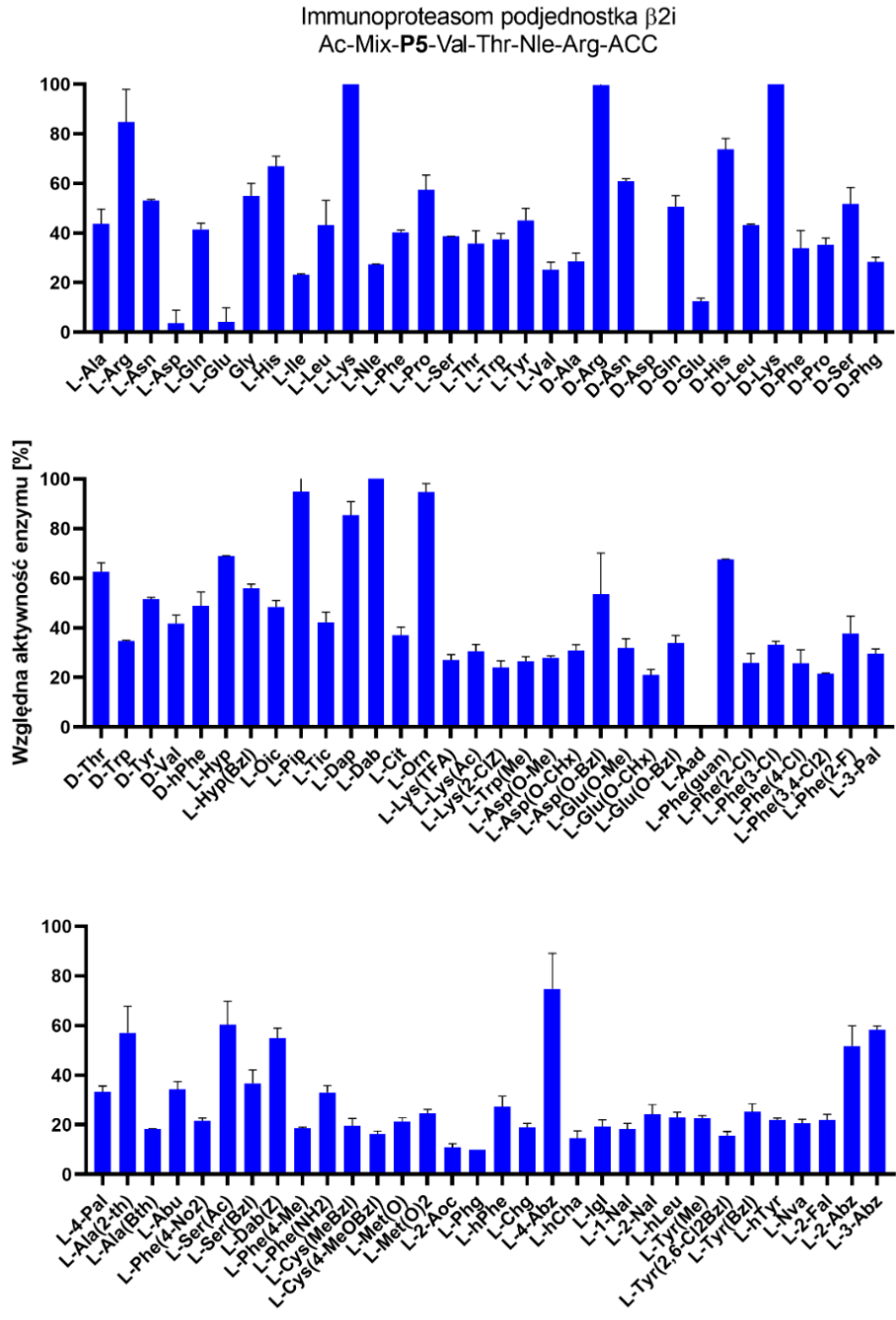
3.3.3. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P5

Podjednostka $\beta 1i$ immunoproteasomu preferuje w pozycji P5 głównie duże i aromatyczne pochodne aminokwasowe, takie jak: L-Lys(2-Cl-Z) (100%), L-Ser(Bzl) (97,81%), D-hPhe (92,55%) i L-hPhe (91,82%). Podjednostka $\beta 2i$ w tej pozycji preferuje przede wszystkim pochodne zasadowe: L-Dab (100%), L-Lys (100%), D-Lys (100%), D-Arg

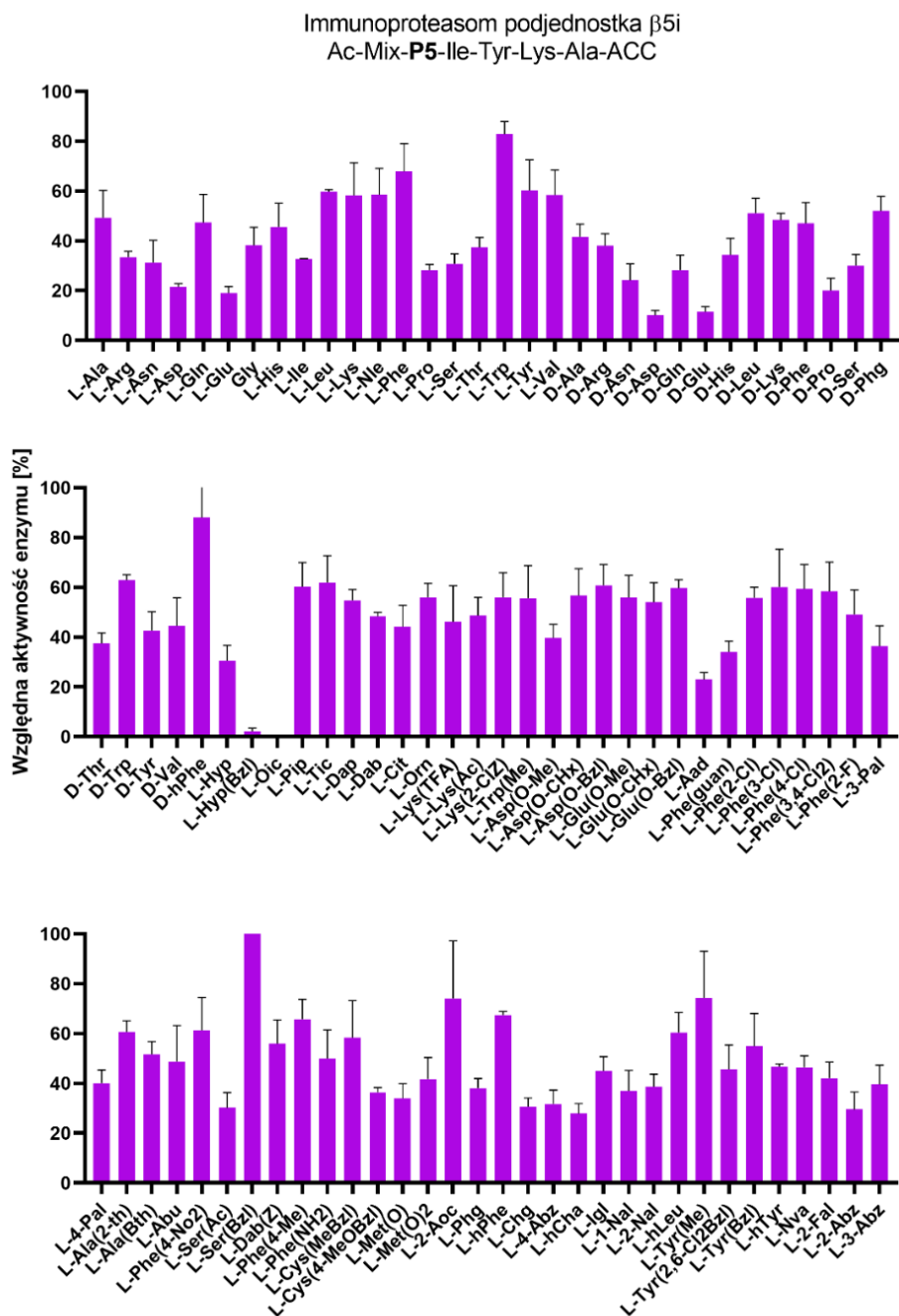
(99,73%) i L-Orn (94,67%). Podjednostka $\beta 5i$, podobnie jak $\beta 1i$, wykazuje najwyższą aktywność względem dużych i aromatycznych aminokwasów, takich jak: L-Ser(Bzl) (100%), D-hPhe (88,04%) i L-Trp (82,91%).



Rysunek 36. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu w pozycji P5.



Rysunek 37. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P5.

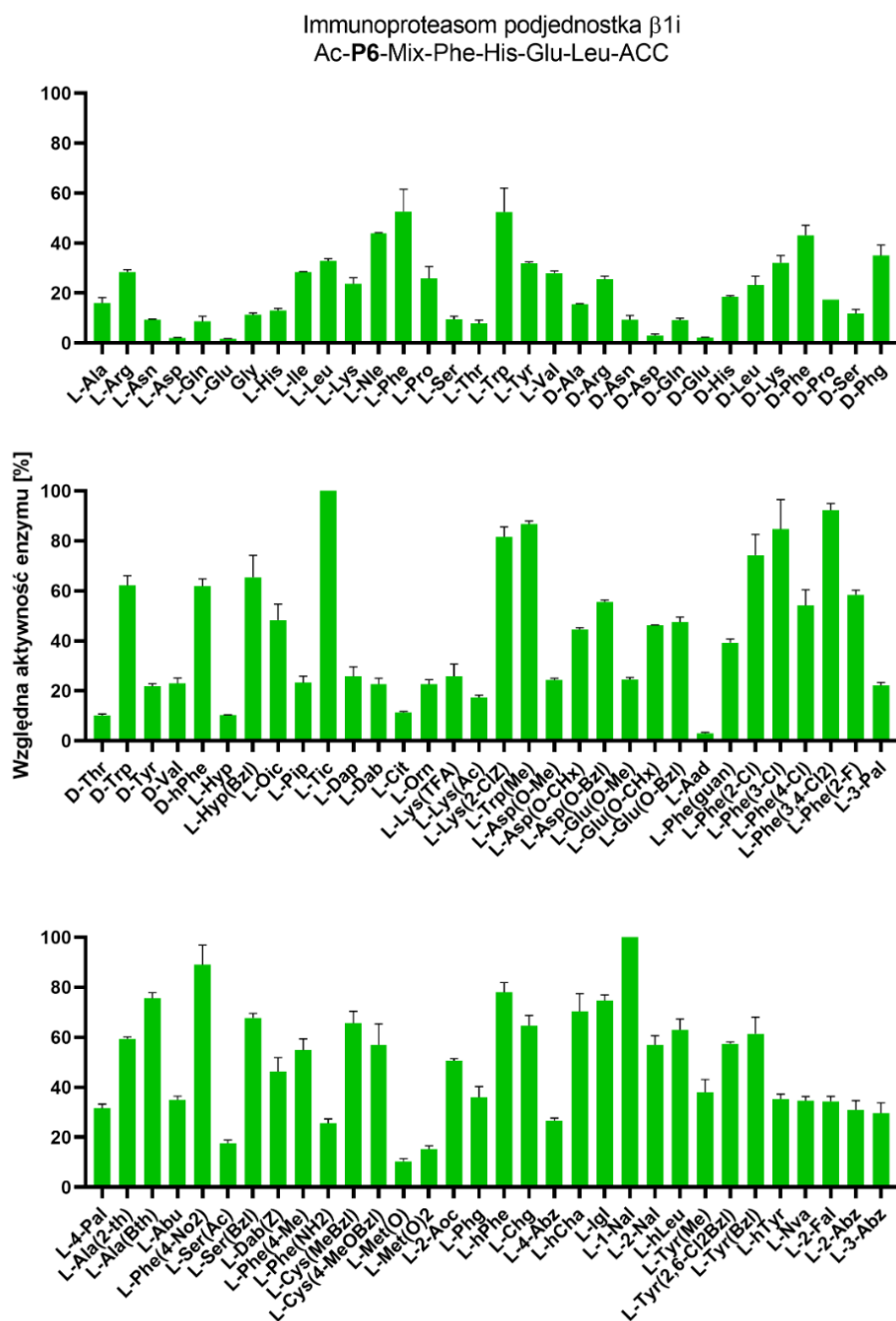


Rysunek 38. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P5.

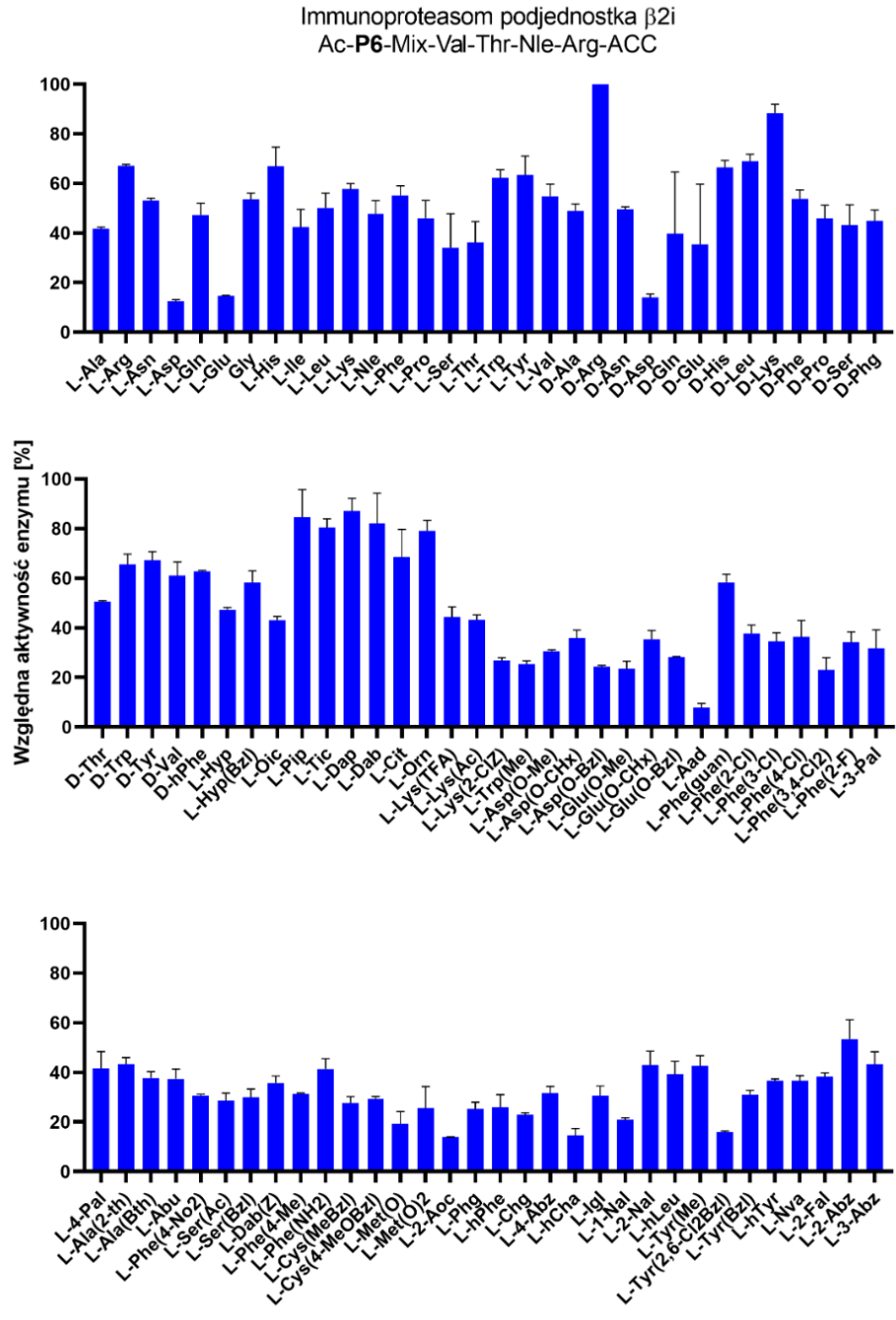
3.3.4. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P6

Podjednostka $\beta 1i$ immunoproteasomu w pozycji P6 preferuje przede wszystkim duże i hydrofobowe pochodne aromatyczne, takie jak: L-1-Nal (100%), L-Tic (100%), L-Phe(3,4-Cl₂) (92,26%), L-Phe(4-NO₂) (89,01%) i L-Trp(Me) (86,89%). Podjednostka $\beta 2i$ najlepiej rozpoznaje pochodne o charakterze zasadowym, takie jak: D-Arg (100%), D-Lys (88,38%), L-

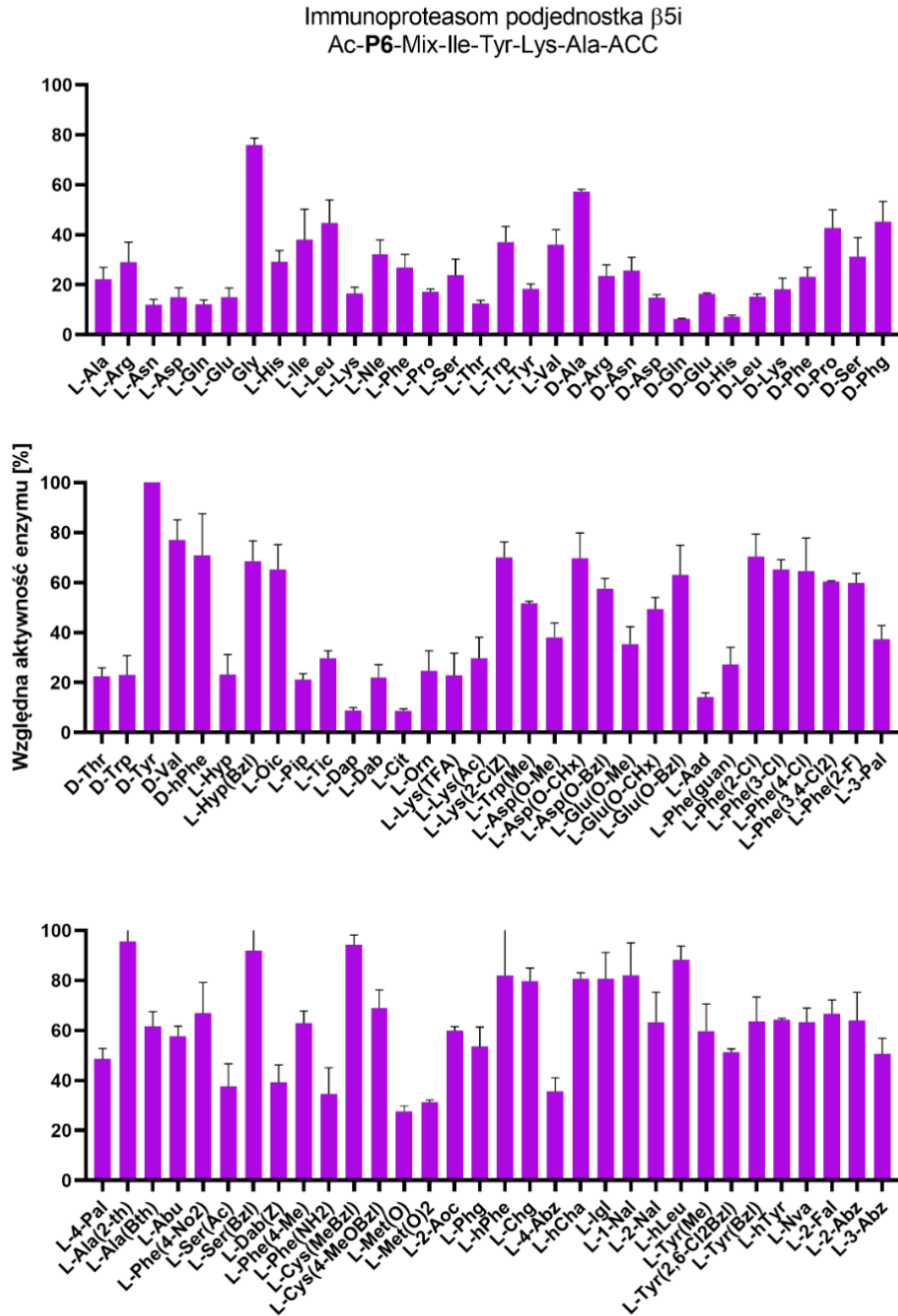
Dap (87,07%), L-Dab (82,12%) oraz pochodne proliny: L-Pip (84,64%) i L-Tic (80,48%). Podjednostka β 5i w pozycji P6 najlepiej rozpoznaje pochodne aromatyczne, takiej jak: D-Tyr (100%), L-Ala(2-th) (95,63%), L-Cys(MeBzl) (94,21%), L-Ser(Bzl) (91,95%).



Rysunek 39. Profil specyficzności substratowej podjednostki β 1i immunoproteasomu w pozycji P6.



Rysunek 40. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P6.



Rysunek 41. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P6.

3.4. Projektowanie i synteza bibliotek substratów typu IQF do badania specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P1' i P2'

Ze względu na swoją strukturę, biblioteki HyCoSuL nie są odpowiednie do badania specyficzności substratowej proteaz po stronie primowanej. W celu określenia profili specyficzności w pozycjach P1' i P2' wykorzystano biblioteki substratów peptydowych typu

IQF [95]. Podobnie jak w przypadku bibliotek dedykowanych badaniu specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S5 i S6, do badania kieszeni S1' i S2' zaprojektowano i zsyntetyzowano cztery biblioteki przeznaczone dla każdej aktywności proteasomalnej.

Każda z zaprojektowanych bibliotek typu IQF składała się z dwóch podbibliotek i posiadała jako parę donor-akceptor kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (ACC) oraz 2,4-dinitrofenylo-*L*-lizynę (Lys(Dnp)) i składała się z dwóch podbibliotek o ogólnej strukturze: ACC-Gly-P4-P3-P2-P1-X-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂ i ACC-Gly-P4-P3-P2-P1-P1'-X-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂ (Tabela 3). Naturalne sekwencje aminokwasowe P4-P2 dla bibliotek β1, β2/β2i oraz β5/β5i zostały wybrane na podstawie profili specyficzności proteasomu 20S otrzymanych przez dr inż. Wioletę Rut [49]. Sekwencja dla biblioteki β1i została opracowana zgodnie z otrzymanymi wcześniej wynikami preferencji substratowej immunoproteasomu w pozycjach P4-P2. Aminokwasy w pozycjach P1' oraz P2' zostały wybrane na podstawie informacji zawartych w internetowej bazie peptydaz MEROPS. Pozycje X zawierają 18 naturalnych i 78 nienaturalnych aminokwasów reprezentujących reszty o różnym rozmiarze i charakterze chemicznym.

Tabela 3. Struktury bibliotek substratów typu IQF wykorzystanych do określenia preferencji substratowych proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P1' i P2'.

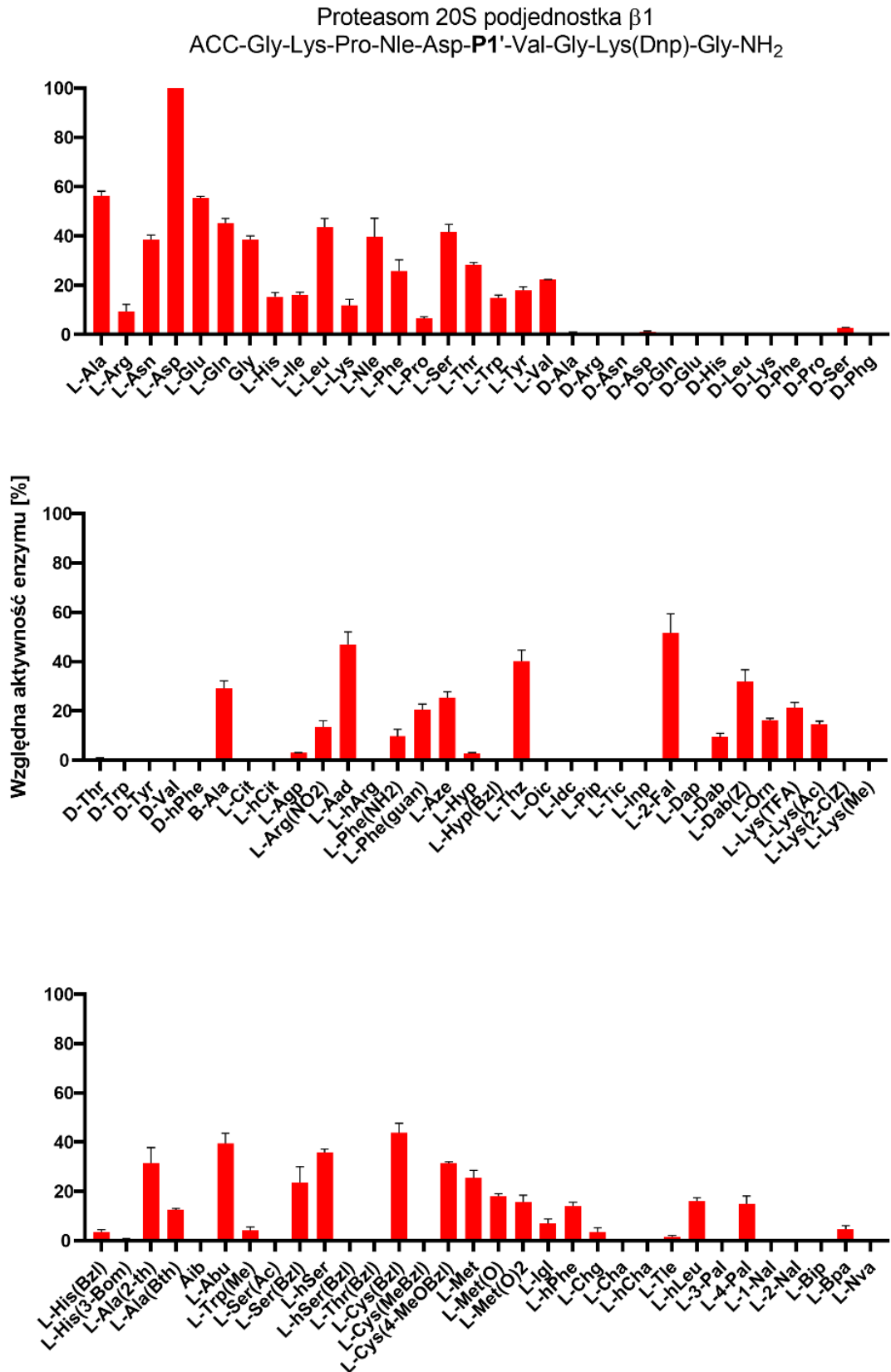
Podjednostka	Pozycja	Struktura podbiblioteki
β1	P1'	ACC-Gly-Lys-Pro-Nle-Asp-P1'-Val-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
	P2'	ACC-Gly-Lys-Pro-Nle-Asp-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
β1i	P1'	ACC-Gly-Phe-His-Glu-Leu-P1'-Ser-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
	P2'	ACC-Gly-Phe-His-Glu-Leu-Lys-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
β2/β2i	P1'	ACC-Gly-Val-Thr-Nle-Arg-P1'-Leu-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
	P2'	ACC-Gly-Val-Thr-Nle-Arg-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
B5/β5i	P1'	ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-P1'-Met-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
	P2'	ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂

Wszystkie substraty wchodzące w skład bibliotek zostały zsyntezowane na podłożu stałym – żywicy amidowej. Pierwszy aminokwas z wolną grupą karboksylową i N-końcem zabezpieczonym grupą ochronną Fmoc przyłączono do podłoża przy użyciu 2,4,6-trimetylopirydyny i HATU w DMF. Po zakończonej reakcji grupę Fmoc usunięto za pomocą 20% roztworu piperidyny w DMF. Każda kolejna reszta aminokwasowa i fluorofor Fmoc-ACC-OH zostały przyłączone identyczny sposób. Żywicę wysuszono, a gotowe substraty zostały uwolnione z podłoża za pomocą mieszaniny: TFA/TIPS/H₂O w stosunku 95:2,5:2,5, wytrącone w zimnym eterze dietylowym. Otrzymane substraty zostały oczyszczone za pomocą HPLC i scharakteryzowane z pomocą LC-MS (czystość >95%). Zliofilizowane substraty zostały rozpuszczone w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywane w temperaturze -80°C. Do określenia specyficzności substratowej enzymów w pozycjach P1' i P2' wykorzystano proteasom 20S w stężeniu 0,5 nM i immunoproteasom w stężeniu 1 nM oraz biblioteki substratów w stężeniu 1 μM. Pomiar przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, a uśrednione wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych, na których oś OX przedstawia aminokwasy, a oś OY względną aktywność enzymu wyrażoną w procentach, gdzie 100% to aktywność wobec najlepiej rozpoznawanego substratu (Rysunki 42-53).

3.5. Określenie specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w pozycjach P1' i P2'

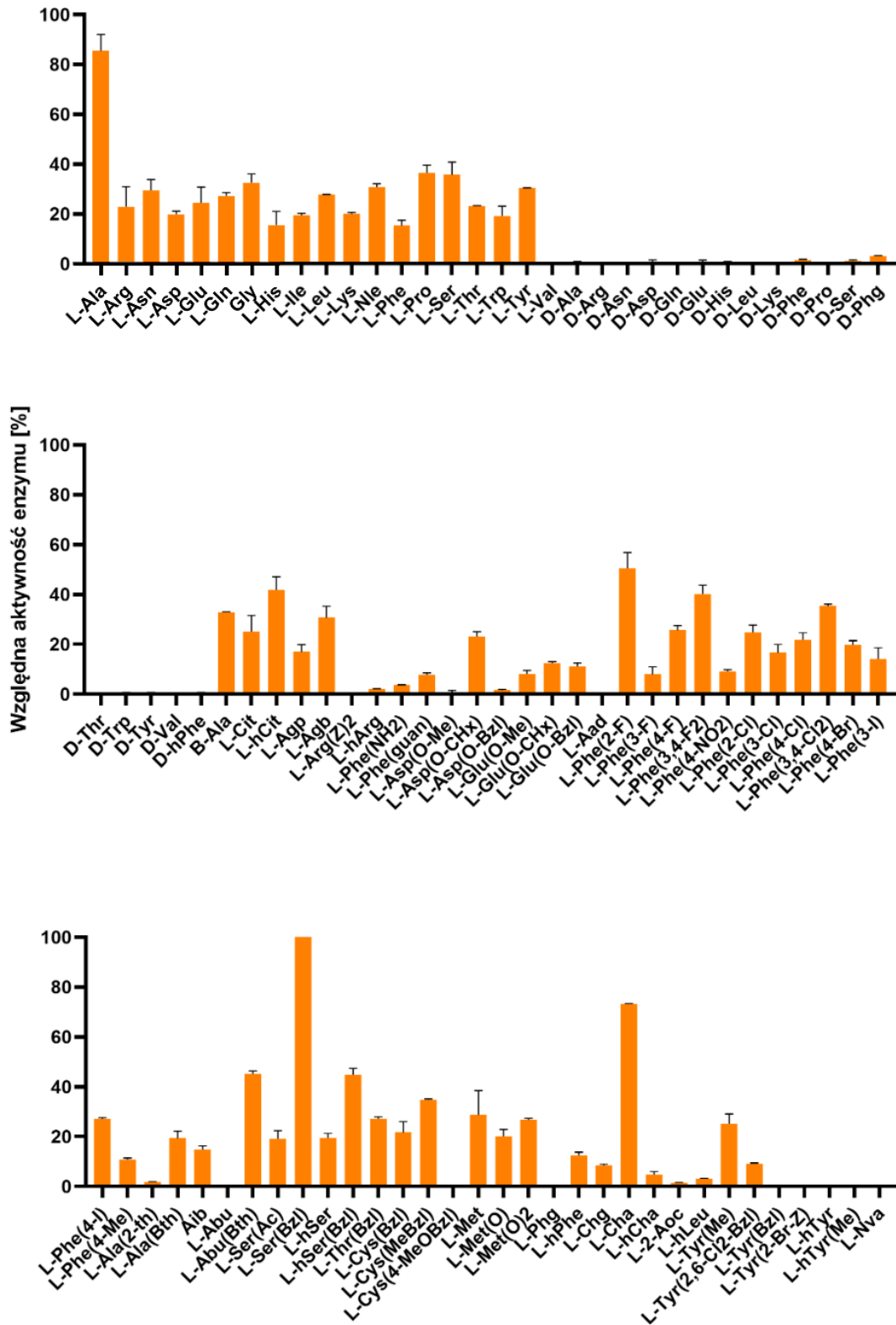
3.5.1. Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P1'

Podjednostka β1 proteasomu 20S w pozycji P1' wykazuje bardzo wąską specyficzność substratową. Najlepiej rozpoznawanym aminokwasem jest L-Asp (100%). Wobec pozostałych aminokwasów wykazuje ona znacznie niższą aktywność: L-Ala (56,21%), L-Glu (55,37%). Podjednostka β2 również wykazuje największą aktywność wobec dwóch aminokwasów: L-Ser(Bzl) (100%) oraz L-Ala (85,44%). Podjednostka β5 wykazuje szerszy profil specyficzności substratowej w pozycji P1' niż pozostałe dwie podjednostki. W dużej mierze dobrze rozpoznaje naturalne aminokwasy o zróżnicowanym charakterze chemicznym, takie jak: L-Asp (100%), L-Asn (96,16%) L-Glu (94,63%), L-Gln (94,39%) i L-Ala (91,24%).



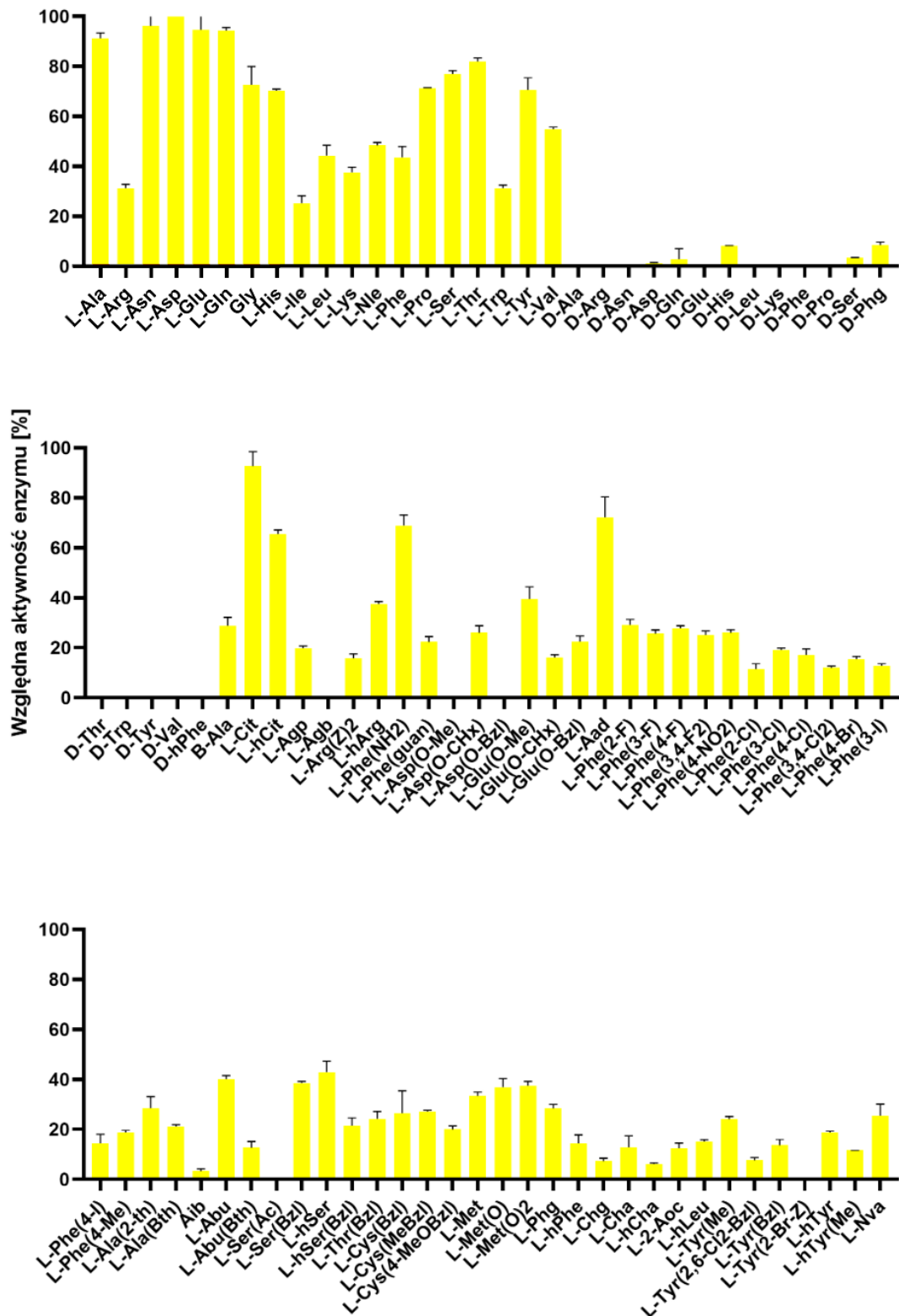
Rysunek 42. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1$ proteasomu 20S w pozycji P1'.

Proteasom 20S podjednostka $\beta 2$
 ACC-Gly-Val-Thr-Nle-Arg-P1'-Leu-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Rysunek 43. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2$ proteasomu 20S w pozycji P1'.

Proteasom 20S podjednostka $\beta 5$
 ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-**P1'**-Met-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂

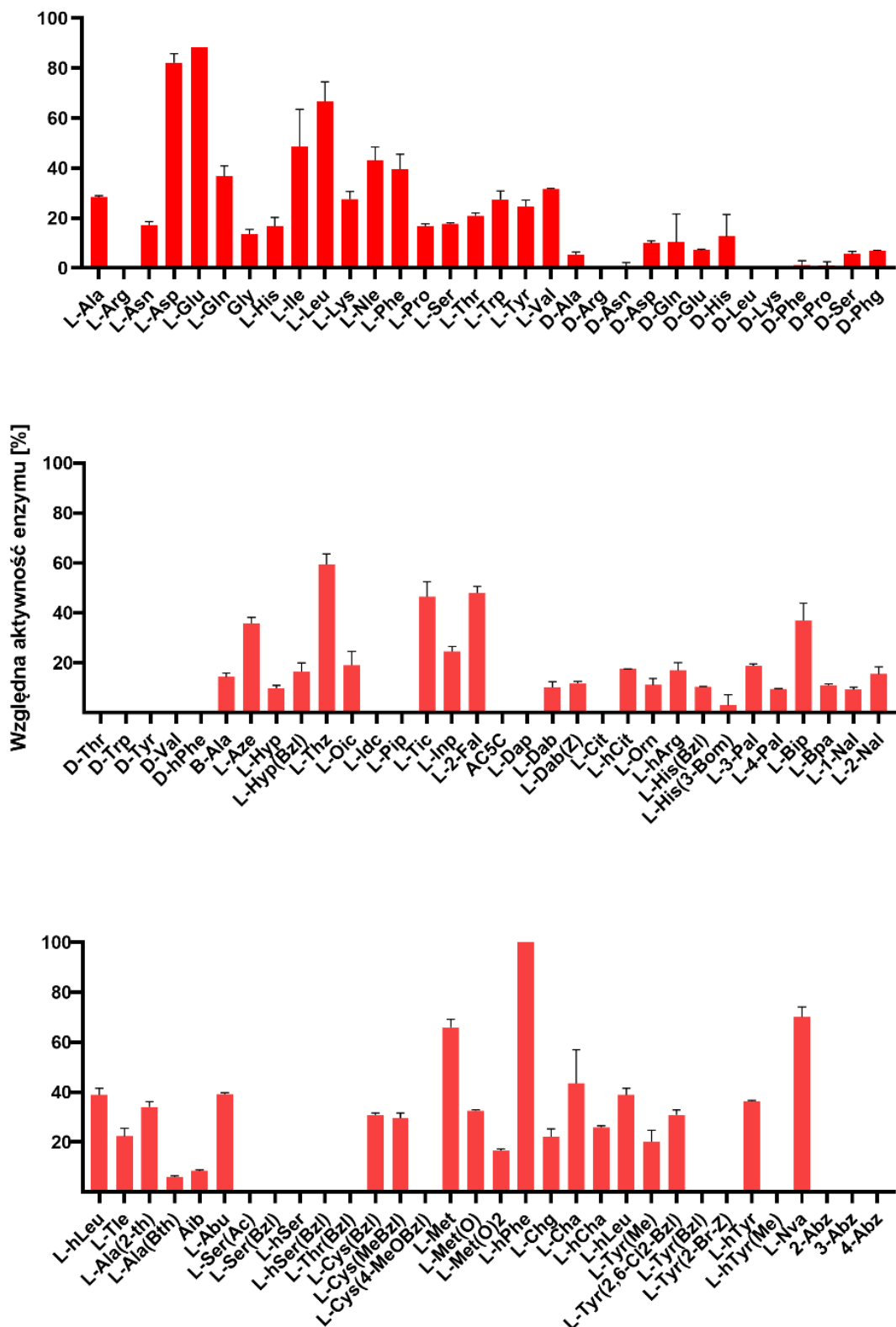


Rysunek 44. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5$ proteasomu 20S w pozycji P1'.

3.5.2. Specyficzność substratowa proteasomu 20S w pozycji P2'

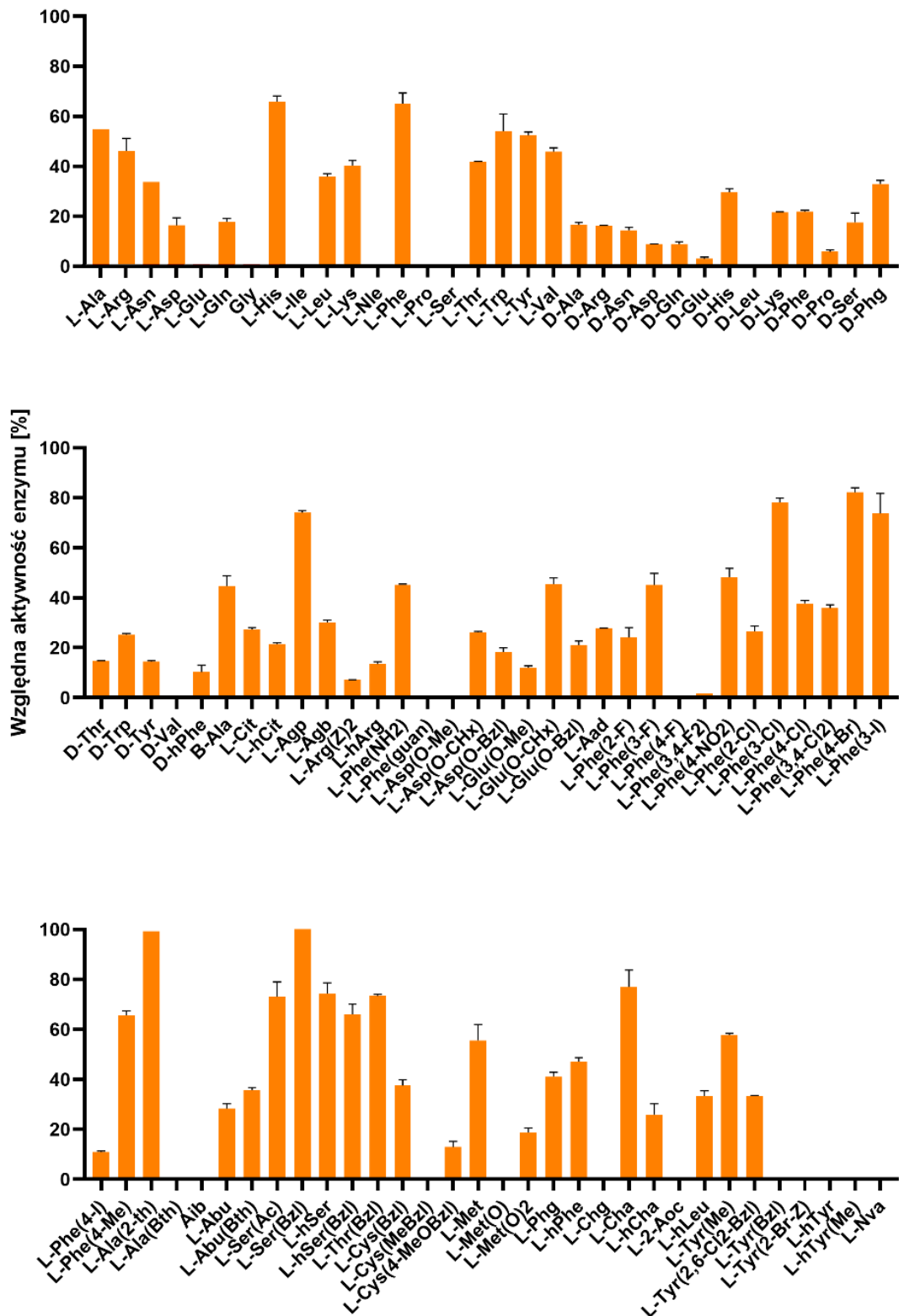
Podjednostka $\beta 1$ w pozycji P2' wykazuje wąską specyficzność substratową. Najlepiej rozpoznawanymi przez nią aminokwasami są: L-hPhe (100%), L-Glu (88,39%) i L-Asp (82,24%). Podjednostka $\beta 2$ najlepiej rozpoznaje hydrofobowe, aromatyczne reszty aminokwasowe takie jak: L-Ser(Bzl) (100%), L-Ala(2-th) (99,31%), L-Phe(4-Br) (78,28%) i L-Phe(3-Cl) (78,28%). Podjednostka $\beta 5$ wykazuje w pozycji P2' najszerszą specyficzność substratową. Wśród preferowanych aminokwasów znajdują się głównie reszty hydrofobowe – L-Thr(Bzl) (100%), L-Cys(Bzl) (96,96%) i L-hPhe (95,95%).

Proteasom 20S podjednostka $\beta 1$
ACC-Gly-Lys-Pro-Nle-Asp-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



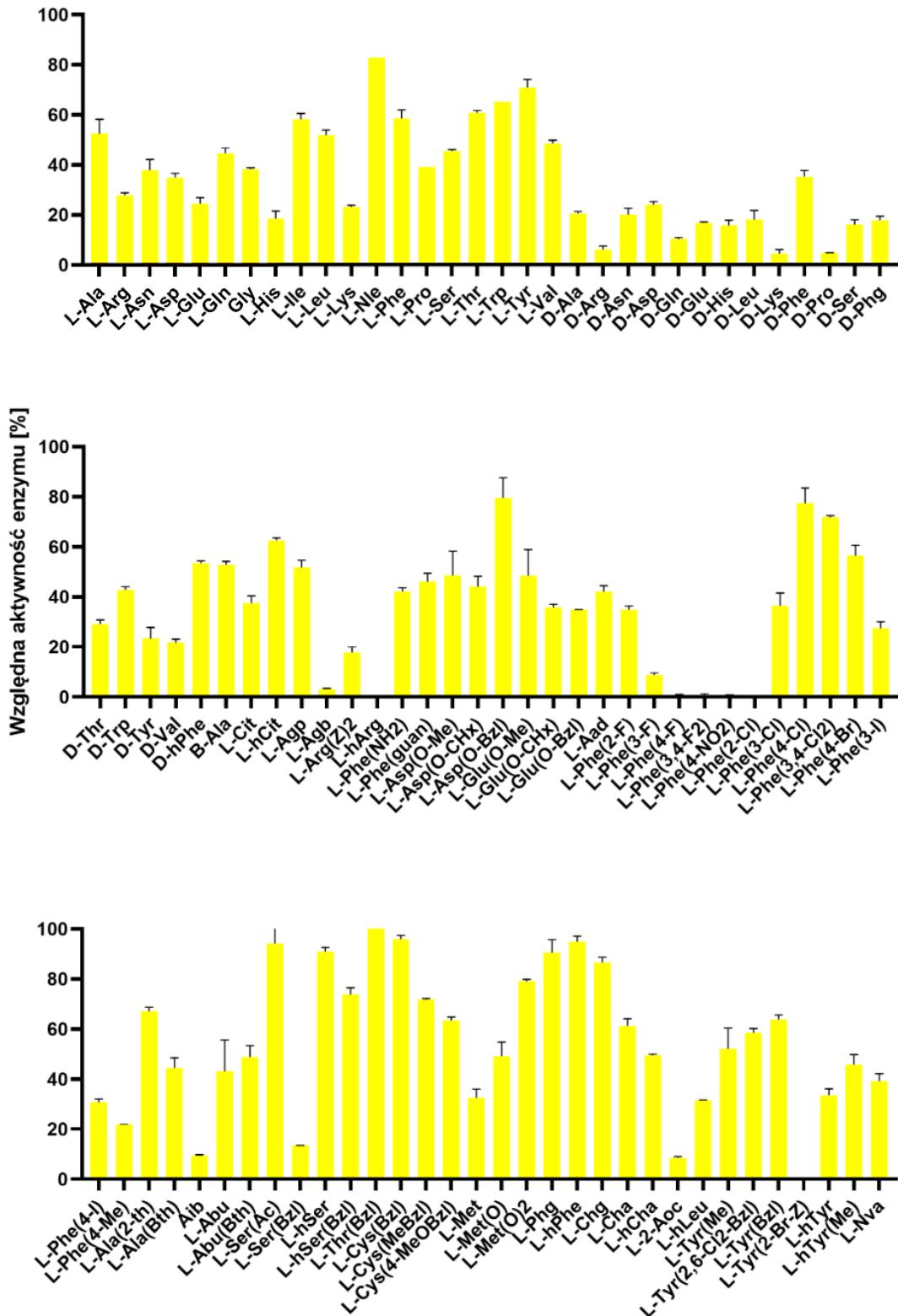
Rysunek 45. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1$ proteasomu 20S w pozycji P2'.

Proteasom 20S podjednostka $\beta 2$
ACC-Gly-Val-Thr-Nle-Arg-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Rysunek 46. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2$ proteasomu 20S w pozycji P2'.

Proteasom 20S podjednostka $\beta 5$
 ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂

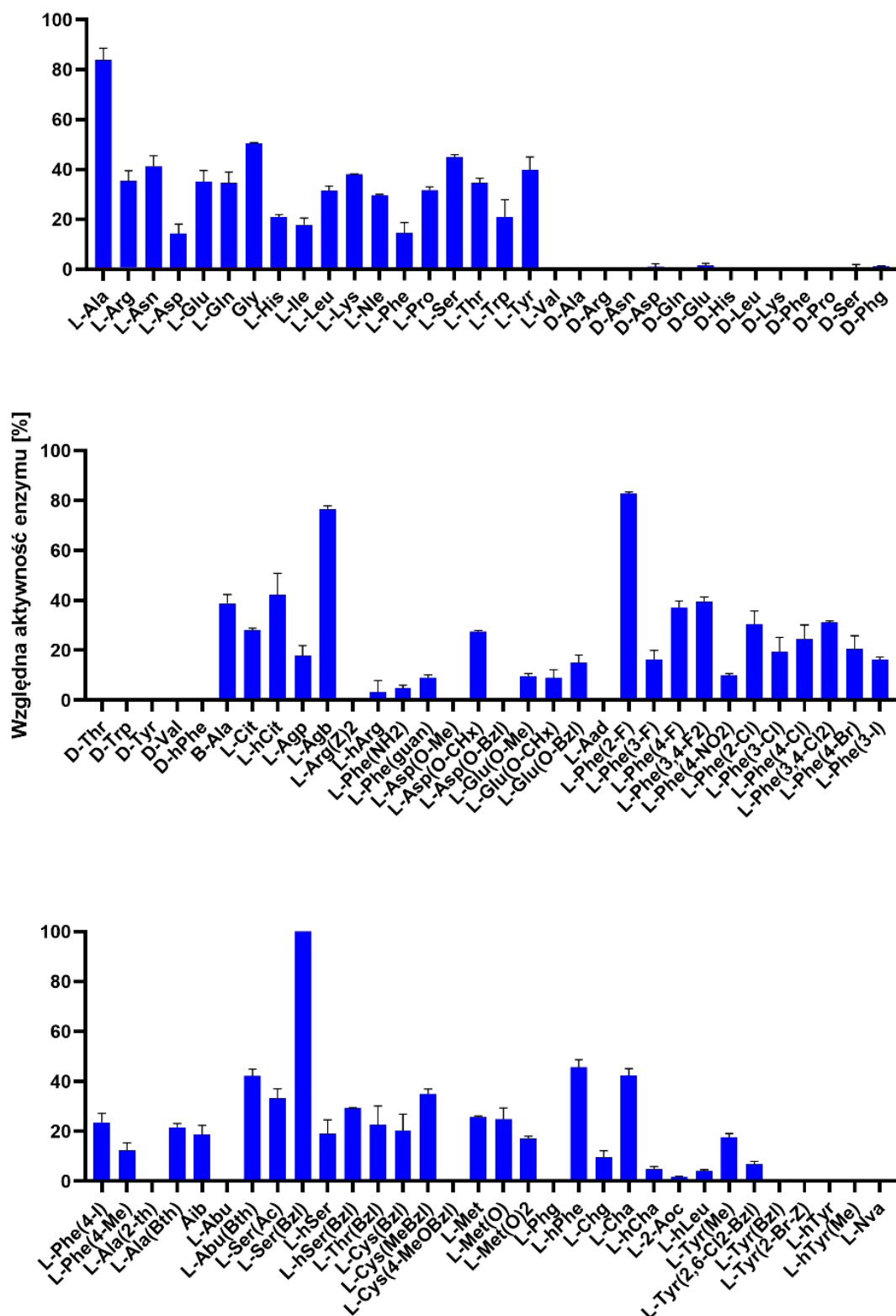


Rysunek 47. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5$ proteasomu 20S w pozycji P2'.

3.5.3. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P1'

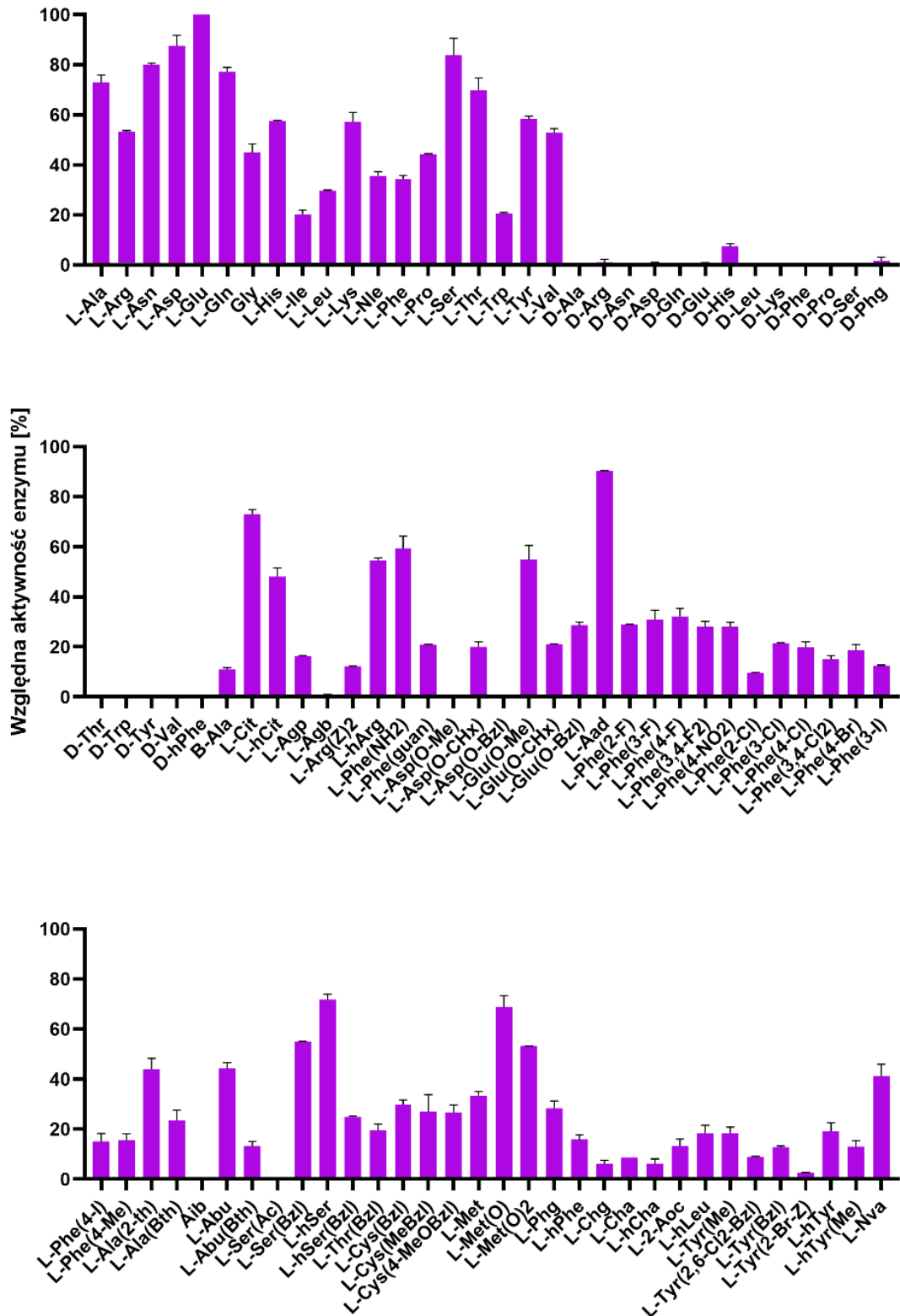
Podjednostka $\beta 1i$ immunoproteasomu w pozycji P1' nie wykazuje specyficzności substratowej. Najlepiej rozpoznawanym przez nią aminokwasem jest L-Asp (100%). Podjednostka $\beta 2i$ również wykazuje aktywność wobec niewielkiej grupy reszt aminokwasowych, z czego najlepiej rozpoznawanymi są: L-Ser(Bzl) (100%), L-Ala (83,93%), i L-Phe(2-F) (82,73%). Podjednostka $\beta 5i$ preferuje głównie naturalne reszty aminokwasowe, takie jak: L-Glu (100%), L-Asp (87,61%), L-Ser (83,81%) i L-Asn (80,13%) oraz nienaturalną pochodną L-Aad (90,15%).

Immunoproteasom podjednostka $\beta 2i$
ACC-Gly-Val-Thr-Nle-Arg-P1'-Leu-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Rysunek 49. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P1'.

Immunoproteasom podjednostka $\beta 5i$
ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-P1'-Met-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂

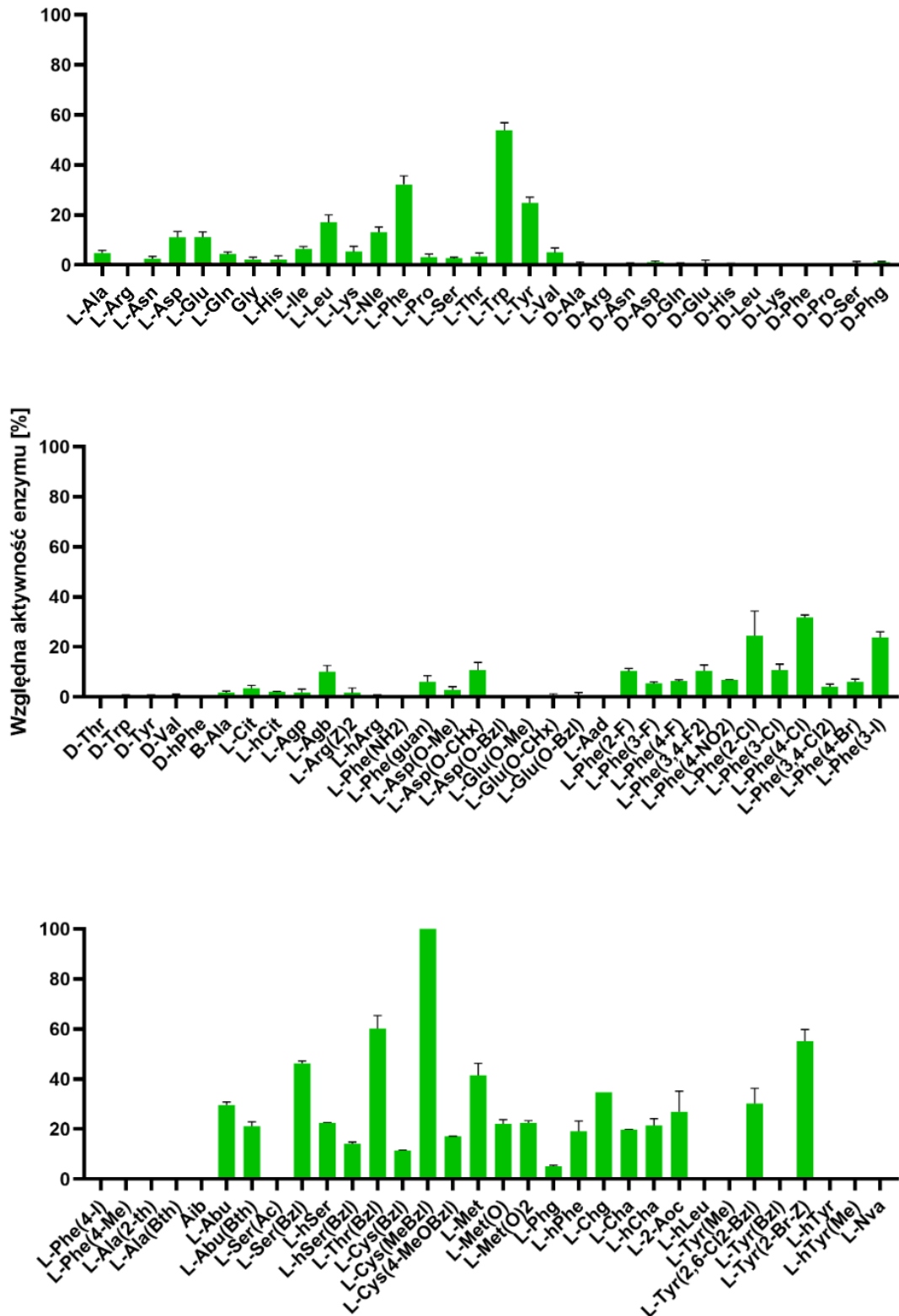


Rysunek 50. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P1'.

3.5.4. Specyficzność substratowa immunoproteasomu w pozycji P2'

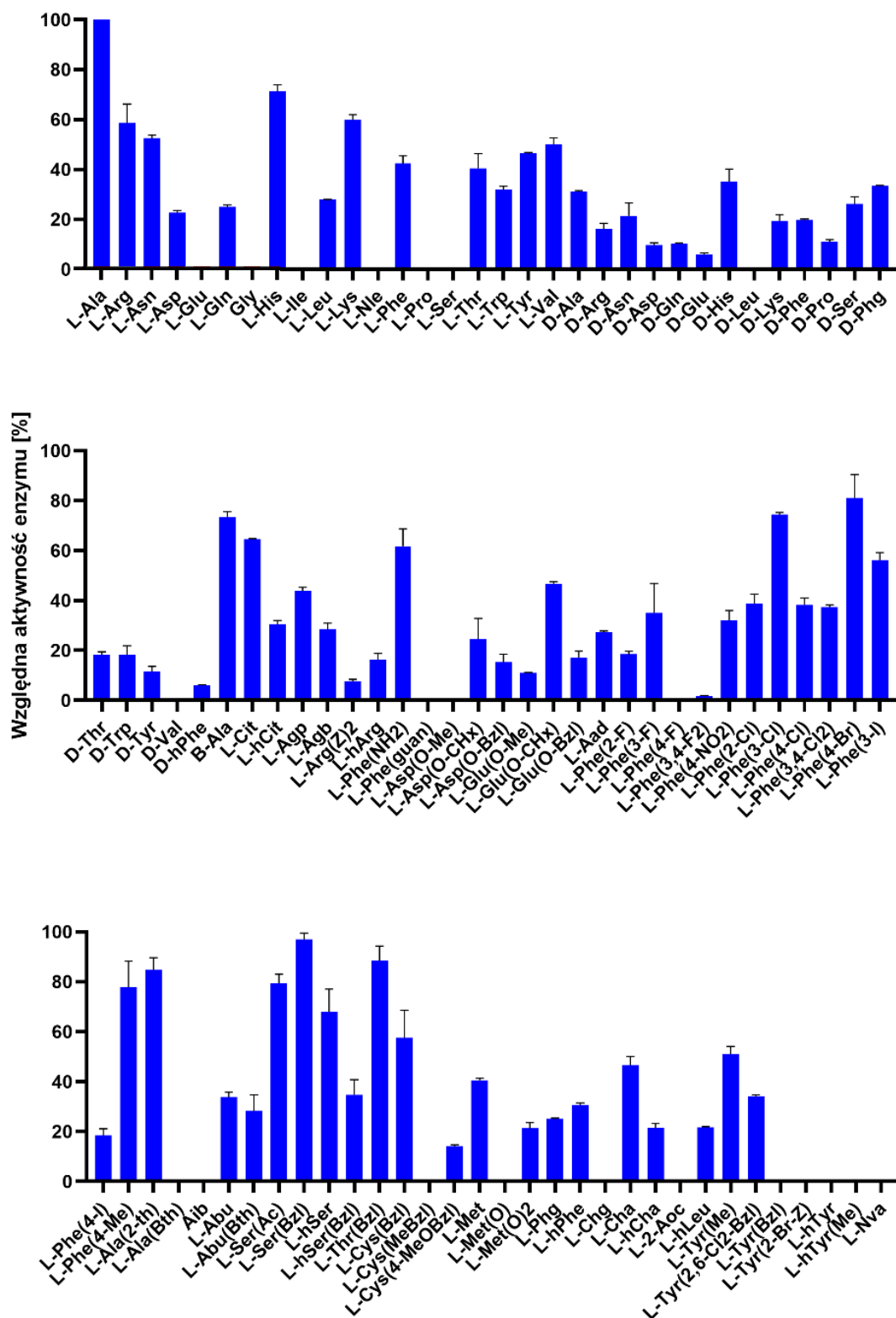
Podjednostka $\beta 1i$ w pozycji P2' nie wykazuje specyficzności substratowej. Najlepiej rozpoznawanym przez nią aminokwasem jest L-Cys(MeBzl) (100%). Podjednostka $\beta 2i$ wykazuje najwyższą aktywność wobec alifatycznej L-Ala (100%), a następnie wobec dużych i hydrofobowych pochodnych takich jak: L-Se(Bzl) (96,94%), L-Thr(Bzl) (88,65%), L-Ala(2-th) (84,79%) i L-Phe(4-Br) (81,15%). Podjednostka $\beta 5i$ najlepiej rozpoznaje aminokwas L-Nle (100%), a następnie L-Ser(Ac) (91,69%) oraz L-Ala(2-th) (90,46%).

Immunoproteasom podjednostka $\beta 1i$
 ACC-Gly-Phe-His-Glu-Leu-Lys-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



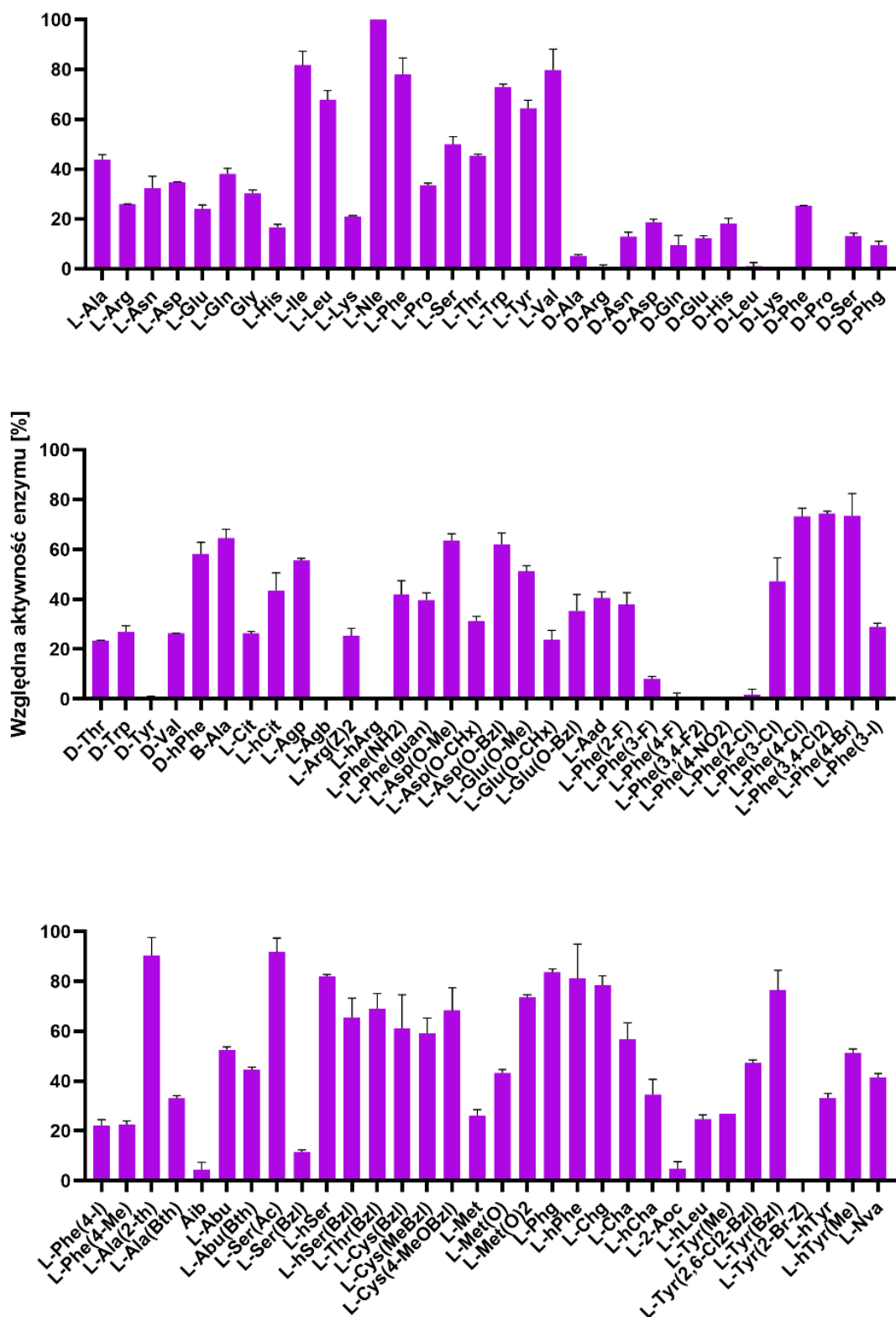
Rysunek 51. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu w pozycji P2'.

Immunoproteasom podjednostka $\beta 2i$
ACC-Gly-Val-Thr-Nle-Arg-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Rysunek 52. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 2i$ immunoproteasomu w pozycji P2'.

Immunoproteasom podjednostka $\beta 5i$
ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Rysunek 53. Profil specyficzności substratowej podjednostki $\beta 5i$ immunoproteasomu w pozycji P2'.

3.6. Określenie wpływu długości łańcucha peptydowego substratu na aktywność proteasomu 20S i immunoproteasomu

Selektywność małowczątkowych związków peptydowych względem proteaz jest determinowana przez aminokwasy zawarte w sekwencji peptydowej oraz jej długość. W celu określenia wpływu długości łańcucha peptydowego na aktywność poszczególnych podjednostek katalitycznych ludzkich proteasomów dla każdej z nich zaprojektowano zestaw siedmiu substratów, których sekwencje były stopniowo wydłużane o jeden aminokwas. W skład każdego zestawu wchodziło pięć fluorogenicznych substratów, których długość łańcucha zmieniała się od pozycji P2 do P6, oraz dwa substraty typu IQF, które zawierały sekwencję P6-P1' oraz P6-P2'. Ze względu na wysokie podobieństwo podjednostek $\beta 2$ oraz $\beta 2i$ do badania ich aktywności wykorzystano ten sam zestaw substratów (Tabele 4-8).

Wszystkie sekwencje peptydowe zostały zaprojektowane na podstawie wcześniej otrzymanych profili specyficzności. Na etapie projektowania związków wzięto pod uwagę nie tylko aktywność poszczególnych podjednostek wobec wybranych pochodnych aminokwasowych, ale również ich rozmiar i charakter chemiczny. Miało to na celu zapewnienie odpowiedniej hydrofilowości substratów i zapobiegnięcie ich wytrąceniu w środowisku wodnym podczas pomiarów kinetycznych oraz umożliwienie przeprowadzenia syntezy z dostatecznie wysoką wydajnością. Wszystkie związki zostały zsyntezowane na podłożu stałym zgodnie z wcześniej opisanymi protokołami. Otrzymane substraty zostały oczyszczone za pomocą HPLC i scharakteryzowane z pomocą LC-MS (czystość >95%). Zliofilizowane substraty zostały rozpuszczone w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu pomiaru. Do określenia wpływu długości łańcuchowego peptydowego na aktywność enzymów wykorzystano proteasom 20S w stężeniu 1,5 nM i immunoproteasom w stężeniu 3 nM oraz zestawy substratów w stężeniu 5 μM . Pomiar przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, a uśrednione wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych, na których oś OX przedstawia substraty, a oś OY względną aktywność enzymu wyrażoną we względnych jednostkach fluorescencji na sekundę (Rysunki 54-56).

Tabela 4. Substraty peptydowe o różnej długości łańcucha dedykowane podjednostce $\beta 1$ ludzkiego proteasomu 20S.

Podjednostka $\beta 1$

Substrat	Pozycje	Sekwencja
Dipeptyd	P2-P1	Ac-Phe(2-F)-Asp-ACC
Tripeptyd	P3-P1	Ac-Pro-Phe(2-F)-Asp-ACC
Tetrapeptyd	P4-P1	Ac-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-ACC
Pentapeptyd	P5-P1	Ac-D-Arg-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-ACC
Heksapeptyd	P6-P1	Ac-Lys-(2-Cl-Z)-D-Arg-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-ACC
IQF P1'	P6-P1'	ACC-Gly-Lys-(2-Cl-Z)-D-Arg-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-Asp-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
IQF P2'	P6-P2'	ACC-Gly-Lys-(2-Cl-Z)-D-Arg-hArg-Pro-Phe(2-F)-Asp-Asp-Cys(MeBzl)-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂

Tabela 5. Substraty peptydowe o różnej długości łańcucha dedykowane podjednostkom $\beta 2$ i $\beta 2i$ ludzkiego proteasomu 20S i immunoproteasomu.

Podjednostka $\beta 2$ i $\beta 2i$

Substrat	Pozycje	Sekwencja
Dipeptyd	P2-P1	Ac-hTyr-Arg-ACC
Tripeptyd	P3-P1	Ac-Ile-hTyr-Arg-ACC
Tetrapeptyd	P4-P1	Ac-Idc-Ile-hTyr-Arg-ACC
Pentapeptyd	P5-P1	Ac-D-Lys-Idc-Ile-hTyr-Arg-ACC
Heksapeptyd	P6-P1	Ac-D-Arg-D-Lys-Idc-Ile-hTyr-Arg-ACC

IQF P1'	P6-P1'	ACC-Gly-D-Arg-D-Lys-Idc-Ile-hTyr-Arg-Ser(Bzl)-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
IQF P2'	P6-P2'	ACC-Gly-D-Arg-D-Lys-Idc-Ile-hTyr-Arg-Ser(Bzl)-His-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂

Tabela 6. Substraty peptydowe o różnej długości łańcucha dedykowane podjednostce $\beta 5$ ludzkiego proteasomu 20S.

Podjednostka $\beta 5$

Substrat	Pozycje	Sekwencja
Dipeptyd	P2-P1	Ac-Aze-Phe-ACC
Tripeptyd	P3-P1	Ac-Cha-Aze-Phe-ACC
Tetrapeptyd	P4-P1	Ac-Dap-Cha-Aze-Phe-ACC
Pentapeptyd	P5-P1	Ac-D-Phe-Dap-Cha-Aze-Phe-ACC
Heksapeptyd	P6-P1	Ac-Gly-D-Phe-Dap-Cha-Aze-Phe-ACC
IQF P1'	P6-P1'	ACC-Gly-Gly-D-Phe-Dap-Cha-Aze-Phe-Cit-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
IQF P2'	P6-P2'	ACC-Gly-Gly-D-Phe-Dap-Cha-Aze-Phe-Cit-Cys(Bzl)-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂

Tabela 7. Substraty peptydowe o różnej długości łańcucha dedykowane podjednostce $\beta 1i$ ludzkiego immunoproteasomu.

Podjednostka $\beta 1i$

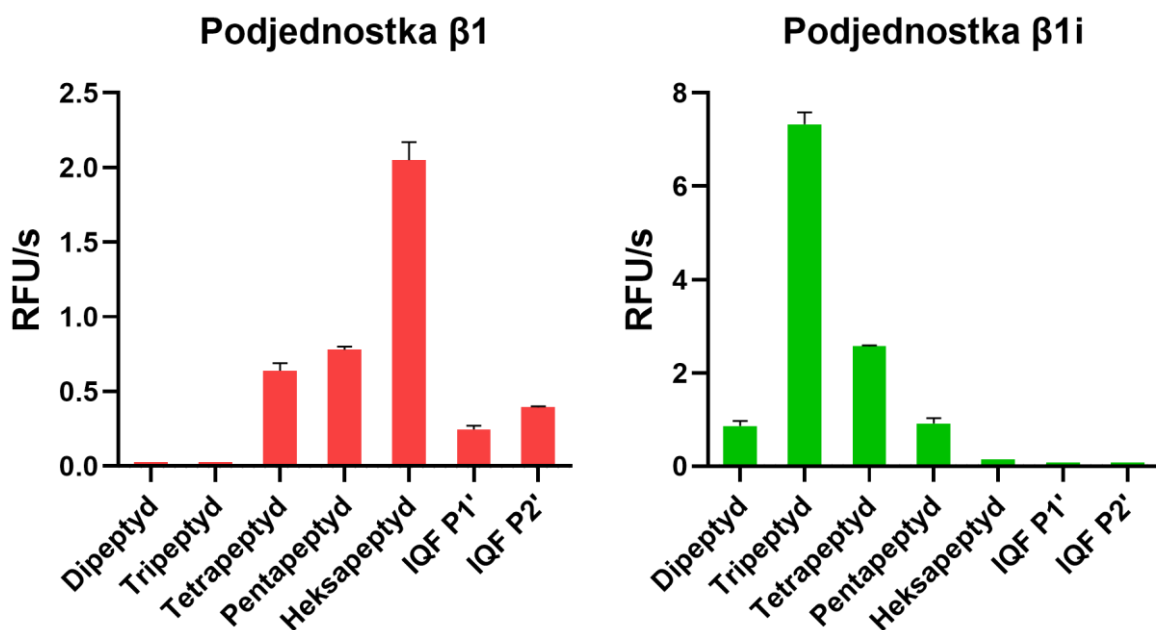
Substrat	Pozycje	Sekwencja
----------	---------	-----------

Dipeptyd	P2-P1	Ac-Ile-Leu-ACC
Tripeptyd	P3-P1	Ac-Glu(O-Bzl)-Ile-Leu-ACC
Tetrapeptyd	P4-P1	Ac-D-Tyr-Glu(O-Bzl)-Ile-Leu-ACC
Pentapeptyd	P5-P1	Ac-Trp(Me)-D-Tyr-Glu(O-Bzl)-Ile-Leu-ACC
Heksapeptyd	P6-P1	Ac-Chg-Trp(Me)-D-Tyr-Glu(O-Bzl)-Ile-Leu-ACC
IQF P1'	P6-P1'	ACC-Gly-Chg-Trp(Me)-D-Tyr-Glu(O-Bzl)-Ile-Leu-Asp-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
IQF P2'	P6-P2'	ACC-Gly-Chg-Trp(Me)-D-Tyr-Glu(O-Bzl)-Ile-Leu-Asp-Glu-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂

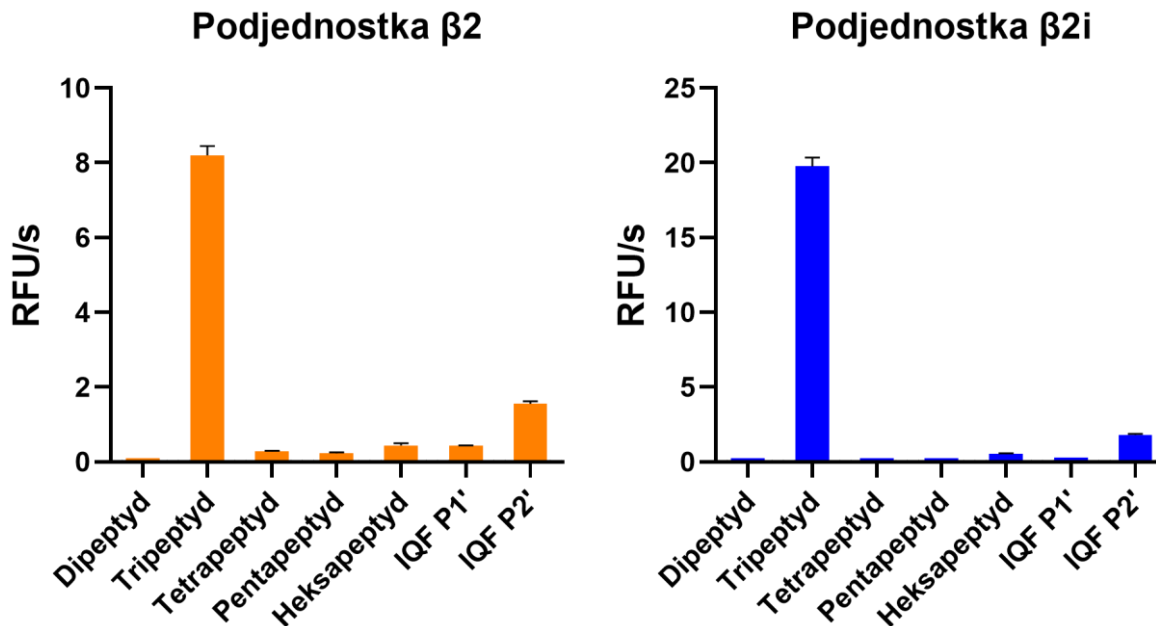
Tabela 8. Substraty peptydowe o różnej długości łańcucha dedykowane podjednostce $\beta 5i$ ludzkiego immunoproteasomu.

Podjednostka $\beta 5i$

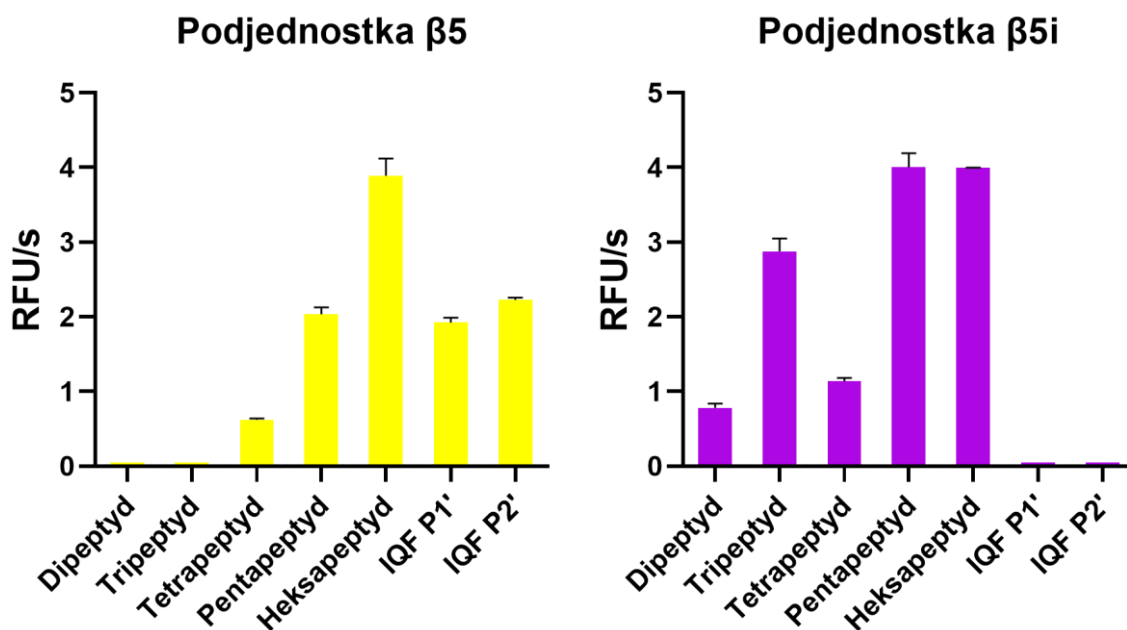
Substrat	Pozycje	Sekwencja
Dipeptyd	P2-P1	Ac-Gly-Phe-ACC
Tripeptyd	P3-P1	Ac-D-Tyr-Gly-Phe-ACC
Tetrapeptyd	P4-P1	Ac-D-Trp-D-Tyr-Gly-Phe-ACC
Pentapeptyd	P5-P1	Ac-Ser(Bzl)-D-Trp-D-Tyr-Gly-Phe-ACC
Heksapeptyd	P6-P1	Ac-D-Tyr-Ser(Bzl)-D-Trp-D-Tyr-Gly-Phe-ACC
IQF P1'	P6-P1'	ACC-Gly-D-Tyr-Ser(Bzl)-D-Trp-D-Tyr-Gly-Phe-Asp-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂
IQF P2'	P6-P2'	ACC-Gly-D-Tyr-Ser(Bzl)-D-Trp-D-Tyr-Gly-Phe-Asp-Nle-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH ₂



Rysunek 54. Aktywność podjednostek β_1 i β_{1i} wobec substratów o różnej długości łańcucha peptydowego.



Rysunek 55. Aktywność podjednostek β_2 i β_{2i} wobec substratów o różnej długości łańcucha peptydowego.



Rysunek 56. Aktywność podjednostek β_5 i β_{5i} wobec substratów o różnej długości łańcucha peptydowego.

Podjednostka β_1 wykazuje największą aktywność wobec substratów heksapeptydowych. Wobec substratów tetra- i pentapeptydowych wykazuje blisko trzykrotnie mniejszą aktywność. W jeszcze mniejszym stopniu hydrolizuje ona substraty typu IQF, a di- i tripeptydy są przez nią praktycznie nierozpoznawane. Podjednostka β_{1i} wykazuje największą aktywność wobec substratów tripeptydowych. Wobec substratów tetrapeptydowych wykazuje trzykrotnie mniejszą aktywność. W niewielkim stopniu rozpoznaje ona również substraty di- i pentapeptydowe, a substraty typu IQF prawie w ogóle.

Podjednostki β_2 oraz β_{2i} wykazują aktywność praktycznie wyłącznie wobec substratów tripeptydowych. W niewielkim stopniu hydrolizowały one również substrat IQF zawierający sekwencję P6-P2.

Podjednostka β_5 wykazuje najwyższą aktywność wobec substratów heksapeptydowych. Blisko dwukrotnie mniejszą aktywność wykazuje wobec substratów pentapeptydowych oraz typu IQF. W niewielkim stopniu rozpoznaje również substraty tripeptydowe. Podjednostka β_{5i} również wykazuje największą aktywność wobec substratów heksapeptydowych, a także pentapeptydowych. W nieco mniejszym stopniu wykazuje aktywność wobec substratów tripeptydowych. W najmniejszym stopniu rozpoznaje substraty di- i tetrapeptydowe, a substraty IQF praktycznie w ogóle.

3.7. Synteza selektywnych substratów dla podjednostki β 1i immunoproteasomu

Na podstawie otrzymanych profili specyficzności oraz wyników badań wpływu długości łańcucha peptydowego na aktywności poszczególnych podjednostek katalitycznych ludzkich proteasomów zaprojektowano siedem dipeptydowych substratów fluorogenicznych, które miały wykazać selektywność wobec podjednostki β 1i immunoproteasomu. Związki zostały zsyntezowane na podłożu stałym według tej samej procedury, co biblioteki substratów P5 i P6. Po uwolnieniu ich z żywicy, związki zostały oczyszczone za pomocą HPLC i zliofilizowane. Gotowe związki zostały rozpuszczone w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywane w temperaturze -80°C . Czystość każdego związku została potwierdzona za pomocą LC-MS i wyniosła przynajmniej 95%.

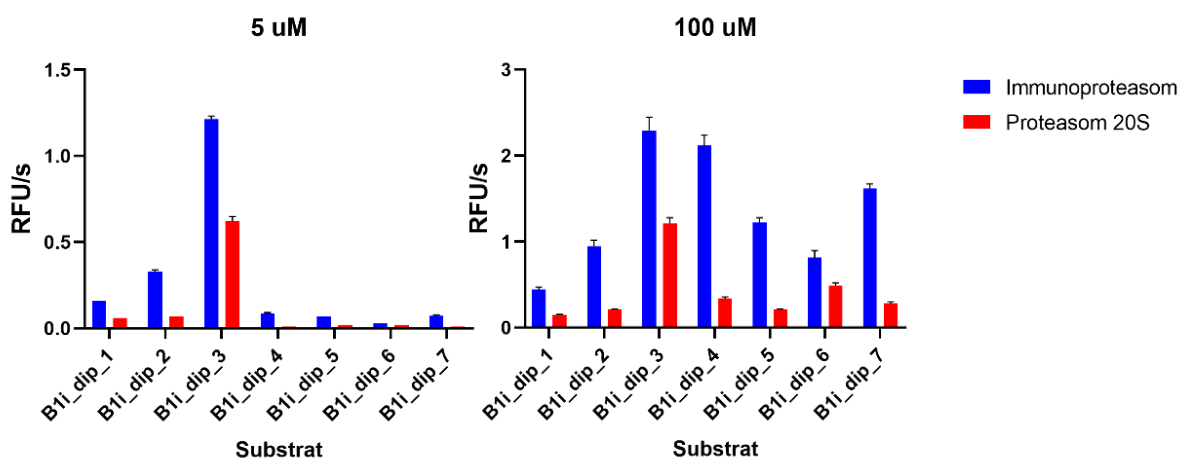
Tabela 9. Wyniki analizy LC-MS substratów dla podjednostki β 1i immunoproteasomu.

Nazwa substratu	Sekwencja	m/z teoretyczne	m/z zmierzone
β 1i_dip_1	Ac-Bpa-Leu-ACC	624,68	625,03
β 1i_dip_2	Ac-Tyr-Leu-ACC	537,23	537,34
β 1i_dip_3	Ac-hPhe-Leu-ACC	535,25	535,28
β 1i_dip_4	Ac-Phe(4-Cl)-Leu-ACC	555,19	555,32
β 1i_dip_5	Ac-2-Nal-Leu-ACC	571,25	571,36
β 1i_dip_6	Ac-Tyr(2,6-Cl-Bzl)-Leu-ACC	695,20	695,29
β 1i_dip_7	Ac-Phe(4-Br)-Leu-ACC	599,47	599,65

3.8. Badania kinetyczne selektywnych substratów dla podjednostki β 1i immunoproteasomu

W celu określenia selektywności zsyntezowanych substratów przebadano je w dwóch stężeniach: 5 μM i 100 μM . Stężenie proteasomu 20S i immunoproteasomu wyniosło 3 nM. Pomiar przeprowadzono co najmniej dwukrotnie, a uśrednione wyniki przedstawiono

w postaci wykresów słupkowych, na których oś OX przedstawia aminokwasy, a oś OY względną aktywność enzymu wyrażoną we względnych jednostkach fluorescencji na sekundę (Rysunek 57).



Rysunek 57. Badania selektywności substratów dla podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu.

Dla dwóch substratów wykazujących największą aktywność względem podjednostki $\beta 1i$ w stosunku do podjednostki $\beta 1$ ($\beta 1i_dip_4$ oraz $\beta 1i_dip_7$) wyznaczono parametr kinetyczny k_{kat}/K_M (Tabela 10) korzystając z zależności:

gdy $[S] \ll K_M$ to nachylenie prostej na wykresie zależności szybkości reakcji hydrolizy od stężenia substratu jest równe $v_{max} = [E]$;

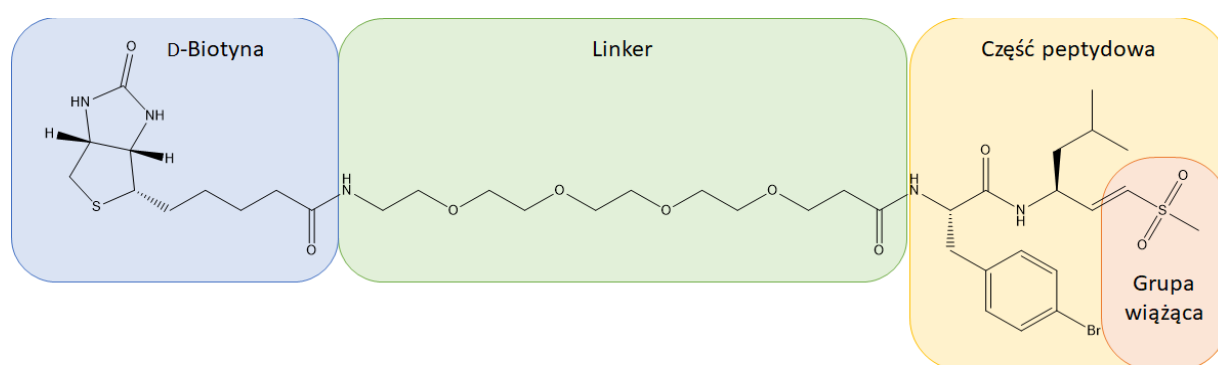
natomiast $v_{max} = [E] \cdot k_{kat}$, stąd: $k_{kat}/K_M = \text{nachylenie}/[E]$.

Tabela 10. Wartości parametru kinetycznego substratów $\beta 1i_dip_4$ i $\beta 1i_dip_7$.

Substrat	k_{kat}/K_M immunoproteasom	k_{kat}/K_M proteasom 20S
$\beta 1i_dip_4$	1270 ± 61	4723 ± 139
$\beta 1i_dip_7$	989 ± 93	630 ± 59

3.9. Projektowanie i synteza specyficznego inhibitora dla podjednostki β 1i immunoproteasomu

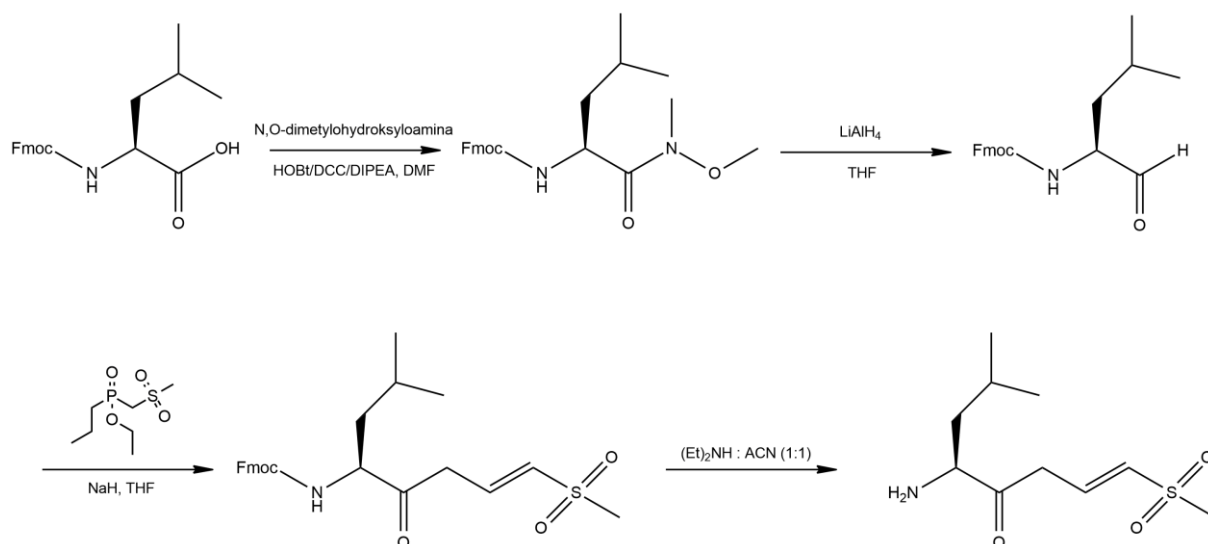
W celu potwierdzenia selektywności substratu β 1i_dip_7 względem podjednostki β 1i immunoproteasomu zsyntezowano inhibitor (Rysunek 58), który był oparty o tę samą sekwencję peptydową. Otrzymany związek składał się z: części peptydowej zawierającej wiążącą grupę winylosulfonową, linkera (glikol polietylenowy - Peg-4) oraz znacznika (D-biotyna).



Rysunek 58. Struktura specyficznego inhibitora podjednostki β 1i immunoproteasomu.

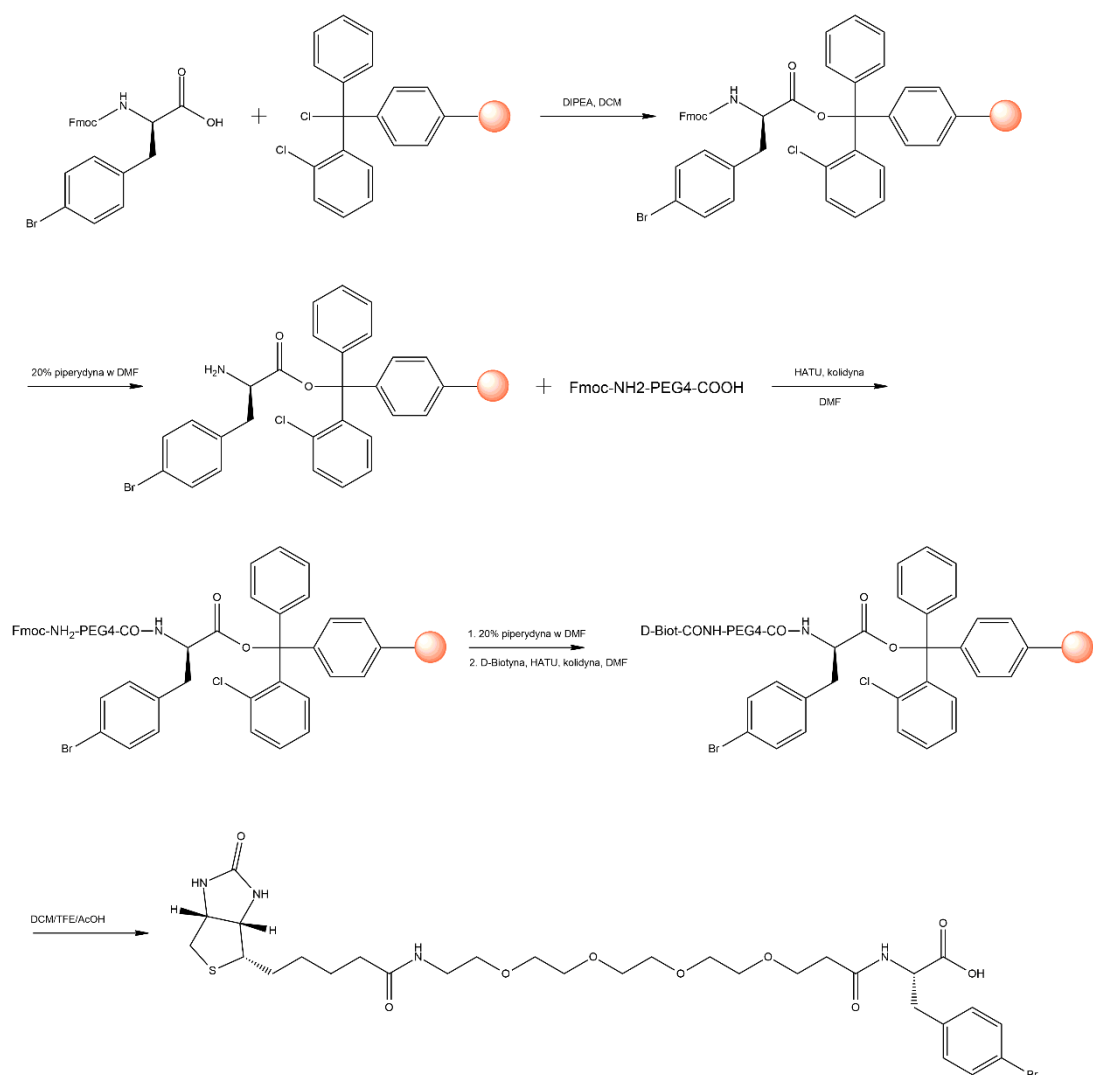
Synteza inhibitora obejmowała 3 główne etapy: syntezę grupy wiążącej; syntezę części peptydowej z przyłączonym linkerem i biotyną oraz połączenie obu wcześniej otrzymanych fragmentów.

Syntezę grupy wiążącej (Rysunek 59) rozpoczęto od przekształcenia N-zabiepieczonego aminowaksu (Fmoc-Leu-OH) w pochodną amidu Weinreba za pomocą N,O-dimetylohydroksyloaminy. Następnie otrzymaną pochodną zredukowano z wykorzystaniem glinowodoru litu do aldehydu, który poddano reakcji kondensacji Horner-Wadsworth-Emmonsa (HWE) otrzymując ugrupowanie winylosulfonowe. Otrzymany produkt zliofilizowano i użyto do dalszej reakcji bez wcześniejszego oczyszczenia.



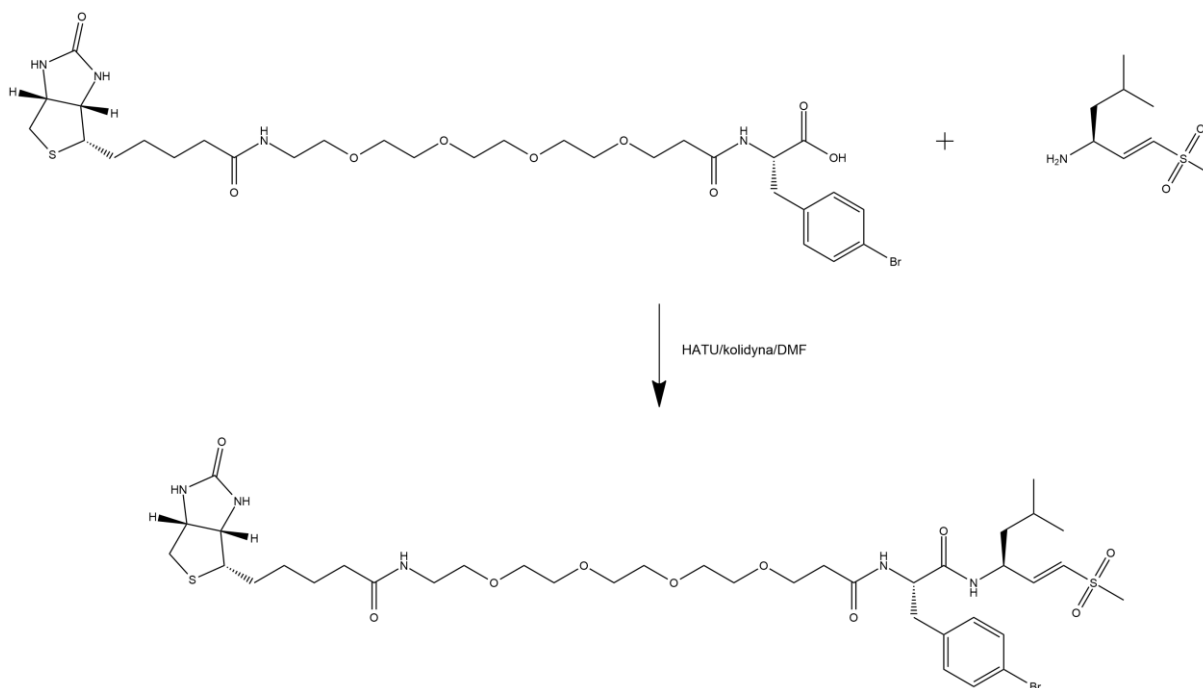
Rysunek 59. Schemat syntezy winylosulfonowej grupy wiążącej.

Fragment peptydowy połączony z linkerem i biotyną otrzymano na drodze syntezy na podłożu stałym z wykorzystaniem żywicy 2-chlorotrytylowej (Rysunek 60). Ten rodzaj żywicy umożliwił otrzymanie związku zawierającego wolną grupę karboksylową, którą można było poddać reakcji sprzęgania z wolną grupą aminową pochodnej zawierającej grupę wiążącą. Aminokwas – Fmoc-Phe(4-Br)-OH przyłączono do żywicy z wykorzystaniem N,N-diizopropylloetyloaminy (DIPEA) w dichlorometanie (DCM). Następnie usunięto grupę ochronną Fmoc wykorzystując 20% roztwór piperidyny w N,N-dimetyloformamidzie (DMF). Linker oraz biotynę przyłączono przy użyciu HATU oraz 2,4,6-trimetylopirydyny. Po zakończonej syntezie żywicę wysuszono i otrzymany fragment zhydrolizowano z niej za pomocą mieszaniny TFE:DCM:AcOH (1:8:1, v/v). Otrzymany produkt zliofilizowano i użyto do dalszej reakcji bez wcześniejszego oczyszczenia.



Rysunek 60. Schemat syntezy części peptydowej z przyłączonym linkerem i biotyną.

W ostatnim etapie otrzymany fragment peptydowy zawierający linker i biotynę sprzężnięto z grupą wiążącą wykorzystując HATU oraz 2,4,6-trimetylopirydynę (Rysunek 61). Reakcję prowadzono w DMF przez 2,5 godziny, a następnie mieszaninę preakcyjną rozcieńczono octanem etylu i przeprowadzono ekstrakcję kolejno: 5% roztworem kwasu cytrynowego, 5% roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymany produkt oczyszczono na HPLC i zliofilizowano. Gotowy związek został rozpuszczony w DMSO do stężenia 10 mM i był przechowywany w temperaturze -80°C . Czystość otrzymanego inhibitora została potwierdzona za pomocą LC-MS i wyniosła przynajmniej 95%.



Rysunek 61. Schemat sprzężenia części peptydowej i grupy wiążącej.

3.10. Badania kinetyczne specyficznego inhibitora dla podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu

W kolejnym etapie badań sprawdzono aktywność i specyficzność zsyntezowanego inhibitora względem podjednostek katalitycznych ludzkiego proteasomu 20S i immunoproteasomu. W tym celu wybrany enzym inkubowano z inhibitorem w 37°C przez 30 minut, a następnie dodawano substrat dedykowany danej podjednostce i mierzono ilość uwalnianego znacznika fluorescencyjnego ACC w zależności od ilości dodanego inhibitora. Dla podjednostki $\beta 1i$ immunoproteasomu użyto substratu: Ac-Pro-Ala-Leu-ACC, a dla podjednostki $\beta 1$ proteasomu 20S: Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-ACC. Stężenie immunoproteasomu i proteasomu 20s wyniosło 6 nM, natomiast inhibitora od 0,5 uM do 100 uM. Każdy pomiar powtórzono co najmniej 3 razy, a na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono wartość parametru IC50 dla immunoproteasomu (Tabela 11). W przypadku proteasomu wyznaczenie wartości IC50 okazało się niemożliwe, jednak szacuje się, że wyniosłaby ona ponad 100 uM.

Tabela 11. Wartości parametru IC50 dla inhibitora Ac-Phe(4-Br)-Leu-VS

Immunoproteasom	Proteasom 20s
12,10 uM	>100 uM

4. Podsumowanie i wnioski końcowe

W niniejszej rozprawie doktorskiej opisano projektowanie i syntezę bibliotek substratów peptydowych, które pozwoliły określić profil specyficzności substratowej ludzkiego immunoproteasomu w pozycjach P6-P2 i P1'-P2' oraz proteasomu 20S w pozycjach P6-P5 i P1'-P2'. W następnym kroku zbadano również zależność pomiędzy długością substratu peptydowego, a aktywnością poszczególnych podjednostek katalitycznych ludzkiego proteasomu 20S i immunoproteasomu. Otrzymane wyniki ujawniły różnice w preferencjach substratowych poszczególnych podjednostek katalitycznych, co jest niezwykle istotne podczas projektowania selektywnych narzędzi chemicznych (substratów, inhibitorów) dla proteaz.

Podjednostka β 1i ludzkiego immunoproteasomu w pozycji P2 preferuje aminokwasy hydrofobowe, posiadające w strukturze łańcucha bocznego ugrupowanie aromatyczne. Do najlepiej rozpoznawanych należą: L-Tyr, L-hPhe, L-Phe(4-Cl) i L-Trp. Podjednostka kaspazo-podobna proteasomu 20S, będąca odpowiednikiem podjednostki β 1i, w tej pozycji również preferuje hydrofobowe i aromatyczne reszty aminokwasowe: L-Trp, L-Phe, L-hTyr, L-hTyr(Me) [52]. Pochodne alifatyczne o hydrofobowym charakterze: L-hLeu, L-2-Aoc, L-Met są również dobrze rozpoznawane przed obie podjednostki. Podjednostka β 1 w pozycji P3 preferuje prolinę, co jest dla niej charakterystyczne [52]. Podjednostka β 1i rozpoznaje przede wszystkim hydrofobowe i aromatyczne łańcuchy boczne: L-hPhe, L-Glu(O-Chx), L-Phe(3,4-Cl₂) i L-Phe(4-Br), a prolina jest przez nią rozpoznawana na bardzo niskim poziomie. W pozycji P4 podjednostka kaspazo-podobna proteasomu wykazuje wąską specyficzność substratową. Przede wszystkim preferuje ona aminokwasy z pozytywnie naładowanym łańcuchem bocznym, takie jak: L-hArg, L-Phe(guan), L-Arg i L-Lys [52]. Podjednostka β 1i również wykazuje węższą specyficzność substratową i rozpoznaje ona przede wszystkim duże i hydrofobowe reszty aminokwasowe: L-Lys(2-Cl-Z), L-1-Nal, L-Phe(3-Cl), L-Tyr(Me) i L-Bip. Podjednostka β 1 w pozycji P5 ma bardzo szeroki profil specyficzności substratowej. Rozpoznaje ona dobrze łańcuchy boczne aminokwasów o zróżnicowanej strukturze i charakterze chemicznym, D-aminokwasy i pochodne proliny. Podjednostka β 1i preferuje głównie duże i aromatyczne reszty aminokwasowe: L-Lys(2-Cl-Z), L-Ser(Bzl), D-hPhe i L-hPhe. Niemniej, rozpoznaje ona również pochodne proliny i D-aminokwasy, jednak w mniejszym stopniu niż podjednostka β 1. Obie podjednostki preferują w pozycji P6 duże i hydrofobowe łańcuchy boczne. W przypadku β 1 najlepiej rozpoznawanymi aminokwasami są: L-Lys(2-Cl-Z), L-Tyr(2,6-Cl₂-Bzl) i L-Tyr(Bzl), zaś β 1i: L-1-Nal, L-Phe(3,4-Cl₂), L-Phe(4-NO₂) i L-Trp(Me). Dodatkowo

podjednostka $\beta 1$ preferowała również w tej pozycji pochodną proliny – L-Tic. Specyficzność substratowa obu tych podjednostek jest znacznie węższa po stronie primowanej. W pozycji P1' podjednostka $\beta 1$ najlepiej rozpoznaje L-Asp. L-Ala, będąca drugim w kolejności preferowanym aminokwasem, jest rozpoznawana prawie 2 razy słabiej. Obie podjednostki najlepiej rozpoznają w pozycji P2' ten sam aminokwas – L-hPhe. Dodatkowo podjednostka $\beta 1$ wykazuje preferencję substratową wobec dwóch kwasowych pochodnych – L-Glu i L-Asp.

Podjednostka trypsyno-podobna proteasomu 20S w pozycji P2 preferuje L-metioninę oraz jej pochodne: L-Met(O) i L-Met(O)₂ oraz L-Hyp(Bzl) i L-Gln. Podjednostka $\beta 2$ również rozpoznaje L-Met, L-Met(O), L-Met(O)₂ i inne pochodne zawierające długi łańcuch alifatyczny: L-2-Aoc i L-hLeu. Dodatkowo w tej pozycji preferowane są pochodne tyrozyny: L-hTyr i L-hTyr(Me). W pozycji P3 podjednostka $\beta 2$ najlepiej rozpoznaje: L-Arg, L-hArg, L-Phe(guan), L-Abu, L-hSer, L-Met, L-Val i L-Thr. Podjednostka $\beta 2$ również najlepiej rozpoznaje: L-Arg, L-hArg, L-Phe(guan), L-Val i L-Abu. W pozycji P4 obie podjednostki mają szeroki profil specyficzności substratowej. Podjednostka $\beta 2$ w przeciwieństwie do $\beta 1$ rozpoznaje nawet pochodne o stereochemii D oraz pochodne proliny. W pozycji P5 obie podjednostki wykazują specyficzność wobec zasadowych aminokwasów, również tych o stereochemii D. Najlepiej rozpoznawanymi przez obie podjednostki aminokwasami są: D-Arg i D-Lys (w przypadku $\beta 2$ również L-Lys), a następnie L-Dap, L-Dab, L-Orn i L-Pip. W pozycji P6 obie podjednostki wykazują szeroki profil specyficzności substratowej i rozpoznają pochodne o zróżnicowanym charakterze chemicznym, wliczając D-aminokwasy oraz pochodne proliny. Najlepiej rozpoznawanymi przez podjednostkę $\beta 2$ aminokwasami są: L-2-Abz, L-Tic, L-Phe(guan), D-Arg i D-Leu. Podjednostka $\beta 2$ również rozpoznaje głównie zasadowe pochodne: D-Arg, D-Lys, L-Pip, L-Dap, L-Dab i L-Tic. Obie podjednostki wykazują znacznie węższą specyficzność substratową w pozycji P1'. Najlepiej rozpoznają w tej pozycji L-hSer(Bzl) i L-Ala, a podjednostka $\beta 2$ dodatkowo jeszcze L-hCit i L-Thz. W pozycji P2' podjednostka $\beta 2$ preferuje przede wszystkim duże, hydrofobowe pochodne: L-Trp(Me), L-Cys(Bzl), L-Ala(2-th) i L-Bta. Podjednostka $\beta 2$ również najlepiej rozpoznaje L-Cys(Bzl) i L-Trp(Me), a także L-Ala i L-Met.

Podjednostka chymotrypsyno-podobna proteasomu 20S najlepiej rozpoznaje w pozycji P2 aminokwasy zasadowe oraz hydrofobowe, takie jak: L-2-Aoc, L-Met, L-Met(O)₂, L-Cha, L-Oic, L-Orn, L-Lys i L-Arg [52]. Podjednostka $\beta 5$ również rozpoznaje hydrofobowe pochodne aminokwasowe, ale o rozbudowanym łańcuchu bocznym, które zawierają w swojej strukturze ugrupowanie aromatyczne: L-Tyr(2-Br-Z), L-Ser(Bzl) i L-hSer(Bzl). Pochodne zasadowe, takie jak: L-His i L-Lys są również dobrze przez nią rozpoznawane. W pozycji P3 podjednostka $\beta 5$

preferuje przede wszystkim reszty hydrofobowe będące pochodnymi fenyloalaniny: L-2-Nal, L-hPhe, L-Phe(4-I), L-Phe(4-Cl) i L-Phe(NH₂) [52]. Podjednostka β 5i w tej pozycji również rozpoznaje L-2-Nal, a także: L-Trp, L-Aze i L-Nle. Obie podjednostki w pozycji P4 preferują aminokwasy hydrofobowe. Najlepiej rozpoznawanymi przez podjednostkę chymotrypsyno-podobną proteasomu 20S są: L-Cys(MeBzl), L-Lys(TFA), L-Nle i L-Nle(O-Bzl). Jej odpowiednik zaś najlepiej rozpoznaje: L-Arg(Z)₂, L-Hyp(Bzl), L-Thr(Bzl), L-Cys(Bzl), L-Glu(O-Chx) i L-Cys(4-MeOBzl) [52]. W pozycji P5 podjednostka β 5 najlepiej rozpoznaje hydrofobowe pochodne, w tym te o stereochemii D: D-hPhe, D-Leu, L-hPhe i L-Leu. Podjednostka β 5i najlepiej rozpoznaje w pozycji P5 aminokwasy hydrofobowe i aromatyczne, takie jak: D-hPhe i L-Ser(Bzl). Podjednostka β 5 w pozycji P6 rozpoznaje większość aminokwasów, jednak preferowanymi przez nią są: Gly i D-Tyr. Podjednostka β 5i również wykazuje wysoką aktywność wobec tych reszt aminokwasowych, a dodatkowo można zaobserwować u niej zwiększoną preferencję w stosunku do dużych, aromatycznych i hydrofobowych pochodnych. W pozycji P1' podjednostka β 5 najlepiej rozpoznaje naturalne aminokwasy o kwasowym i zasadowym charakterze: L-Asp, L-Asn, L-Glu, L-Glu, a także L-Aze. W pozycji P2' preferuje ona pochodne o dużym i hydrofobowym łańcuchu bocznym: L-Cys(Bzl), L-Cys(MeBzl), L-Ser(Bzl). Podjednostka β 5i w pozycji P1' również dobrze rozpoznaje naturalne aminokwasy: L-Asp, L-Asn, L-Glu, L-Glu oraz L-Aad. W pozycji P2' preferuje przede wszystkim hydrofobowe pochodne: L-Nle, L-Ala(2-th), L-Ser(Bzl).

Porównując dane zebrane z analizy profili specyficzności substratowej podjednostek β 1 oraz β 1i można zauważyć, że β 1i wykazuje znacznie większą preferencję wobec pochodnych hydrofobowych, posiadających duże i aromatyczne łańcuchy boczne. Widoczna zmiana profilu specyficzności substratowej podjednostki β 1i na bardziej hydrofobowy znajduje odzwierciedlenie w zwiększonej przez immunoproteasom produkcji niepolarnych epitopów dla głównego układu zgodności tkankowej klasy I [96]. Podjednostka β 2 oraz β 2i wykazują najmniejsze różnice strukturalne pomiędzy sobą i znajduje to potwierdzenie w otrzymanych matrycach specyficzności substratowej [75].

. Obie podjednostki chymotrypsyno-podobne w dużej mierze wykazują preferencję dla reszt aminokwasowych o podobnym charakterze chemicznym i strukturze. W przypadku podjednostek β 5 oraz β 5i można zaobserwować zmianę profilu specyficzności w stronę bardziej hydrofobowych aminokwasów, jak ma to miejsce w przypadku podjednostek β 1 i β 1i.

Przeprowadzone badania nad wpływem długości łańcucha peptydowego na aktywność danej podjednostki katalitycznej również wykazały pewne różnice pomiędzy proteasomem 20S

i immunoproteasomem. Podjednostka $\beta 1$ wykazała największą aktywność wobec substratów zawierających w swojej strukturze 6 reszt aminokwasowych, podczas gdy $\beta 1i$ preferuje znacznie krótsze substraty tripeptydowe. Podjednostki $\beta 2$ oraz $\beta 2i$ również wykazują największą aktywność wobec sekwencji tripeptydowych. Podjednostka $\beta 5$ wykazywała największą aktywność wobec substratów heksapeptydowych, jednak w mniejszym stopniu rozpoznawała również pentapeptydy oraz substraty typu IQF. Podjednostka $\beta 5i$ najlepiej rozpoznawała substraty penta- i heksapeptydowe, ale wykazała również aktywność wobec tripeptydów. Otrzymane wyniki mogą posłużyć jako podstawa do dalszych badań nad opracowaniem narzędzi chemicznych (substratów, inhibitorów) o zwiększonej selektywności wobec poszczególnych aktywności proteasomalnych.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej:

1. Zsyntezowano biblioteki peptydowych substratów fluorogenicznych służące do określenia specyficzności substratowej podjednostek katalitycznych ludzkiego proteasomu 20S oraz immunoproteasomu w pozycjach P6-P5
2. Zsyntezowano biblioteki peptydowych substratów typu IQF służące do określenia specyficzności substratowej podjednostek katalitycznych ludzkiego proteasomu 20S oraz immunoproteasomu w pozycjach P1'-P2'
3. Scharakteryzowano specyficzność substratową podjednostek katalitycznych $\beta 1i$, $\beta 2i$ oraz $\beta 5i$ ludzkiego immunoproteasomu w pozycjach P4-P2 i porównano z wcześniej opisaną specyficznością substratową ludzkiego proteasomu 20S
4. Scharakteryzowano i porównano specyficzność substratową podjednostek katalitycznych $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ ludzkiego immunoproteasomu oraz podjednostek $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ proteasomu 20S w pozycjach P6-P5
5. Scharakteryzowano i porównano specyficzność substratową podjednostek katalitycznych $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ ludzkiego immunoproteasomu oraz podjednostek $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ proteasomu 20S w pozycjach P1'-P2'
6. Zsyntezowano serię dipeptydowych substratów fluorogenicznych wykazujących specyficzność wobec podjednostki $\beta 1i$ ludzkiego immunoproteasomu
7. Zsyntezowano dipeptydowy inhibitor specyficzny wobec podjednostki $\beta 1i$ ludzkiego immunoproteasomu

5. Część eksperymentalna

Wszystkie badania opisane w rozprawie zostały wykonane w laboratorium prof. dra hab. Marcina Drąga w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Odczynniki wykorzystane do syntez zostały zakupione w firmach: Sigma-Aldrich, VWR International, Iris Biotech GmbH, Combi Blocks, AAPPTec, Merck Milipore i Thermo Fisher Scientific. Wyizolowane i oczyszczone ludzkie proteazy: proteasom 20S i immunoproteasom zostały zakupione w firmie South Bay Bio.

Analizy LC-MS otrzymanych związków wykonano z użyciem systemu Waters Alliance e2695, detektora UV-Vis 2489 oraz spektrometru masowego Acquity QDa. System LC był wyposażony w kolumnę analityczną Phenomenex Jupiter C4. Rozdział prowadzono w układzie odwróconych faz: A – 0,1% wodny roztwór HCOOH, B – 0,1% roztwór HCOOH w ACN. Zmiana gradientu: 95% fazy A do 95% B fazy B w ciągu 15 minut.

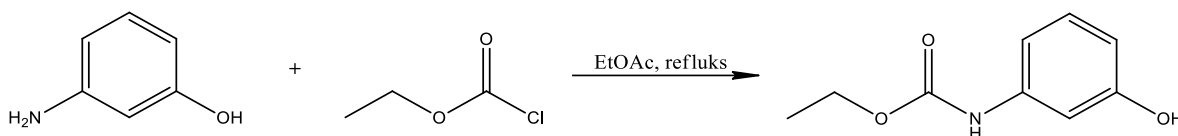
5.1. Synteza znacznika fluorescencyjnego Fmoc-ACC-OH

Synteza znacznika fluorescencyjnego Fmoc-ACC-OH składała się z 4 etapów i opierała się zmodyfikowanym raporcie opisanym przez Mały'ego i współpracowników [48].

Synteza (3-hydroksyfenilo)karbaminianu etylu:

W kolbie trój szyjnej okrągłodennej o objętości 2 l umieszczono 3-aminofenol (154,63 g, 1,42 mol) oraz 750 ml EtOAc. Mieszaninę ogrzewano w koszu grzejnym pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut. Następnie przez godzinę wkraplało powoli chloromrówczan etylu (65,8 ml, 0,69 mol). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 30 minut, a następnie schłodzono do temperatury pokojowej. Otrzymany biały osad przefiltrowano na lejku ze spiekem i przemyto trzykrotnie 300 ml EtOAc. Przemyty osad odrzucono, a przesącz zagęszczono na wyparce. Kiedy roztwór przyjął postać gęstego syropu o żółtym zabarwieniu, wylano go do krystalizatora i zainicjowano proces krystalizacji za pomocą szklanej bagietki. Wykrystalizowany produkt w postaci białych kryształów odsączono na lejku ze spiekem, przeniesiono do krystalizatora i wysuszono na powietrzu. Otrzymano 105,35 g (3-hydroksyfenilo)karbaminianu etylu (wydajność: 84,6%). Masę molową produktu potwierdzono za pomocą LC-MS (m/z obliczone $[M+H]^+ = 182,08$, m/z zmierzone $[M+H]^+ =$

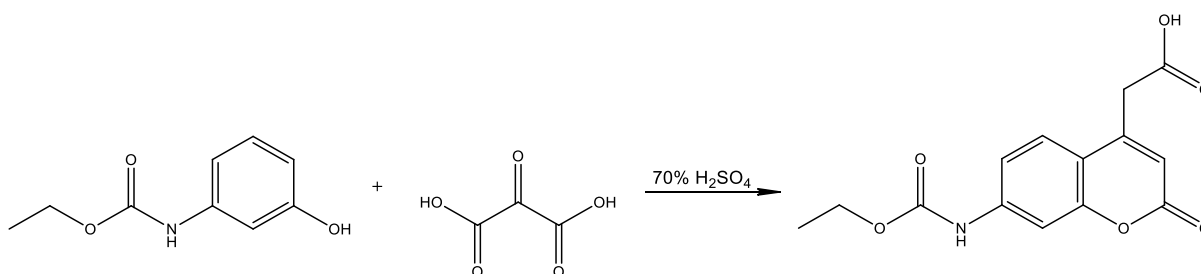
181,88). Otrzymany produkt wykorzystano w kolejnym etapie syntezy bez dalszego oczyszczania.



Rysunek 62. Schemat syntezy (3-hydroksyfenylo)karbaminianu etylu.

Synteza kwasu 7-N-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowego:

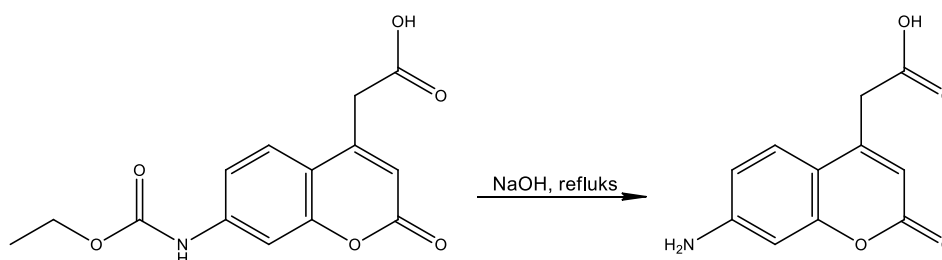
W kolbie okrągłodennej o pojemności 3 l zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne dodano 1,5 l 70% H₂SO₄ i schłodzono w łaźni lodowej. Przez godzinę dodawano porcjami (3-hydroksyfenylo)-karbaminian etylu (55,02 g, 0,304 mol), a następnie przez kolejną godzinę porcjami dodawano kwas 1,3-acetonodikarboksyłowy (49 g, 0,335 mol). Następnie łaźnię lodową usunięto i reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 10 godzin. Po tym czasie zawartość kolby przelano do dwóch zlewek o pojemności 3 l wypełnionych pokruszonym lodem i mieszano przez 30 minut. Otrzymany biały osad przesączono na lejku ze spiekim, przemyto Et₂O i rozpuszczono w acetonitrylu. Mieszaninę doprowadzono do wrzenia i mieszano przez 30 minut. Następnie schłodzono ją do temperatury pokojowej i przesączono na lejku ze spiekim. Otrzymano 70,83 g kwasu 7-N-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowego (wydajność: 79,95%). Masę molową produktu potwierdzono za pomocą LC-MS (m/z obliczone [M+H]⁺ = 292,08, m/z zmierzone [M+H]⁺ = 291,93). Otrzymany produkt wykorzystano w kolejnym etapie syntezy bez dalszego oczyszczania.



Rysunek 63. Schemat syntezy kwasu 7-N-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowego.

Synteza kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 3 l zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne rozpuszczono NaOH (189,94 g, 4,75 mol) w 1,24 wody destylowanej. Następnie porcjami dodawano kwas 7-N-(karbetoksy)aminokumaryno-4-octowy (138,84 g, 0,477 mol) i mieszaninę ogrzano do wrzenia. Reakcję prowadzono przez 3 godziny pod chłodnicą zwrotną, a następnie schłodzono do temperatury pokojowej. Zawartość kolby przelano do zlewki o pojemności 5 l zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne. Roztwór schłodzono w łaźni lodowej i powoli dodawano do niego niewielkimi porcjami stężony H₂SO₄ do otrzymania pH 2,35. Kwas 7-aminokumaryno-4-octowy wytrącił się z roztworu w postaci żółtego osadu wraz z produktem ubocznym – Na₂SO₄. Wytrącony osad odsączono i wysuszono w eksykatorze nad bezwodnym P₂O₅. W celu oddzielenia produktu od Na₂SO₄, 20 g mieszaniny osadów umieszczono w kolbie gruszkowej o pojemności 1 l i dodano 200 ml acetonu i ogrzewano w temperaturze 60°C przez 20 minut. Otrzymaną zawiesinę przesączono na lejku ze spiekim i odrzucono osad. Zachowany przesącz odparowano do sucha na wyparce próżniowej w celu odzyskania produktu. Czynność tę powtarzano aż oddzielono całość kwasu kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego od Na₂SO₄. Uzyskano 55,17 g produktu (wydajność 52,8%). Masę molową i czystość produktu potwierdzono za pomocą LC-MS (m/z obliczone [M+H]⁺ = 220,06, m/z zmierzone [M+H]⁺ = 219,87). Otrzymany produkt wykorzystano w kolejnym etapie syntezy bez dalszego oczyszczania.

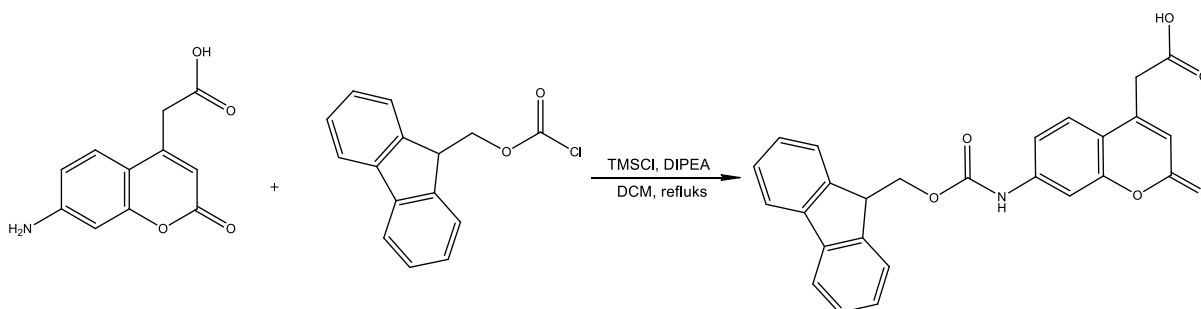


Rysunek 64. Schemat syntezy kwasu 7-aminokumaryno-4-octowego.

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

W kolbie okrągłodennej o pojemności 1 l zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono kwas 7-aminokumaryno-4-octowy (9,70 g, 0,04 mol), DMC (73 ml) i DIPEA (17 ml). Mieszaninę schładzano w łaźni lodowej przez 15 minut i dodano TMSCL (13 ml). Następnie łaźnię lodową usunięto i mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia przez 3 godziny. Po tym czasie zawartość kolby schłodzono do

temperatury poniżej 10°C i porcjami dodawano Fmoc-Cl (12,8 g, 0,05 mol). Następnie reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej i bez dostępu światła przez 12 godzin. Po tym czasie do zawartości kolby dodano 243 ml MeOH i wytrząsano przez 30 minut. Wytrącony produkt w postaci białego osadu odsączono na lejku ze spiekim i przemyto: trzykrotnie MeOH, trzykrotnie heksanem i trzykrotnie Et₂O. Odsączony produkt przeniesiono do krystalizatora i wysuszono na powietrzu. Otrzymano 15,73 g Fmoc-ACC-OH (wydajność 81,0%). Masę molową i czystość produktu potwierdzono za pomocą LC-MS (m/z obliczone [M+H]⁺ = 442,13, m/z zmierzone [M+H]⁺ = 442,21). Otrzymany produkt wykorzystano do kolejnych syntez bez dalszego oczyszczania.



Rysunek 65. Schemat syntezy kwasu 7-N-(fluorenylmetoksykarbonylo)aminokumaryno-4-octowego.

5.2. Synteza bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych P5 i P6

Wszystkie biblioteki P5 oraz P6 zsyntezowano na podłożu stałym. Synteza dla każdej z nich przebiegała w analogiczny sposób, a poniższą procedurę opisano na przykładzie biblioteki P5 dedykowanej podjednostce kaspazo-podobnej proteasomu 20S. W szkalnym reaktorze umieszczono 10 g żywicy amidowej Amide Rink (stopień podstawienia: 0,74 mmol/g). Żywicę spulchniono w dichlorometanie (DCM) przez 30 minut i następnie przemyto trzykrotnie dimetyloformamidem (DMF). Następnie, w celu usunięcia grupy ochronnej Fmoc, do reaktora dodano 20% roztwór piperidyny w DMF i umieszczono na kołysce na 5 minut. Po tym czasie żywicę przemyto DMF, dodano świeżą porcję roztworu piperidyny i reaktor pozostawiono na kołysce na 15 minut. Po tym żywica została przemyta sześciokrotnie DMF. Po przeprowadzeniu hydrolizy grupy Fmoc wykonano test ninhydrynowy w celu potwierdzenia obecności wolnych grup aminowych. Kilkanaście ziaren żywicy zostało umieszczonych w szklanej probówce i dodano do niej roztwór ninhydryny w 96% alkoholu etylowym skażonym eterem dietylowym. Probówkę z żywicą inkubowano w temperaturze 95°C przez 5

minut. Po tym czasie zaobserwowano zmianę koloru żywicy z jasnożółtej na ciemnogrnatową, co potwierdziło obecność wolnych grup aminowych. Opisaną procedurę usunięcia grupy Fmoc wraz z wykonaniem testu ninhydrynowego przeprowadzono przed przyłączeniem każdej reszty aminokwasowej. Następnie w probówce typu Falcon o pojemności 50 ml odważono Fmoc-ACC-OH (8,16 g, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i HATU (7,03 g, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość probówki rozpuszczono w 45 ml DMF i dodano 2,4,6-kolidynę (2,44 ml, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Aktywowany roztwór przeniesiono do reaktora i pozostawiono na 24 godziny. Po tym czasie żywicę przemyto trzykrotnie DMF, dodano świeżą porcję aktywowanego roztworu Fmoc-ACC-OH, HATU i 2,4,6-kolidyny i pozostawiono na kolejne 24 godziny. Po tym czasie przeprowadzono test ninhydrynowy, którego negatywny wynik świadczył o braku wolnych grup aminowych i usunięto grupę ochronną Fmoc zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Następnie w probówce typu Falcon odważono po 2,5 równoważnika molowego Fmoc-Asp-OH (7,60 g, 18,5 mmol) oraz HATU (7,03 g, 18,5 mmol) i następnie rozpuszczono w 40 ml DMF. Do roztworu dodano 2,4,6-kolidynę (3,66 ml, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i przeniesiono do reaktora. Po 2,5 godziny usunięto grupę ochronną Fmoc bez uprzedniego przeprowadzenia testu ninhydrynowego, ponieważ ninhydryna nie reaguje z grupą aminową ACC. W kolejnych etapach wydłużono łańcuch peptydowy o pozycje P2, P3 i P4 postępując w analogiczny sposób jak podczas przyłączania aminokwasu P1. Po otrzymaniu sekwencji H₂N-Lys-Pro-Nle-Asp-ACC-Rink, żywicę przemyto trzykrotnie DMF, trzykrotnie DCM i trzykrotnie metanolem, a następnie wysuszono w eksykatorze nad bezwodnym P₂O₅. Wysuszoną żywicę rozporcjowano do dwóch 48-dołkowych syntezaatorów półautomatycznych (100 mg na porcję), spulchniono przez 30 minut w DCM, a następnie przemyto trzykrotnie DMF. Do każdej z porcji przyłączono w pozycji P5 jeden z 98 wcześniej wybranych aminokwasów (Tabela 12). Sprzęganie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem 2,5 równoważników molowych aminokwasu, HATU i 2,4,6-kolidyny rozpuszczonych w 0,8 ml DMF. Reakcja była prowadzona przez 24 godziny, a następnie przeprowadzono test ninhydrynowy, usunięto grupę ochronną Fmoc i wykonano kolejny test ninhydrynowy. W kolejnym kroku do każdej porcji żywicy przyłączono mieszaninę izokinetyczną 18 naturalnych aminokwasów i norleucyny (2,5 równoważnika molowego, z pominięciem cysteiny i metioniny) za pomocą HOBt (28 mg, 0,185 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i DICl (24 µl, 0,185 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Reakcję prowadzono 24 godziny, a następnie usunięto grupę ochronną Fmoc. Po hydrolizie przeprowadzono reakcję acetylację końcowej grupy aminowej. W tym celu w dwóch probówkach typu Falcon odważono HBTU (6,75g, 17,76 mmol, 5 równoważników molowych,

dla 48 porcji z żywicą) i rozpuszczono w 40 ml DMF. Do każdej probówki dodano kwas octowy (1,07 ml, 17,76 mmol, 5 równoważników molowych, dla 48 porcji z żywicą) i DIPEA (3,09 ml, 17,76 mmol, 5 równoważników molowych, dla 48 porcji z żywicą). Roztwory aktywowano przez 3 minuty, a następnie rozpipetowano do syntezyatorów (po 0,8 ml na dołek z żywicą). Po godzinie żywicę przemyto pięciokrotnie DMF, trzykrotnie DCM, trzykrotnie MeOH i wysuszono w eksykatorze nad bezwodnym P₂O₅. Ostatni etap syntezy polegał na hydrolizie peptydów z żywicy. Do tego celu wykorzystano mieszaninę kwas trifluorooctowy (TFA): triizopropylsilan (TIPS): woda w stosunku 95:2,5:2,5. Reakcję hydrolizy prowadzono przez 2 godziny, a następnie roztwór z każdego dołka przeniesiono do osobnej probówki typu Falcon o objętości 15 ml. Do każdej probówki dodano zimny eter dietylowy do objętości 12 ml. Wytrącony osad zwirowano (4°C, 4 minuty, 4400 rpm), a następnie zlano roztwór i uzupełniono świeżą porcją eteru do objętości 6 ml. Zawartość probówek wymieszano, a następnie znów zwirowano i zlano roztwór z nad osadu. Otrzymane osady pozostawiono do wysuszenia na powietrzu, a następnie zliofilizowano. Gotową bibliotekę rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w temperaturze -20°C do momentu użycia.

Tabela 12. Lista naturalnych i nienaturalnych aminokwasów wykorzystanych do syntezy bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych P5 i P6.

Numer substratu	Aminokwas w pozycji P5 lub P6
1	L-Ala
2	L-Arg
3	L-Asn
4	L-Asp
5	L-Gln
6	L-Glu
7	Gly
8	L-His
9	L-Ile
10	L-Leu

11	L-Lys
12	L-Nle
13	L-Phe
14	L-Pro
15	L-Ser
16	L-Thr
17	L-Trp
18	L-Tyr
19	L-Val
20	D-Ala
21	D-Arg
22	D-Asn
23	D-Asp
24	D-Gln
25	D-Glu
26	D-His
27	D-Leu
28	D-Lys
29	D-Phe
30	D-Pro
31	D-Ser
32	D-Phg
33	D-Thr
34	D-Trp
35	D-Tyr
36	D-Val

37	D-hPhe
38	L-Hyp
39	L-Hyp(Bzl)
40	L-Oic
41	L-Pip
42	L-Tic
43	L-Dap
44	L-Dab
45	L-Cit
46	L-Orn
47	L-Lys(TFA)
48	L-Lys(Ac)
49	L-Lys(2-Cl-Z)
50	L-Trp(Me)
51	L-Asp(O-Me)
52	L-Asp(O-CHx)
53	L-Asp(O-Bzl)
54	L-Glu(O-Me)
55	L-Glu(O-CHx)
56	L-Glu(O-Bzl)
57	L-Aad
58	L-Phe(guan)
59	L-Phe(2-Cl)
60	L-Phe(3-Cl)
61	L-Phe(4-Cl)
62	L-Phe(3,4-Cl ₂)

63	L-Phe(2-F)
64	L-3-Pal
65	L-4-Pal
66	L-Ala(2-th)
67	L-Ala(Bth)
68	L-Abu
69	L-Phe(4-NO ₂)
70	L-Ser(Ac)
71	L-Ser(Bzl)
72	L-Dab(Z)
73	L-Phe(4-Me)
74	L-Phe(NH ₂)
75	L-Cys(MeBzl)
76	L-Cys(4-MeOBzl)
77	L-Met(O)
78	L-Met(O) ₂
79	L-2-Aoc
80	L-Phg
81	L-hPhe
82	L-Chg
83	L-hCha
84	L-Igl
85	L-1-Nal
86	L-2-Nal
87	L-hLeu
88	L-Tyr(Me)

89	L-Tyr(2,6-Cl ₂ Bzl)
90	L-Tyr(Bzl)
91	L-hTyr
92	L-Nva
93	L-2-Fal
94	L-2-Abz
95	L-3-Abz
96	L-4-Abz

5.3. Badania kinetyczne bibliotek fluorogenicznych substratów peptydowych P2-P4 oraz P5 i P6

Zsyntezowane biblioteki P5 i P6 zostały wykorzystane do określenia specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S5 i S6. Badania kinetyczne przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofluorymetru (Molecular Devices Spectramax Gemini XPS) w 384 dołkowych płytkach (Corning®, płaskie dno, białe) zawierających 1 μ l roztworu substratu w DMSO i 49 μ l roztworu enzymu w buforze (skład buforu: 0,5 mM EDTA, 20 mM HEPES), który był wcześniej inkubowany w temperaturze 37°C. Końcowe stężenie substratów na płytce wynosiło 5 μ M, natomiast stężenie proteasomu 20S 0,5 μ M, a immunoproteasomu 1,5 nM. Pomiar szybkości hydrolizy substratów prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C przy długościach fali: wzbudzenia $\lambda_{exc} = 355$ nm i emisji $\lambda_{em} = 460$ nm. Podczas analizy wybrano jedynie liniowy odcinek przyrostu fluorescencji w czasie (RFU/s). Każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie. Profile specyficzności ludzkich proteasomach w kieszeniach S5 i S6 przedstawiono w postaci wykresów kolumnowych, gdzie najwyższą wartość RFU/s w danej pozycji przedstawiono jako 100% i przyrównano do niej wartości RFU/s pozostałych substratów.

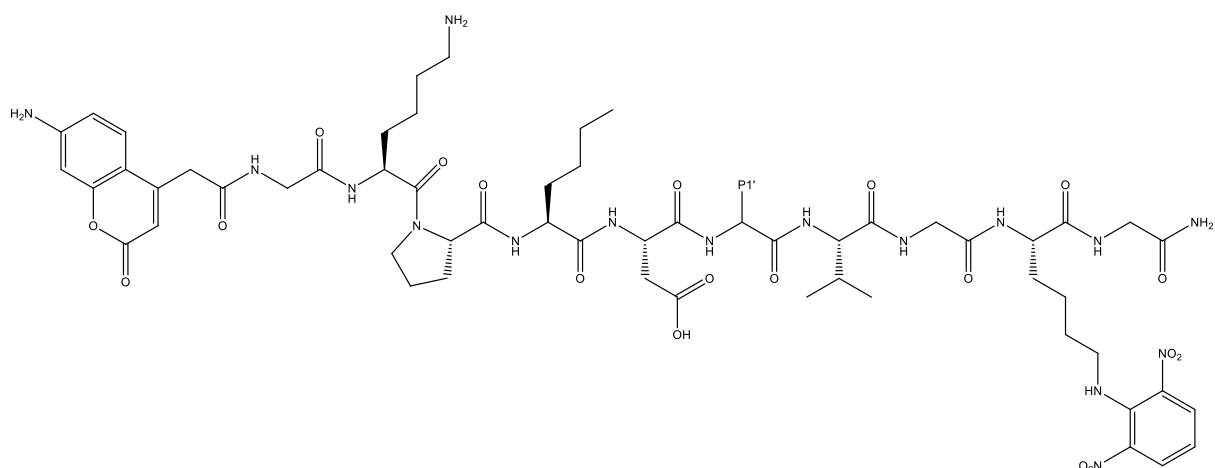
5.4. Synteza bibliotek substratów peptydowych typu IQF P1' i P2'

Wszystkie biblioteki P1' oraz P2' zsyntezowano na podłożu stałym. Synteza dla każdej z nich przebiegała w analogiczny sposób, a poniższą procedurę opisano na przykładzie

biblioteki P1' dedykowanej podjednostce kaspazo-podobnej proteasomu 20S. W szkalnym reaktorze umieszczono 10 g żywicy amidowej Amide Rink (stopień podstawienia: 0,74 mmol/g). Żywicę spulchniono w dichlorometanie (DCM) przez 30 minut i następnie przemyto trzykrotnie dimetyloformamidem (DMF). Następnie, w celu usunięcia grupy ochronnej Fmoc, do reaktora dodano 20% roztwór piperydyny w DMF i umieszczono na kołysce na 5 minut. Po tym czasie żywicę przemyto DMF, dodano świeżą porcję roztworu piperydyny i reaktor pozostawiono na kołysce na 15 minut. Po tym żywica została przemyta sześciokrotnie DMF. Po przeprowadzeniu hydrolizy grupy Fmoc wykonano test ninhydrynowy w celu potwierdzenia obecności wolnych grup aminowych. Kilkanaście ziaren żywicy zostało umieszczonych w szklanej probówce i dodano do niej roztwór ninhydryny w 96% alkoholu etylowym skażonym eterem dietylowym. Probówkę z żywicą inkubowano w temperaturze 95°C przez 5 minut. Po tym czasie zaobserwowano zmianę koloru żywicy z jasnożółtej na ciemnognatową, co potwierdziło obecność wolnych grup aminowych. Opisaną procedurę usunięcia grupy Fmoc wraz z wykonaniem testu ninhydrynowego przeprowadzono przed przyłączeniem każdej reszty aminokwasowej. Następnie w probówce typu Falcon o pojemności 50 ml odważono Fmoc-Gly-OH (5,50 g, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i HATU (7,03 g, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość probówki rozpuszczono w 45 ml DMF i dodano 2,4,6-kolidynę (2,44 ml, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Aktywowany roztwór przeniesiono do reaktora i pozostawiono na kołysce na 2,5 godziny. Po tym czasie przeprowadzono test ninhydrynowy, którego negatywny wynik świadczył o braku wolnych grup aminowych i usunięto grupę ochronną Fmoc zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Następnie w probówce typu Falcon odważono po 2,5 równoważnika molowego Fmoc-Lys(Dnp)-OH (9,89 g, 18,5 mmol) oraz HATU (7,03 g, 18,5 mmol) i następnie rozpuszczono w 40 ml DMF. Do roztworu dodano 2,4,6-kolidynę (3,66 ml, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i przeniesiono do reaktora. Po 2,5 godziny przeprowadzono test ninhydrynowy (wynik negatywny) i usunięto grupę ochronną Fmoc. Następnie do żywicy przyłączono Gly i Val. Po otrzymaniu sekwencji H₂N-Val-Gly-Lys(Dnp)-Gly-Rink żywicę przemyto trzykrotnie DMF, trzykrotnie DCM, trzykrotnie MeOH i wysuszono w eksykatorze nad bezwodnym P₂O₅. Wysuszoną żywicę rozporcjowano do dwóch 48-dółkowych syntezyatorów półautomatycznych (100 mg na porcję), spulchniono przez 30 minut w DCM, a następnie przemyto trzykrotnie DMF. Do każdej z porcji przyłączono w pozycji P1' jeden z wcześniej wybranych aminokwasów (Tabela 13). Sprzęganie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem 2,5 równoważników molowych aminokwasu, HATU i 2,4,6-kolidyny rozpuszczonych w 0,8 ml DMF. Reakcja była prowadzona przez 24 godziny, a następnie przeprowadzono test

ninhydrinowy (wynik negatywny), usunięto grupę ochronną Fmoc i wykonano kolejny test ninhydrinowy (wynik pozytywny). W kolejnych krokach wydłużono łańcuch peptydowy o pozycje P5-P1. W kolejnym kroku do otrzymanej sekwencji H₂N-Gly-Lys-Pro-Nle-Asp-P1'-Val-Gly-Lys(Dnp)-Gly-Rink przyłączono znacznik fluorescencyjny Fmoc-ACC-OH. W tym celu w dwóch probówkach typu Falcon o pojemności 50 ml odważono Fmoc-ACC-OH (8,16 g, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i HATU (7,03 g, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Zawartość każdej próbki rozpuszczono w 45 ml DMF i dodano 2,4,6-kolidynę (2,44 ml, 18,5 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Roztwory aktywowano przez 3 minuty, rozpipetowano do reaktorów (0,8 ml na dołek) i pozostawiono na kołysce na 24 godziny. Po tym czasie żywicę przemyto trzykrotnie DMF, dodano świeżą porcję aktywowanego roztworu Fmoc-ACC-OH, HATU i 2,4,6-kolidyny i pozostawiono na kolejne 24 godziny. Po tym czasie przeprowadzono test ninhydrinowy (wynik negatywny) i usunięto grupę ochronną Fmoc. Następnie żywicę przemyto trzykrotnie DMF, trzykrotnie DCM, trzykrotnie MeOH i wysuszono w eksykatorze nad bezwodnym P₂O₅. Ostatni etap syntezy polegał na hydrolizie peptydów z żywicy. Do tego celu wykorzystano mieszaninę kwas trifluorooctowy (TFA): triizopropylsilan (TIPS): woda w stosunku 95:2,5:2,5. Reakcję hydrolizy prowadzono przez 2 godziny, a następnie roztwór z każdego dołka przeniesiono do osobnej próbki typu Falcon o objętości 15 ml. Do każdej próbki dodano zimny eter dietylowy do objętości 12 ml. Wytrącony osad zwirowano (4°C, 4 minuty, 4400 rpm), a następnie zlano roztwór i uzupełniono świeżą porcją eteru do objętości 6 ml. Zawartość probówek wymieszano, a następnie znów zwirowano i zlano roztwór z nad osadu. Otrzymane osady pozostawiono do wysuszenia na powietrzu, a następnie oczyszczono za pomocą HPLC i zliofilizowano. Gotowe proszki rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w temperaturze -20°C do momentu badań. Każdy z otrzymanych związków poddano analizie LC-MS, a ich czystość wynosiła przynajmniej 95%.

Tabela 13. Struktura podbiblioteki: ACC-Gly-Lys-Pro-Nle-Asp-P1'-Val-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



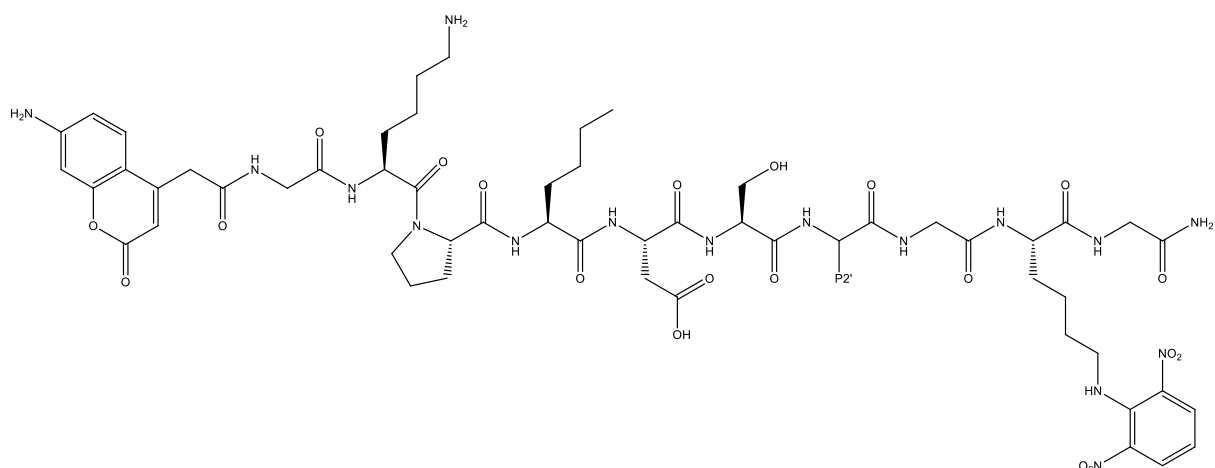
Numer substratu	Aminokwas w pozycji P1'	(M+H) ²⁺ obliczone	(M+H) ²⁺ zmierzone
1	L-Ala	654,29	654,48
2	L-Arg	696,83	697,08
3	L-Asn	675,80	676,04
4	L-Asp	676,29	676,50
5	L-Gln	683,30	683,51
6	L-Glu	682,82	682,98
7	Gly	647,29	647,45
8	L-His	687,31	687,50
9	L-Ile	675,32	675,56
10	L-Leu	675,32	675,57
11	L-Lys	682,82	683,05
12	L-Nle	675,32	675,57
13	L-Phe	692,32	692,53
14	L-Pro	667,3	667,41
15	L-Ser	662,29	662,57
16	L-Thr	669,30	669,55
17	L-Trp	711,82	712,13
18	L-Tyr	700,31	700,62
19	L-Val	668,32	668,57

20	D-Ala	654,29	654,42
21	D-Arg	696,83	697,02
22	D-Asn	675,8	675,93
23	D-Asp	676,29	676,44
24	D-Gln	682,82	682,92
25	D-Glu	683,30	683,45
26	D-His	687,31	687,46
27	D-Leu	675,32	675,43
28	D-Lys	682,82	682,97
29	D-Phe	692,32	692,48
30	D-Pro	667,3	667,44
31	D-Ser	662,29	662,42
32	D-Phg	685,31	685,44
33	D-Thr	669,30	669,42
34	D-Trp	711,82	712,01
35	D-Tyr	700,31	700,50
36	D-Val	668,32	668,40
37	D-hPhe	699,32	699,49
38	β -Ala	654,29	654,30
39	L-Cit	697,32	697,49
40	L-hCit	704,33	704,52
41	L-Agp	682,81	682,96
42	L-Arg(NO ₂)	719,32	719,51
43	L-Aad	690,32	690,58
44	L-hArg	703,85	704,12
45	L-Phe(NH ₂)	699,82	700,10
46	L-Phe(guan)	720,83	721,04
47	L-Aze	660,29	680,42
48	L-Hyp	675,3	675,44

49	L-Hyp(Bzl)	720,33	720,52
50	L-Thz	676,29	676,46
51	L-Oic	694,33	694,5
52	L-Idc	691,31	691,55
53	L-Pip	674,32	674,62
54	L-Tic	698,32	698,5
55	L-Inp	674,32	674,44
56	L-2-Fal	687,30	687,48
57	L-Dap	661,80	681,94
58	L-Dab	668,81	668,97
59	L-Dab(Z)	736,03	736,08
60	L-Orn	675,82	675,99
61	L-Lys(TFA)	730,82	731,04
62	L-Lys(Ac)	703,78	704,02
63	L-Lys(2-ClZ)	766,83	767,04
64	L-Lys(Me)	689,84	690,12
65	L-His(Bzl)	732,33	732,59
66	L-His(3-Bom)	747,34	747,67
67	L-Ala(2-th)	695,29	695,49
68	L-Ala(Bth)	687,30	721,01
69	Aib	661,31	661,42
70	L-Abu	661,32	661,43
71	L-Trp(Me)	718,77	719,03
72	L-Ser(Ac)	683,30	654,16
73	L-Ser(Bzl)	707,32	707,45
74	L-hSer	669,30	669,44
75	L-hSer(Bzl)	714,33	714,52
76	L-Thr(Bzl)	714,33	714,52
77	L-Cys(Bzl)	715,31	715,61

78	L-Cys(MeBzl)	722,32	722,6
79	L-Cys(4-MeOBzl)	730,31	730,58
80	L-Met	684,30	684,47
81	L-Met(O)	692,29	692,48
82	L-Met(O)2	700,29	700,48
83	L-Igl	705,32	705,55
84	L-hPhe	699,32	699,5
85	L-Chg	688,33	688,52
86	L-Cha	695,34	695,53
87	L-hCha	702,35	702,58
88	L-Tle	675,32	675,52
89	L-hLeu	682,33	682,49
90	L-3-Pal	692,81	692,98
91	L-4-Pal	692,81	693,02
92	L-1-Nal	717,32	717,54
93	L-2-Nal	717,32	717,57
94	L-Bip	730,33	730,62
95	L-Bpa	744,33	744,61
96	L-Nva	668,45	668,64

Tabela 14. Struktura podbiblioteki: ACC-Gly-Lys-Pro-Nle-Asp-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



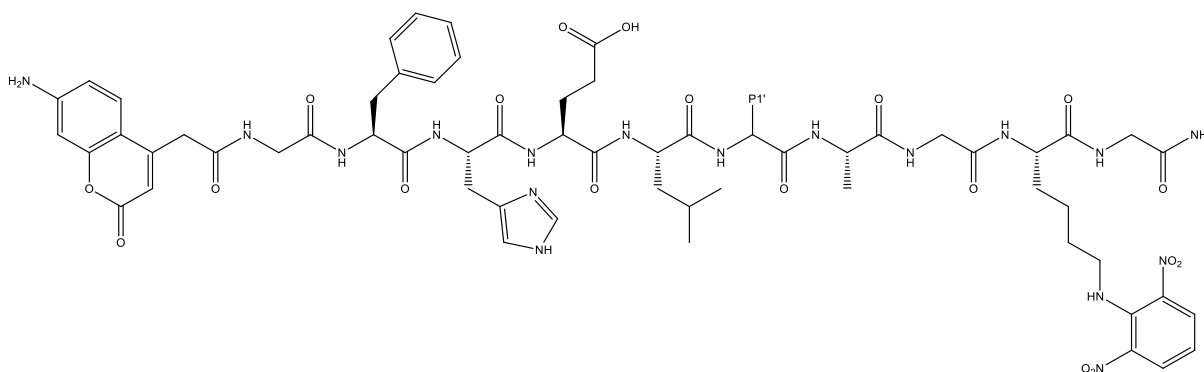
Numer substratu	Aminokwas w pozycji P1'	(M+H) ²⁺ obliczone	(M+H) ²⁺ zmierzone
1	L-Ala	647,78	648,42
2	L-Arg	690,81	691,01
3	L-Asn	669,29	669,92
4	L-Asp	670,28	670,40
5	L-Gln	677,28	677,43
6	L-Glu	676,79	676,94
7	Gly	640,27	641,40
8	L-His	680,29	681,46
9	L-Ile	669,30	669,44
10	L-Leu	669,30	669,44
11	L-Lys	676,81	676,96
12	L-Nle	669,30	669,46
13	L-Phe	686,29	686,51
14	L-Pro	661,29	661,45
15	L-Ser	656,28	656,40
16	L-Thr	663,29	663,42
17	L-Trp	705,80	706,11
18	L-Tyr	694,29	694,49
19	L-Val	662,29	662,44

20	D-Ala	647,78	648,45
21	D-Arg	690,81	691,00
22	D-Asn	669,29	669,95
23	D-Asp	670,28	670,44
24	D-Gln	677,28	676,99
25	D-Glu	676,79	677,46
26	D-His	680,29	681,50
27	D-Leu	669,30	661,48
28	D-Lys	676,81	656,45
29	D-Phe	686,29	686,51
30	D-Pro	661,29	661,16
31	D-Ser	656,28	656,44
32	D-Phg	679,29	679,56
33	D-Thr	663,29	663,46
34	D-Trp	705,8	706,06
35	D-Tyr	694,29	662,51
36	D-Val	662,29	694,6
37	D-hPhe	693,30	693,44
38	B-Ala	647,78	648,65
39	L-Aze	654,28	654,33
40	L-Hyp	669,29	669,53
41	L-Hyp(Bzl)	714,31	714,56
42	L-Thz	670,29	670,48
43	L-Oic	688,31	688,56
44	L-Idc	685,29	641,96
45	L-Pip	668,29	668,50
46	L-Tic	692,29	692,53
47	L-Inp	690,29	668,50
48	2Fal	674,28	681,51

49	AC5C	668,29	668,47
50	L-Dap	655,79	656,44
51	L-Dab	677,78	663,01
52	L-Dab(Z)	722,81	730,04
53	L-Cit	691,31	691,47
54	L-hCit	698,31	699,09
55	L-Orn	669,58	670,49
56	L-hArg	697,82	698,10
57	L-His(Bzl)	726,32	726,56
58	L-His(3-Bom)	741,32	741,64
59	L-3-Pal	686,79	687,04
60	L-4-Pal	686,79	686,98
61	L-Ala(2-th)	689,29	689,52
62	L-Ala(Bth)	714,78	715,12
63	Aib	655,29	655,92
64	L-Abu	655,29	655,44
65	L-Ser(Ac)	677,28	701,50
66	L-Ser(Bzl)	701,30	701,98
67	L-hSer	663,29	663,44
68	L-hSer(Bzl)	708,31	708,59
69	L-Thr(Bzl)	708,29	708,58
70	L-Cys(Bzl)	709,29	709,58
71	L-Cys(MeBzl)	716,29	716,83
72	L-Cys(4-MeOBzl)	724,28	724,43
73	L-Met	678,28	678,52
74	L-Met(O)	686,28	686,54
75	L-Met(O)2	694,28	694,52
76	L-Bip	724,31	724,59
77	L-Bpa	738,31	738,63

78	L-hPhe	693,30	693,57
79	L-Chg	682,31	689,56
80	L-Cha	689,32	689,55
81	L-hCha	696,33	696,57
82	L-Igl	699,30	699,56
83	L-1-Nal	711,31	711,57
84	L-2-Nal	711,32	711,95
85	L-hLeu	676,31	676,47
86	L-Tle	669,30	699,56
87	L-Tyr(Me)	701,30	701,48
88	L-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)	773,28	773,44
89	L-Tyr(Bzl)	739,32	739,62
90	L-Tyr(2-Br-Z)	800,27	800,40
91	L-hTyr	701,30	701,50
92	L-hTyr(Me)	708,31	708,74
93	L-Nva	662,29	662,43
94	2-Abz	672,28	672,42
95	3-Abz	672,28	672,42
96	4-Abz	672,28	672,42

Tabela 15. Struktura podbiblioteki: ACC-Gly-Phe-His-Glu-Leu-P1'-Ala-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Numer substratu	Aminokwas w pozycji P1'	(M+H) ²⁺ obliczone	(M+H) ²⁺ zmierzone
-----------------	-------------------------	-------------------------------	-------------------------------

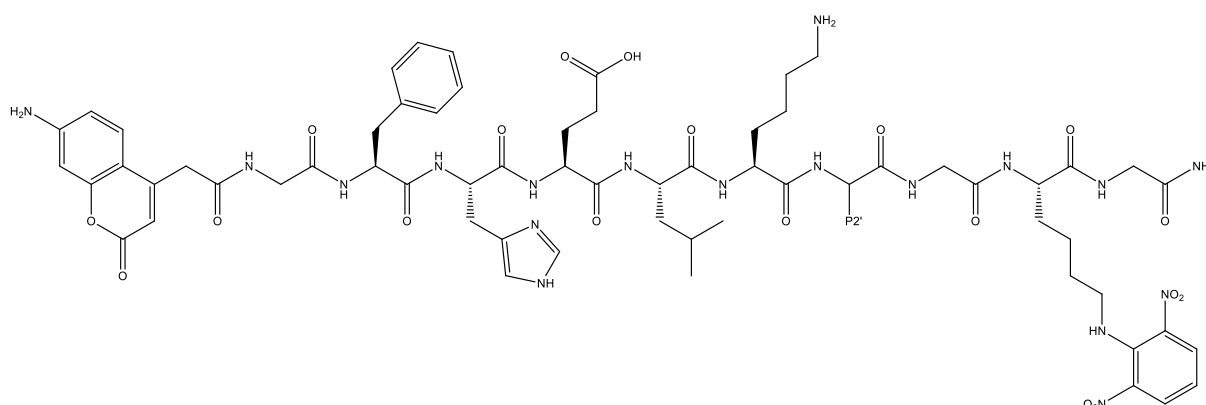
1	L-Ala	676,78	677,12
2	L-Arg	719,31	719,69
3	L-Asn	698,28	698,6
4	L-Asp	698,78	699,12
5	L-Gln	705,78	706,14
6	L-Glu	705,29	705,64
7	Gly	669,77	670,06
8	L-His	709,79	710,16
9	L-Ile	697,80	698,17
10	L-Leu	697,80	698,18
11	L-Lys	705,31	705,69
12	L-Nle	697,80	698,17
13	L-Phe	714,80	715,2
14	L-Pro	689,79	690,12
15	L-Ser	684,78	685,06
16	L-Thr	691,79	692,11
17	L-Trp	734,30	734,67
18	L-Tyr	722,79	723,15
19	L-Val	690,80	691,12
20	D-Ala	676,78	677,09
21	D-Arg	719,31	719,59
22	D-Asn	698,28	698,61
23	D-Asp	698,78	699,07
24	D-Gln	705,29	705,63
25	D-Glu	705,78	706,1
26	D-His	709,79	710,12
27	D-Leu	697,80	698,2
28	D-Lys	705,31	705,73
29	D-Phe	714,78	715,21

30	D-Pro	689,79	690,15
31	D-Ser	684,78	685,11
32	D-Phg	708,22	708,22
33	D-Thr	691,79	692,12
34	D-Trp	734,30	734,70
35	D-Tyr	722,79	723,15
36	D-Val	690,80	691,16
37	D-hPhe	721,80	722,18
38	β -Ala	676,78	677,11
39	L-Cit	720,23	720,31
40	L-hCit	727,54	727,63
41	L-Agp	705,71	706,11
42	L-Agb	712,73	713,14
43	L-Arg(Z)2	853,87	854,11
44	L-hArg	726,75	727,04
45	L-Phe(NH2)	722,74	722,65
46	L-Phe(guan)	743,76	743,55
47	L-Asp(O-Me)	705,78	706,10
48	L-Asp(O-CHx)	739,81	740,43
49	L-Asp(O-Bzl)	743,79	744,21
50	L-Glu(O-Me)	712,79	713,71
51	L-Glu(O-CHx)	746,82	747,18
52	L-Glu(O-Bzl)	750,81	751,34
53	L-Aad	712,79	713,33
54	L-Phe(2-F)	723,79	724,17
55	L-Phe(3-F)	723,79	724,09
56	L-Phe(4-F)	723,79	724,08
57	L-Phe(3,4-F2)	732,79	733,27
58	L-Phe(4-NO2)	731,78	732,24

59	L-Phe(2-Cl)	731,78	732,29
60	L-Phe(3-Cl)	731,78	732,11
61	L-Phe(4-Cl)	748,76	749,12
62	L-Phe(3,4-Cl ₂)	753,75	754,07
63	L-Phe(4-Br)	777,74	778,16
64	L-Phe(3-I)	777,74	778,22
65	L-Phe(4-I)	721,80	722,01
66	L-Phe(4-Me)	723,79	724,17
67	L-Ala(2-th)	717,78	718,21
68	L-Ala(Bth)	743,28	743,69
69	Aib	683,79	684,14
70	L-Abu	683,79	684,12
71	L-Abu(Bth)	729,80	730,19
72	L-Ser(Ac)	706,05	706,12
73	L-Ser(Bzl)	729,80	730,19
74	L-hSer	691,79	692,02
75	L-hSer(Bzl)	736,81	737,18
76	L-Thr(Bzl)	736,81	737,21
77	L-Cys(Bzl)	737,79	738,15
78	L-Cys(MeBzl)	744,80	745,16
79	L-Cys(4-MeOBzl)	752,80	753,13
80	L-Met	706,78	707,14
81	L-Met(O)	714,78	715,12
82	L-Met(O) ₂	722,78	723,14
83	L-Phg	708,22	708,22
84	L-hPhe	721,80	722,17
85	L-Chg	710,81	711,16
86	L-Cha	717,81	717,81
87	L-hCha	724,77	724,65

88	L-2-Aoc	711,82	712,02
89	L-hLeu	704,81	705,16
90	L-Tyr(Me)	729,80	729,73
91	L-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)	801,78	802,2
92	L-Tyr(Bzl)	767,82	768,31
93	L-Tyr(2-Br-Z)	829,75	830,05
94	L-hTyr	729,80	730,41
95	L-hTyr(Me)	736,81	737,13
96	L-Nva	690,80	691,16

Tabela 16. Struktura podbiblioteki: ACC-Gly-Phe-His-Glu-Leu-Lys'-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



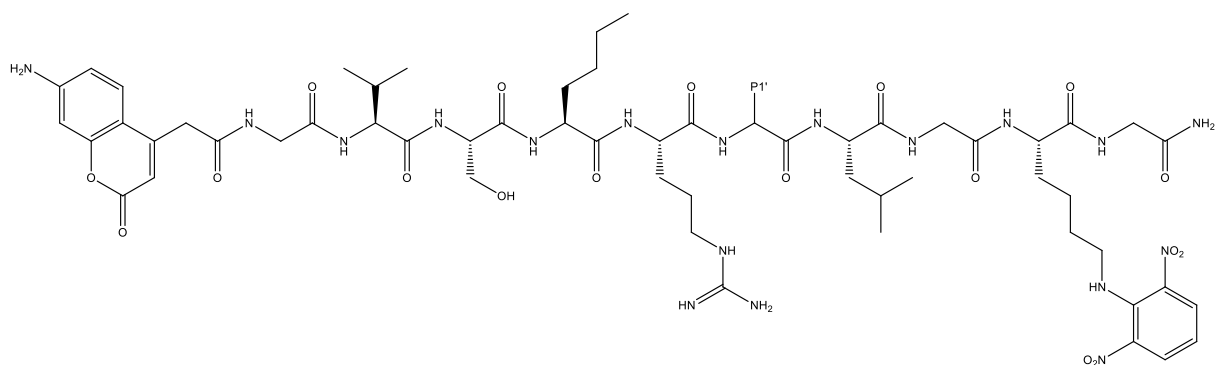
Numer substratu	Aminokwas w pozycji P1'	(M+H) ²⁺ obliczone	(M+H) ²⁺ zmierzone
1	L-Ala	705,31	705,66
2	L-Arg	747,84	748,22
3	L-Asn	726,81	727,17
4	L-Asp	727,31	727,67
5	L-Gln	734,31	734,73
6	L-Glu	733,82	734,24
7	Gly	698,30	698,33
8	L-His	738,32	738,71
9	L-Ile	726,33	726,72

10	L-Leu	726,33	726,75
11	L-Lys	733,84	734,14
12	L-Nle	726,33	726,73
13	L-Phe	743,33	743,73
14	L-Pro	718,32	718,71
15	L-Ser	713,31	713,72
16	L-Thr	720,32	720,73
17	L-Trp	762,83	763,22
18	L-Tyr	751,32	751,71
19	L-Val	719,33	719,71
20	D-Ala	705,31	705,66
21	D-Arg	747,84	748,18
22	D-Asn	726,81	727,15
23	D-Asp	727,31	727,69
24	D-Gln	733,82	734,19
25	D-Glu	734,31	734,69
26	D-His	738,32	738,64
27	D-Leu	726,33	726,77
28	D-Lys	733,84	734,23
29	D-Phe	743,31	743,72
30	D-Pro	718,32	718,68
31	D-Ser	713,31	713,65
32	D-Phg	736,77	737,02
33	D-Thr	720,32	720,65
34	D-Trp	762,83	763,20
35	D-Tyr	751,32	751,70
36	D-Val	719,33	719,66
37	D-hPhe	750,33	750,74
38	β -Ala	705,31	705,67

39	L-Cit	748,78	748,82
40	L-hCit	755,59	755,96
41	L-Agp	734,26	734,55
42	L-Agb	740,27	740,45
43	L-Arg(Z)2	875,41	875,55
44	L-hArg	755,30	755,44
45	L-Phe(NH ₂)	751,33	751,17
46	L-Phe(guan)	772,31	772,41
47	L-Asp(O-Me)	734,31	734,44
48	L-Asp(O-CH _x)	768,34	768,55
49	L-Asp(O-Bzl)	772,32	772,45
50	L-Glu(O-Me)	741,32	741,67
51	L-Glu(O-CH _x)	775,35	775,75
52	L-Glu(O-Bzl)	779,34	779,78
53	L-Aad	741,76	742,33
54	L-Phe(2-F)	752,32	752,75
55	L-Phe(3-F)	752,32	752,77
56	L-Phe(4-F)	752,32	752,71
57	L-Phe(3,4-F ₂)	761,32	761,68
58	L-Phe(4-NO ₂)	760,31	760,88
59	L-Phe(2-Cl)	760,31	761,54
60	L-Phe(3-Cl)	760,31	761,33
61	L-Phe(4-Cl)	777,29	777,88
62	L-Phe(3,4-Cl ₂)	782,28	783,41
63	L-Phe(4-Br)	806,27	806,64
64	L-Phe(3-I)	806,27	806,81
65	L-Phe(4-I)	750,33	750,81
66	L-Phe(4-Me)	752,32	752,75
67	L-Ala(2-th)	746,31	746,72

68	L-Ala(Bth)	771,81	772,19
69	Aib	712,32	712,69
70	L-Abu	712,32	712,68
71	L-Abu(Bth)	778,91	779,12
72	L-Ser(Ac)	734,80	735,21
73	L-Ser(Bzl)	758,33	758,75
74	L-hSer	720,32	720,68
75	L-hSer(Bzl)	765,34	765,72
76	L-Thr(Bzl)	765,34	765,72
77	L-Cys(Bzl)	766,32	766,82
78	L-Cys(MeBzl)	773,33	773,74
79	L-Cys(4-MeOBzl)	781,33	781,74
80	L-Met	735,31	735,74
81	L-Met(O)	743,31	743,72
82	L-Met(O)2	751,31	751,76
83	L-Phg	736,77	737,02
84	L-hPhe	750,33	750,73
85	L-Chg	739,34	739,73
86	L-Cha	746,34	746,66
87	L-hCha	753,55	753,67
88	L-2-Aoc	740,35	740,73
89	L-hLeu	733,34	733,73
90	L-Tyr(Me)	758,33	758,75
91	L-Tyr(2,6-Cl ₂ -Bzl)	830,31	830,74
92	L-Tyr(Bzl)	796,35	796,75
93	L-Tyr(2-Br-Z)	858,29	858,44
94	L-hTyr	758,33	758,73
95	L-hTyr(Me)	765,34	765,71
96	L-Nva	719,33	719,71

Tabela 17. Struktura podbiblioteki: ACC-Gly-VaL-Thr-Nle-Arg-P1'-Leu-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Numer substratu	Aminokwas w pozycji P1'	(M+H) ²⁺ obliczone	(M+H) ²⁺ zmierzone
1	L-Ala	669,44	669,56
2	L-Arg	712,21	712,13
3	L-Asn	691,88	690,93
4	L-Asp	691,33	691,44
5	L-Gln	698,74	698,46
6	L-Glu	698,74	698,89
7	Gly	662,32	622,42
8	L-His	702,33	702,50
9	L-Ile	690,35	690,47
10	L-Leu	690,35	690,44
11	L-Lys	697,85	698,27
12	L-Nle	690,35	690,43
13	L-Phe	707,34	707,48
14	L-Pro	682,32	682,44
15	L-Ser	677,33	677,44
16	L-Thr	684,33	684,43
17	L-Trp	726,84	726,99
18	L-Tyr	715,34	715,49
19	L-Val	683,44	683,44

20	D-Ala	669,44	669,43
21	D-Arg	712,21	712,33
22	D-Asn	691,88	691,94
23	D-Asp	691,33	691,41
24	D-Gln	697,74	697,96
25	D-Glu	698,74	698,4
26	D-His	702,33	702,53
27	D-Leu	690,35	690,57
28	D-Lys	697,85	698,04
29	D-Phe	707,34	707,46
30	D-Pro	682,32	682,42
31	D-Ser	677,33	677,43
32	D-Phg	700,33	700,47
33	D-Thr	684,33	684,47
34	D-Trp	726,84	727,06
35	D-Tyr	715,34	715,54
36	D-Val	683,34	683,44
37	D-hPhe	714,35	715,38
38	β -Ala	669,32	669,58
39	L-Cit	713,02	712,57
40	L-hCit	719,36	719,49
41	L-Agp	698,25	698,45
42	L-Agb	705,13	705,33
43	L-Arg(Z) ₂	846,41	846,55
44	L-hArg	719,29	719,65
45	L-Phe(NH ₂)	715,28	715,65
46	L-Phe(guan)	736,31	736,47
47	L-Asp(O-Me)	698,32	698,44
48	L-Asp(O-CH _x)	732,59	732,87

49	L-Asp(O-Bzl)	736,33	736,54
50	L-Glu(O-Me)	705,33	705,48
51	L-Glu(O-CHx)	739,37	739,52
52	L-Glu(O-Bzl)	743,45	743,49
53	L-Aad	705,75	705,88
54	L-Phe(2-F)	716,33	716,6
55	L-Phe(3-F)	716,33	716,73
56	L-Phe(4-F)	716,33	716,6
57	L-Phe(3,4-F2)	725,33	725,67
58	L-Phe(4-NO2)	729,83	730,25
59	L-Phe(2-Cl)	724,32	724,99
60	L-Phe(3-Cl)	724,32	724,87
61	L-Phe(4-Cl)	724,32	724,62
62	L-Phe(3,4-Cl2)	741,30	741,28
63	L-Phe(4-Br)	746,29	747,22
64	L-Phe(3-I)	770,28	770,64
65	L-Phe(4-I)	770,28	770,6
66	L-Phe(4-Me)	714,34	714,81
67	L-Ala(2-th)	710,32	710,45
68	L-Ala(Bth)	735,82	736
69	Aib	676,33	676,45
70	L-Abu	676,33	676,47
71	L-Abu(Bth)	742,84	743,09
72	L-Ser(Ac)	698,33	688,13
73	L-Ser(Bzl)	722,35	722,46
74	L-hSer	684,33	684,43
75	L-hSer(Bzl)	729,35	729,02
76	L-Thr(Bzl)	729,35	729,47
77	L-Cys(Bzl)	730,33	730,44

1	L-Ala	656,30	656,42
2	L-Arg	698,83	698,70
3	L-Asn	677,81	677,92
4	L-Asp	678,29	678,40
5	L-Gln	685,31	685,38
6	L-Glu	684,86	684,91
7	Gly	649,29	649,39
8	L-His	689,31	689,36
9	L-Ile	677,33	677,41
10	L-Leu	677,33	677,44
11	L-Lys	684,83	684,07
12	L-Nle	677,33	677,38
13	L-Phe	694,32	694,31
14	L-Pro	669,31	669,31
15	L-Ser	664,30	664,30
16	L-Thr	670,80	669,42
17	L-Trp	713,82	714,11
18	L-Tyr	702,32	702,35
19	L-Val	670,32	670,45
20	D-Ala	656,30	656,41
21	D-Arg	698,83	698,60
22	D-Asn	677,81	667,82
23	D-Asp	678,29	678,34
24	D-Gln	684,86	684,80
25	D-Glu	685,31	685,30
26	D-His	689,31	689,41
27	D-Leu	677,33	677,35
28	D-Lys	684,83	684,87
29	D-Phe	694,31	694,47

30	D-Pro	669,31	669,43
31	D-Ser	664,30	664,43
32	D-Phe	687,31	687,47
33	D-Thr	671,31	671,44
34	D-Trp	713,82	713,81
35	D-Tyr	702,32	702,55
36	D-Val	670,32	670,44
37	D-hPhe	701,33	701,29
38	β -Ala	663,31	656,30
39	L-Cit	699,33	699,42
40	L-hCit	706,33	706,37
41	L-Agp	685,21	685,56
42	L-Agb	692,22	692,41
43	L-Arg(Z)2	833,37	833,44
44	L-hArg	697,85	698,05
45	L-Phe(NH2)	702,24	702,32
46	L-Phe(guan)	723,26	723,41
47	L-Asp(O-Me)	685,31	685,41
48	L-Asp(O-CHx)	719,76	719,88
49	L-Asp(O-Bzl)	723,32	723,55
50	L-Glu(O-Me)	692,32	692,82
51	L-Glu(O-CHx)	726,36	726,86
52	L-Glu(O-Bzl)	730,44	730,94
53	L-Aad	691,81	692,55
54	L-Phe(2-F)	703,32	703,82
55	L-Phe(3-F)	703,32	703,82
56	L-Phe(4-F)	703,32	703,82
57	L-Phe(3,4-F2)	712,32	712,82
58	L-Phe(4-NO2)	716,82	717,32

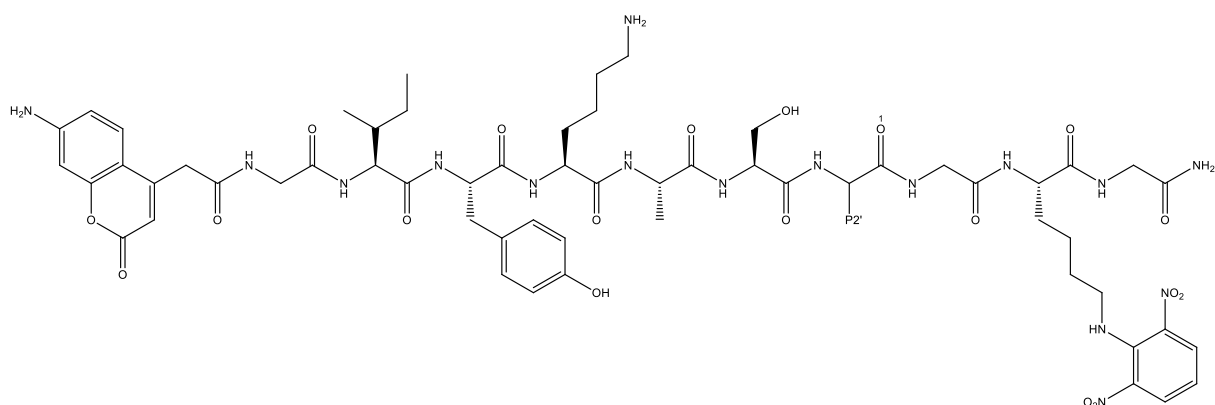
59	L-Phe(2-Cl)	711,31	711,77
60	L-Phe(3-Cl)	711,31	711,75
61	L-Phe(4-Cl)	711,31	711,69
62	L-Phe(3,4-Cl ₂)	728,29	728,79
63	L-Phe(4-Br)	733,28	733,78
64	L-Phe(3-I)	757,27	757,77
65	L-Phe(4-I)	757,27	757,77
66	L-Phe(4-Me)	701,33	701,83
67	L-Ala(2-th)	696,29	696,47
68	L-Ala(Bth)	714,85	715,08
69	Aib	663,31	663,44
70	L-Abu	663,31	663,45
71	L-Abu(Bth)	730,28	730,55
72	L-Ser(Ac)	685,31	685,45
73	L-Ser(Bzl)	702,32	702,66
74	L-hSer	671,28	671,44
75	L-hSer(Bzl)	716,55	716,58
76	L-Thr(Bzl)	715,88	716,52
77	L-Cys(Bzl)	717,31	717,52
78	L-Cys(MeBzl)	724,32	724,56
79	L-Cys(4-MeOBzl)	732,32	732,53
80	L-Met	686,30	686,46
81	L-Met(O)	694,30	694,45
82	L-Met(O) ₂	701,79	702,46
83	L-Phg	687,72	687,88
84	L-hPhe	701,33	701,52
85	L-Chg	690,33	690,51
86	L-Cha	697,34	697,69
87	L-hCha	704,35	704,42

11	L-Lys	709,82	709,83
12	L-Nle	702,31	702,29
13	L-Phe	719,31	719,39
14	L-Pro	694,33	694,28
15	L-Ser	689,29	689,31
16	L-Thr	696,29	696,29
17	L-Trp	738,81	738,91
18	L-Tyr	727,31	727,38
19	L-Val	695,31	695,44
20	D-Ala	681,29	681,34
21	D-Arg	723,73	723,87
22	D-Asn	702,79	702,56
23	D-Asp	703,28	703,24
24	D-Gln	709,81	709,71
25	D-Glu	710,29	710,59
26	D-His	714,34	714,34
27	D-Leu	702,31	702,34
28	D-Lys	709,82	710,26
29	D-Phe	719,31	720,01
30	D-Pro	694,35	694,22
31	D-Ser	689,29	689,24
32	D-Phg	712,36	712,24
33	D-Thr	696,29	697,65
34	D-Trp	738,81	738,85
35	D-Tyr	727,36	727,15
36	D-Val	695,31	695,91
37	D-hPhe	726,315	726,26
38	β -Ala	681,29	680,85
39	L-Cit	724,31	724,29

40	L-hCit	731,35	731,37
41	L-Agp	709,85	709,56
42	L-Agb	716,85	717,11
43	L-Arg(Z)2	857,86	858,04
44	L-hArg	730,83	730,93
45	L-Phe(NH2)	726,81	726,66
46	L-Phe(guan)	747,85	747,9
47	L-Asp(O-Me)	710,25	710,25
48	L-Asp(O-CHx)	744,35	744,48
49	L-Asp(O-Bzl)	748,31	748,31
50	L-Glu(O-Me)	717,34	717,44
51	L-Glu(O-CHx)	751,35	751,5
52	L-Glu(O-Bzl)	755,31	756,24
53	L-Aad	717,31	717,52
54	L-Phe(2-F)	728,31	728,36
55	L-Phe(3-F)	728,31	728,41
56	L-Phe(4-F)	728,31	728,35
57	L-Phe(3,4-F2)	737,29	737,56
58	L-Phe(4-NO2)	741,85	741,94
59	L-Phe(2-Cl)	736,28	736,35
60	L-Phe(3-Cl)	736,28	736,39
61	L-Phe(4-Cl)	736,28	736,44
62	L-Phe(3,4-Cl2)	753,26	753,98
63	L-Phe(4-Br)	758,26	758,99
64	L-Phe(3-I)	782,25	782,77
65	L-Phe(4-I)	782,25	782,47
66	L-Phe(4-Me)	726,31	726,39
67	L-Ala(2-th)	722,28	722,38
68	L-Ala(Bth)	747,79	747,86

69	Aib	688,33	688,37
70	L-Abu	688,33	688,45
71	L-Abu(Bth)	754,79	755,14
72	L-Ser(Ac)	710,29	710,43
73	L-Ser(Bzl)	734,31	734,78
74	L-hSer	696,29	696,39
75	L-hSer(Bzl)	741,32	741,64
76	L-Thr(Bzl)	741,32	741,52
77	L-Cys(Bzl)	742,33	742,39
78	L-Cys(MeBzl)	749,31	749,43
79	L-Cys(4-MeOBzl)	757,31	757,39
80	L-Met	711,29	711,35
81	L-Met(O)	719,29	719,42
82	L-Met(O)2	727,28	727,34
83	L-Phg	712,3	712,43
84	L-hPhe	726,315	726,45
85	L-Chg	715,32	715,45
86	L-Cha	722,33	722,41
87	L-hCha	729,34	729,49
88	L-2-Aoc	716,33	716,49
89	L-hLeu	709,32	709,55
90	L-Tyr(Me)	734,31	734,45
91	L-Tyr(2,6-Cl2-Bzl)	806,29	806,89
92	L-Tyr(Bzl)	772,33	772,46
93	L-Tyr(2-Br-Z)	833,28	833,45
94	L-hTyr	734,31	734,44
95	L-hTyr(Me)	741,32	741,44
96	L-Nva	695,31	695,53

Tabela 20. Struktura podbiblioteki: ACC-Gly-Ile-Tyr-Lys-Ala-Ser-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH₂



Numer substratu	Aminokwas w pozycji P2'	(M+H) ²⁺ obliczone	(M+H) ²⁺ zmierzone
1	L-Ala	659,56	659,66
2	L-Arg	702,23	701,84
3	L-Asn	681,19	681,56
4	L-Asp	680,68	681,32
5	L-Gln	688,71	688,28
6	L-Glu	688,25	687,77
7	Gly	652,12	652,24
8	L-His	692,32	692,39
9	L-Ile	680,32	680,32
10	L-Leu	680,32	680,74
11	L-Lys	687,82	687,94
12	L-Nle	680,31	679,71
13	L-Phe	697,31	698,83
14	L-Pro	672,31	672,77
15	L-Ser	667,29	667,24
16	L-Thr	674,29	674,59
17	L-Trp	716,81	716,89
18	L-Tyr	705,3	705,29
19	L-Val	673,31	673,45
20	D-Ala	659,29	659,51

21	D-Arg	702,23	701,86
22	D-Asn	681,19	681,12
23	D-Asp	680,68	682,64
24	D-Gln	688,21	687,96
25	D-Glu	688,71	688,44
26	D-His	692,31	692,66
27	D-Leu	680,32	680,81
28	D-Lys	687,82	687,87
29	D-Phe	697,33	697,41
30	D-Pro	672,34	672,24
31	D-Ser	667,29	667,35
32	D-Phg	690,72	690,84
33	D-Thr	674,29	674,49
34	D-Trp	716,81	717,21
35	D-Tyr	705,3	705,65
36	D-Val	673,3	673,82
37	D-hPhe	704,13	704,42
38	β -Ala	659,5	659,64
39	L-Cit	702,55	702,60
40	L-hCit	709,74	710,48
41	L-Agp	688,21	688,64
42	L-Agb	695,22	695,41
43	L-Arg(Z)2	836,37	836,49
44	L-hArg	709,25	709,28
45	L-Phe(NH2)	704,81	704,22
46	L-Phe(guan)	725,82	725,89
47	L-Asp(O-Me)	688,29	688,65
48	L-Asp(O-CHx)	722,32	722,48
49	L-Asp(O-Bzl)	726,25	726,54

50	L-Glu(O-Me)	695,3	695,3
51	L-Glu(O-CHx)	729,3	729,33
52	L-Glu(O-Bzl)	733,21	733,34
53	L-Aad	695,5	695,32
54	L-Phe(2-F)	706,32	706,59
55	L-Phe(3-F)	706,32	706,44
56	L-Phe(4-F)	706,32	706,32
57	L-Phe(3,4-F2)	715,32	715,63
58	L-Phe(4-NO2)	720,34	720,17
59	L-Phe(2-Cl)	714,31	714,38
60	L-Phe(3-Cl)	714,31	714,23
61	L-Phe(4-Cl)	714,31	714,61
62	L-Phe(3,4-Cl2)	731,29	732,84
63	L-Phe(4-Br)	736,28	737,37
64	L-Phe(3-I)	760,27	760,56
65	L-Phe(4-I)	760,27	760,69
66	L-Phe(4-Me)	704,33	704,61
67	L-Ala(2-th)	700,29	700,49
68	L-Ala(Bth)	725,79	726,58
69	Aib	666,3	666,54
70	L-Abu	666,3	666,48
71	L-Abu(Bth)	732,59	732,86
72	L-Ser(Ac)	688,70	688,87
73	L-Ser(Bzl)	712,31	712,33
74	L-hSer	674,29	674,35
75	L-hSer(Bzl)	719,32	719,11
76	L-Thr(Bzl)	719,32	719,38
77	L-Cys(Bzl)	720,30	720,31
78	L-Cys(MeBzl)	727,30	727,73

79	L-Cys(4-MeOBzl)	735,30	735,44
80	L-Met	689,29	689,99
81	L-Met(O)	697,29	697,29
82	L-Met(O)2	705,29	705,27
83	L-Phg	690,72	691,14
84	L-hPhe	703,30	704,39
85	L-Chg	693,34	693,58
86	L-Cha	700,34	700,72
87	L-hCha	707,77	708,11
88	L-2-Aoc	694,33	694,51
89	L-hLeu	687,32	687,24
90	L-Tyr(Me)	712,30	712,38
91	L-Tyr(2,6-Cl2-Bzl)	784,33	784,91
92	L-Tyr(Bzl)	750,32	750,43
93	L-Tyr(2-Br-Z)	812,25	812,45
94	L-hTyr	712,31	712,52
95	L-hTyr(Me)	719,32	719,37
96	L-Nva	673,31	673,51

5.5. Badania kinetyczne bibliotek substratów peptydowych typu IQF P1' i P2'

Zsyntezowane biblioteki P1' i P2' zostały wykorzystane do określenia specyficzności substratowej proteasomu 20S i immunoproteasomu w kieszeniach S5 i S6. Badania kinetyczne przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofluorymetru (Molecular Devices Spectramax Gemini XPS) w 384 dołkowych płytkach (Corning®, płaskie dno, białe) zawierających 1 μ l roztworu substratu w DMSO i 49 μ l roztworu enzymu w buforze (skład buforu: 0,5 mM EDTA, 20 mM HEPES), który był wcześniej inkubowany w temperaturze 37°C. Końcowe stężenie substratów na płytce wynosiło 1 μ M, natomiast stężenie proteasomu 20S 0,5 μ M, a immunoproteasomu 1,5 nM. Pomiar szybkości hydrolizy substratów prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C przy długościach fali: wzbudzenia $\lambda_{exc} = 355$ nm i emisji $\lambda_{em} = 460$

nm. Podczas analizy wybrano jedynie liniowy odcinek przyrostu fluorescencji w czasie (RFU/s). Każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie. Profile specyficzności ludzkich proteasomach w kieszeniach S5 i S6 przedstawiono w postaci wykresów kolumnowych, gdzie najwyższą wartość RFU/s w danej pozycji przedstawiono jako 100% i przyrównano do niej wartości RFU/s pozostałych substratów.

5.6. Badanie wpływu długości łańcucha peptydowego na aktywność proteasomu 20S i immunoproteasomu

Wszystkie substraty peptydowe wykorzystane w badaniu wpływu długości łańcucha na aktywność poszczególnych podjednostek proteasomalnych zostały zsyntezowane w analogiczny sposób jak substraty wcześniej opisanych bibliotek. Każdy z otrzymanych związków oczyszczono na HPLC i poddano analizie LC-MS, a ich czystość wynosiła przynajmniej 95%.

. Badania kinetyczne przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofluorymetru (Molecular Devices Spectramax Gemini XPS) w 384 dołkowych płytkach (Corning®, płaskie dno, białe) zawierających 1 μ l roztworu substratu w DMSO i 49 μ l roztworu enzymu w buforze (skład buforu: 0,5 mM EDTA, 20 mM HEPES), który był wcześniej inkubowany w temperaturze 37°C. Końcowe stężenie substratów na płytce wynosiło 5 μ M, natomiast stężenie proteasomu 20S 1,5 μ M, a immunoproteasomu 3 nM. Pomiar szybkości hydrolizy substratów prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C przy długościach fali: wzbudzenia $\lambda_{exc} = 355$ nm i emisji $\lambda_{em} = 460$ nm. Podczas analizy wybrano jedynie liniowy odcinek przyrostu fluorescencji w czasie (RFU/s). Każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie.

5.7. Synteza inhibitora specyficznego dla podjednostki β 1i ludzkiego immunoproteasomu

Otrzymaną specyficzną sekwencję peptydową wykorzystano do syntezy kowalencyjnego inhibitora. Synteza obejmowała trzy etapy: syntezę grupy wiążącej, syntezę fragmentu peptydowego z linkerem i D-biotyną oraz połączenie obu fragmentów inhibitora.

Synteza grupy wiążącej:

Syntezę grupy wiążącej inhibitora przeprowadzono według metodologii opisanej w literaturze [tu, literatura]. Do kolby okrągłodennej o pojemności 10 ml odważono Fmoc-Leu-OH (1,06 g, 3 mmol), HOBt (495 mg, 3,3 mmol) oraz DCC (681 mg, 3,3 mmol), rozpuszczono w 3 ml DMF i mieszano przez 30 minut w temp. pokojowej. Następnie wytrącony dicykloheksylomocznik odsączono na lejku ze spiekami, a do przesączu dodano chlorowodrek N,O-dimetylohydroksyloaminy (421,2 mg, 3,6 mmol) oraz DIPEA (626,4 μ l, 3,6 mmol). Kolbę umieszczono na mieszadle magnetycznym i reakcję prowadzono przez 2 godziny w temperaturze pokojowej (postęp reakcji prowadzono za pomocą HPLC). Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono w octanie etylu i ekstrahowano NaHCO_3 , 5% roztworem kwasu cytrynowego i solanką. Warstwę organiczną wysuszono za pomocą bezwodnego MgSO_4 i odparowano na wyparce. Otrzymany produkt: Fmoc-Leu-N(CH₃)-O(CH₃) użyto do dalszej syntezy bez wcześniejszego oczyszczania. Otrzymany amid Weinreba rozpuszczono w 5 ml bezwodnego THF i ochłodzono do temperatury 0°C w atmosferze argonu. Kolejno dodano LiAlH_4 (4,5 mmol, 1 M roztwór w THF) i reakcję prowadzono przez 25 minut, a następnie zakończono ją dodając 6 ml 5% roztworu KHSO_4 . Mieszaninę rozcieńczono octanem etylu i ekstrahowano dwukrotnie 5% roztworem KHSO_4 oraz solanką. Fazę organiczną wysuszono za pomocą bezwodnego MgSO_4 i odparowano na wyparce otrzymując Fmoc-Leu-H. W drugiej kolbie umieszczono dietylometylosulfonylmetylofosfonian (690,3 mg, 3 mmol) i rozpuszczono w 6 ml bezwodnego THF. Kolbę umieszczono w łaźni chłodzącej pod argonem, a po 20 minutach dodano do niej NaH (86,4 mg, 3,6 mmol) i mieszano przez 30 minut. Po tym czasie dodano świeżo otrzymany aldehyd Fmoc-Leu-H rozpuszczony w 6 ml bezwodnego THF. Reakcję prowadzono z mieszaniem w atmosferze argonu przez godzinę (postęp reakcji monitorowano za pomocą HPLC). Reakcję zakończono dodając 12 ml 5% roztworu KHSO_4 , a mieszaninę poreakcyjną rozcieńczono w octanie etylu i ekstrahowano 5% roztworem KHSO_4 i solanką. Warstwę organiczną wysuszono za pomocą bezwodnego MgSO_4 i rozpuszczalnik odparowano na wyparce. Surowy produkt Fmoc-Leu-VS oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan:octan etylu 2:1) otrzymując 0,614 g produktu (wydajność 45%).

Synteza fragmentu peptydowego:

Syntezę fragmentu peptydowego z linkerem i znacznikiem – D-biotyną przeprowadzono na podłożu stałym – żywicy 2-chlorotrytylowej o stopniu podstawie 1,6 mmol/g. W szklanym reaktorze odważono 0,3 g żywicy i dodano bezwodny DCM w celu jej spulchnienia. Po 30 minutach żywicę przemyto 3-krotnie DMF. W probówce typu Falcon odważono Fmoc-Phe(4-Br)-OH (559,58 mg, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), dodano 5 ml bezwodnego DCM i DIPEA (209 μ l, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego). Następnie mieszaninę przelano do reaktora z przemytą żywicą. Reakcję prowadzono z mieszaniem przez 3 godziny. Po tym czasie żywicę przemyto 3-krotnie DCM i 3-krotnie DMF. W następnym kroku usunięto grupę ochronną Fmoc dodając 20% roztwór piperydyny w DMF i mieszając żywicę przez 5 minut. Po tym czasie roztwór usunięto, żywicę przemyto 3-krotnie DMF i dodano świeżą porcję 20% roztworu piperydyny w DMF. Żywicę mieszano przez 20 minut, po tym czasie roztwór usunięto i przemyto reaktor 6-krotnie DMF. Po etapie hydrolizy grupy ochronnej Fmoc przeprowadzono test ninhydrynowy na obecność wolnych grup aminowych. W szklanej probówce umieszczono 5% roztwór ninhydryny w alkoholu etylowym i przeniesiono kilka ziaren żywicy. Probówkę umieszczono na 5 minut w termobloku. Po tym czasie zaobserwowano zmianę koloru żywicy z jasnożółtej na ciemnogramatową, co potwierdziło obecność wolnych grup aminowych i całkowitą hydrolizę grupy ochronnej Fmoc. W następnym kroku do żywicy przyłączono linker – glikol polietylenowy (Peg-4). W tym celu w probówce typu Falcon odważono Fmoc-NH-Peg(4)-OH (585 mg, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i HATU (456,3 mg, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), a następnie rozpuszczono w 5 ml DMF. Do mieszaniny dodano kolidynę (158,4 μ l, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i przeniesiono ją do reaktora z żywicą. Reakcję prowadzono przez 2,5 godziny, a po tym czasie usunięto roztwór i przemyto żywicę 3-krotnie DMF. Wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny) i usunięto grupę ochronną Fmoc. W probówce typu Falcon odważono D-biotynę (293,1 mg, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i HATU (456,3 mg, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego), a następnie rozpuszczono w 5 ml DMF. Do mieszaniny dodano kolidynę (158,4 μ l, 1,2 mmol, 2,5 równoważnika molowego) i przeniesiono ją do reaktora z żywicą. Reakcję prowadzono przez 2,5 godziny, a po tym czasie usunięto roztwór i przemyto żywicę 3-krotnie DMF. Wykonano test ninhydrynowy (wynik negatywny), żywicę przemyto 3-krotnie DMF, 3-krotnie DCM i 3-krotnie MeOH i suszono w eksykatorze nad P₂O₅ przez 24 godziny. Ostatni etap syntezy polegał na hydrolizie fragmentu peptydowego z żywicy. W tym celu w reaktorze umieszczono 5 ml mieszaniny TFE/CH₃COOH/DCM (1:1:8, v/v/v). Reakcję hydrolizy

prowadzono przez 30 minut, mieszaninę poreakcyjną zebrano do kolby okrągłodennej i dodano 20 ml heksanu i odparowano na wyparce. Otrzymany osad D-biotyna-Peg(4)-Phe(4-Br)-OH rozpuszczono w mieszaninie ACN:woda (3:1) i zliofilizowano. Produkt użyto do dalszej syntezy bez wcześniejszego oczyszczania.

Połączenie fragmentu peptydowego z grupą wiążącą:

Przed przyłączeniem fragmentu peptydowego do grupy wiążącej, usunięto z niej grupę ochronną Fmoc. W kolbie okrągłodennej umieszczono Fmoc-Leu-VS (48,3 mg, 0,106 mmol) i dodano 4 ml mieszaniny ACN:Et₂NH. Kolbę umieszczono na mieszadle i reakcję prowadzono przez 30 minut, po czym roztwór odparowano na wyparce. Do otrzymanego H₂N-Leu-VS dodano D-biotyna-Peg(4)-Phe(4-Br)-OH (52 mg, 0,106 mmol), HATU (40,3 mg, 0,106 mmol) oraz kolidynę (56 µl, 0,424 mmol) rozpuszczone w 2 ml DMF. Reakcję prowadzono przez 2 godziny (postęp monitorowano za pomocą HPLC). Następnie otrzymany produkt oczyszczono za pomocą HPLC i zliofilizowano otrzymując 16,9 mg proszku (wydajność: 18%). Oczyszczony związek rozpuszczono w DMSO do stężenia 10 mM i przechowywano w temperaturze -20°C do momentu badań.

Tabela 21. Wyniki analizy LCMS dla grupy wiążącej, fragmentu peptydowego oraz gotowego inhibitora.

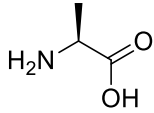
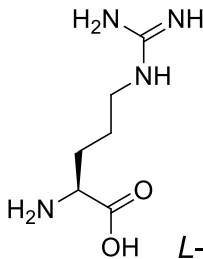
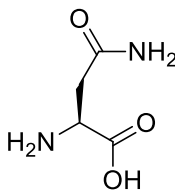
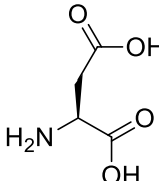
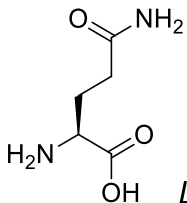
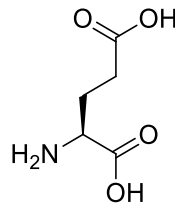
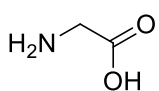
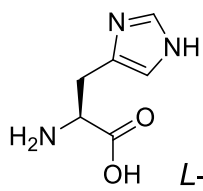
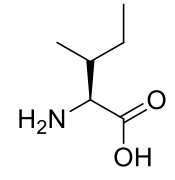
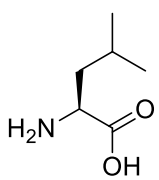
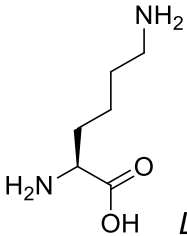
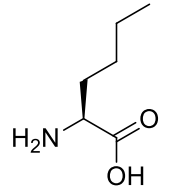
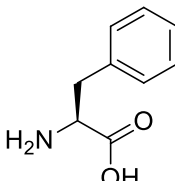
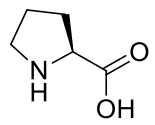
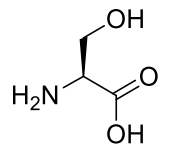
Związek	(M+H) ⁺ obliczone	(M+H) ⁺ zmierzone
Fmoc-Leu-VS	455,57	455,65
D-Biotyna-Peg(4)-Phe(4-Br)-OH	491,60	491,77
D-Biotyna-Peg(4)-Phe(4-Br)-Leu-VS	890,94	891,04

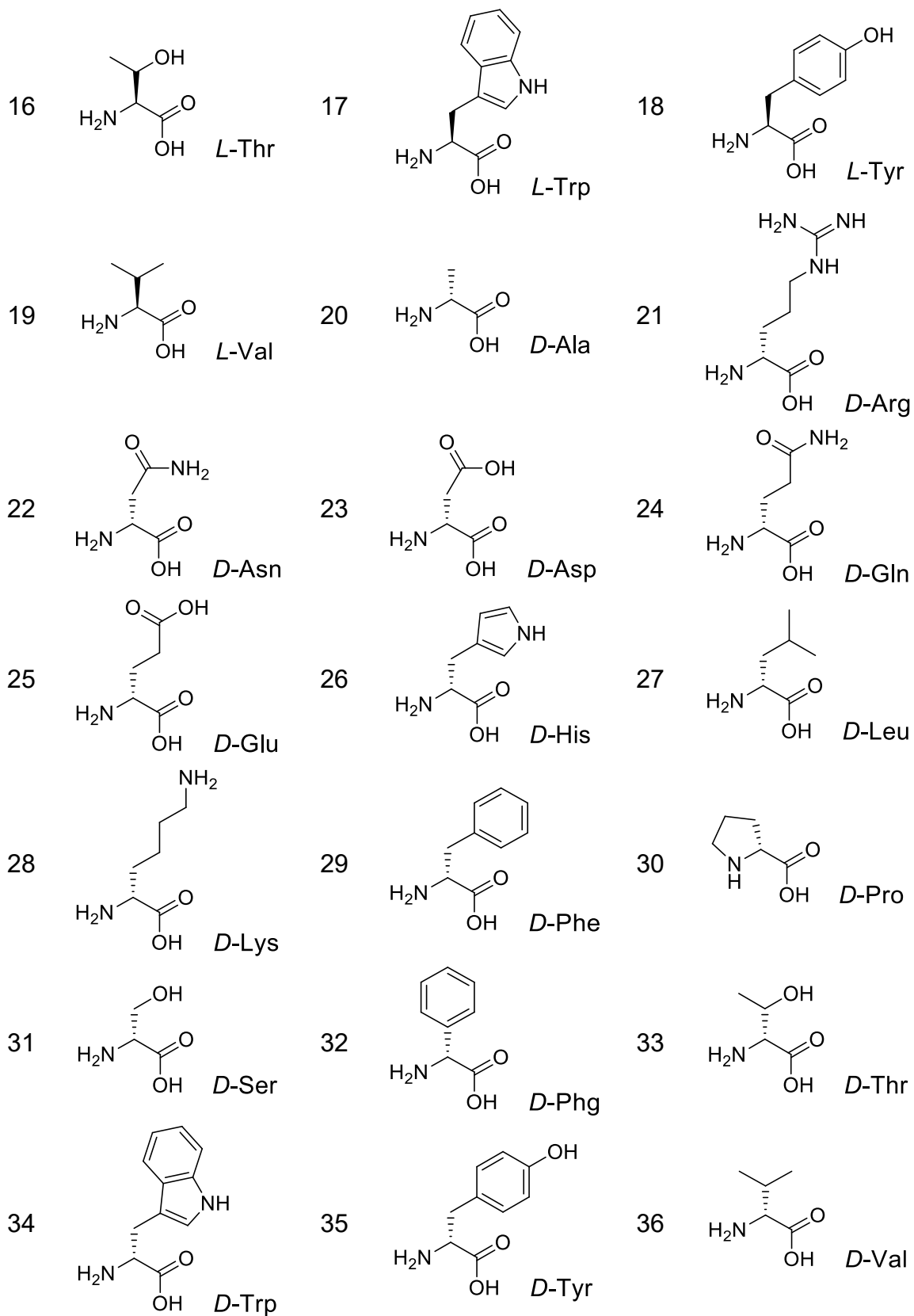
5.8. Badania kinetyczne specyficznego dla podjednostki β1i ludzkiego immunoproteasomu

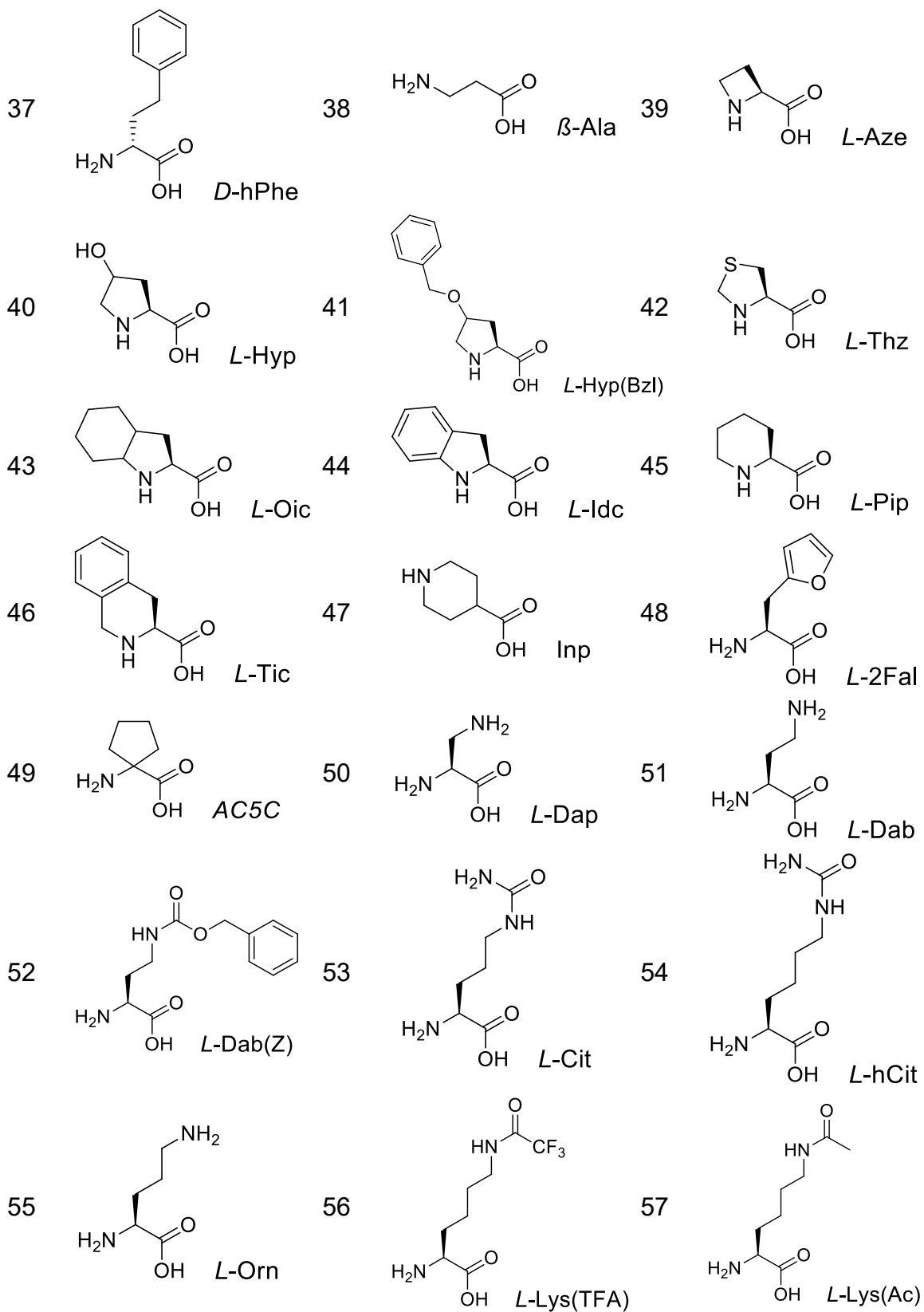
W celu określenia aktywności i specyficznego dla zsyntezowanego inhibitora wobec proteasomu 20S i immunoproteasomu wykonano pomiar hamowania aktywności. W tym celu oba enzymy inkubowano z inhibitorem w temperaturze 37°C przez 30 minut, a następnie

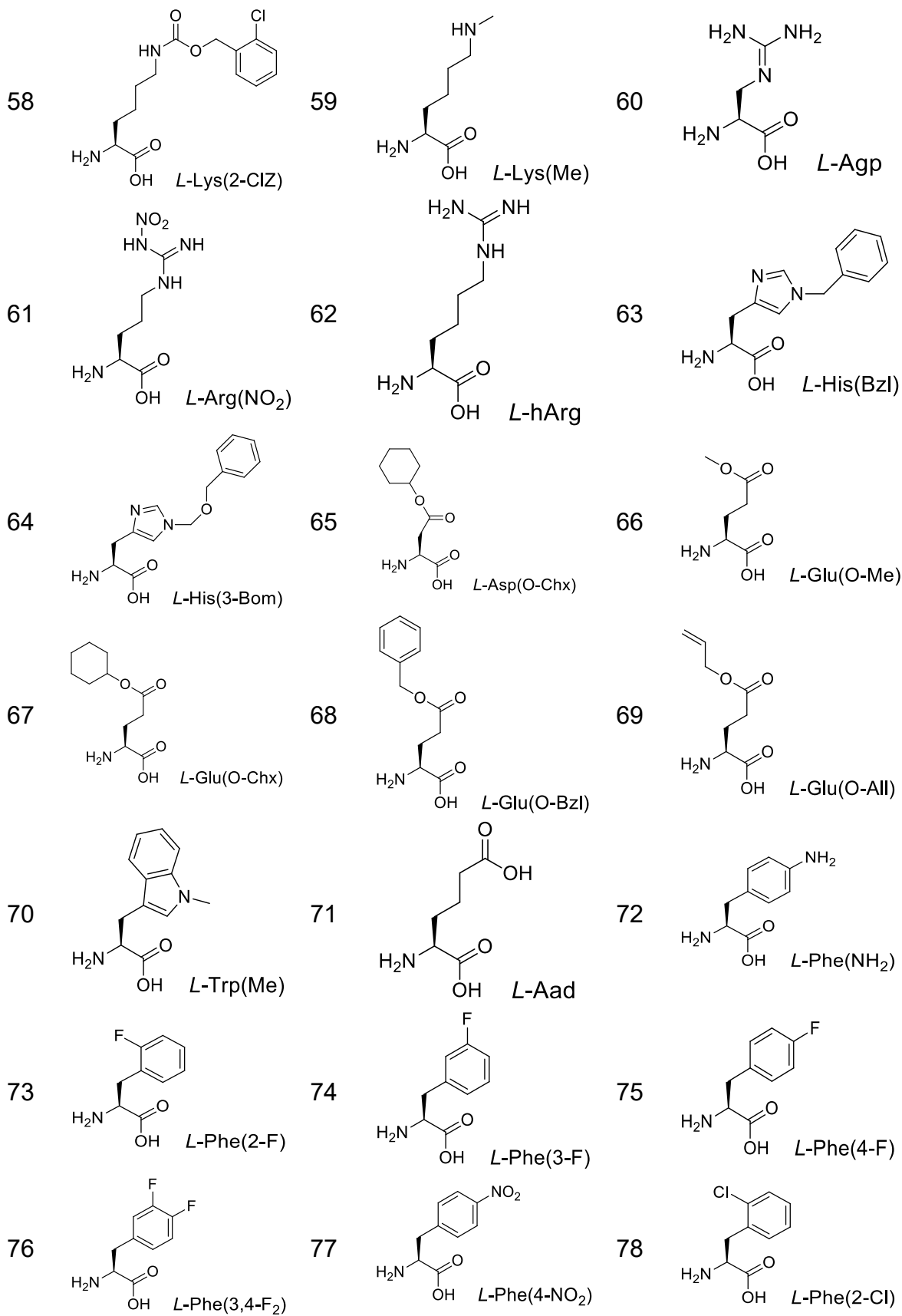
zmierzono ich aktywność wobec substratów: Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-ACC (dla proteasomu 20S) i Ac-Pro-Ala-Leu-ACC (dla immunoproteasomu). Na płytce 96 dołkowej umieszczono 20 μ l inhibitora w stężeniu od 100 μ M do 0,5 μ M (rozcieńczenie seryjne), następnie do każdego dołka z inhibitorem dodano 60 μ l roztworu enzymu w buforze (skład buforu: 0,5 mM EDTA, 20 mM HEPES) o stężeniu końcowym 6 nM. Płytkę z enzymem i inhibitorem inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut, a następnie dodano 20 μ l substratu o stężeniu końcowym 50 μ M. Pomiary prowadzono przez 40 minut i każdy powtórzono 3-krotnie. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono wartość współczynnika IC50.

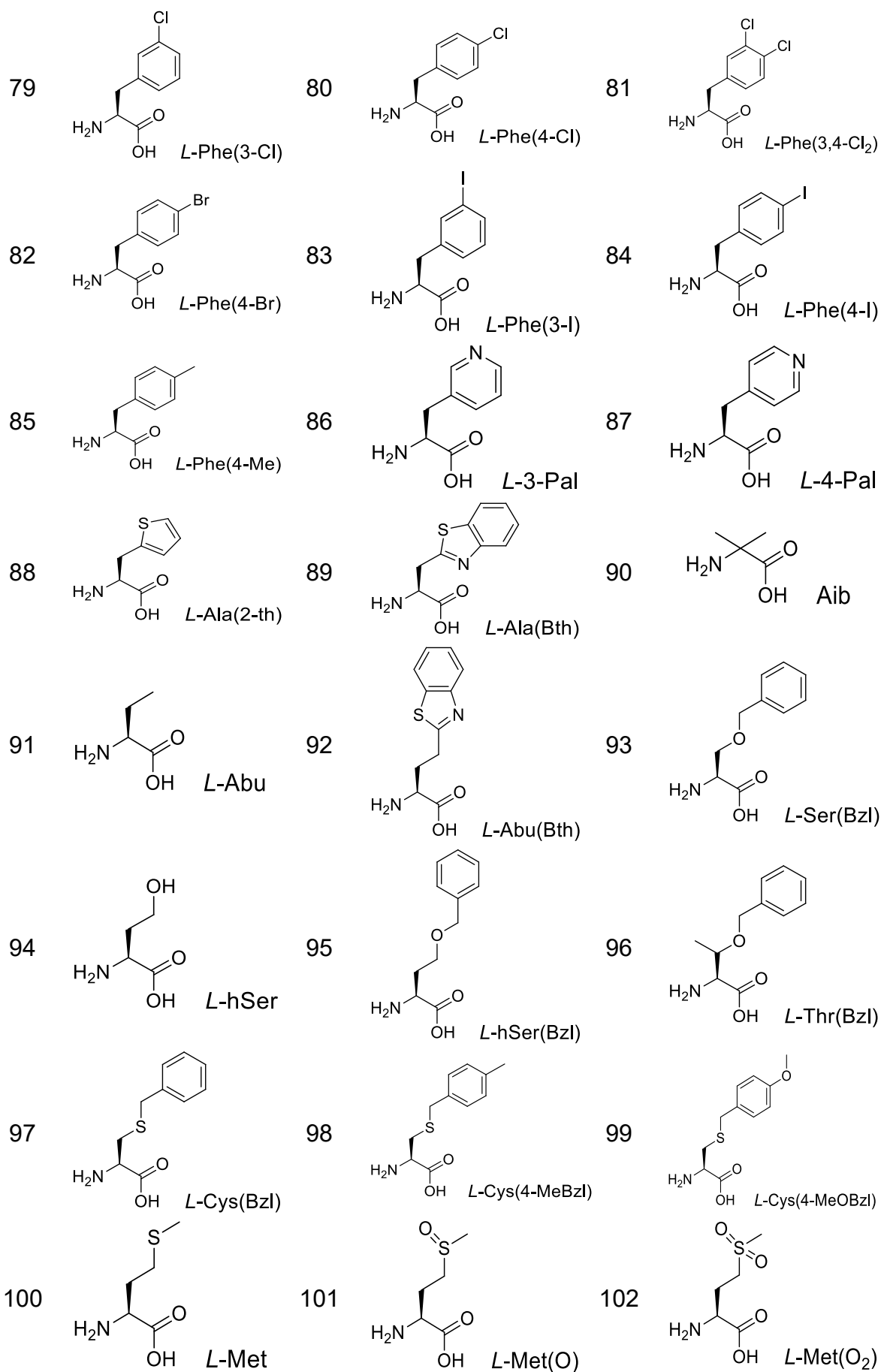
6. Struktury aminokwasów użytych do syntezy bibliotek substratów

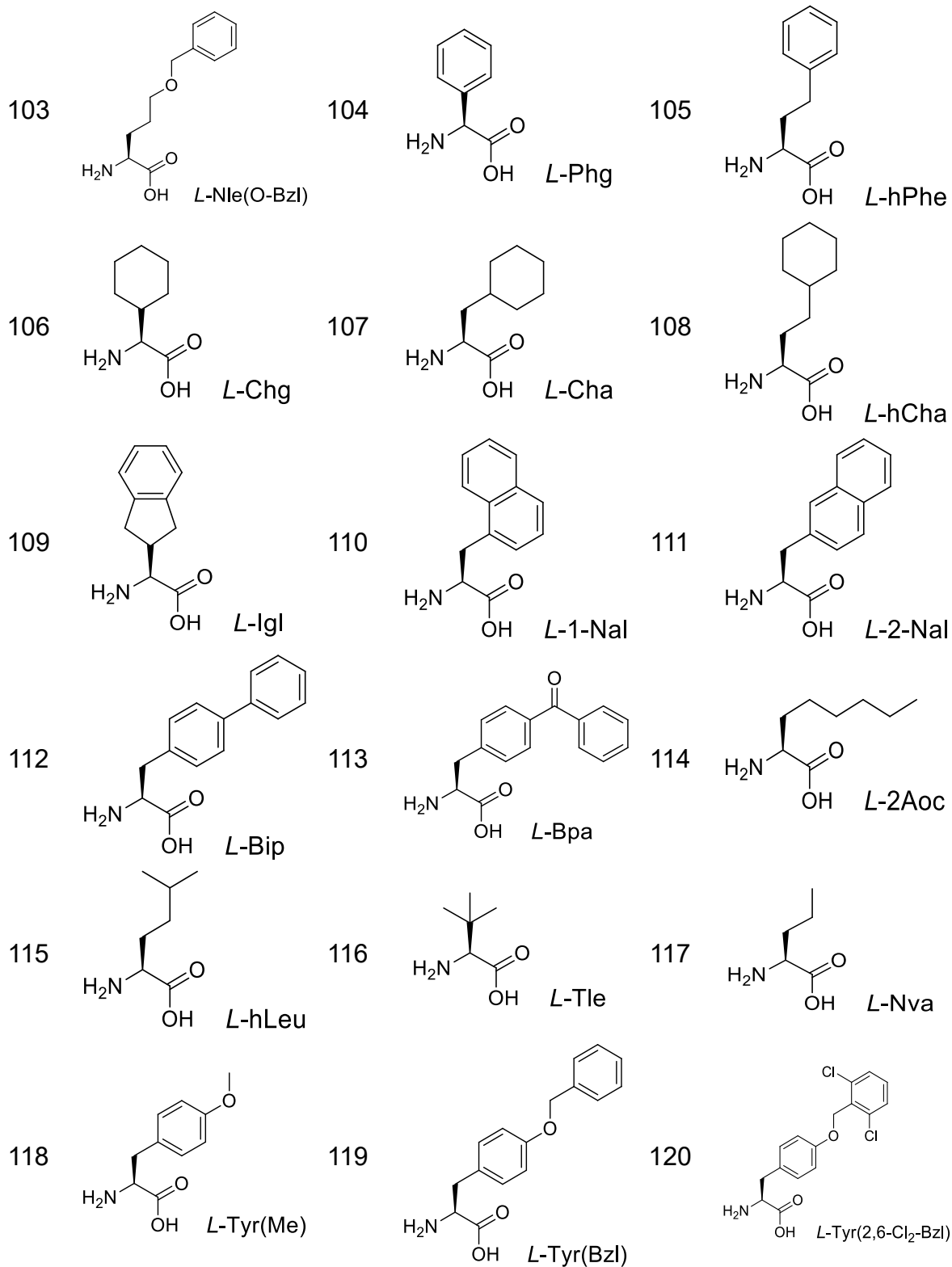
Lp	Struktura i kod	Lp	Struktura i kod	Lp	Struktura i kod
1	 <i>L</i> -Ala	2	 <i>L</i> -Arg	3	 <i>L</i> -Asn
4	 <i>L</i> -Asp	5	 <i>L</i> -Gln	6	 <i>L</i> -Glu
7	 Gly	8	 <i>L</i> -His	9	 <i>L</i> -Ile
10	 <i>L</i> -Leu	11	 <i>L</i> -Lys	12	 <i>L</i> -Nle
13	 <i>L</i> -Phe	14	 <i>L</i> -Pro	15	 <i>L</i> -Ser

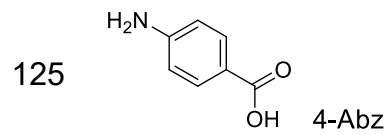
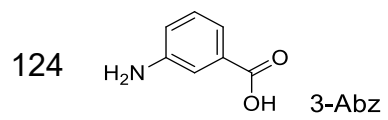
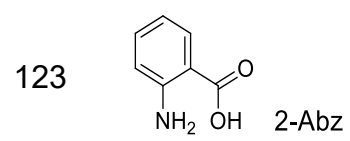
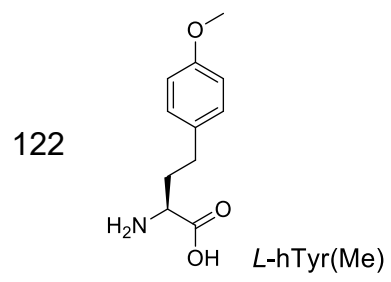
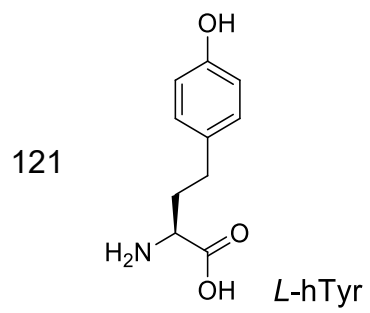












7. Dorobek naukowy

Publikacje

1. **Gładysz, R.**, Małek, N., Rut. W., Dąg, M., *Investigation of the P1' and P2' sites of IQF substrates and their selectivity toward 20S proteasome subunits*, Biological Chemistry, 2022.
2. Małek, N., **Gładysz R.**, Stelmach, N., Dąg, M., *Targeting Microglial Immunoproteasome: A Novel Approach in Neuroinflammatory-Related Disorders*, ACS Chemical Neuroscience, 2024 (praca w recenzji).

Wystąpienia konferencyjne

1. Autor komunikatu ustnego: **Gładysz, R.**, Małek, N., Dąg, M., *Determination of human proteasomes substrate specificity profiles*. ChemBiotIC Chemistry & Biotechnology International Conference, 2023, Wrocław.

Granty:

1. Grant Opus Narodowego Centrum Nauki pt. „Zintegrowana platforma skringowa do wyznaczania rozszerzonej specyficzności substratowej ludzkich proteasomów” (2017/25/B/ST5/00215) – wykonawca projektu.

8. Literatura

1. Barrett, A.J., *Proteases*. Current Protocols in Protein Science, 2000. **21**(1).
2. Denault, J.-B. and G.S. Salvesen, *Apoptotic Caspase Activation and Activity*, in *Apoptosis and Cancer*. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. s. 191-220.
3. Bennett, B. and O.D. Ratnoff, *The normal coagulation mechanism*. The Medical clinics of North America, 1972. **56**(1): s. 95-104.
4. Bird, P.I., J.A. Trapani, and J.A. Villadangos, *Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity*, in *Nature Reviews Immunology*. 2009. s. 871-882.
5. Ciechanover, A. and A.L. Schwartz, *The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(6): s. 2727-2730.
6. Klein, T., et al., *Proteolytic Cleavage—Mechanisms, Function, and “Omic” Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification*. Chemical Reviews, 2018. **118**(3): s. 1137-1168.
7. Khan, A.R. and M.N.G. James, *Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes*. Protein Science, 1998. **7**(4): s. 815-836.
8. López-Otín, C. and J.S. Bond, *Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(45): s. 30433-30437.
9. Jang, H.H., *Regulation of Protein Degradation by Proteasomes in Cancer*. Journal of Cancer Prevention, 2018. **23**(4): s. 153-161.
10. Tabrez, S., et al., *Association of autoimmunity and cancer: An emphasis on proteolytic enzymes*. Seminars in Cancer Biology, 2020. **64**: s. 19-28.
11. Vidoni, C., et al., *The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders*. Medicinal Research Reviews, 2016. **36**(5): s. 845-870.
12. Siklos, M., M. BenAissa, and G.R.J. Thatcher, *Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015. **5**(6): s. 506-519.
13. Feng, Y., K. Nouri, and A.D. Schimmer, *Mitochondrial ATP-Dependent Proteases—Biological Function and Potential Anti-Cancer Targets*. Cancers, 2021. **13**(9).
14. Majerová, T. and J. Konvalinka, *Viral proteases as therapeutic targets*. Molecular Aspects of Medicine, 2022. **88**: s. 101159-101159.

15. Southan, C., *A genomic perspective on human proteases as drug targets*. Drug Discovery Today, 2001. **6**(13): s. 681-688.
16. Gurumallesh, P., et al., *A systematic reconsideration on proteases*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **128**: s. 254-267.
17. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(D1): s. D503-D509.
18. Poreba, M. and M. Drag, *Current Strategies for Probing Substrate Specificity of Proteases*. Current Medicinal Chemistry, 2012. **17**(33): s. 3968-3995.
19. Schechter, I. and A. Berger, *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **27**(2): s. 157-162.
20. Perona' And, J.J. and C.S. Craik, *Structural basis of substrate specificity in the serine proteases*, in *Protein Science*. 1995, Cambridge University Press. s. 337-360.
21. Ratnikov, B.I., et al., *Quantitative profiling of protease specificity*. PLOS Computational Biology, 2021. **17**(2): s. e1008101.
22. Thornberry, N.A., et al., *A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(29): s. 17907-17911.
23. Drag, M., et al., *Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes)*. Biochemical Journal, 2008. **415**(3): s. 367-375.
24. Drag, M. and G.S. Salvesen, *DeSUMOylating enzymes-SENPs*. IUBMB Life, 2008. **60**(11): s. 734-742.
25. Rut, W., et al., *Recent advances and concepts in substrate specificity determination of proteases using tailored libraries of fluorogenic substrates with unnatural amino acids*. Biological Chemistry, 2015. **396**(4): s. 329-337.
26. Poreba, M., et al., *Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms*. Cell Death & Differentiation, 2019. **26**(2): s. 229-244.
27. Modrzycka, S., et al., *Parallel imaging of coagulation pathway proteases activated protein C, thrombin, and factor Xa in human plasma*. Chemical Science, 2022. **13**(23): s. 6813-6829.
28. Modrzycka, S., et al., *Fluorescent Activity-Based Probe To Image and Inhibit Factor XIa Activity in Human Plasma*. Journal of Medicinal Chemistry, 2023. **66**(6): s. 3785-3797.

29. Toyama, B.H. and M.W. Hetzer, *Protein homeostasis: live long, won't prosper*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013. **14**(1): s. 55-61.
30. Etlinger, J.D. and A.L. Goldberg, *A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(1): s. 54-58.
31. Tanaka, K., L. Waxman, and A.L. Goldberg, *ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin*. Journal of Cell Biology, 1983. **96**(6): s. 1580-1585.
32. Herrmann, J., et al., *The ubiquitin-proteasome system—micro target for macro intervention?* International Journal of Cardiovascular Interventions, 2005. **7**(1): s. 5-13.
33. ; Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2004/summary/>.
34. Ding, W.-X. and X.-M. Yin, *Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome*. Autophagy, 2008. **4**(2): s. 141-150.
35. Bedford, L., et al., *Assembly, structure, and function of the 26S proteasome*. Trends in Cell Biology, 2010. **20**(7): s. 391-401.
36. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1695**(1-3): s. 55-72.
37. George, A.J., et al., *A Comprehensive Atlas of E3 Ubiquitin Ligase Mutations in Neurological Disorders*. Frontiers in Genetics, 2018. **9**.
38. Grigoreva, T.A., et al., *The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies*. Oncotarget, 2015. **6**(28): s. 24733-24749.
39. Budenholzer, L., et al., *Proteasome Structure and Assembly*. Journal of Molecular Biology, 2017. **429**(22): s. 3500-3524.
40. Orłowski, M. and S. Wilk, *Catalytic Activities of the 20 S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **383**(1): s. 1-16.
41. Mitsiades, N., et al., *Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(22): s. 14374-14379.
42. Merin, N. and K. Kelly, *Clinical Use of Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma*. Pharmaceuticals, 2014. **8**(1): s. 1-20.

43. Adams, J., *The proteasome: a suitable antineoplastic target*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(5): s. 349-360.
44. Richardson, P.G. and K.C. Anderson, *Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma*. Clinical advances in hematology & oncology : H&O, 2003. **1**(10): s. 596-600.
45. Gandolfi, S., et al., *The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma*. Cancer and Metastasis Reviews, 2017. **36**(4): s. 561-584.
46. Kuhn, D.J. and R.Z. Orlowski, *The Immunoproteasome as a Target in Hematologic Malignancies*. Seminars in Hematology, 2012. **49**(3): s. 258-262.
47. Kisselev, A.F. and A.L. Goldberg, *Monitoring Activity and Inhibition of 26S Proteasomes with Fluorogenic Peptide Substrates*. 2005. s. 364-378.
48. Maly, D.J., et al., *Expedient Solid-Phase Synthesis of Fluorogenic Protease Substrates Using the 7-Amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC) Fluorophore*. The Journal of Organic Chemistry, 2002. **67**(3): s. 910-915.
49. Nazif, T. and M. Bogyo, *Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(6): s. 2967-2972.
50. Harris, J.L., et al., *Substrate specificity of the human proteasome*. Chemistry & Biology, 2001. **8**(12): s. 1131-1141.
51. Poreba, M., G.S. Salvesen, and M. Drag, *Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity*. Nature Protocols, 2017. **12**(10): s. 2189-2214.
52. Rut, W., et al., *Selective Substrates and Activity-Based Probes for Imaging of the Human Constitutive 20S Proteasome in Cells and Blood Samples*. Journal of Medicinal Chemistry, 2018. **61**(12): s. 5222-5234.
53. Rut, W. and M. Drag, *Human 20S proteasome activity towards fluorogenic peptides of various chain lengths*. Biological Chemistry, 2016. **397**(9): s. 921-926.
54. Gruba, N., et al., *Novel internally quenched substrate of the trypsin-like subunit of 20S eukaryotic proteasome*. Analytical Biochemistry, 2016. **508**: s. 38-45.
55. Gruba, N., et al., *Bladder cancer detection using a peptide substrate of the 20S proteasome*. The FEBS Journal, 2016. **283**(15): s. 2929-2948.
56. Yaron, A., A. Carmel, and E. Katchalski-Katzir, *Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes*. Analytical Biochemistry, 1979. **95**(1): s. 228-235.

57. Kisselev, A.F., et al., *The Caspase-like Sites of Proteasomes, Their Substrate Specificity, New Inhibitors and Substrates, and Allosteric Interactions with the Trypsin-like Sites*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(38): s. 35869-35877.
58. Geier, E., et al., *A Giant Protease with Potential to Substitute for Some Functions of the Proteasome*. Science, 1999. **283**(5404): s. 978-981.
59. von Haehling, S., et al., *Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism*. International Journal of Cardiology, 2002. **85**(1): s. 173-183.
60. Lazarus, D.D., et al., *A new model of cancer cachexia: contribution of the ubiquitin-proteasome pathway*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 1999. **277**(2): s. E332-E341.
61. Manasanch, E.E. and R.Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2017. **14**(7): s. 417-433.
62. Adams, J. and M. Kauffman, *Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib)*. Cancer Investigation, 2004. **22**(2): s. 304-311.
63. Teicher, B.A. and J.E. Tomaszewski, *Proteasome inhibitors*. Biochemical Pharmacology, 2015. **96**(1): s. 1-9.
64. Kortuem, K.M. and A.K. Stewart, *Carfilzomib*. Blood, 2013. **121**(6): s. 893-897.
65. Korde, N., et al., *Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. JAMA Oncology, 2015. **1**(6): s. 746-746.
66. Shirley, M., *Ixazomib: First global approval*. Drugs, 2016. **76**(3): s. 405-411.
67. Kupperman, E., et al., *Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer*. Cancer Research, 2010. **70**(5): s. 1970-1980.
68. Sanchorawala, V., et al., *A phase I/2 study of the oral proteasome inhibitor ixazomib in relapsed or refractory AL amyloidosis*. Blood, 2017. **130**(5): s. 597-605.
69. Mishto, M., et al., *Proteasome isoforms exhibit only quantitative differences in cleavage and epitope generation*. European Journal of Immunology, 2014. **44**(12): s. 3508-3521.
70. Kimura, H., et al., *New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells*. Journal of Immunology Research, 2015. **2015**: s. 1-8.
71. Johnston-Carey, H.K., L.C.D. Pomatto, and K.J.A. Davies, *The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2016. **51**(4): s. 268-281.

72. Ogorevc, E., et al., *A patent review of immunoproteasome inhibitors*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2018. **28**(7): s. 517-540.
73. del Rio Oliva, M., et al., *Effective therapy of polymyositis in mice via selective inhibition of the immunoproteasome*. European Journal of Immunology, 2022. **52**(9): s. 1510-1522.
74. Farini, A., et al., *Therapeutic Potential of Immunoproteasome Inhibition in Duchenne Muscular Dystrophy*. Molecular Therapy, 2016. **24**(11): s. 1898-1912.
75. Lee, W. and K. Bo Kim, *The Immunoproteasome: An Emerging Therapeutic Target*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2011. **11**(23): s. 2923-2930.
76. Eskandari, S.K., et al., *The immunoproteasome: An old player with a novel and emerging role in alloimmunity*. American Journal of Transplantation, 2017. **17**(12): s. 3033-3039.
77. van Hall, T., et al., *Differential Influence on Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Presentation by Controlled Expression of Either Proteasome Immunosubunits or Pa28*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(4): s. 483-494.
78. Cascio, P., *Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes*. The EMBO Journal, 2002. **21**(11): s. 2636-2645.
79. Huber, Eva M., et al., *Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity*. Cell, 2012. **148**(4): s. 727-738.
80. Winter, M.B., et al., *Immunoproteasome functions explained by divergence in cleavage specificity and regulation*.
81. O'Donoghue, A.J., et al., *Global identification of peptidase specificity by multiplex substrate profiling*. Nature Methods, 2012. **9**(11): s. 1095-1100.
82. Kuhn, D.J., et al., *Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors*. Blood, 2009. **113**(19): s. 4667-4676.
83. Park, J.E., et al., *PSMB9 Codon 60 Polymorphisms Have No Impact on the Activity of the Immunoproteasome Catalytic Subunit B1i Expressed in Multiple Types of Solid Cancer*. PLoS ONE, 2013. **8**(9): s. e73732-e73732.
84. Singh, P.K., et al., *Immunoproteasome $\beta 5i$ -Selective Dipeptidomimetic Inhibitors*. ChemMedChem, 2016. **11**(19): s. 2127-2131.
85. Ho, Y.K., et al., *LMP2-Specific Inhibitors: Chemical Genetic Tools for Proteasome Biology*. Chemistry and Biology, 2007. **14**(4): s. 419-430.

86. Bhattarai, D., et al., *LMP2 Inhibitors as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease*. Journal of Medicinal Chemistry, 2020. **63**(7): s. 3763-3783.
87. de Bruin, G., et al., *Structure-Based Design of β 1i or β 5i Specific Inhibitors of Human Immunoproteasomes*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(14): s. 6197-6209.
88. Xin, B.-T., et al., *Structure-Based Design of Inhibitors Selective for Human Proteasome β 2c or β 2i Subunits*. Journal of Medicinal Chemistry, 2019. **62**(3): s. 1626-1642.
89. Muchamuel, T., et al., *A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis*. Nature Medicine, 2009. **15**(7): s. 781-787.
90. Friguet, B., et al., *Protein Degradation by the Proteasome and Its Implications in Aging*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **908**(1): s. 143-154.
91. Basler, M., C.J. Kirk, and M. Groettrup, *The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions*. Current Opinion in Immunology, 2013. **25**(1): s. 74-80.
92. Bellavista, E., et al., *Immunoproteasome in Cancer and Neuropathologies: A New Therapeutic Target?* Current Pharmaceutical Design, 2013. **19**(4): s. 702-718.
93. Dahlmann, B., *Role of proteasomes in disease*. BMC Biochemistry, 2007. **8**(1): s. S3.
94. Rousseau, A. and A. Bertolotti, *Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(11): s. 697-712.
95. Maggiora, L.L., C.W. Smith, and Z.Y. Zhang, *A general method for the preparation of internally quenched fluorogenic protease substrates using solid-phase peptide synthesis*. Journal of Medicinal Chemistry, 1992. **35**(21): s. 3727-3730.
96. Gomez-Perosanz, M., et al., *Identification of CD8+ T cell epitopes through proteasome cleavage site predictions*. BMC Bioinformatics, 2020. **21**(17): s. 484.