

Katarzyna Cekała

**Peptydy i peptydomimetyki wywodzące się z białek  
Rpt5 i Blm10 jako stymulatory ludzkiego  
proteasomu 20S *in vitro* i *in cellulo***

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

Promotor pomocniczy: dr Ewa Wieczerek

*Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Biomedycznej  
Pracownia Chemii Medycznej*

**Gdańsk 2024**

*„Co my wiemy, to tylko kropelka. Czego nie wiemy, to cały ocean.”*

*– Isaac Newton*

*Przede wszystkim serdecznie dziękuję mojej promotor dr hab. Eli Jankowskiej, prof. UG za przekazaną wiedzę, pomoc oraz cenne rady.*

*Nie mniej dziękuję dr Ewie Wieczerzak za ogrom poświęconego czasu, pomocną dłoń, cierpliwość, zarażenie pasją do nauki, a także za wiarę w moje możliwości.*

*Dziękuję również wszystkim koleżankom i kolegom z laboratorium, szczególnie „proteasomowej rodzinie”, za pomoc i serdeczną atmosferę.*

*Podziękowania dla dr hab. A. Giełdonia, prof. UG; dr hab. M. Wysockiej, prof. UG oraz dr P. Karpowicza za wsparcie w realizacji eksperymentów.*

*Dziękuję mojej rodzinie i przyjaciołom, a w szczególności mojemu mężowi, za to że podnosicie mnie na duchu, mobilizujecie oraz cieszyecie się razem ze mną.*

## SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	3
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	7
I WSTĘP LITERATUROWY .....	10
1. Proteasomalna degradacja białek .....	11
1.1. Ubikwitynozależny system proteasomalny .....	12
1.1.1. Budowa i mechanizm działania proteasomu 26S .....	12
1.1.2. Mechanizm proteolizy .....	14
1.1.3. Mechanizm ubikwitynacji.....	18
1.1.4. Sygnały destrukcji.....	20
1.2. Niezależny od ubikwityny system proteasomalny (UIPS).....	21
1.2.1. Regulacja proteasomu 20S w komórkach.....	23
1.2.1.1. PA28.....	23
1.2.1.2. PA200.....	24
1.2.2. Białka wewnętrznie nieuporządkowane jako substraty proteasomu 20S ..	26
1.2.3. Rola proteasomu 20S w trawieniu białek utlenionych na skutek stresu oksydacyjnego .....	28
2. Proteasom 20S a procesy starzeniowe i choroby neurodegeneracyjne.....	31
2.1. Wykorzystanie UIPS do przeciwdziałania proteotoksyczności .....	31
2.2. Wpływ procesów starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych na zawartość proteasomów w komórce.....	32
3. Niskocząsteczkowe aktywatory proteasomu 20S .....	33
3.1. Odczynniki denaturujące .....	33
3.2. Związki małowcząsteczkowe .....	34
3.3. Terapeutyczne zastosowanie peptydów .....	36
3.3.1. Strategie projektowania peptydowych aktywatorów proteasomu 20S .....	37
3.3.2. Mechanizm allosterycznej aktywacji proteasomu 20S .....	38
3.3.3. Peptydowe aktywatory proteasomu .....	42
3.3.4. Stabilność proteolityczna farmaceutyków peptydowych .....	43
3.3.5. Transport aktywnych peptydomimetyków do wnętrza komórki .....	46
3.3.5.1. Budowa błony komórkowej oraz sposoby przenikania substancji do cytozolu .....	46
3.3.5.2. Sposoby przenoszenia peptydów do wnętrza komórki .....	49
II ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	53
III BADANIA WŁASNE. Prezentacja i omówienie wyników .....	55

4. Uwagi ogólne .....	55
IIIA CZĘŚĆ PIERWSZA – peptydy wywodzące się z regulatora 19S .....	55
5. Wybór i optymalizacja struktury aktywatora ludzkiego proteasomu 20S .....	55
5.1. Wpływ peptydów wywodzących się z C-końcowych fragmentów podjednostek Rpt1-6 regulatora 19S na aktywność proteasomu 20S wyizolowanego z ludzkiej krwi .....	55
5.2. Badanie znaczenia długości łańcucha peptydowego związku Rpt5 dla aktywności ludzkiego proteasomu 20S .....	58
5.3. Skan alaninowy sekwencji peptydu Rpt5(10) .....	60
5.4. Wpływ charakteru chemicznego łańcuchów bocznych aminokwasów w pozycjach 1-7 peptydu Rpt5(10) na pobudzanie aktywności proteasomu 20S .....	61
5.5. Poprawa właściwości aktywujących oraz stabilności proteolitycznej aktywatora Rpt5(10) .....	66
5.5.1 Testy stabilności peptydu Rpt5(10) w ludzkim osoczu / w obecności proteasomu 20S oraz identyfikacja miejsc degradacji wiązania peptydowego przez h20S .....	66
5.5.2. Wpływ modyfikacji wprowadzonych do sekwencji peptydu Rpt5(10) na właściwości aktywujące oraz stabilność proteolityczną aktywatorów .....	68
5.5.2.1. Właściwości aktywujące peptydomimetyków opartych o sekwencję aktywatora Rpt5(10).....	69
5.5.2.2. Odporność mimetyków peptydu Rpt5(10) na degradację proteasomalną .....	71
5.5.2.3. Stabilność peptydomimetyków w ludzkim osoczu .....	71
6. Badania możliwości wykorzystania otrzymanych aktywatorów w testach komórkowych.....	72
6.1. Badanie zdolności peptydu Rpt5(10) oraz jego analogu z przyłączoną sekwencją CPP do penetrowania błony komórek HEK 293T .....	72
6.2. Badanie wpływu peptydu Tat-Rpt5(10) na aktywność proteasomu 20S .....	74
6.3. Badanie wpływu analogów Rpt5(10) z przyłączoną sekwencją CPP na aktywność proteasomu .....	75
6.4. Testy cytotoksyczności peptydów z przyłączonym fragmentem Tat.....	78
6.5. Badania aktywności peptydów w żywych komórkach HEK 293T z wykorzystaniem sondy TAS3.....	79
IIIB CZĘŚĆ DRUGA – peptydy wywodzące się z białkowego aktywatora Blm10.....	83
7. Poszukiwanie optymalnej sekwencji aktywatora.....	83
7.1. Modelowanie molekularne .....	83
7.2. Ocena krytycznego znaczenia poszczególnych reszt w peptydzie M2-6 dla właściwości aktywujących proteasom.....	88
8. Badania na substratach białkowych .....	91

8.1. Badanie oddziaływania białek z proteasomem 20S za pomocą mikroskalowej termoforezy kapilarnej.....	91
8.2. Sprawdzenie wpływu otrzymanych modulatorów na trawienie białek przez proteasom 20S .....	94
9. Badania komórkowe.....	96
9.1. Testy aktywności cytotoksycznej wybranych aktywatorów .....	96
9.2. Stabilność wybranych związków w obecności ludzkiego osocza .....	97
9.3. Badania wpływu wybranych peptydomimetyków na aktywność proteasomu w lizacie komórkowym .....	98
IV PODSUMOWANIE .....	100
V METODOLOGIA .....	104
10. Otrzymywanie związków .....	104
10.1. Synteza potencjalnych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S .....	104
10.2. Procedury osadzania pierwszego aminokwasu na nośniku stałym .....	104
10.3. Określanie stopnia osadzenia żywicy .....	106
10.4. Elongacja łańcucha peptydowego przy pomocy automatycznego syntezyzatora mikrofalowego.....	106
10.5. Odszczepianie peptydów z nośnika.....	112
11. Synteza peptydów zawierających zredukowane wiązanie peptydowe .....	112
11.1. Utlenianie Fmoc-aminoalkoholu do odpowiedniego aldehydu przy pomocy odczynnika Dess-Martina.....	112
11.2. Przyłączanie otrzymanego aldehydu do żywicy z osadzonym peptydem z utworzeniem wiązania iminowego, połączone z redukcją wiązania iminowego za pomocą NaBH <sub>3</sub> CN .....	113
12. Synteza peptydów znakowanych fluorescencyjnie.....	113
12.1. Przyłączanie barwnika fluorescencyjnego do grupy aminowej peptydu .....	113
13. Synteza sondy TAS3 .....	114
14. Oczyszczanie zsyntezowanych surowych peptydów .....	115
15. Charakterystyka otrzymanych związków .....	120
16. Badania biologiczne otrzymanych peptydów .....	124
16.1. Badanie zdolności modulujących otrzymanych peptydów względem ludzkiego proteasomu 20S .....	124
16.1.1. Badania aktywności z użyciem peptydowych substratów fluorogenicznych .....	124
16.1.1.1. Przygotowanie substratów do badań.....	124
16.1.1.2. Przygotowanie proteasomu do badań.....	125
16.1.1.3. Przygotowanie związków do badań .....	125
16.1.1.4. Przeprowadzenie badań.....	126

16.1.1.5. Ewaluacja wyników .....	126
16.1.2. Badania aktywności z użyciem modelowych białek .....	127
16.1.2.1. Utlenianie białek .....	127
16.1.2.2. Badania aktywności z wykorzystaniem substratu białkowego .....	127
16.2. Badania stabilności peptydów .....	128
16.2.1. Badania stabilności proteolitycznej wybranych modulatorów w ludzkim osoczu .....	128
16.2.2. Badanie szybkości i miejsc trawienia wybranych modulatorów przez proteasom 20S.....	128
17. Badania komórkowe.....	129
17.1. Hodowla komórek .....	129
17.2. Badanie potencjału wybranych modulatorów proteasomu 20S do przenikania błony komórkowej.....	129
17.3. Badania aktywności cytotoksycznej peptydów w stosunku do linii komórkowej HEK 293T .....	129
17.4. Badania aktywności proteasomu w lizacie komórek HEK 293T.....	130
17.5. Badania aktywności proteasomu w komórkach HEK 293T z wykorzystaniem sondy TAS3.....	131
18. Badanie oddziaływania białek z proteasomem za pomocą mikroskalowej termoforezy .....	132
18.1. Znakowanie białek fluoroforem .....	132
18.2. Przeprowadzenie testów MST .....	133
19. Pozyskiwanie proteasomu 20S z ludzkich erytrocytów .....	133
19.1. Liza osmotyczna erytrocytów.....	134
19.2. Oczyszczanie białka .....	134
19.2.1. Chromatografia jonowymienna na złożu Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare).....	135
19.2.2. Wysalanie siarczanem (VI) amonu.....	135
19.2.3. Chromatografia oddziaływań hydrofobowych na kolumnie HiPrep Phenyl FF (High Sub) (Cytiva).....	136
19.2.4. Chromatografia jonowymienna na kolumnie Mono-Q (GE Healthcare) .....	136
19.2.5. Charakterystyka oczyszczonego proteasomu 20S .....	137
VI BIBLIOGRAFIA .....	138
VII Streszczenie .....	150
VIII SUMMARY .....	155
IX Wykaz dorobku naukowego .....	159

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Stosowane w tekście skróty i symbole aminokwasów oraz grup ochronnych są zgodne z zaleceniami IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, opublikowanymi w J. Biol. Chem., 260, 14, 1985. Ogólnie stosowane skróty i symbole są zgodne z listą zamieszczoną w J. Org. Chem., 65, 21a, 2000 oraz J. Peptide Sci., 5, 465, 1999.

Pozostałe skróty i symbole stosowane w pracy:

Aa - aminokwas

AAA - ATP-azy zaangażowane w różne komórkowe aktywności (ang. ATPases Associated with diverse cellular Activities)

Ac - grupa acetylowa, CH<sub>3</sub>C(O)-

ACN – acetonitryl

AcOH - kwas octowy

AD – choroba Alzheimera (ang. Alzheimer's Disease)

AFM – mikroskopia sił atomowych (ang. Atomic Force Microscopy)

ALS - stwardnienie zanikowe boczne (ang. Amyotrophic Lateral Sclerosis)

AMC - 7-amino-4-metylokumaryna

APP – białko prekursorowe amyloidu (ang. Amyloid Precursor Protein)

ATP – adenozylo-5'-trifosforan

ATPaza – enzym katalizujący reakcję hydrolizy ATP do ADP

Boc – grupa *tert*-butoksykarbonylowa

Bpa – 4-benzoilofenyloalanina

CDI - 1,1'-karbonylodiimidazol

ChT-L – aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu

C-L – aktywność kaspazopodobna proteasomu

CPP – peptydy penetrujące komórkę (ang. Cell Penetrating Peptides)

cryo-EM - mikroskopia krioelektronowa (ang. cryo-Electron Microscopy)

DCM – dichlorometan

ddH<sub>2</sub>O – woda podwójnie destylowana (ang. double distilled water)

DIC – diizopropylokarbodiimid

DIPEA – *N,N*-diizopropylloetyloamina  
DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna  
DMF – dimetyloformamid  
DMSO – dimetylosulfotlenek  
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy  
DTT – ditiotreitrol  
DUB – enzym deubikwitynujący (ang. Deubiquitinating Enzyme)  
EDT – etanoditiol  
EM – mikroskopia elektronowa (ang. Electron Microscopy)  
FA – kwas mrówkowy  
Fc – fragment zdolny do krystalizacji (ang. fragment crystallizable)  
FDA - Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)  
FITC– izotiocyjanian fluoresceiny  
Fmoc – grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa  
FRET - rezonansowy transfer energii Förstera (ang. Förster Resonance Energy Transfer)  
h20S – ludzki proteasom 20S  
HATU – heksafluorofosforan *O*-(7-aza-benzotriazolo-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy  
HD – choroba Huntingtona (ang. Huntington's Disease)  
HEK293T – linia embrionalnych komórek ludzkiej nerki zawierających antygen T SV40 (ang. human embryonic kidney cell line expressing T antigen of SV40)  
HEPES – kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy  
HOBt – 1-hydroksybenzotriazol  
IDPs - białka wewnątrznie nieuporządkowane (ang. Intrinsically Disordered Proteins)  
IDR – region wewnątrznie nieuporządkowany (ang. Intrinsically Disordered Region)  
IFN- $\gamma$  – interferon gamma  
KRBH – bufor Krebsa-Ringera (ang. Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer)  
Mca – 4-karboksymetylo-7-metoksykumaryna  
MeIm - metyloimidazol  
MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex)  
Msnt – 1-(mezytyleno-2-sulfonylo)-3-nitro-1,2,4-triazol



NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. Nuclear Magnetic Resonance)

Oxyma – (hydroksyimino)cyjanooctan etylu

PAN – nukleotyda aktywiająca proteasom (ang. Proteasome-Activating Nucleotidase)

PBS – bufor fosforanowy z solą fizjologiczną

PD – choroba Parkinsona (ang. Parkinson's Disease)

PEG – poli(glikol etylenowy)

PR – peptydy bogate w reszty proliny i argininy

PrLD – domena prionowa (ang. Prion-Like Domain)

RE – retikulum endoplazmatyczne

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. Reactive Oxygen Species)

RNS – reaktywne formy azotu (ang. Reactive Nitrogen Species)

RP – cząstka regulatorowa (ang. Regulatory Particle)

RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz

SAR – zależność struktura-aktywność (ang. Structure-Activity Relationship)

SDS – dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – elektroforeza żelowa w warunkach denaturujących

TBTU – tetrafluoroboran 2-(1*H*-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy

TFA – kwas trifluoroctowy

TIS – triizopropylosilan

T-L – aktywność trypsynopodobna proteasomu

Tris – 2-amino-2-(hydroksymetylo)-propano-1,3-diol

Ub - ubikwityna

UIPS – system proteasomalny niezależny od ubikwityny (ang. Ubiquitin-Independent Proteasome System)

UPS – system ubikwityna-proteasom (ang. Ubiquitin-Proteasome System)

y20S – drożdżowy proteasom 20S

$\alpha$ -syn –  $\alpha$ -synukleina

Z – grupa benzyloksykarbonylowa

## I WSTĘP LITERATUROWY

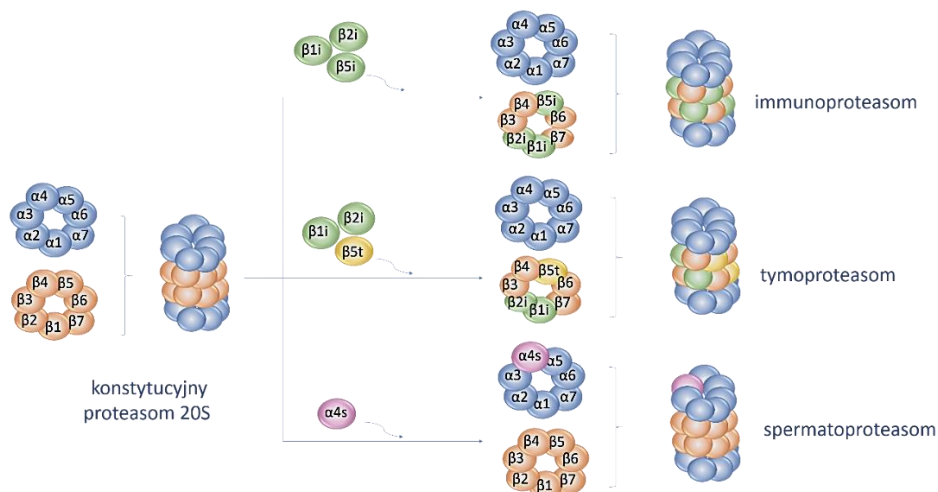
Aby organizm człowieka mógł prawidłowo funkcjonować, musi skutecznie reagować na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Efektorami tych odpowiedzi są zazwyczaj tysiące różnych białek, zaś procesy komórkowe regulujące syntezę, zwijanie, transport oraz degradację tych białek są kluczowe dla zapewnienia prawidłowego rozwoju, a także odporności na stres środowiskowy oraz patogeny takie jak wirusy. Utrata homeostazy białek stanowi natomiast jedną z cech procesu starzenia się, który związany jest z pojawianiem się nieprawidłowo sfałdowanych lub uszkodzonych białek, wykazujących tendencję do tworzenia agregatów, co w konsekwencji prowadzi do szeregu chorób, takich jak choroby neurodegeneracyjne czy też cukrzyca typu II. Agregacja białek hamowana jest przez złożony system proteolityczny, na który składają się: system autofagosomalno-lizosomalny oraz system proteasomalny, które to systemy są wspomagane przez chaperony czyli tzw. białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe (roz)fałdowanie substratów białkowych<sup>1,2</sup>, a także stanowią swego rodzaju ochronę przed powstawaniem toksycznych agregatów białkowych<sup>3</sup>. Kiedy chaperony nie są w stanie poradzić sobie z nieprawidłowo uformowanym białkiem, kierują je na drogę degradacji. Na szlaku autofagosom-lizosom trawione są długożyjące białka, agregaty czy też wadliwe lub nadmiarowe organelle<sup>4</sup>. Proteasomy są z kolei odpowiedzialne za degradację większości białek komórkowych, zarówno w ich natywnej, jak i nieprawidłowo sfałdowanej konformacji. Znaczenie systemu proteasomalnego dla funkcjonowania komórki zostało potwierdzone doświadczalnie dzięki badaniom ilustrującym obniżanie wydajności proteasomu, wraz z wiekiem, w tkankach i komórkach ssaków<sup>5</sup>, a spadek ten ściśle powiązano z długością życia organizmu<sup>6,7</sup>. Nie dziwi więc fakt, że proteasom stał się obiektem zainteresowania wielu grup badawczych na całym świecie, a modulowanie jego aktywności rozpoznano jako metodę możliwą do zastosowania w leczeniu wielu schorzeń, w tym patologicznego nowotworzenia<sup>8,9</sup>.

## 1. Proteosomalna degradacja białek

Jeszcze w 1950 roku za jedyny istniejący system kontrolujący syntezę i degradację białek uznawano system lizosomalny. Odkrycie ATP (adenozyno-5'-trifosforanu) sprawiło, że w 1953 roku Simpson zasugerował istnienie dwóch współistniejących mechanizmów niszczenia białek: hydrolityczny (egzoergiczny) i drugi - wymagający energii. Dopiero w 1977 roku Etlinger i Goldberg zidentyfikowali istnienie nowego, ATP-zależnego systemu degradacji, nieangażującego lizosomów, co potwierdziły badania z 1981r., w których Bigelow wykazał, że większość białek wewnątrzkomórkowych jest trawiona w cytozolu, a nie lizosomie<sup>10</sup>. W mniej więcej tym samym czasie Wilk i Orłowski oczyścili 700 kDa białko, które nazwane zostało proteasomem<sup>11</sup>.

Proteasom stanowi centralną maszynę degradacji białek. W komórkach eukariontów białko to stanowi ok. 1-2% całego proteomu<sup>7</sup>, a znaleźć je można w cytoplazmie oraz nukleoplazmie wypełniającej jądro komórkowe. Dzięki swoim właściwościom hydrolitycznym jest ono w stanie usuwać uszkodzone i niepotrzebne białka, tym samym zapewniając aminokwasy niezbędne do dalszej biosyntezy. Proteasom został również powiązany z innymi funkcjami, takimi jak regulacja cyklu komórkowego, różnicowanie, odpowiedź zapalna czy też apoptoza<sup>12</sup>.

Obecnie, termin proteasom używany jest w kontekście kilku poznanych struktur, których wspólny element stanowi rdzeń katalityczny nazywany proteasomem 20S [Rys. 1]<sup>13</sup>.

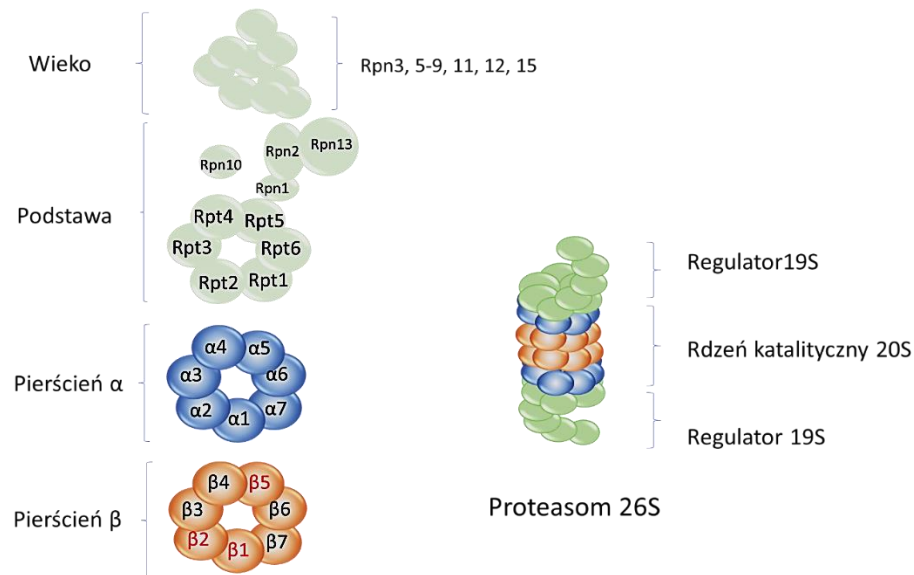


Rys. 1 Schemat ilustrujący typy proteasomów występujących w komórkach, z zaznaczonymi podjednostkami różnicującymi<sup>13</sup>

## 1.1. Ubikwitynozależny system proteasomalny

### 1.1.1. Budowa i mechanizm działania proteasomu 26S

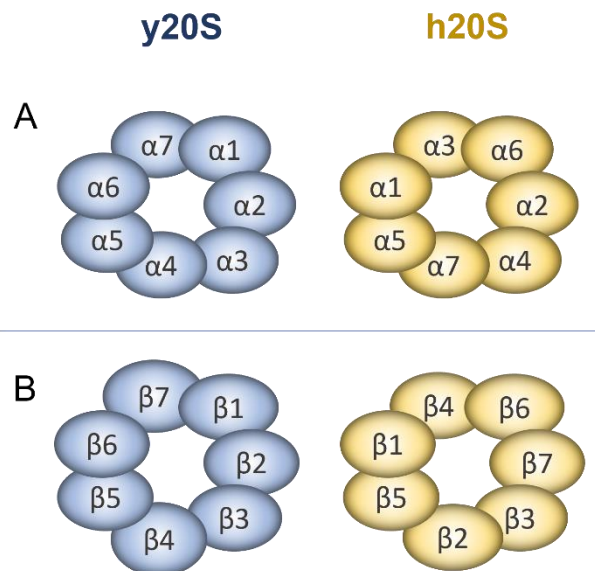
U eukariontów większość białek (w cytozolu i jądrze komórkowym) jest degradowana na szlaku ubikwityna-proteasom (UPS). Proteasom 26S to 2,5 MDa maszyna molekularna zbudowana z rdzenia katalitycznego 20S i dołączonej po jednej lub obu jego stronach cząstki regulatorowej 19S (RP – ang. Regulatory Particle). Wiele lat badań pozwoliło na dokładne poznanie funkcji i budowy rdzenia katalitycznego 20S, jednak struktura, funkcje i dynamika konformacyjna regulatora 19S zostały opisane stosunkowo niedawno <sup>14</sup>. Strukturę proteasomu 26S z przyłączoną cząstką regulatorową 19S przedstawia Rys. 2.



Rys. 2 Schematyczne przedstawienie struktury proteasomu 26S

Architektura proteasomu 20S jest wysoce konserwatywna - tworzy on cylindryczną strukturę o masie 700 kDa, której proteolityczne miejsca aktywne są zamknięte w jej wewnętrznej komorze. Wspomniany cylinder tworzony jest przez 28 podjednostek, ułożonych w cztery heptameryczne pierścienie ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ) <sup>15</sup>. U organizmów prokariotycznych, budowa proteasomu jest mniej skomplikowana - mianowicie składa się on z jednego rodzaju podjednostek  $\alpha$  oraz jednego rodzaju podjednostek  $\beta$ , które wykazują tylko aktywność chymotrypsynopodobną <sup>16</sup>. U eukariontów natomiast, dwa zewnętrzne pierścienie składają się z siedmiu różnych podjednostek  $\alpha$ . Podobnie po siedem różnych podjednostek tworzy dwa wewnętrzne pierścienie  $\beta$  ( $\beta$  i  $\beta'$ ) [Rys.3]. Sześć z czternastu podjednostek  $\beta$  posiada właściwości proteolityczne. Podjednostki  $\beta 1$  i

$\beta 1'$  wykazują aktywność podobną do kaspazy (C-L),  $\beta 2$  i  $\beta 2'$  wykazują aktywność podobną do trypsyny (T-L), a podjednostki  $\beta 5$  i  $\beta 5'$  posiadają funkcję podobną do chymotrypsyny (ChT-L) <sup>17</sup>. Wszystkie razem zapewniają degradację wielu substratów białkowych. Miejsca aktywne enzymatycznie znajdują się na *N*-końcach podjednostek  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  oraz  $\beta 5$  (mechanizm degradacji omówiono w kolejnym podrozdziale), jednakże potencjalny substrat, który został przeznaczony do degradacji, musi pokonać barierę tzw.  $\alpha$ -bramki utworzonej przez *N*-końce podjednostek  $\alpha$  <sup>18</sup>. Nieliczne substraty, takie jak krótkie peptydy czy nieustrukturyzowane białka, są w stanie samoistnie wnikać do wnętrza komory, jednakże w większości przypadków, konieczna jest obecność regulatora, którego zadanie polega m.in. na rozluźnieniu  $\alpha$  bramki poprzez indukowanie zmian konformacyjnych w jej strukturze <sup>19</sup>.



Rys. 3 Sposób numeracji podjednostek w proteasomie drożdżowym i ludzkim

W proteasomie 26S rolę regulatora pełni kompleks 19S. Jego strukturę można podzielić na tzw. podstawę i wieko. Podstawa składa się z podjednostek Rpn (ang. regulatory particle nonATPase): Rpn1, Rpn2, Rpn13 oraz Rpn10, odpowiedzialnych za wiązanie ubikwityny oraz ATP-azowego heteroheksamerycznego pierścienia Rpt1-6 (ang. regulatory particle ATPase), który dzięki energii pozyskanej z hydrolizy ATP, stanowi swoisty motor podczas rozfałdowywania substratu. Indukuje on także zmiany konformacyjne w pierścieniu  $\alpha$  rdzenia 20S, w celu translokacji rozfałdowanego substratu do wnętrza komory katalitycznej. Wieko regulatora 19S to swego rodzaju rusztowanie, które usztywnia jedną stronę podstawy i jest zbudowane z 9 podjednostek Rpn (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12, Rpn15). Podjednostka Rpn11 pełni

funkcję deubikwitynazy, odpowiadając za odcinanie łańcuchów ubikwityny od substratów białkowych zanim trafią do ATP-azowego pierścienia Rpt<sup>20</sup>.

### 1.1.2. Mechanizm proteolizy

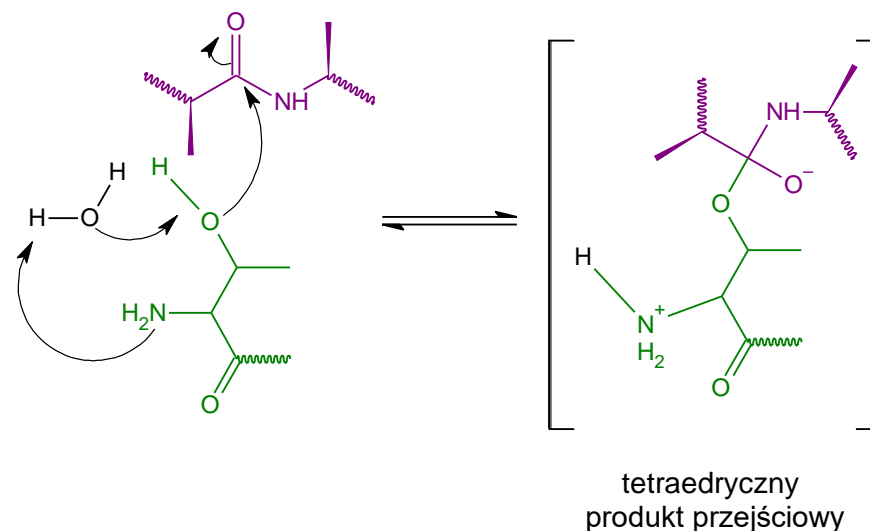
Brak podobieństwa sekwencyjnego do innych proteaz oraz niejednoznaczne wyniki badań nad inhibitorami uniemożliwiły przypisanie proteasomu do jednej ze znanych rodzin proteaz. Początkowo jego wrażliwość na 3,4-dichloroizokumarynę i na aldehydy peptydowe sprawiła, że uznano go za rzadki rodzaj proteazy serynowej lub cysteinowej. Dopiero badania przeprowadzone przez grupę E. Seemüller wykazały, że delecja

*N*-terminalnej reszty treoniny w proteasomie, jak również zastąpienie jej resztą alaniny prowadzą do całkowitej dezaktywacji enzymu, natomiast zastąpienie jej resztą seryny powoduje powstanie wysoce aktywnego enzymu wrażliwego na inhibitory proteaz serynowych<sup>21</sup>. Te doniesienia, a także struktura krystaliczna proteasomu z jego inhibitorem Ac-Leu-Leu-Nle-al<sup>16</sup>, dowiodły, że w ataku nukleofilowym, mającym miejsce podczas trawienia substratu, bierze udział *N*-terminalna reszta treoniny. W ten sposób proteasom został uznany za pierwszą odkrytą *N*-końcową nukleofilową proteazę treoninową<sup>21</sup>. Proteazy takie syntezowane są w postaci prekursorów zawierających nieaktywne propeptydy, przekształcanych później na drodze autokatalizy w ich formy aktywne<sup>22</sup>. Obecność propeptydów w trakcie składania proteasomu jest konieczna, aby zapobiec

*N*-acylowaniu podjednostek katalitycznych, które to acylowanie doprowadziłoby do utraty właściwości hydrolitycznych<sup>23</sup>.

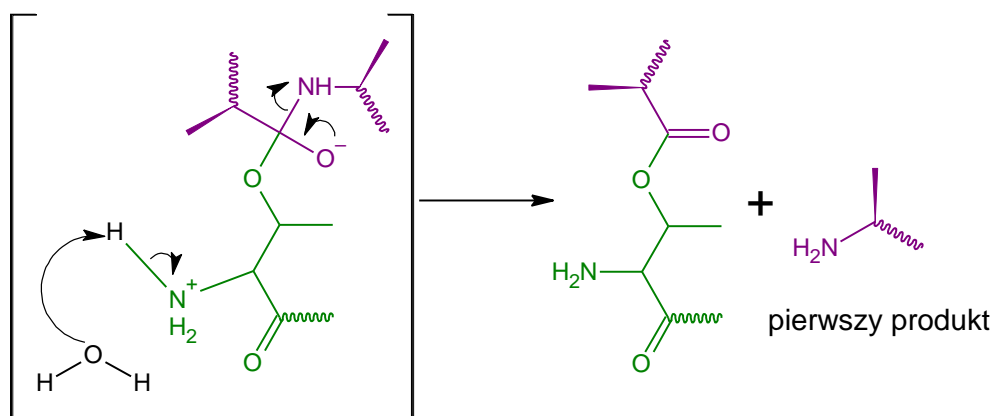
Wszystkie trzy podjednostki  $\beta$  o właściwościach proteolitycznych hydrolizują wiązania peptydowe według tego samego mechanizmu, który możliwy jest dzięki obecności wspomnianej reszty treoniny w pozycji 1 oraz wolnej grupy  $\alpha$ -aminowej. Proces hydrolizy można podzielić na 4 zasadnicze etapy<sup>24</sup>:

- nukleofilowy atak grupy hydroksylowej łańcucha bocznego treoniny na karbonyłowy węgiel zaangażowany w wiązanie peptydowe substratu (w tym etapie wolna grupa aminowa reszty treoniny pełni rolę akceptora protonu przeniesionego z grupy hydroksylowej treoniny, w co zaangażowana jest cząsteczka wody – powstaje tetraedryczny produkt przejściowy [Rys. 4a]);



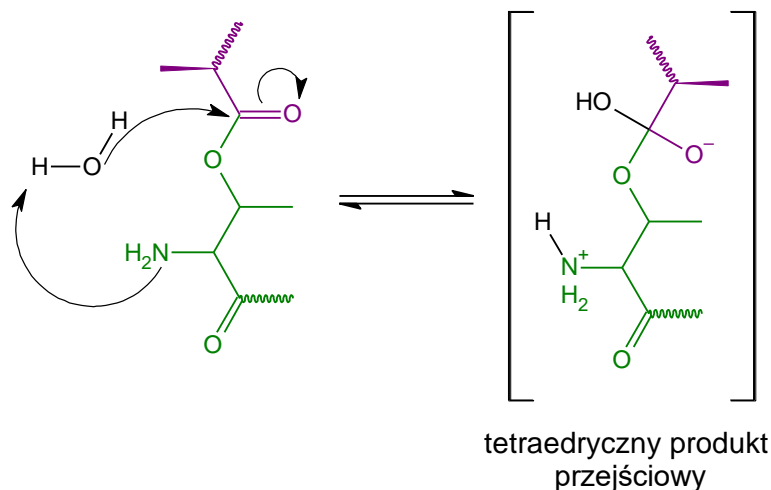
Rys. 4a Schemat reakcji przedstawiający pierwszy etap proteolizy wiązania peptydowego przez proteasom 20S

- przegrupowanie prowadzące do rozerwania wiązania peptydowego substratu, w wyniku którego uwolniony zostaje pierwszy produkt z wolną *N*-końcową grupą aminową oraz acylowany produkt pośredni połączony wiązaniem estrowym [Rys. 4b];



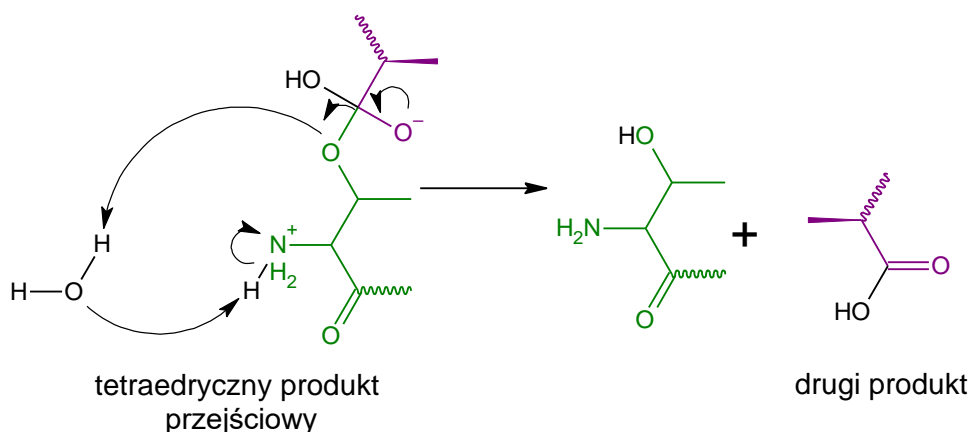
Rys. 4b Schemat reakcji przedstawiający drugi etap proteolizy wiązania peptydowego przez proteasom 20S (uwolnienie pierwszego produktu)

- kolejny atak nukleofilowy cząsteczki wody na karbonyłowy węgiel wiązania estrowego (powstanie tetraedrycznego kompleksu) [Rys. 4c];



Rys. 4c Schemat reakcji przedstawiający trzeci etap proteolizy wiązania peptydowego przez proteasom 20S

- przegrupowanie prowadzące do powstania drugiego, zawierającego wolną grupę karboksylową produktu oraz odtworzenia katalitycznej reszty treoniny [Rys. 4d].



Rys. 4d Schemat reakcji przedstawiający czwarty etap proteolizy wiązania peptydowego przez proteasom 20S (uwolnienie drugiego produktu, odtworzenie katalizatora)

Pomimo takiego samego mechanizmu degradacji substratów, katalityczne podjednostki proteasomu:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 5$  różnią się specyficznością substratową. Jak ustalono, m.in. na podstawie badań krystalograficznych proteasomu z kompetencyjnymi inhibitorami, różnorodność ta wynika z architektury kieszeni substratowych tworzonych przez sąsiednie podjednostki, odpowiednio:  $\beta 1$ - $\beta 2$ ,  $\beta 2$ - $\beta 3$  oraz  $\beta 5$ - $\beta 6$ . Kieszenie takie składają się z 6-7 reszt aminokwasowych pochodzących od jednostki katalitycznej oraz 3-4 reszt z sąsiadującego łańcucha, jednakże zazwyczaj tylko jeden aminokwas dyktuje specyfikę całej kieszeni. W proteasomie jest to reszta 45 kieszeni S1 (wg klasyfikacji Schechtera-Bergera) <sup>25</sup>. Dlatego też, zasadowa reszta argininy (Arg45) w kieszeni S1 podjednostki  $\beta 1$  klasyfikuje ją jako podjednostkę o aktywności kaspazopodobnej, czyli

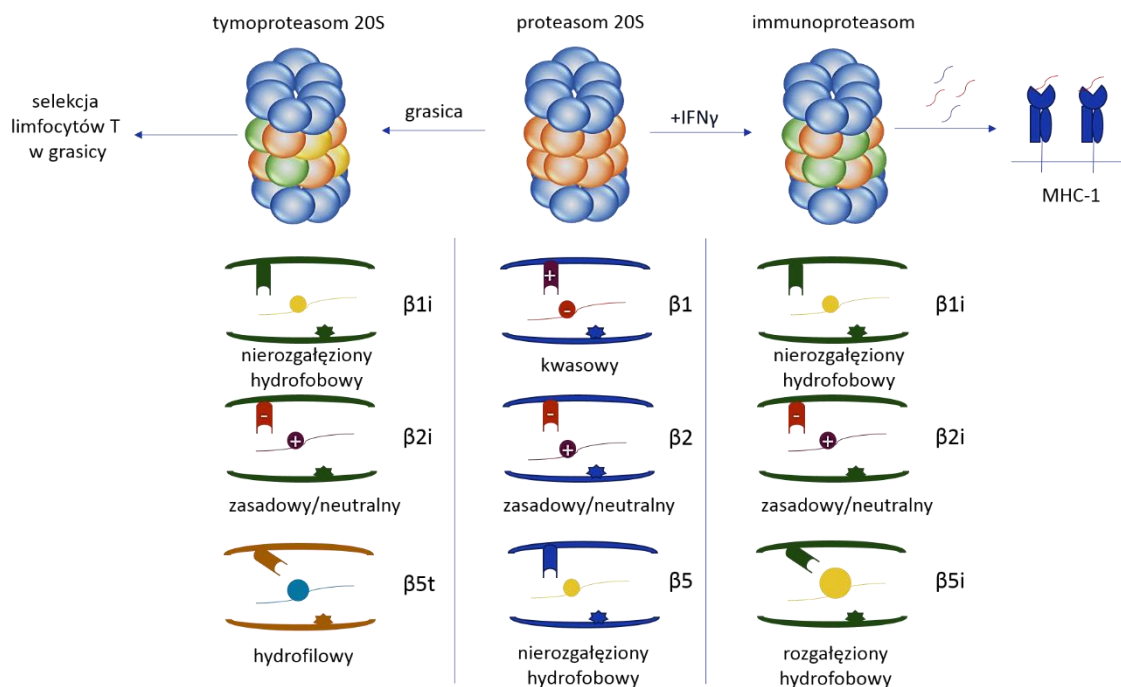


odpowiadającej za hydrolizowanie wiązań peptydowych po resztach kwasowych, chociaż przypisuje się jej również aktywność BrAAP (ang. branched chain amino acid preferring), czyli preferowanie cięcia po aminokwasach z rozbudowanymi łańcuchami bocznymi. Obecność reszty glicyny w pozycji 45 podjednostki  $\beta 2$  sprawia natomiast, że kieszeń ta posiada sporo wolnej przestrzeni, która ułatwia wiązanie się aminokwasów zasadowych posiadających rozbudowane łańcuchy boczne, które dodatkowo chętnie oddziałują z kwasową resztą Asp53. W kieszeni S1 podjednostki  $\beta 5$  w pozycji 45 znajduje się reszta metioniny, która ze względu na swój hydrofobowy charakter chętnie oddziałuje z innymi niepolarnymi aminokwasami, przez co nadaje tej podjednostce charakter katalityczny podobny do chymotrypsyny <sup>26</sup>.

Procesy adaptacyjne zachodzące w organizmie mogą indukować ekspresję alternatywnych fenotypów proteasomów, takich jak immunoproteasom, spermatoproteasom oraz tymoproteasom. Ekspresja tych alternatywnych form proteasomu zachodzi w głównej mierze w środowisku cytokinowym.

Immunoproteasom różni się właściwościami katalitycznymi od konstytucyjnego proteasomu 20S. Jest to związane z zamianą podjednostek  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  na podjednostki  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  oraz  $\beta 5i$ . Kieszeń substratowa podjednostki  $\beta 1i$  wykazuje zwiększoną hydrofobowość w stosunku do jej konstytucyjnego analogu, dzięki czemu posiada zdolność do hydrolizowania substratów tylko po rozgałęzionych resztach hydrofobowych (BrAAP), natomiast kieszeń podjednostki  $\beta 5i$  posiada większą wnękę w stosunku do  $\beta 5$ , co sprawia, że podjednostka ta z łatwością trawi duże, hydrofobowe substraty <sup>27</sup>. Badania z ostatnich 15 lat sugerują rolę immunoproteasomu w stanach zapalnych <sup>28</sup>, rozwoju nowotworów <sup>29</sup>, metabolizmie lipidów <sup>30</sup> i sygnalizacji NF- $\kappa$ B <sup>31</sup>. Za główny czynnik indukujący składanie immunoproteasomu uważa się interferon- $\gamma$  (odpowiedzialny również za odpowiedź immunologiczną jako reakcję na patogeny) oraz stres oksydacyjny <sup>32</sup>. Zmiany w podjednostkach proteasomu indukowane przez wspomniane czynniki skutkują powstaniem immunoproteasomu posiadającego silniejsze zdolności do produkcji peptydów antygenowych <sup>33</sup>. Potwierdzono również, że immunoproteasom składany jest w komórkach ok. cztery razy szybciej w porównaniu do proteasomu konstytucyjnego, jednakże posiada przy tym obniżoną stabilność <sup>32</sup>. Proteasom 20S i immunoproteasom zwykle współistnieją w komórkach, ale stosunek między tymi dwoma izoformami różni się w zależności od typu komórki i środowiska <sup>34</sup>.

Z kolei w tymoproteasomie rdzeń katalityczny tworzony jest przez podstawienie podjednostek  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  podjednostkami  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  oraz charakterystyczną podjednostką  $\beta 5t$ , która wykazuje odmienny, hydrofilowy charakter, dzięki czemu posiada szczególne właściwości proteolityczne<sup>35</sup>. Ekspresja tymoproteasomu jest niezbędna do pozytywnej selekcji limfocytów T w grasicy<sup>36</sup> [Rys. 5].



Rys. 5 Schemat ilustrujący różnice w budowie podjednostek katalitycznych konstytucyjnego proteasomu 20S oraz tymo- i immunoproteasomu z uwzględnieniem preferencji substratowych (legenda: plus – substrat zawierający reszty zasadowe; minus – substrat bogaty w reszty kwasowe; żółta kropka – substrat posiadający hydrofobowe aminokwasy; niebieska kropka – substrat posiadający reszty o charakterze hydrofilowym)<sup>37</sup>.

### 1.1.3. Mechanizm ubikwitynacji

Kolejnym milowym krokiem w badaniu mechanizmów degradacji było odkrycie ubikwityny – małego, 8 kDa białka, pełniącego ważną rolę w proteasomalnym systemie degradacji<sup>38</sup>. Ubikwitynowanie białka może być podyktowane różnymi celami: oznaczeniem go jako substratu do degradacji przez proteasom, zmianą jego lokalizacji w komórce, zmianą aktywności białka oraz promowaniem lub zapobieganiem interakcjom z innymi białkami<sup>39</sup>.

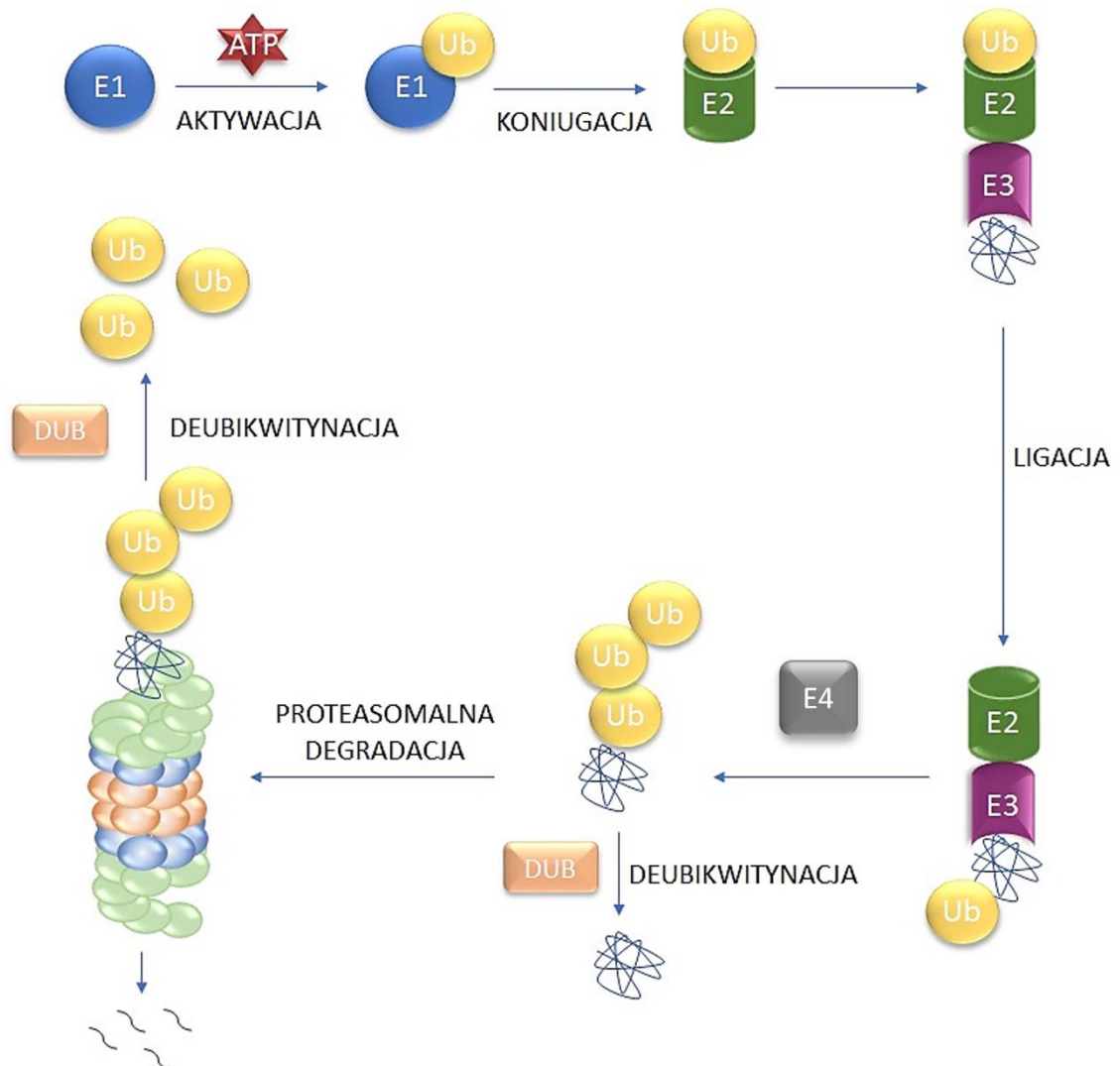
Ubikwityna jest prototypem rodziny białek o podobnych strukturach, ale różnych sekwencjach. Dojrzałe formy białek pochodzących z tej rodziny zawierają na C-końcu charakterystyczny motyw dwóch reszt glicyny, które eksponowane są dopiero w trakcie procesu proteolitycznego. Co ciekawe, u prokariotów nie znaleziono struktury

funkcjonalnie analogicznej do ubikwityny. U eukariontów wszystkie białka z rodziny ubikwityn charakteryzują się wspólnym mechanizmem działania, w którym C-końcowa reszta glicyny wiąże się z aminową grupą białka docelowego <sup>40</sup>. Zazwyczaj jest to grupa ε-aminowa reszty lizyny – w wyniku takiego połączenia powstaje wiązanie izopeptydowe, jednakże są również znane przypadki ubikwitynacji na N-końcu substratu z utworzeniem wiązania peptydowego <sup>41</sup>. Proces ubikwitynacji jest zależny od energii pozyskanej z hydrolizy ATP i można go podzielić na trzy etapy:

- 1) wstępny etap aktywacji katalizowany przez enzym E1;
- 2) etap pośredni, w którym ubikwityna jest kowalencyjnie wiązana z enzymem koniugującym E2;
- 3) etap końcowy katalizowany przez ligazę E3, w którym ubikwityna przyłącza się do miejsca docelowego, czyli do grupy aminowej substratu.

Na wstępnym etapie ubikwityna jest aktywowana w dwóch krokach. Pierwszy polega na adenylacji grupy karboksylowej C-końcowej reszty glicyny ubikwityny, w drugim zaś kroku dochodzi do przeniesienia ubikwityny na enzym E1 na skutek reakcji transtioestryfikacji z grupą -SH reszty cysteiny pochodzącej od enzymu aktywującego E1. W ten sposób tworzy się wiązanie tioestrowe, mające na celu zaktywowanie wolnej grupy karboksylowej <sup>42</sup>. Następnym krokiem jest przeniesienie ubikwityny z enzymu E1 na enzym koniugujący E2 z ponownym utworzeniem wiązania tioestrowego, tym razem z grupą -SH enzymu E2 <sup>43</sup>. Ostatni etap obejmuje przeniesienie ubikwityny na grupę aminową docelowego substratu z utworzeniem wiązania (izo)peptydowego, która to reakcja katalizowana jest przez ligazę E3 <sup>44</sup>. Zazwyczaj przyłączenie tylko jednej cząsteczki ubikwityny do białka nie powoduje skierowania go na drogę degradacji proteasomalnej. Aby substrat taki został rozpoznany przez regulator 19S, potrzebne jest utworzenie łańcucha poliubikwitynowego, które jest możliwe ze względu na obecność reszt lizyny w sekwencji samej ubikwityny <sup>45</sup>. Niedawne badania wykazały jednak, iż również monoubikwitynowane białka mogą być trawione przez proteasomy. Co ciekawe, dużą część puli tych białek (czyli ulegających degradacji proteasomalnej na skutek monoubikwitynacji) stanowią białka zaangażowane w procesy odpowiedzi na stres oksydacyjny <sup>46</sup>. W celu zachowania homeostazy, komórki wykształciły również enzymy deubikwitynujące (DUB – ang. deubiquitinating enzyme), pełniące odwrotną rolę poprzez usuwanie ubikwityny z białek substratowych. Zazwyczaj są one proteazami cysteinowymi, które rozcinają wiązanie amidowe pomiędzy białkami. Enzymy DUB

rozszczepiają także łańcuchy poliubikwitynowe w celu odzyskania wolnej ubikwityny, która może zostać użyta do znakowania nowych substratów<sup>47, 48, 49</sup> [Rys. 6].



Rys. 6 Schemat działania systemu UPS (system ubikwityna-proteasom – ang. Ubiquitin Proteasome System), gdzie: Ub - ubikwityna, E1 - enzym aktywujący Ub, E2 - enzym koniugujący Ub, E3 - ligaza ubikwitynowa, E4 - czynnik elongacji łańcucha, DUB - enzym deubikwitynujący, ATP - energia pozyskana z hydrolizy ATP.

#### 1.1.4. Sygnały destrukcji

O tym, czy białko powinno zostać ubikwitynowane i strawione decydują degrony, czyli elementy sygnałowe obecne w strukturze białek i kierujące je na drogę degradacji.

Chociaż większość białek jest syntetyzowana z resztą metioniny na *N*-końcu, tożsamość *N*-końcowego aminokwasu można zmienić. Klasa enzymów zwana transferazami może katalizować dodanie określonych reszt aminokwasowych do *N*-końca białka akceptorowego, tym samym powodując potranslacyjną modyfikację sekwencji białkowej. Pracując z drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*, Bachmair i wsp.

wykazali, że rodzaj *N*-końcowego aminokwasu może wpłynąć na stabilność białka, a zależność tę nazwali regułą *N*-końca. O tym, czy białko będzie promowane do degradacji decyduje zazwyczaj 8-10 *N*-końcowych reszt. Najbardziej podatne na ubikwitynację i degradację są białka zawierające na *N*-końcu reszty argininy i leucyny, natomiast białka posiadające

w tym miejscu reszty metioniny oraz małe obojętne aminokwasy takie jak Ala, Val, Ser, Thr, Cys, wykazują dłuższy okres półtrwania <sup>50</sup>.

Porównując sekwencje aminokwasowe dwunastu szybko degradowanych białek o okresie półtrwania wynoszącym 2 godziny lub krócej, Rogers i wsp. stwierdzili, że wszystkie mają jeden lub więcej regionów bogatych w cztery aminokwasy: prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę. Takie obszary nazwano regionami PEST, po jednoliterowym kodzie aminokwasowym tych reszt i są one dzisiaj uznawane za jedne z powszechniej występujących degronów <sup>51</sup>.

Niektóre z białek już w DNA mają zakodowany fragment sekwencji ubikwityny, który determinuje ich przeznaczenie do degradacji (UFD – ubiquitin fusion degradation); są to zazwyczaj enzymy naprawcze DNA <sup>52</sup>. Kolejną sekwencją programującą „śmierć” białka jest tzw. kasetę destrukcyjną D-box występująca w niektórych cyklinach <sup>53</sup>.

Nowo syntezowane białka posiadające w swojej strukturze degrony są chronione przed ubikwitynacją przez białka opiekuńcze – chaperony. Chaperony chronią również nieprawidłowo sfałdowane białka przed agregacją, a także towarzyszą translokacji takich ubikwitynowanych białek do wnętrza proteasomu <sup>54</sup>. Natomiast we właściwie pofałdowanym białku degrony są ukryte wewnątrz jego struktury. Dopiero denaturacja lub nieprawidłowe pofałdowanie powoduje odsłonięcie tychże sekwencji, a w konsekwencji ubikwitynację i degradację takiego substratu.

## 1.2. Niezależny od ubikwityny system proteasomalny (UIPS)

Jak omówiono powyżej, około 90% ludzkiego proteomu regulowane jest przez UPS. Zdecydowana większość ustrukturyzowanych białek musi zostać rozpoznana i rozfałdowana przed degradacją, dlatego ich trawienie odbywa się z wykorzystaniem systemu zależnego od ubikwityny i energii pozyskanej z hydrolizy ATP. Część proteomu jest natomiast degradowana w sposób niezależny od ubikwityny. Takie ubikwityno-niezależne substraty są rozpoznawane przez proteasom bezpośrednio w regionach

inicjacji degradacji lub pośrednio poprzez wiązanie z partnerem powodującym rozfałdowanie substratu i odsłonięcie sygnału destrukcji. Białka, które mogą być degradowane przez oba systemy zawierają najczęściej dwa typy degronów: jeden zależny, a drugi niezależny od ubikwityny. Taka niezależna od ubikwityny degradacja może stanowić alternatywny mechanizm uzupełniający, który zapewnia pewną suwerenność od dostępnej puli ubikwityny. Ciekawym przypadkiem ukazującym tę zależność jest białko Rpn4 - czynnik transkrypcyjny stymulujący ekspresję genów proteasomów, który jednocześnie jest substratem proteasomu. Gdyby homeostaza ubikwityny i homeostaza proteasomu stanowiły identyczne stany komórkowe, dwa degrony obecne w Rpn4 byłyby całkowicie zbędne<sup>55</sup>. Wykazano jednak, że w różnych warunkach komórki mogą doświadczać „stresu ubikwitynowego” i „stresu proteasomowego”<sup>56</sup>. Gdyby degradacja Rpn4 była ograniczona do zależności od koniugacji ubikwityny, w przypadku braku dostępności Ub doszłoby do nieodpowiedniej odpowiedzi regulacyjnej – wzrostu poziomu Rpn4 i napędzenia syntezy proteasomów, zaburzając tym samym metabolizm całej komórki.

Istnieje również rodzina białek wewnątrznie nieuporządkowanych IDPs (ang. intrinsically disordered proteins) oraz białek zawierających nieustrukturyzowane regiony IDR (ang. intrinsically disordered regions), które ze względu na częściowo lub całkowicie rozwiniętą strukturę mogą być degradowane przez proteasom 20S w sposób niezależny od ubikwityny.

W degradację niezależną od ubikwityny zaangażowany jest zazwyczaj proteasom 20S samodzielnie lub wraz z jego swoistymi regulatorami, które mają za zadanie pobudzać zdolności degradacyjne enzymu. Do takich regulatorów należą PA28<sup>57</sup> oraz PA200<sup>58</sup>. Aktywatory proteasomu specyficzne dla UIPS nie wykazują zdolności do wiązania

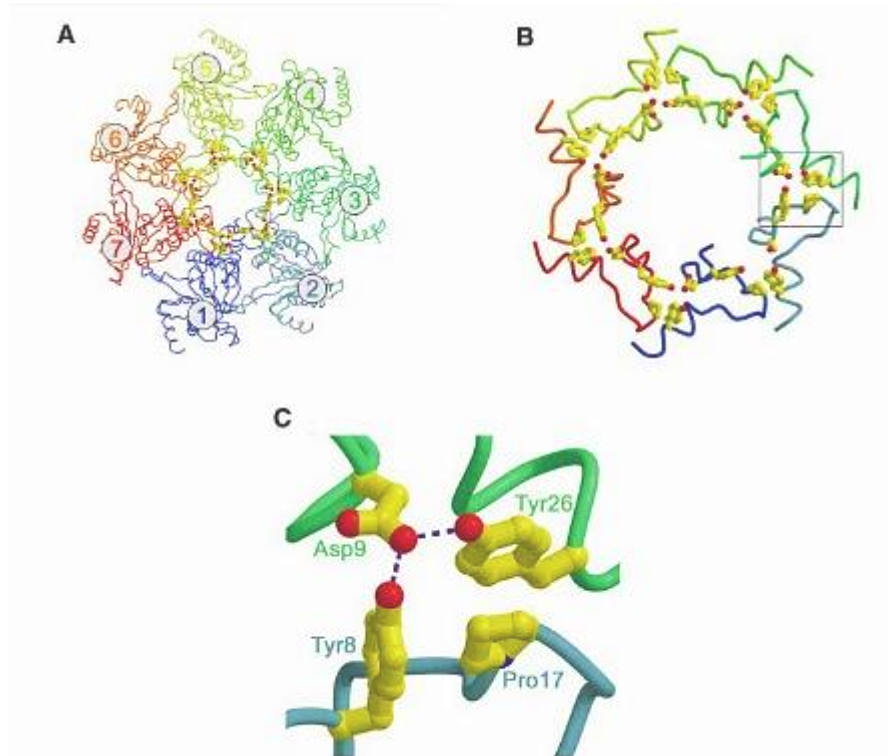
i rozfałdowywania substratów. Ich rola polega natomiast na otwieraniu bramy proteasomu 20S tworzonej przez *N*-końce zewnętrznych podjednostek alfa poprzez oddziaływanie wywołujące zmiany konformacyjne, powodując tym samym zwiększony przepływ substratów do miejsc degradacji. Sam proteasom 20S bez przyłączonego regulatora jest w stanie trawić tylko niewielkie, niesfałdowane substraty, które są w stanie wnikać do jego wnętrza nawet przez zamkniętą bramę katalityczną.

## 1.2.1. Regulacja proteasomu 20S w komórkach

### 1.2.1.1. PA28

Jednym z przedstawicieli komórkowych regulatorów proteasomu 20S, który aktywuje niezależną od ATP i ubikwityny degradację proteasomalną, jest regulator PA28 (nazywany również 11S, REG, lub PMSE). U kręgowców kompleksy PA28 tworzone są przez trzy wysoce homologiczne podjednostki:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o przybliżonej masie cząsteczkowej 28 kDa. Powstające w wyniku asocjacji kompleksy przyjmują postać heptameru heterogenicznego PA28 $\alpha\beta$  lub homogenicznego PA28 $\gamma$ , które oprócz struktury różnią się miejscem występowania oraz rolą jaką pełnią w organizmie. Podczas gdy PA28 $\alpha\beta$  u ssaków znajduje się głównie w cytoplazmie komórek limfoidalnych oraz w narządach układu immunologicznego, przyspieszając degradację utlenionych białek <sup>31</sup>, PA28 $\gamma$  znaleźć można w całym organizmie, a przeważnie w jądrach komórek mózgowych <sup>59</sup>. Dotychczasowe badania wskazują jakoby kompleks PA28 $\gamma$  wykazywał prodegradacyjne działanie stymulujące względem białek o nieuporządkowanej strukturze trzeciorzędowej <sup>60</sup>. Mechanizm aktywacji proteasomu przez regulator PA28 został zaproponowany w oparciu o strukturę krystaliczną drożdżowego proteasomu 20S (*Saccharomyces cerevisiae*) z regulatorem PA26. PA26 jest homologiem PA28 występującym u pasożyta – świdrowca nagany (*Trypanosoma brucei*), który pomimo różnic sekwencyjnych posiada strukturę analogiczną do kompleksu występującego u wyższych eukariontów i jest w stanie aktywować proteasomy wyizolowane z różnych gatunków <sup>61</sup>. Ponadto reszty proteasomu oddziałujące z aktywatorem również wykazują wysoką konserwatywność wśród proteasomów pochodzących z różnych organizmów. W strukturze krystalicznej rozwiązanej przez Hilla i współpracowników <sup>62</sup>, C-końcowe reszty PA26 zaobserwowano w kieszeniach sąsiadujących podjednostek  $\alpha$  proteasomu. Mostki solne utworzone pomiędzy C-końcowymi grupami karboksylowymi PA26 oraz grupami aminowymi Lys66 łańcuchów  $\alpha$ , a także liczne wiązania wodorowe, zapewniają wiązanie heptamerycznych pierścieni aktywatora i enzymu. Do samej zaś aktywacji proteasomu niezbędne są jeszcze 6-aminokwasowe pętle PA26, zawierające reszty Glu102 oddziałujące z resztami Pro17 znajdującymi się na powierzchni proteasomu. Oddziaływania te, nieznacznie przesuwając reszty proliny, powodują destabilizację zamkniętej bramy poprzez zaburzanie oddziaływań (wiązań wodorowych i sił van der Waalsa). Zmiana położenia reszt proliny 17 skutkuje nie tylko zniszczeniem oddziaływań

podtrzymujących zamkniętą strukturę, ale umożliwia również stabilizujące otwartą konformację interakcje pomiędzy Tyr8/Pro17 i Asp9/Tyr26 sąsiadujących podjednostek  $\alpha$ <sup>62, 63</sup> [Rys. 7].



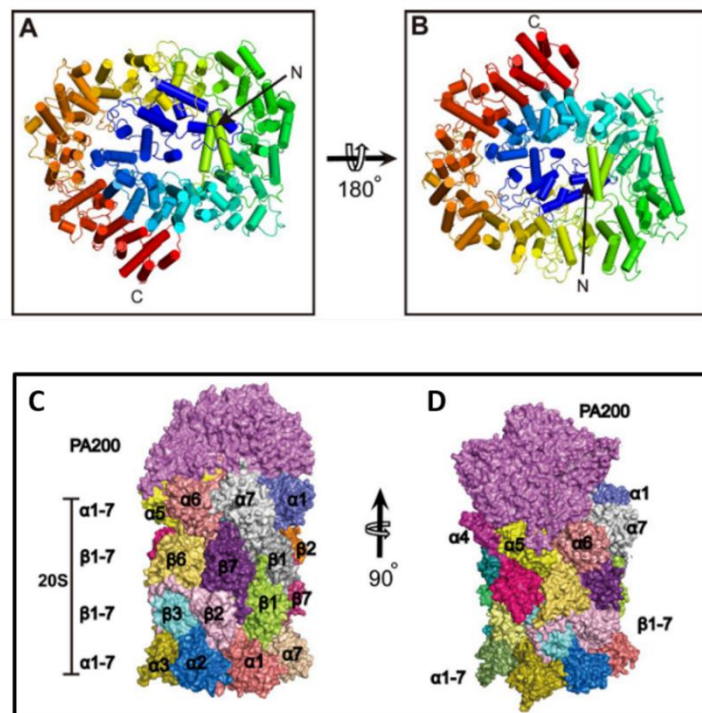
Rys. 7 Schemat przedstawiający interakcje PA26 z drożdżowym proteasomem 20S. A: widok z góry na kompleks PA26-y20S (cyframi 1-7 oznaczono podjednostki  $\alpha$ 1-7 proteasomu); B: zbliżenie ukazujące C-końce oraz pętle aktywne monomerów PA26 oddziałujących z pierścieniem  $\alpha$  proteasomu; C: wiązania wodorowe stabilizujące otwartą konformację pierścienia  $\alpha$

### 1.2.1.2. PA200

Kolejnym aktywatorem proteasomu, który pobudza enzym do degradacji białek niezależnej od wiązania ubikwityny oraz od energii pozyskanej z hydrolizy ATP, jest PA200. Jego drożdżowym odpowiednikiem jest białko Blm10, a obie te struktury (w przeciwieństwie do aktywatorów 19S oraz 11S) to monomeryczne białka o masie cząsteczkowej 200 kDa. Homologi te wykazują między sobą jedynie ok. 20% podobieństwa sekwencyjnego, które ograniczone jest do funkcyjnie kluczowych reszt aminokwasowych oraz motywów strukturalnych. Białko Blm10 zaangażowane jest w szereg procesów komórkowych, takich jak: spermatogeneza, naprawa pęknięć dwuniciowego DNA, a także utrzymanie dziedziczenia mitochondrialnego<sup>58, 64</sup>.



PA200/Blm10 wykryto również w nieaktywnym prekursorze proteasomu – 15S<sup>65, 66</sup>, a także w kompleksach z niedojrzałym 20S<sup>67</sup>, co dowodzi jego roli w procesach składania i dojrzewania proteasomów. PA200 ma kształt kopuły, która prawie całkowicie zbudowana jest z motywów typu helisa-zwrot-helisa zwanych HEAT (skrót pochodzący od 4 białek, w których znaleziono charakterystyczny motyw: Huntingtin - Elongation factor 3 - PR65/A subunit of PP2A - lipid kinase TOR). Dzięki takiej strukturze, utworzonej przez powtórzenia HEAT, białko PA200 na powierzchni 20S związa się w dwuwarstwową strukturę przypominającą ślimaka, oddziałując z kanałem translokacyjnym proteasomu i w ten sposób regulując jego właściwości proteolityczne [Rys.8]<sup>68</sup>.

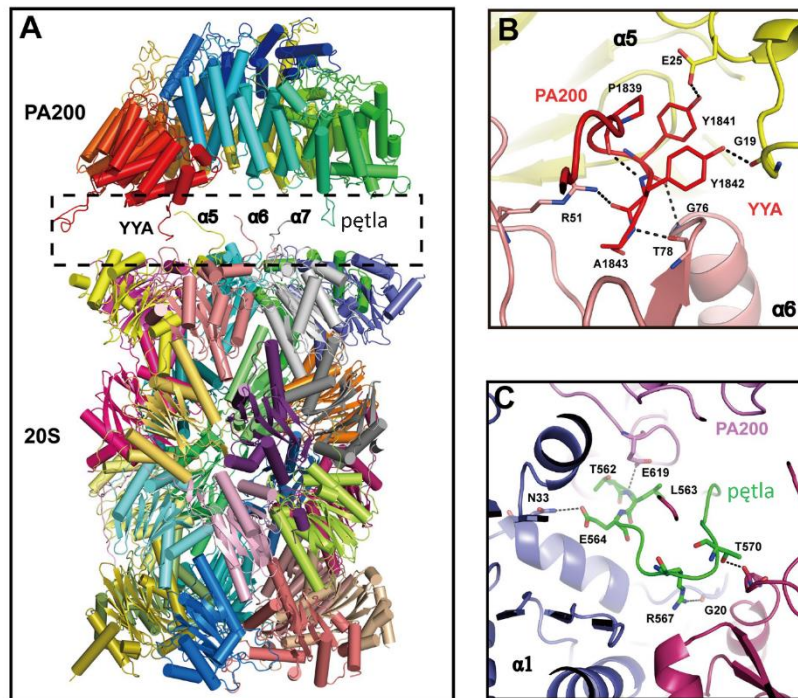


Rys. 8 Schemat ilustrujący białko PA200 oraz jego kompleks z proteasomem 20S. **A, B:** widok z góry (A) i z dołu (B) na strukturę białka PA200 przypominającą ślimaka, z zaznaczonym *N*- i *C*-końcem białka; **C, D:** widok z boku na kompleks PA200 z 20S, prezentujący interakcje pierścienia  $\alpha$  proteasomu z białkiem PA200

Udowodniono, że PA200 może tworzyć z proteasomem kompleksy takie jak: (PA200)<sub>2</sub>-20S, PA200-20S oraz PA200-20S-19S<sup>64</sup>.

Po związaniu jednej cząstki PA200 z pierścieniem  $\alpha$  proteasomu 20S, cały obszar tego pierścienia zostaje przearanżowany, tak aby uzyskać konformację otwartego kanału, umożliwiającą przejście substratu do komory katalitycznej. Dzieje się to poprzez interakcje zachodzące pomiędzy aktywatorem a enzymem. Liczne kontakty z

pierścieniem  $\alpha$  proteasomu tworzone są z C-końcowym motywem HbYX (sekwencja utworzona przez: **Hb** - aminokwas o charakterze hydrofobowym; **Y**-tyrozynę; **X**- dowolną resztę) białka PA200 tj. sekwencją Tyr1841-Tyr1842-Ala1843. Fragment ten oddziałuje z kieszenią  $\alpha5/\alpha6$  proteasomu w sposób podobny do aktywatorów 11S i 19S,



Rys. 9 **A**: Rysunek przedstawiający interakcje C-końca oraz pętli białka PA200 z podjednostkami  $\alpha5$ ,  $\alpha6$ ,  $\alpha7$  proteasomu; **B**: zbliżenie ukazujące reszty proteasomu zaangażowane w interakcje z C-końcem białka PA200; **C**: zbliżenie ilustrujące reszty proteasomu zaangażowane w interakcje z pętlą białka PA200

powodując przesunięcie Pro17, a w konsekwencji rozluźnienie bramy proteasomu. Dzieje się to za sprawą wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy atomami wodoru grup hydroksylowych Tyr1841 oraz Tyr1842 białka PA200 i atomami tlenu grup karbonylowych  $\alpha5$ Glu25 i  $\alpha5$ Gly19 proteasomu. Dodatkowe miejsce oddziaływania z proteasomem stanowi pętla Thr562-Lys574 domeny PA200, która tworzy kontakty z podjednostkami  $\alpha1$  i  $\alpha2$  proteasomu [Rys. 9] <sup>68</sup>.

### 1.2.2. Białka wewnętrznie nieuporządkowane jako substraty proteasomu 20S

Powszechnie spotykaną i dobrze opisaną grupą białek są białka globularne posiadające niepowtarzalną strukturę 3D, która wynika z ich sekwencji aminokwasowej oraz zestawu specyficznych niekowalencyjnych oddziaływań (oddziaływań elektrostatycznych, hydrofobowych, wiązań wodorowych czy też sił van der Waalsa). Struktura takich białek może zostać zniszczona na skutek ekspozycji na różne czynniki,

w skrajnych przypadkach powodując powstanie całkowicie nieuporządkowanego białka. Istnieje jednak grupa protein nieposiadająca ściśle określonej struktury nazywana białkami wewnątrznie nieuporządkowanymi IDP oraz hybrydy białkowe zawierające zarówno wewnątrznie nieuporządkowane regiony białkowe (IDR), jak i domeny uporządkowane. IDP i białka zawierające IDR charakteryzują się niską złożonością sekwencji i składem aminokwasowym z preferencjami do naładowanych reszt hydrofilowych. Brak rozbudowanych, hydrofobowych aminokwasów w strukturze skutkuje stosunkowo płaską powierzchnią takich białek, a słabe oddziaływania między resztami tworzą raczej zespół wzajemnie przekształcających się stanów konformacyjnych niż zwartą natywną konformację<sup>69</sup>. Statystyki wykazały, że białka te nie tylko występują we wszystkich organizmach żywych, ale ustalono również, że ich liczebność wzrasta proporcjonalnie do złożoności organizmu<sup>70</sup>. U organizmów eukariotycznych IDP stanowią ok. 30% całego proteomu<sup>71</sup>. Podłoże takiej nieuporządkowanej struktury przestrzennej białek IDP stanowi sekwencja aminokwasowa uboga w reszty promujące stabilne struktury tj. Trp, Cys, Tyr, Ile, Phe, Val, Asn i Leu, ale bogata z kolei w aminokwasy propagujące zaburzenia (Arg, Pro, Gln, Gly, Glu, Ser, Ala i Lys), a także w liczne powtarzające się fragmenty<sup>72, 73</sup>.

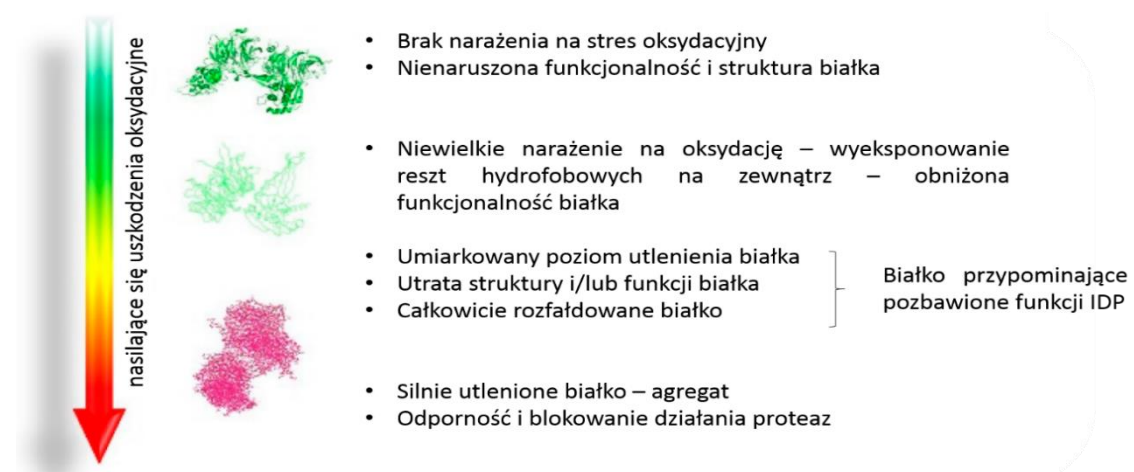
Ze względu na swoją dużą labilność białka takie są w stanie angażować się w wiele interakcji i brać udział w różnych procesach biologicznych, w szczególności w sygnalizacji i regulacji komórkowej. Poprzez takie partycypowanie w szlakach regulatorowych, białka IDP często wiązane są z różnymi stanami patologicznymi, takimi jak nowotwory lub choroby neurodegeneracyjne. Agregacja białek nieustrukturyzowanych ze względu na ich wysoką podatność do nieprawidłowego fałdowania oraz tworzenia losowych asocjacji jest przyczyną wielu proteinopatii<sup>74</sup>. Przykładem może być  $\alpha$ -synukleina, białko wewnątrznie nieuporządkowane, które na skutek różnych czynników (stresu oksydacyjnego, upośledzenia mitochondriów), a także swoistej elastyczności i podatności na modyfikacje ulega agregacji. Agregaty takie toksycznie akumulują się w komórkach, doprowadzając w konsekwencji do ich śmierci<sup>75</sup>. Innym przykładem mogą być białka zawierające powtarzające się fragmenty poliglutaminowe, które opisano między innymi jako przyczynę choroby Huntingtona.

Ponieważ *N*-końcowe fragmenty podjednostek  $\alpha$  proteasomu 20S blokują centralny kanał proteolityczny, może on trawić tylko niesfałdowane, rozciągnięte łańcuchy polipeptydowe<sup>76, 77</sup>. Niemniej jednak, obecność krótkiego, nieustrukturyzowanego

fragmentu, nie oznacza, że degradacja białka będzie odbywała się za pośrednictwem 20S. Większość IDP ulega również ubikwitynacji, która prowadzi je na ścieżkę degradacji przez proteasom 26S. Udowodniono jednak, że proteoliza nieuporządkowanych i nieubikwitynowanych substratów zachodzi szybciej przez 20S niż 26S<sup>78</sup>. Związane jest to zapewne z zawiłym systemem ubikwitynacji, przetwarzania i translokacji substratów przez proteasom 26S. Grupa białek IDP, które są substratami 20S, nazywana jest 20S-IDPome<sup>79</sup>. Stwierdzono również, że białka nieuporządkowane, o strukturze podobnej do prionów (PrLD), które oddziałują z białkami posiadającymi charakterystyczne powtórzenia dipeptydowe: Gly-Arg oraz Pro-Arg (białkami przyczyniającymi się do rozwoju ALS) są najbardziej preferowane jako substraty proteasomu 20S. Zasadniczym pytaniem pozostaje jednak, jak takie nieuporządkowane białka mogą być trawione przez proteasom 20S bez przyłączonego aktywatora. Jest to prawdopodobnie związane z obecnością pewnych specyficznych cech w nieuporządkowanych segmentach tych białek, które mogą samoistnie oddziaływać z  $\alpha$ -bramą proteasomu 20S i ułatwiać swoją własną degradację<sup>80</sup>.

Niestety, powstałe w stanach patologicznych formy oligomeryczne IDP nie są już tak dobrze trawione przez proteasom 20S. Udowodniono, że takie toksyczne oligomery, oddziałując z proteasomem, hamują jego aktywność i powodują zaburzenia w regulacji stężenia białek IDP w komórce. Taki stan prowadzi do jeszcze szybszego powstawania toksycznych agregatów, a spirala akumulacji sama się napędza, w konsekwencji czego dochodzi m.in. do postępu chorób neurodegeneracyjnych<sup>81, 82, 83</sup>.

### 1.2.3. Rola proteasomu 20S w trawieniu białek utlenionych na skutek stresu oksydacyjnego



Rys. 10 Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę białek

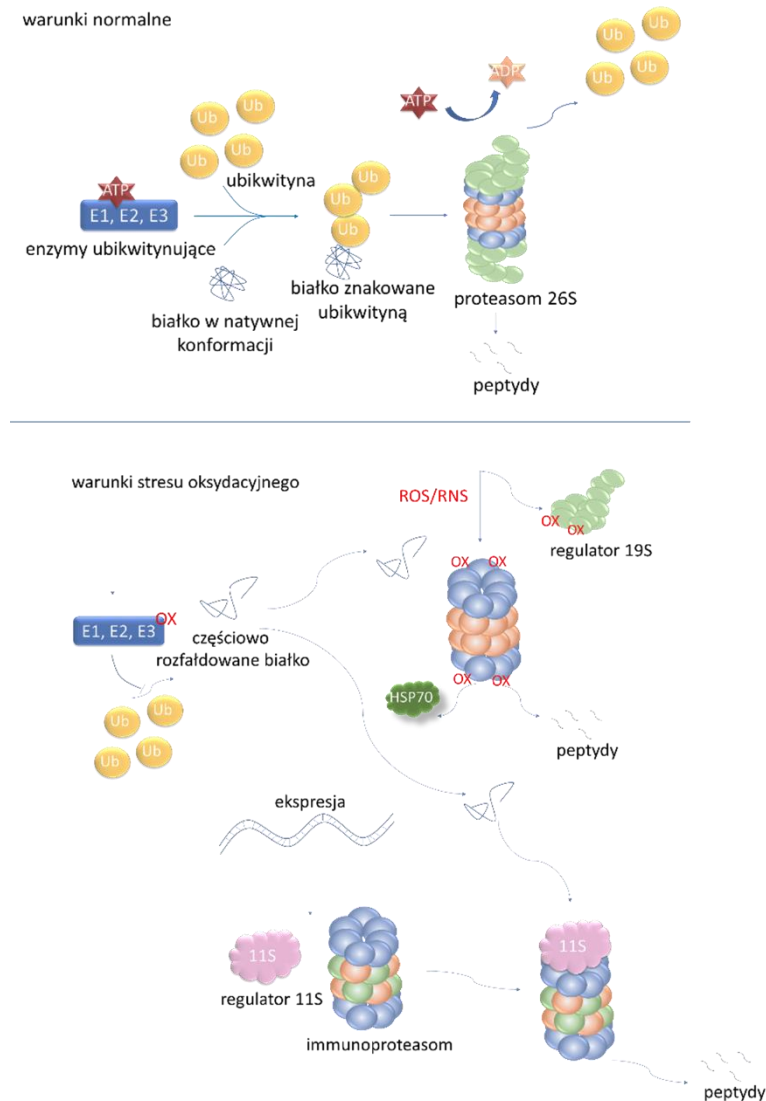
Metabolizmowi komórkowemu towarzyszy ciągle powstawanie wolnych rodników i utleniaczy. Reaktywne formy tlenu (ROS) oraz azotu (RNS) są uważane za główną przyczynę starzenia, dysfunkcji komórek oraz stanów patologicznych. Są one w stanie modyfikować wiele składowych komórki, takich jak białka, lipidy czy też kwasy nukleinowe. Ze względu na to, że modyfikacje oksydacyjne są procesami ciągłymi, w komórce wyewoluowało kilka systemów przeciwdziałania tym procesom. Część białek może zostać niejako naprawiona i przywrócona do wyjściowego stanu (sprzed utlenienia). W komórkach ssaków tylko dwie reszty aminokwasowe białek mogą być poddawane odwracalnej oksydacji: metionina i cysteina<sup>84</sup>. Jeśli natomiast białko zostanie utlenione nieodwracalnie, komórka posiada systemy rozpoznające oraz usuwające takie formy, np. lizosomy lub proteazy mitochondrialne<sup>85</sup>. Jednak głównym systemem „sprząającym” takie uszkodzone na skutek utleniania białka jest proteasom 20S<sup>86</sup>.

Większość białek globularnych posiada nieustrukturyzowane segmenty łańcucha peptydowego, jednakże albo są one schowane wewnątrz białka albo chronione przez białka opiekuńcze. Na skutek ekspozycji na stres oksydacyjny, białka ulegają utlenieniu, co może prowadzić do zwiększenia stopnia nieuporządkowania oraz destabilizacji białka, powodując odsłonięcie ukrytych wewnątrz fragmentów nieposiadających ustalonej struktury. Po wyeksponowaniu, segment taki może skierować całe białko do degradacji [Rys. 10]. Udowodniono, że białka utlenione na skutek stresu oksydacyjnego stają się substratami proteasomu 20S. Taka proteasomalna degradacja białek utlenionych ma ogromne znaczenie dla życia komórki. Redukcja poziomu utlenionych białek zapobiega tworzeniu powstałych na skutek silnych uszkodzeń oksydacyjnych toksycznych agregatów, które są odporne na degradację enzymatyczną<sup>87</sup>.

Ze względu na dużą odporność proteasomu 20S na stres oksydacyjny, w przeciwieństwie do 26S, który na skutek oksydacji ulega rozpadowi do 20S i 19S<sup>88</sup>, w przeważającej większości to 20S odpowiada za trawienie utlenionych białek. Co ciekawe, immunoproteasom wraz z aktywatorem 11S, których ekspresja zwiększa się wraz z ekspozycją na stres oksydacyjny, również odpowiadają za usuwanie utlenionych białek<sup>89, 90</sup>. W szczególności obecność podjednostki katalitycznej  $\beta 5i$  (zarówno w dojrzałym immunoproteasomie, jak i jego formach pośrednich, powstałych podczas składania białka) znacząco przyczynia się do degradacji takich białek<sup>91, 92</sup>.

W warunkach bezstresowych większość białek przeznaczonych do zniszczenia jest ubikwitynowana i rozkładana przez proteasom 26S. Białka regulatora 19S rozpoznają ubikwitynowane substraty, usuwają łańcuch poliubikwitynowy i pośredniczą w

otwieraniu  $\alpha$ -bramki. Ponadto dostarczają energii do rozwinięcia i wprowadzenia łańcucha polipeptydowego do wnętrza beczkowatej struktury 20S. W warunkach stresu



Rys. 11 Schemat przedstawiający degradację białek w warunkach normalnych (góra) oraz podczas narażenia komórek na stres oksydacyjny (warunki oksydacyjne oznaczone symbolem „OX”) (dół)

oksydacyjnego, białka, częściowo rozwinięte na skutek oksydacji, bezpośrednio oddziałują z pierścieniami  $\alpha$  proteasomu 20S poprzez oddziaływania hydrofobowe, eliminując potrzebę wykorzystania energii z hydrolizy ATP, jak również obecności regulatora 19S oraz enzymów ubikwitynujących, które na skutek narażenia na ROS/RNS ulegają dezaktywacji. Utlenianie grup tiolowych białek w pierścieniu  $\alpha$  proteasomu sprzyja dalszemu otwieraniu bramki 20S i wspomaga demontaż cząstek regulatora 19S, które są sekwestrowane przez Hsp70<sup>93</sup>.

Przewlekły stres oksydacyjny indukuje natomiast ekspresję alternatywnego regulatora 11S i trzech alternatywnych podjednostek katalitycznych  $\beta$ , które łączą się

w immunoproteasom 20S (i20S). Trawienie białek przez rdzeń i20S generuje inne peptydy niż 20S. Regulator 11S wiąże się zarówno z istniejącymi proteasomami 20S, jak i nowo złożonymi i20S. Oba działają niezależnie od ATP i zwiększają obrót białkami w proteasomie w warunkach stresu oksydacyjnego [Rys.11].

## 2. Proteasom 20S a procesy starzeniowe i choroby neurodegeneracyjne

### 2.1. Wykorzystanie UPS do przeciwdziałania proteotoksyczności

Zaburzenia neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy też stwardnienie zanikowe boczne, charakteryzują się postępującym upośledzeniem funkcji neuronów. Chociaż choroby te znacząco różnią się objawami klinicznymi, wszystkie ściśle wiążą się z akumulacją białek w komórkach. Jak już wcześniej wspomniano, dysfunkcja UPS może prowadzić do tworzenia się toksycznych agregatów. Nie jest jednak oczywistym, czy to akumulacja białek zaburza funkcje UPS czy też dysfunkcja UPS prowadzi do odkładania białek. Te przypuszczenia są przedmiotem wielu badań naukowców na całym świecie. Jedna z tez tłumaczy, że odkładające się białka są w stanie niejako „zatykać” bramę proteasomu, upośledzając jego funkcjonowanie<sup>94</sup>. Taka rosnąca proteotoksyczność związana z odkładaniem się białek przyczynia się natomiast do powstania sprzężenia zwrotnego, powodując dysfunkcję mitochondriów, zwiększanie poziomu ROS oraz uszkodzenia DNA<sup>93</sup>. Te procesy napędzają zarówno dalsze nieprawidłowe fałdowanie białek, jak również inaktywację proteasomu poprzez utlenianie jego podjednostek. Liczne doniesienia sugerują jednak, iż komórki wypracowały różne mechanizmy w celu przeciwdziałania temu problemowi; na przykład wzrost reaktywnych form tlenu indukuje ekspresję PA28 $\alpha$ , która z kolei promuje aktywność UPS<sup>95</sup>.

Ponadto stres oksydacyjny indukuje ekspresję podjednostek 20S poprzez czynnik stresu oksydacyjnego Nrf2 (SKN-1), który w odpowiedzi na inhibicję proteasomu, uruchamia mechanizm kompensujący poprzez pobudzenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę proteasomu 20S<sup>96</sup>, przy czym nie zauważono przy tym wzrostu poziomu 19S<sup>97</sup>. Ponadto, stres oksydacyjny pośredniczy w rozkładaniu 26S zależnym od białka Ecm29, które to białko nie wpływa na funkcje proteasomu

w komórkach nienarażonych na oksydację<sup>98</sup>. Doniesienia te sugerują więc, że komórki narażone na oksydację usuwają nieprawidłowo sfałdowane białka oraz białka uszkodzone oksydacyjnie poprzez niezależny od ubikwityny system proteasomalny.

## 2.2. Wpływ procesów starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych na zawartość proteasomów w komórce

Nieuniknionym skutkiem starzenia się organizmu jest postępująca utrata funkcjonalności całego proteomu. Wiele badań potwierdziło, że skuteczność systemów proteolitycznych zmniejsza się wraz z wiekiem<sup>99, 100</sup>.

Aktywność proteasomu w starzejącym się organizmie może być znacznie obniżona, co zaobserwowano w różnych komórkach i tkankach, w tym w limfocytach<sup>101</sup>, komórkach rdzenia kręgowego<sup>102</sup>, czy też w fibroblastach, które potraktowane inhibitorami proteasomu wykazywały skróconą żywotność oraz słabe zdolności replikacji<sup>103, 104</sup>. Upośledzenie aktywności proteasomu w starzejących się komórkach może wynikać ze zmniejszonej ekspresji jego podjednostek, w tym podjednostek tworzących regulator 19S<sup>104</sup>. W innym badaniu Ponnappan i wsp. potwierdzili obniżenie aktywności systemu UPS poprzez stwierdzenie upośledzenia indukcji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B u osób starszych w porównaniu z młodszymi organizmami. To właśnie obniżenie aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 26S wiąże się z niezdolnością do degradacji białka I $\kappa$ B $\alpha$  - inhibitora NF- $\kappa$ B, które ściśle wiąże się ze stanami zapalnymi u ludzi w podeszłym wieku<sup>105</sup>. Wydaje się, że starzenie ma również wpływ na znakowanie substratów białkowych ubikwityną. Podczas badania tkanki soczewki bydłowej udokumentowano spadek poziomu wolnej ubikwityny, a postępująca z wiekiem bydłeca katarakta korelowała z obniżeniem transkrypcji ligazy E3<sup>106</sup>.

Proces starzenia się organizmu wpływa również niekorzystnie na zawartość i funkcjonowanie immunoproteasomu<sup>107</sup>. Zubożenie komórek odpornościowych we wspomniany rodzaj proteasomu powoduje mniej efektywną prezentację peptydów dla białek klasy MHC, w wyniku czego odpowiedź immunologiczna słabnie, a antygeny pochodzące od patogenów mogą nie zostać prawidłowo rozpoznane i zwalczone<sup>108</sup>.

Choroby związane z proteotoksycznością wynikającą z nadmiarowej agregacji białek są ściśle powiązane z procesem starzenia się komórek. Wśród tych chorób wymienia się schorzenia takie jak choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD), Huntingtona (HD) czy też stwardnienie zanikowe boczne (ALS). Schorzenia te łączą



jeden wspólny wzorzec pojawiania się białkowych agregatów, który częściej objawia się w podeszłym wieku <sup>109</sup>. Nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek może prowadzić do zaburzeń funkcji komórkowych i ostatecznie do śmierci neuronów, objawiającej się chorobą neurodegeneracyjną. Zmiany w ilościach proteasomów mogą po części tłumaczyć, dlaczego starzenie się stanowi czynnik ryzyka wymienionych schorzeń <sup>110</sup>. Eksperymenty z wywołaną utratą funkcji proteasomu wykazywały wzmocnienie fenotypu chorób neurodegeneracyjnych <sup>111</sup>. Ponadto, ciała inkluzyjne AD, PD, HD i ALS zawierały nieprawidłowe ilości ubikwityny, co sugeruje związek pomiędzy dysfunkcją proteasomu a neurodegeneracją organizmu <sup>112, 113</sup>.

### 3. Niskocząsteczkowe aktywatory proteasomu 20S

Powszechnie wiadomo, że proces starzenia jest ściśle powiązany z akumulacją uszkodzonych i nieprawidłowo sfałdowanych białek. Zjawisku temu towarzyszy zmniejszona aktywność proteasomu. Kiedy akumulacja nadmiarowych białek przewyższa degradację, dochodzi do niepożądanego sygnalizacji i/lub agregacji, które są cechami charakterystycznymi chorób neurodegeneracyjnych i wielu nowotworów. W związku z tym, zwiększanie aktywności proteasomu zostało uznane za nowe podejście do opóźnienia wystąpienia lub złagodzenia objawów neurodegeneracyjnych, a poszukiwanie niskocząsteczkowych aktywatorów proteasomu nowym obszarem zainteresowań naukowców z całego świata.

#### 3.1. Odczynniki denaturujące

Pierwszym poznany agonistą proteasomu 20S był laurylosiarczan sodu (SDS – ang. sodium dodecyl sulfate). Ta powszechnie znana substancja była w stanie zaktywować enzym niemal 20-krotnie, jednakże tylko poniżej tzw. krytycznego stężenia micelarnego. Takie wyniki potwierdziły mechanizm działania SDS jako swoistego detergentu, który prawdopodobnie niejako denaturuje strukturę proteasomu, powodując otwieranie bramy i umożliwiając wniknięcie substratu do komory katalitycznej <sup>114</sup>. Takie działanie substancji w wąskim zakresie stężeń, tj. obserwowanie aktywacji wszystkich peptydaz proteasomu tylko przy niskich stężeniach, a przy wyższych uwidocznienie inhibicji, nazwano działaniem aktywacyjnym detergentopodobnym. Podobne do SDS działanie stymulujące proteasom wykazuje szereg innych substancji, takich jak kwasy tłuszczowe <sup>115, 116</sup> czy też szeroko opisywana oleuropeina <sup>117</sup>. Niestety, tego typu

aktywatory nie mogą być stosowane w medycynie w celu pobudzania aktywności proteasomu. Ich wadą jest możliwość wywołania niespecyficznych interakcji, które mogłyby przyczynić się do pojawienia się niekorzystnych skutków ubocznych. SDS sam w sobie jest za to chętnie stosowany w badaniach *in vitro* jako substancja rozluźniająca natywnie ściśle zamkniętą bramę proteasomu.

### 3.2. Związki małowczątkowe

Pomimo iż zaburzenia proteasomalnego systemu degradacji są ściśle powiązane z chorobami neurodegeneracyjnymi, ciężko doszukać się przykładów zastosowania indukcji jego aktywności w terapiach medycznych. Istnieje jednak spora grupa małowczątkowych związków, które mają duży potencjał w tej dziedzinie. Jednym z przykładów może być opisany jako aktywator proteasomu kwas betulinowy<sup>118</sup>. Kwas betulinowy należy do rodziny terpenów, a izoluje się go z kory tzw. brzozy omszonej (*Betula pubescens*)<sup>119</sup>. Niestety, pomimo pobudzania aktywności proteasomu 20S do trawienia małych substratów peptydowych, nie jest on w stanie stymulować enzymu do rozkładania białek zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*<sup>120</sup>. Do innych aktywatorów pochodzenia naturalnego możemy zaliczyć kwas ursolowy oraz oleuropeinę, a także lipidy, kwasy tłuszczowe oraz fosfolipidy<sup>121</sup>.

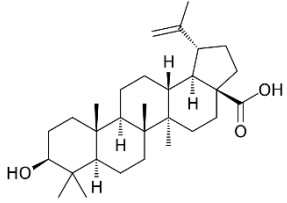
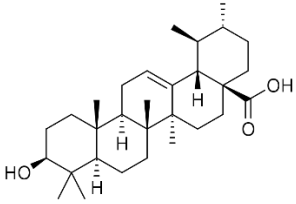
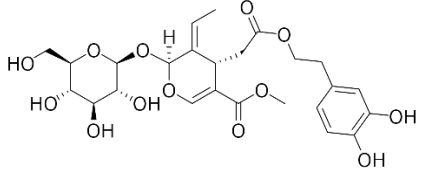
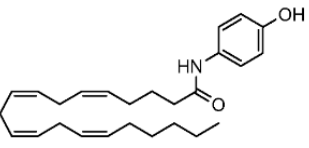
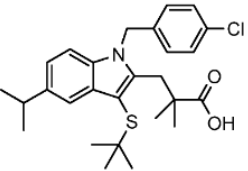
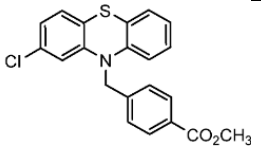
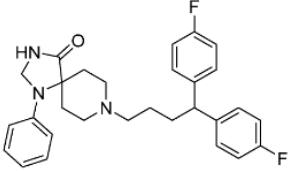
Jako aktywatory proteasomu zidentyfikowano również dwa związki nieposiadające pochodzenia naturalnego: AM-404 i MK-886, które były w stanie stymulować proteasom do trawienia  $\alpha$ -synukleiny w żywych komórkach<sup>120</sup>. Naukowcom udało się określić dla związku AM-404 wymagania strukturalne niezbędne do aktywacji proteasomu, którymi były: obecność długiego alifatycznego łańcucha węglowego posiadającego wiązanie podwójne o konfiguracji *cis* pomiędzy atomami węgla C9 i C10. Motyw ten strukturalnie przypomina kwas oleinowy, który również posiada właściwości stymulujące 20S<sup>122</sup>.

Do innych aktywatorów enzymu zaliczyć można również chloropromazyny<sup>123</sup>, wykorzystywane ponadto w leczeniu schizofrenii, a także imidazoliny, posiadające właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe<sup>124</sup>.

Kolejnym ciekawym aktywatorem proteasomu 20S jest cząsteczka fluspirylenu. Związek ten nie tylko jest w stanie pobudzać proteasom, ale również przeciwdziałać zaburzeniom pracy enzymu wywołanym przez toksyczne oligomery, co udowodniono w badaniach na izolowanym proteasomie. Inną zaletą tego związku jest selektywne pobudzanie aktywności 20S w odniesieniu do proteasomu 26S<sup>125</sup>.

Struktury wymienionych powyżej aktywatorów proteasomu 20S zawiera Tabela 1.

Tabela 1 Struktury małowcząsteczkowych aktywatorów proteasomu 20S

Małowcząsteczkowe aktywatory proteasomu	
	Kwas betulinowy <sup>118</sup>
	Kwas ursolowy <sup>126</sup>
	Oleuropeina <sup>117</sup>
	AM-404 <sup>122</sup>
	MK-886 <sup>127</sup>
	Chlorpromazyna analog 8 <sup>128</sup>
	Fluspirylen <sup>125</sup>


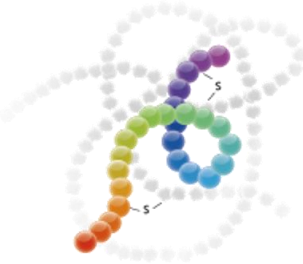
Wymienione powyżej przykładowe małowcząsteczkowe związki będące agonistami proteasomu 20S dają wielkie nadzieje w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, które nadal należą do grupy tych nieuleczalnych. Należy jednak

zaznaczyć, że do tej pory nie zostały poznane długofalowe skutki działania takich aktywatorów. Aby mogły być rozpatrywane w charakterze leków, niezbędne jest przeprowadzenie badań *in vivo*, ocena toksyczności, selektywności, a przede wszystkim mechanizmu działania takich związków.

### 3.3. Terapeutyczne zastosowanie peptydów

Zgodnie z definicją IUPAC peptydy to polimery zbudowane z maksymalnie 50 reszt aminokwasowych <sup>129</sup>.

Terapeutyczne zastosowanie bioaktywnych peptydów sięga roku 1920, kiedy to insulina pozyskiwana ze zwierząt zrewolucjonizowała leczenie cukrzycy <sup>130</sup>. Początkowo peptydowe środki terapeutyczne ograniczały się do peptydów pochodzenia naturalnego. Postęp w syntezie peptydów, który nastąpił w połowie XX wieku, pozwolił na otrzymanie pierwszych syntetycznych leków peptydowych: oksytocyny i wazopresyny <sup>131</sup>. Merrifield zrewolucjonizował podejście do otrzymywania syntetycznych peptydów poprzez wprowadzenie syntezy peptydów w fazie stałej (SPPS), która to metoda zapewnia szybki i niezawodny dostęp do prawie wszystkich peptydów <sup>132</sup>. Intensywne prace badawcze skupiały się również na strategii poprawy parametrów farmakokinetycznych peptydów. Postępy w tej dziedzinie wzmocniły rynek peptydów, a obecnie FDA zatwierdziła ponad 100 peptydów leczniczych, przy czym wiele innych jest w fazie badań klinicznych <sup>133</sup>. Trend ten nadal jest rosnący ze względu na postęp w syntezie peptydów i wyższy wskaźnik sukcesu leków peptydowych w badaniach klinicznych, wynikający z korzystniejszych właściwości w porównaniu do związków małowcząsteczkowych <sup>134</sup>. Peptydy zwykle wykazują silne powinowactwo do celu będącego przedmiotem zainteresowania, a dzięki swojej strukturze i zdolności do tworzenia różnego typu wiązań (wodorowych, hydrofobowych, van der Waalsa, mostków solnych, mostków disulfidowych) mogą oddziaływać z różnymi molekułami, co umożliwia im celowanie w tak zwane choroby nieuleczalne. Dodatkowo ich wysoka selektywność i specyficzność zmniejsza ryzyko wystąpienia efektów ubocznych [Rys. 12].

Związki małowcząsteczkowe	Peptydy
	
<b>Zalety</b>	
Wysoka biodostępność przy podaniu doustnym	Silne działanie w małych dawkach
Stabilność metaboliczna	Wysoka selektywność
Szeroka gama celów farmakologicznych	Szeroka gama celów molekularnych
Mała masa cząsteczkowa	Niska toksyczność
	Brak lub niewielka akumulacja w tkankach
	Wysoka różnorodność chemiczna i biologiczna
<b>Wady</b>	
Wysoka toksyczność	Niska stabilność metaboliczna
Skutki uboczne stosowania	Słaba przenikalność przez błony biologiczne
Potencjalnie niska rozpuszczalność	Obniżona biodostępność przy podaniu doustnym
Niska selektywność	Czasami słaba rozpuszczalność
Wysokie koszty produkcji	

Rys. 12 Porównanie właściwości związków małowcząsteczkowych i peptydów jako potencjalnych leków

### 3.3.1. Strategie projektowania peptydowych aktywatorów proteasomu 20S

Funkcje jakie proteasom 20S pełni w organizmie, a także ich ścisły związek z procesami starzenia, stresem oksydacyjnym oraz licznymi chorobami, powodują, iż jest on coraz częściej wybieranym celem molekularnym dla opracowywania nowych leków. Ze względu na ich liczne zalety, peptydy wydają się być idealnymi kandydatami na aktywatory takiego dużego kompleksu enzymatycznego [Rys.12].

Projektowanie peptydowych aktywatorów enzymu często zaczyna się od przeanalizowania struktury białek, które naturalnie pobudzają enzym w komórkach.

Znalezienie fragmentu sekwencji białka odpowiedzialnej za wiązanie z enzymem stanowi zazwyczaj pierwszy krok w projektowaniu aktywnego peptydu. Następnie przeprowadza się badania typu struktura-aktywność (ang. SAR – Structure-Activity Relationship) w celu zidentyfikowania motywów odpowiedzialnych za funkcje biologiczne. W tym celu można posłużyć się metodą tworzenia biblioteki związków, a także technikami komputerowymi, takimi jak modelowanie molekularne lub dokowanie. Po określeniu minimalnej sekwencji aktywnej, kolejnym krokiem jest wprowadzanie modyfikacji mających na celu poprawę aktywności, a także stabilności i biodostępności cząsteczki. Ważnym jest również określenie mechanizmu aktywacji, które pozwala na przewidzenie ewentualnych skutków ubocznych stosowania takiego peptydowego leku.

Proteasom należy do tak zwanych enzymów allosterycznych, w którym poza centrami aktywnymi, występują również miejsca allosteryczne, podatne na wiązanie zewnętrznych substancji, co skutkuje zmianą aktywności enzymu. Mechanizm allosterycznej aktywacji proteasomu 20S omówiono w kolejnym podrozdziale.

### 3.3.2. Mechanizm allosterycznej aktywacji proteasomu 20S

Termin „allosteria” odnosi się do procesów, w których wiązanie liganda w jednym miejscu makrocząsteczki biologicznej wpływa na jej aktywność w innym, odrębnym miejscu funkcjonalnym, umożliwiając regulację odpowiedniej funkcji. Nazwa „modulator allosteryczny” odnosi się do efektora wywołującego zmiany konformacyjne powodujące zmiany aktywności. Pierwsze wzmianki na temat takich mechanizmów sięgają lat 60-tych XX wieku, a obecnie uważa się, że allosteryczna regulacja odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak transdukcja sygnałów, aktywacja enzymów i regulacja szlaków metabolicznych <sup>135</sup>. Dziś wiadomo, że przemiany allosteryczne mogą zachodzić zarówno pod wpływem związania zewnętrznego liganda, jak również na skutek czynników środowiskowych lub modyfikacji potranslacyjnych białek. Klasyczne podejścia do opracowywania leków, wykorzystujące ligandy ortosteryczne, mogą napotykać pewne przeszkody, które można pokonać za pomocą ligandów allosterycznych. Przykładem mogą być białka należące do licznych rodzin np. proteaz lub kinaz, które charakteryzują się stosunkowo konserwatywnymi miejscami katalitycznymi (ortosterycznymi). Cząsteczki kandydatów na leki, ukierunkowanych na takie cele terapeutyczne, mogą więc wykazywać niską selektywność, co prowadzi *in vivo* do niepożądanych efektów. Warto również pamiętać,

że stosowanie leków opartych na klasycznej kompetycyjnej inhibicji ortosterycznej, może prowadzić do nagromadzenia nieprzetworzonego substratu, który zacznie konkurować z inhibitorem, tworząc sprzężenie zwrotne zaburzające jego działanie. Pod tym względem najbardziej pożądanym jest mechanizm niekonkurencyjny, ponieważ wiązania inhibitora z już złożonym kompleksem enzym-substrat nie można pokonać ani przez nadprodukcję enzymu, ani przez akumulację substratu.

Kolejną zaletą allosterii jest fakt, iż enzymy posiadają zazwyczaj więcej miejsc podatnych na allosteryczną regulację aniżeli miejsc ortosterycznych, w których wiążą się regulatory kompetycyjne. Dodatkowo, modulacja allosteryczna może być stosowana jako terapia skojarzona w celu przeciwdziałania lub opóźniania wywołanej mutacją utraty aktywności ortosterycznych leków, jak ma to miejsce w przypadku nowotworów. Ponadto wymagania chemiczne dla liganda, narzucone przez miejsce katalityczne, z którym ma oddziaływać, mogą nie pokrywać się z wymaganiami fizykokinetycznymi leku.

Proteasom jako wielkocząsteczkowy kompleks enzymatyczny, wykazuje wiele form regulacji allosterycznej. Komunikacja regulacyjna w proteasomie może rozciągać się na odległość przekraczającą 100 Å i modulować interakcje między jego dwoma głównymi modułami: rdzeniem oraz kompleksami regulatorowymi. Efektory allosteryczne mogą zarówno pobudzać działanie proteasomu (aktywatory), jak i powodować zahamowanie jego funkcji (inhibitory). Dodatkowo, dzięki wykorzystaniu allosterii możliwe jest selektywne modulowanie tylko jednego z trzech miejsc aktywnych enzymu. Dowodów na allosteryczną regulację proteasomu dostarczają badania przeprowadzone z wykorzystaniem kilku różnych metod, takich jak mikroskopia sił atomowych (AFM), spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz mikroskopia elektronowa (EM), a także testy biochemiczne. Analiza kinetyki trzech proteasomalnych peptydaz wskazuje, że centra aktywne są związane w sieć interakcji, od kooperacji dwóch miejsc katalitycznych ChT-L (trawienie substratu przez jedną z podjednostek  $\beta 5$  powoduje pobudzenie drugiej - bliźniaczej podjednostki, o czym świadczy sigmoidalny wykres kinetyczny, charakterystyczny dla enzymów allosterycznych<sup>17</sup>), do złożonych schematów aktywacji/hamowania, prawdopodobnie obejmujących niekatalityczne miejsca wiązania substratów<sup>136</sup>.

Omówione wcześniej naturalne aktywatory proteasomu 20S, czyli kompleks 19S, białko PA200, a także kompleks PAN (ang. *Proteasome-Activating Nucleotidase* – archeonowy aktywator proteasomu, homolog eukariotycznego regulatora 19S) oddziałują z enzymem w sposób allosteryczny. Za motyw kluczowy dla oddziaływania tych regulatorów z proteasomem uważa się sekwencję HbYX (Hb – aminokwas o hydrofobowym łańcuchu bocznym, Y- reszta tyrozyny, X – dowolny aminokwas), którą posiadają wszystkie wspomniane cząstki. Jak potwierdzono licznymi badaniami, zarówno C-koniec białka Blm10<sup>137</sup>, jak i C-końce podjednostek Rpt2 i Rpt5 regulatora 19S<sup>138</sup>, a także końcowe aminokwasy podjednostek homologicznego kompleksu PAN<sup>139</sup> wiążą się w kieszeniach tworzonych przez sąsiadujące podjednostki  $\alpha$  proteasomu. Uważa się, że interakcje kieszeni z konserwatywnym motywem HbYX skutkują rotacją podjednostek  $\alpha$  i przemieszczeniem pętli zwrotnej, która utrzymuje konformer z otwartą bramą, pozwalając na wejście substratu do komory katalitycznej. Co ciekawe, wiązanie to nie jest uwarunkowane tylko obecnością motywu HbYX, ponieważ podjednostka Rpt3 regulatora 19S, pomimo posiadania sekwencji Phe-Tyr-Lys na swoim C-końcu, nie pobudza aktywności enzymu<sup>140</sup>.

Z pierścieniem  $\alpha$  proteasomu, pomimo braku charakterystycznego motywu HbYX, w sposób allosteryczny oddziałuje również kompleks 11S. Co ciekawe, jego dwa homologi PA28 $\gamma$  oraz PA28 $\alpha\beta$  wykazują najprawdopodobniej inne mechanizmy allosteryczne. Podczas gdy heptamer PA28 $\alpha\beta$  najpewniej indukuje tylko otwieranie bramy proteasomu, PA28 $\gamma$  specyficznie reguluje aktywność trypsynopodobną. Podejrzewano, że ta selektywna aktywacja może wynikać z działania podobnego do sita, które przepuszcza przez bramę tylko substraty podatne na degradację przez podjednostkę  $\beta 2$ , tym samym hamując dostęp dla substratów przeznaczonych dla pozostałych miejsc ortosterycznych. Za inny potencjalny mechanizm podwyższonej aktywności trypsynopodobnej w obecności regulatora PA28 $\gamma$  uważano przekształcanie podjednostek katalitycznych  $\beta 1$  i  $\beta 5$  w podjednostki  $\beta 2$ . Szereg badań pozwolił jednak wykluczyć dwa powyższe mechanizmy udowadniając, iż najbardziej prawdopodobnym sposobem selektywnej degradacji substratów bogatych w reszty zasadowe jest allosteryczne oddziaływanie dalekiego zasięgu z podjednostkami  $\beta 2$ <sup>141</sup>. Wyniki te pokazują, jak bardzo skomplikowanym procesem jest allosteryczna modulacja i jak niewielkie różnice strukturalne mogą wpływać na efekty wywoływane przez allosterycznych agonistów proteasomu.



Najnowsze badania wskazują również, iż związanie na jednym z dwu pierścieni  $\alpha$  regulatora zawierającego C-końcowy motyw HbYX nie tylko powoduje otwarcie bramy tegoż pierścienia, ale również allosterycznie otwiera bramę tworzoną przez N-końce drugiego (przeciwległego) pierścienia  $\alpha$ , tworząc w ten sposób oddziaływania dalekiego zasięgu. Co ciekawe, aktywatory nieposiadające na C-końcu sekwencji HbYX, takie jak PA26, nie wykazują podobnego efektu <sup>142</sup>.

Małe wirusowe białko HIV-1 Tat również allosterycznie wpływa na aktywność proteasomu 20S. W sekwencji tego białka znajduje się tak zwany motyw RTP (ang. REG/Tat-proteasome-binding site), który występuje również w sekwencji regulatora PA28. Uważa się, iż białko HIV-1 Tat poprzez ten właśnie motyw konkuruje o miejsce wiązania ze wspomnianym aktywatorem, wiążąc się z rdzeniem 20S i silnie hamując aktywność ChT-L. Miejscem odpowiedzialnym za allosteryczną modulację proteasomu przez białko HIV-1 Tat są najprawdopodobniej reszty Lys51, Arg52 oraz Asp67, natomiast motyw RTP w aktywatorze PA28 tworzą reszty Glu235, Lys236, Lys239 <sup>143</sup>.

Oprócz wspomnianej powierzchni pierścieni  $\alpha$ , w tak rozbudowanym kompleksie jak proteasom, mogą występować jeszcze inne miejsca podatne na allosteryczną regulację jego aktywności. Inne miejsca wiązania, a także wpływ niewielkich modyfikacji na allosteryczne właściwości modulatorów, pokazano na przykładzie peptydów bogatych w reszty proliny i argininy (PR). Związki te przez długi czas uważane były za inhibitory proteasomu 20S <sup>144</sup>, jednakże zamiana C-końcowych reszt aminokwasowych w tych peptydach spowodowała, iż stały się jego aktywatorami <sup>145</sup>. Badania z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego połączone z modelowaniem molekularnym, a także sieciowaniem chemicznym sprzężonym ze spektrometrią mas wskazują, że miejscem wiązania peptydów PR jest C-końcowa część podjednostki  $\alpha 7$ , umieszczona na zewnętrznym obrzeżu powierzchni  $\alpha$  <sup>146</sup>. Pozostaje więc otwarta kolejna droga allosterycznej modulacji proteasomu, wiodąca z obrzeży pierścieni  $\alpha$  aż do miejsc katalitycznych enzymu.

Chlorochina, znana jako lek antymalaryczny, oddziałuje z kolei ze stosunkowo dużą, ujemnie naładowaną powierzchnią proteasomu 20S w miejscu styku pierścieni  $\alpha$  i  $\beta$ , inhibując jego aktywność. W podobny sposób wiąże się jej analog – 5AHQ. Oddziaływanie to rozciąga się na ok. 20 Å od miejsc aktywnych enzymu i stanowi kolejny przykład allosterycznej regulacji proteasomu <sup>136</sup>.

### 3.3.3. Peptydowe aktywatory proteasomu

Do znanych związków regulujących aktywność proteasomów należą m.in. peptydy i peptydomimetyki.

Przykładem takiego aktywatora proteasomu jest peptyd PAP1, który pobudza właściwości proteolityczne proteasomu i jest w stanie zapobiegać agregacji białka SOD1 w komórkowym modelu stwardnienia zanikowego bocznego <sup>82</sup>.

Syntetyczne allosteryczne modulatory peptydowe mogą również pochodzić z regionów wiążących naturalnych białkowych regulatorów proteasomów, takich jak regulator 19S i białko Blm10/PA200. Krótkie peptydy zawierające motywy HbYX, wywodzące się z podjednostek Rpt2 i Rpt5 regulatora 19S, zwiększały *in vitro* degradację peptydów i białek za pośrednictwem bydłowego proteasomu 20S <sup>138</sup>. Wykazano również, że peptyd Rpt5 konkuruje z oligomerami amyloidu  $\beta$  (będącego głównym składnikiem blaszek starczych obecnych w strukturach mózgowych osób chorych na chorobę Alzheimera) o wiązanie z 20S, zapobiegając w ten sposób hamowaniu proteasomu <sup>82</sup>.

Ponadto Blm-pep, 14-resztowy peptyd, którego sekwencja pochodzi od białkowego aktywatora Blm10, skutecznie stymulował wszystkie trzy aktywności ludzkiego proteasomu 20S w sposób zależny od dawki <sup>147</sup>.

Zaprojektowane z użyciem techniki modelowania molekularnego peptydomimetyki - analogi zawierające modyfikacje sekwencji Blm-pep - okazały się jeszcze silniejszymi aktywatorami proteasomu 20S. Otrzymane przez mnie związki najskuteczniej stymulowały peptydazy ChT-L i T-L proteasomu 20S. Co więcej, były one zdolne do wzmocnienia degradacji natywnie niesfałdowanych i uszkodzonych przez utlenianie substratów białkowych (w tym podatnej na agregację  $\alpha$ -synukleiny) przez proteasom 20S <sup>148</sup>.

Niedawno udało się również opracować model oddziaływania motywu HbYX z kieszenią utworzoną przez podjednostki  $\alpha$  proteasomu pochodzącego z archeonów (T20S), który od proteasomu ssaczego odróżnia homoheptameryczny pierścień  $\alpha$ . T20S przez swoją uproszczoną budowę umożliwia zastosowanie symetrycznych modeli, co maksymalizuje rozdzielczość prowadzonych pomiarów, przy czym enzym ten posiada konserwatywne dla proteasomów elementy biorące udział w bramkowaniu, takie jak motyw YDR na *N*-końcach podjednostek  $\alpha$ , Pro17 oraz charakterystyczne stany

zamknięte i otwarte bramy proteasomu. Struktura cryo-EM peptydu ZYA (Cbz-Tyr-Ala), opisanego jako minimalny motyw imitujący sekwencję HbYX, z proteasomem T20S, a także wyniki badań przeprowadzonych na mutantach T20S pozwoliły zaproponować potencjalny mechanizm otwierania bramy proteasomu, w którym szczególną rolę przypisuje się tzw. przełącznikowi IT (Ile12, Tyr13 z podjednostki  $\alpha$ ), odpowiadającemu za stabilizację stanu otwartego/zamkniętego bramy proteasomu, a allosterycznie związanemu z Pro17, która jak już opisano wcześniej, wrażliwa jest na związanie aktywatora zawierającego motyw HbYX <sup>149</sup>.

Dodatkowo, Gestwicki i in., syntezując bibliotekę 120 związków (6-7-aminokwasowych pochodnych C-końca podjednostki Rpt5 regulatora 19S) udowodnili istotną rolę aminokwasu poprzedzającego motyw HbYX w peptydowych aktywatorach proteasomu, w której to pozycji preferowany miałby być aminokwas o neutralnym/polarnym, ale przede wszystkim nierozbudowanym łańcuchu bocznym <sup>150</sup>.

#### 3.3.4. Stabilność proteolityczna farmaceutyków peptydowych

Szybka degradacja proteolityczna leków o strukturach opartych na peptydach jest często uważana za główną wadę ograniczającą ogólnoustrojowe zastosowania terapeutyczne. Przyczyną niskiej stabilności peptydów jest obecność wiązań peptydowych hydrolizowanych przez klasę wyspecjalizowanych enzymów – proteaz. Egzoproteazy odcinają końcowe aminokwasy, podczas gdy endoproteazy mogą rozpoznawać motywy wewnątrz sekwencji peptydowych i hydrolizować wewnętrzne wiązania peptydowe. W konsekwencji większość liniowych peptydów składających się z aminokwasów o konfiguracji L ma okres półtrwania w surowicy wynoszący 5–30 minut <sup>151</sup>, co wydaje się niewystarczające, aby umożliwić skuteczną terapię.

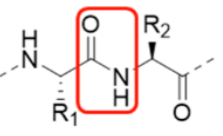
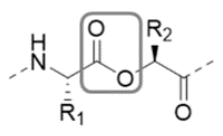
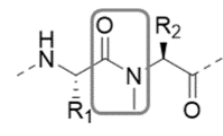
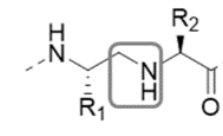
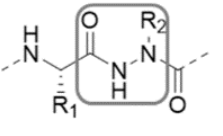
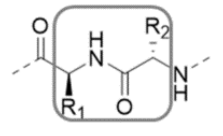
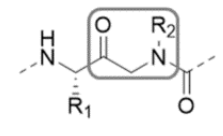
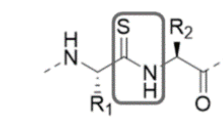
Istnieje szereg chemicznych modyfikacji aktywnych peptydów w celu poprawy ich stabilności. Zmiany te można podzielić na kilka grup ze względu na miejsce występowania danej modyfikacji strukturalnej tj. przekształcanie reszt terminalnych, restrukturyzację szkieletu głównego peptydu, modyfikacje łańcucha bocznego aminokwasów, cyklizacje, a także tworzenie koniugatów z elementami poprawiającymi odporność na proteolizę.

Najczęściej stosowaną ochroną przed działaniem egzopeptydaz jest modyfikowanie C- lub N-końca peptydu. Do najpopularniejszych technik należy

acetylowanie *N*-końcowej grupy aminowej oraz zastąpienie reszty karboksylowej C-końca przez ugrupowanie amidowe<sup>152</sup>.

Z kolei w celu zwiększenia odporności peptydu na działanie endopeptydaz często w miejsce wiązania peptydowego wprowadza się ugrupowanie będące jego bioizosterem. Surogaty takie imitują wiązanie amidowe, ale nie są rozpoznawane przez proteazy. Przykłady modyfikacji szkieletu głównego peptydu, obejmujących wiązanie peptydowe oraz pozostałe elementy łańcucha zebrano w Tabeli 2.

Tabela 2 Modyfikacje wiązania peptydowego poprawiające stabilność proteolityczną peptydów.

			
Wiązanie peptydowe	Wiązanie estrowe	<i>N</i> -metylowane wiązanie amidowe	Zredukowane wiązanie peptydowe
			
Wiązanie semikarbazydowe (azapeptydowe)	Wiązanie peptydowe retro-inverso	Peptoid	Wiązanie tioamidowe

Jedną z szeroko stosowanych modyfikacji jest zamiana wiązania peptydowego na jego zredukowaną formę czyli tzw. surogat aminometylenowy -  $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ . Wprowadzenie drugorzędowej aminy w miejscu wiązania amidowego powoduje zwiększenie elastyczności łańcucha peptydowego w tym miejscu, a także poprawę właściwości hydrofilowych. Co ciekawe, pseudopeptydy zawierające surogat aminometylenowy wykazywały również lepsze zdolności do penetrowania błon komórkowych<sup>153</sup>.

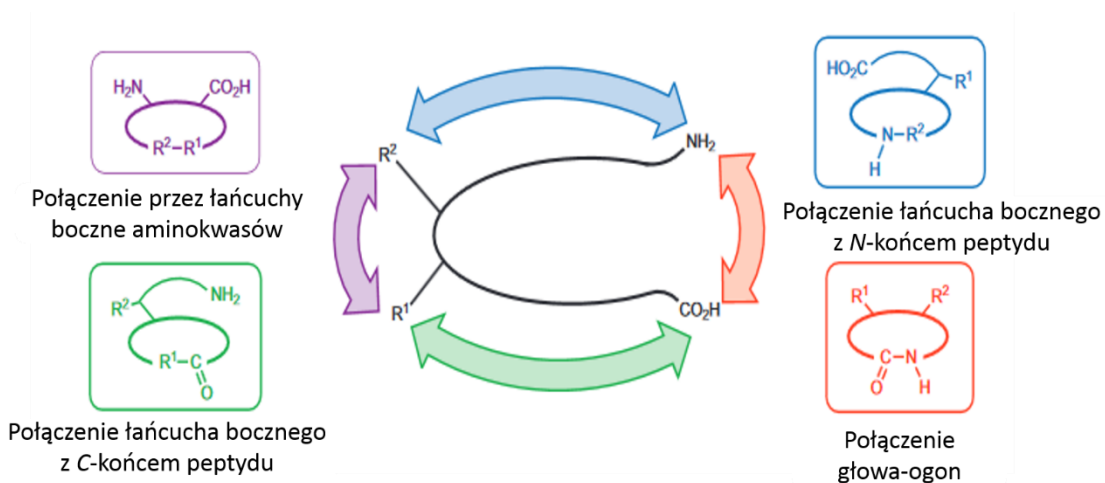
Innymi surogatami mogą być ugrupowania ketometylenowe, sulfotlenki, tioamidy czy też estry. Związki zawierające te ostatnie, nazywane depsiptydami, dobrze imitują wiązanie peptydowe posiadając podobne kąty torsyjne i długości poszczególnych wiązań oraz planarność, ale różnią się znacząco charakterem tworzonych wiązań wodorowych<sup>154</sup>. Często stosowaną strategią jest również tworzenie tak zwanych azapeptydów. Azapochodne peptydów otrzymuje się poprzez podstawienie atomu *C* $\alpha$  za

pomocą atomu azotu. Powstałe w wyniku takiej zamiany struktury semikarbazydowe posiadają odmienne właściwości, które wynikają głównie z ograniczeń konformacyjnych związanych z tworzeniem się tzw.  $\beta$ -skrętu. Charakterystyczne zgięcie jest skutkiem odpychania się wolnych par elektronowych znajdujących się na sąsiadujących atomach azotu. Obniżona w stosunku do wiązania peptydowego elektrofilowość azapochodnych przyczynia się do mniejszej podatności na atak nukleofilowy enzymu, przyczyniając się do zwiększenia odporności proteolitycznej peptydu <sup>155, 156</sup>.

W celu poprawy stabilności proteolitycznej stosuje się podstawianie L-aminokwasów ich odpowiednikami o konfiguracji D. Niestety, jak wykazały badania, peptydy z taką modyfikacją rzadko wykazują odpowiednią aktywność biologiczną <sup>157</sup>.

Inne zamiany obejmują wstawianie  $\beta$ - i  $\gamma$ -aminokwasów <sup>158</sup>, a także używanie  $N_{\alpha}$ -alkilowanych (np. sarkozyna) lub  $C_{\alpha}$ -podstawionych pochodnych <sup>159</sup>.

Cyklizacja jest kolejną powszechnie stosowaną techniką modyfikacji peptydów. Techniki cyklizacji peptydów obejmują połączenia: głowa - ogon, głowa - łańcuch boczny, łańcuch boczny – ogon, a także cyklizacje poprzez łańcuchy boczne dwóch aminokwasów [Rys.13] <sup>160</sup>.



Rys. 13 Schemat przedstawiający typy cyklizacji łańcucha peptydowego

Cyklizacja peptydu może zwiększyć jego stabilność proteolityczną <sup>161</sup> oraz poprawić jego przenikalność przez błony komórkowe <sup>162</sup>. Dodatkowo, modyfikacje tego typu umożliwiają naśladowanie i stabilizację drugorzędowej struktury peptydu, która często wiąże się z jego właściwościami biologicznymi.

Aminokwasy niebiałkowe (tzw. nienaturalne aminokwasy) nie są naturalnie kodowane w ludzkim DNA, a przez to nie występują w łańcuchach polipeptydowych białek i enzymów człowieka. Wiele z nich stanowi metabolity bakterii, grzybów i roślin, inne zaś mają pochodzenie syntetyczne. Ze względu na ich nietypowe struktury, ludzkie enzymy nie są w stanie ich rozpoznawać, w związku z czym stanowią one ciekawe zamienniki naturalnych aminokwasów, stosowane w celu poprawy odporności proteolitycznej peptydów. Takie peptydomimetyki mogą zawierać homoaminokwasy (np. homoarginina), czyli analogi zawierające o jedną grupę metylenową więcej w łańcuchu bocznym. Inną często stosowaną modyfikacją są noraminokwasy, które w miejscu rozgałęzionego łańcucha bocznego posiadają jego liniowy odpowiednik (np. norleucyna, norwalina). Pozostałe podstawienia obejmują np. pochodną ornityny (cytrulinę) lub kwas  $\gamma$ -aminomasłowy.

Powstają również inne strategie opracowane głównie w celu poprawy stabilności enzymatycznej peptydów, takie jak tworzenie koniugatów z łańcuchami PEG<sup>163</sup> lub domenami Fc<sup>164</sup>. W tym przypadku zwiększona odporność na proteolizę uwarunkowana jest efektem osłonowym rozbudowanych grup koniugujących.

### 3.3.5. Transport aktywnych peptydomimetyków do wnętrza komórki

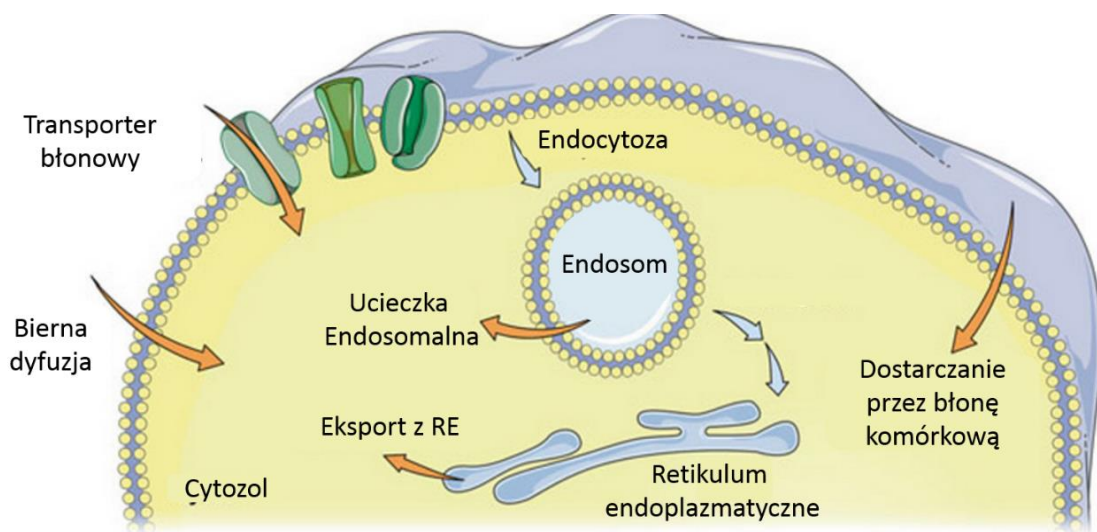
#### 3.3.5.1. Budowa błony komórkowej oraz sposoby przenikania substancji do cytozolu

Błona komórkowa pełni wiele różnych funkcji w organizmie, między innymi zapewnia strukturę komórki, chroni zawartość cytozolu przed środowiskiem zewnętrznym oraz pozwala komórkom działać jako wyspecjalizowane jednostki. Błona jest interfejsem komórki z resztą świata, ale również jej strażnikiem. Ta fosfolipidowa dwuwarstwa określa, jakie cząsteczki mogą przemieszczać się do lub z komórki, a więc jest w dużej mierze odpowiedzialna za utrzymanie jej homeostazy.

Błona komórkowa składa się z lipidów, cukrów oraz białek błonowych tworzących charakterystyczną dwuwarstwę. Na białka błonowe składają się: białka transbłonowe, powierzchniowe oraz integralne. Lipidy, na które składają się fosfolipidy, sfingolipidy oraz sterole, stanowią natomiast ok. 30-40% błony plazmatycznej. Taka wysoka zawartość lipidów w błonie powoduje, że substancje jonowe i takie o wysokiej polarności nie są w stanie swobodnie przenikać bariery środowisko zewnętrzne - błona. Z kolei substancje lipofilowe z łatwością wnikają do samej błony, ale trudność sprawia

im uwolnienie się z dwuwarstwy do cytozolu. Różne typy transportu substancji przez błony komórkowe omówiono poniżej.

Istnieje kilka dróg przedostawania się biologicznie aktywnych związków do cytozolu [Rys. 14]. Małe, średnio polarne cząsteczki są w stanie biernie dyfundować przez błonę plazmatyczną. Do transportu większych, bardziej polarnych związków, takich jak cukry, aminokwasy, peptydy i nukleozydy, wykorzystywane są transportery błonowe. Co ciekawe, bakterie i wirusy rozwinęły wyrafinowane mechanizmy transportu całych organizmów, toksyn białkowych lub materiału genetycznego do cytoplazmy ssaków.



Rys. 14 Sposoby transportu substancji do wnętrza komórki

Transport bierny polega na przenoszeniu niewielkich cząstek zgodnie z zasadą wyrównania gradientu stężeń. Bezpośrednio przez błony mogą dyfundować niewielkie cząstki, takie jak dwutlenek węgla, woda czy tlen, a także steroidy, które wykazują wysoką lipofilowość zbliżoną do tłuszczów tworzących błonę komórkową. Z drugiej strony, związki obdarzone ładunkiem i wykazujące polarność nie są w stanie biernie przenikać hydrofobowej błony. Małe jony, takie jak  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , niezbędne dla prawidłowej pracy komórki przechodzą do jej wnętrza przez tzw. kanały jonowe, utworzone przez odpowiednie białka, natomiast większe jony, takie jak np. fosforany, są przenoszone przez inną grupę białek – tzw. translokazy.

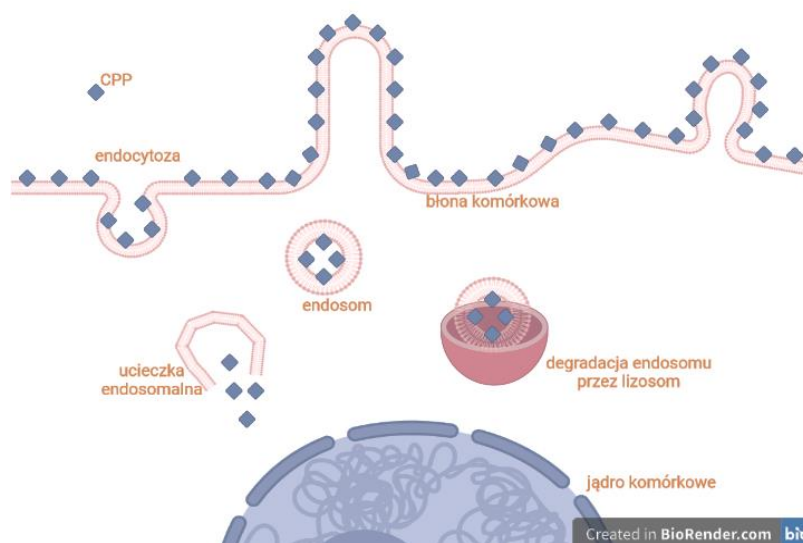
Możliwe jest również przenikanie substancji przez błony przy wykorzystaniu odpowiednich transporterów. Transportery aktywne wykorzystują energię w celu przemieszczenia substratu do wnętrza komórki, wbrew gradientowi stężeń. Jednym

z przykładów takich transporterów są tzw. pompy jonowe, które do transportu wykorzystują energię pozyskaną z hydrolizy ATP.

Cukry, jako związki polarne, są importowane do komórek przez specjalną grupę transporterów – GLUT (ang. glucose transporter). Również aminokwasy, niewielkie oligopeptydy, a także nukleozydy posiadają wyspecjalizowane transportery.

Większość makrocząsteczek, takich jak np. białka, kwasy nukleinowe czy też peptydy, jest dostarczana do komórek na drodze endocytozy. Proces ten dzieli się na 3 zasadnicze etapy:

1. W pierwszym etapie, na skutek oddziaływania z daną cząstką, powierzchnia błony plazmatycznej fałduje się do środka, tworząc charakterystyczną wklęsłą wnękę, która wypełnia się płynem pozakomórkowym zawierającym dostarczane substancje.
2. Następnie fragmenty błony tworzące wnękę zaczynają ze sobą oddziaływać, w wyniku czego końce membrany spotykają się i tworzą pęcherzyk – endosom, wewnątrz którego zamknięte są dostarczane substancje.
3. W ostatnim etapie, pęcherzyk ten odrywa się od membrany, wchodząc do wnętrza komórki, gdzie jest dalej przetwarzany, a na skutek jego dojrzewania następuje uwolnienie uwięzionych w jego wnętrzu substancji, co nazywamy ucieczką endosomalną.

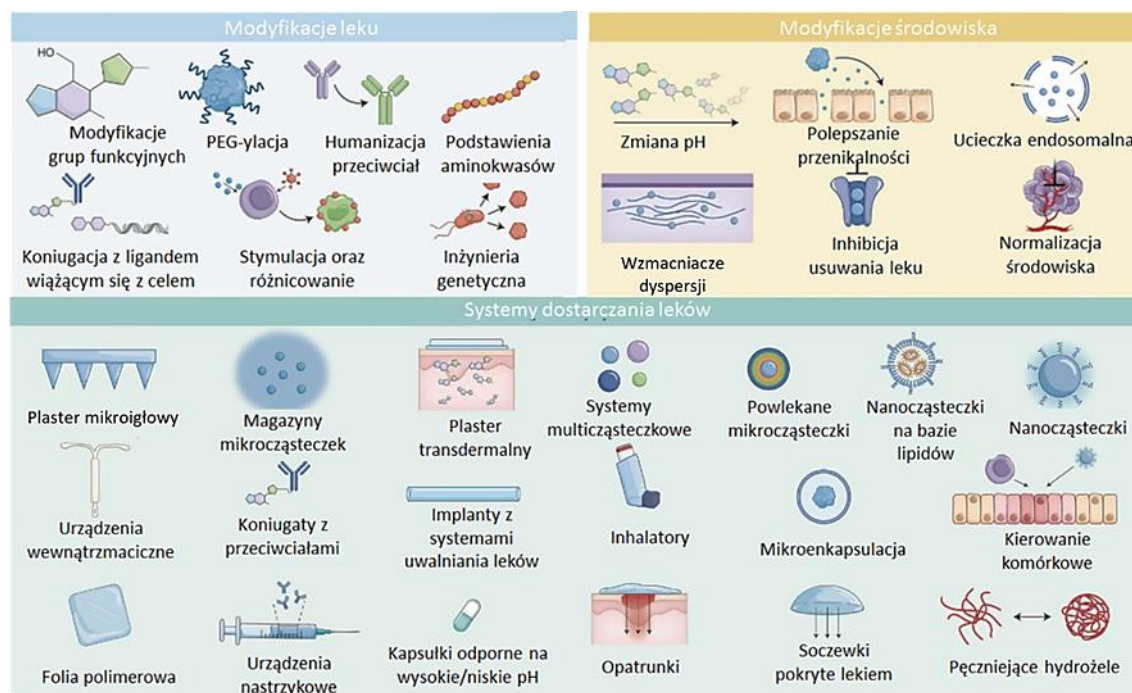


Rys. 15 Schemat przedstawiający mechanizm przenikania peptydu CPP do wnętrza komórki na drodze endocytozy



Również peptydy penetrujące błonę komórkową CPP (ang. cell-penetrating peptides), których używa się jako transporterów leków i samych substancji aktywnych oraz innych związków chemicznych (cargo), wnikają do komórek na drodze endocytozy [Rys. 15]. Peptydy CPP szerzej omówiono w kolejnym podrozdziale.

W przypadku leków różnej generacji, jednym z największych wyzwań jest dostarczenie go w miejsce działania, przy zachowaniu jego terapeutycznych właściwości, ale też bez wywoływania negatywnych skutków ubocznych. Modyfikacjom mającym na celu poprawę biodostępności mogą podlegać same cząstki aktywne, ale również środowisko, do którego mają być dostarczone. Stosowane są również systemy dostarczania leków, a wybór odpowiedniego mechanizmu podyktowany jest najczęściej możliwościami chemicznej modyfikacji leku, ale również celem molekularnym, na który dana cząsteczka ma oddziaływać [Rys. 16].



Rys. 16 Systemy dostarczania leków do organizmu. Sposoby zwiększania dostępności leków obejmują modyfikacje samego leku lub zmiany otoczenia wokół niego w organizmie, a także tworzenia systemu dostarczania, czyli interfejsu kontrolującego interakcje między lekiem a jego mikrośrodowiskiem. W zależności od klasy leku stosowane są jedna lub kilka połączonych strategii (modyfikacji leku i/lub środowiska).

### 3.3.5.2. Sposoby przenoszenia peptydów do wnętrza komórki

W celu łatwego określania zdolności do przenikania błony komórkowej przez różnego typu związki, Lipiński zaproponował tzw. regułę piątki (ang. Rule of 5), która

bardzo dobrze koreluje właściwości fizykochemiczne związku z jego przenikalnością przez błony <sup>165</sup>. Według tej reguły, słaba przenikalność ma miejsce gdy:

1. Obliczona dla substancji lipofilowość (logP) jest większa niż 5.
2. Masa cząsteczkowa związku wynosi więcej niż 500 Da.
3. W strukturze związku istnieje więcej niż 5 donorów wiązań wodorowych – wyrażonych jako suma grup -OH i -NH.
4. W strukturze związku istnieje więcej niż 10 akceptorów wiązań wodorowych – wyrażonych jako suma atomów tlenu i azotu.

Określając powyższe parametry dla związków takich jak peptydy, trudno się spodziewać, że będą one samoistnie przenikać błonę plazmatyczną. Ich wielkość oraz polarność zazwyczaj uniemożliwia im taką spontaniczną dyfuzję.

Istnieją jednak modyfikacje, które mogą poprawiać właściwości peptydów. Uważa się, że zarówno cyklizacja, jak i metylacja atomów azotu zaangażowanych w wiązanie amidowe, może prowadzić do poprawy przenikalności. Cyklizacja powoduje utworzenie wiązań wodorowych wewnątrz peptydu, uwydatniając hydrofobowe powierzchnie na zewnątrz w celu umożliwienia oddziaływania z lipofilową błoną, natomiast metylacja poprawia hydrofobowość związku. <sup>166</sup>

Innym sposobem na poprawę przenikalności peptydów jest włączanie w jego sekwencję zasadowych reszt lub przyłączanie całego peptydu CPP. Metoda ta wydaje się być najbardziej dostępną z proponowanych ze względu na łatwość tworzenia takich koniugatów poprzez wiązanie CPP z peptydem wiązaniem amidowym na jednym z jego końców lub w łańcuchu bocznym.

Ze względu na pochodzenie CPP można podzielić na białkowe, syntetyczne i chimeryczne. W zależności zaś od ich budowy CPP dzielą się na liniowe i cykliczne. Wiele aktualnych badań potwierdziło, że cykliczne CPP oferują więcej korzyści w porównaniu z ich liniowymi odpowiednikami, np. charakteryzują się zazwyczaj wyższą przenikalnością i większym powinowactwem do receptora znajdującego się na powierzchni komórki, a niektóre z nich są zdolne do penetrowania błony, bez degradacji endosomu, poprzez miejscową destabilizację błony endosomalnej <sup>167</sup>. Ponadto liniowe CPP są zwykle wrażliwe na hydrolizę proteolityczną, co skutkuje słabymi właściwościami farmakokinetycznymi <sup>168</sup>.

W oparciu o różnice w właściwościach fizykochemicznych, peptydy penetrujące można podzielić na trzy podgrupy: kationowe, amfifilowe i hydrofobowe.

W warunkach fizjologicznych, dodatnio naładowane kationowe CPP wykazują doskonałe powinowactwo do błony cytoplazmatycznej. Kationowe CPP łączą się z naładowaną ujemnie glikoproteiną błony komórkowej poprzez oddziaływania elektrostatyczne, a następnie ulegają internalizacji poprzez mechanizm niezależny od receptora. Kluczowymi czynnikami wpływającymi na aktywność kationowych CPP są liczba i pozycja dodatnio naładowanych arginin w strukturze CPP. Większość kationowych CPP zwykle zawiera minimum pięć dodatnio naładowanych aminokwasów<sup>169</sup>. Przedstawicielem kationowych CPP jest 13-aminokwasowy peptyd TAT (48-60), którego mechanizm działania związany jest z dużym ładunkiem dodatnim obecnym na licznych resztach zasadowych. Peptyd ten wywodzi się z sekwencji HIV-1 Tat – 86-aminokwasowego białka zaangażowanego w replikację ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1. Liczne badania wykazały, że białko to jest w stanie przemieszczać się przez błonę plazmatyczną do jądra komórkowego, gdzie transaktywuje genom wirusa<sup>170</sup>. Za region odpowiedzialny za zdolności penetrujące uznano zasadowy fragment sekwencji białka: GRKKRRQRRRPPQ<sup>171</sup>.

Tat (48-60), podobnie jak syntetyczny 9-argininowy CPP – R9<sup>172</sup>, jest w stanie dostarczać do komórki różnorodne cząstki takie jak: peptydy, białka<sup>173</sup>, kwasy nukleinowe<sup>174</sup>, a także liposomy<sup>175</sup>. Badania wykazały, że różne rodzaje szlaków endocytotycznych biorą udział w mechanizmie wychwytu CPP bogatych w argininę, zarówno samych, jak i sprzężonych z cząsteczkami przyłączonego cargo, a zarówno charakter linii komórkowych oraz obecność i rodzaj ładunku transportowanej cząstki mogą wpływać na specyficzny mechanizm stosowany przez CPP<sup>176, 177</sup>. Wiele badań wskazuje, że większość kationowych peptydów CPP wchodzi do komórek na drodze makropinocytozy, w której cząstki zawarte w płynie otaczającym komórkę są przez nią pobierane na drodze wpuklenia błony plazmatycznej i odcięcia pęcherzyka endocytarnego<sup>178, 179</sup>. Niestety, jak wykazały badania, takie polikationowe segmenty mogą przyczyniać się do niszczenia błon ssaków, o czym świadczą toksyczne właściwości naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych, które zawierają liczne reszty lizyny i argininy<sup>180</sup>. Jednakże, w 2012 roku, grupa Hirose, bazując na konfokalnej mikroskopii skaningowej oraz elektronowej, potwierdziła, iż niektóre zasadowe peptydy

penetrujące, posiadające przyłączone hydrofobowe cargo są w stanie bezpośrednio przenikać błonę komórkową, pozostawiając komórkę w nienaruszonym stanie <sup>181</sup>.

Do innych metod dostarczania peptydów i peptydomimetyków do komórek można zaliczyć tworzenie koniugatów aktywnych peptydów z ligandami powierzchniowych receptorów komórkowych. Najczęściej stosowaną techniką jest przyłączanie lipidu lub reszty cukrowej do peptydu. Przykładowo przyłączenie maltozy do *N*-końca somatostatyny skutkowało 10-krotnym zwiększeniem biodostępności tego peptydu <sup>182</sup>.

Do transportu aktywnych peptydów mogą posłużyć również liposomy. Liposomy to kuliste mikroskopijne pęcherzyki zawierające jedną lub więcej dwuwarstw fosfolipidowych. Wewnętrzny rdzeń liposomów składa się z hydrofilowych części fosfolipidu, podczas gdy części lipofilowe mają tendencję do pozostawania w lipidowej części dwuwarstw. Peptyd-cargo jest więc kapsułowany we wnętrzu liposomu, dzięki czemu nie jest trawiony przez enzymy proteolityczne.

Do innych systemów dostarczania peptydowych leków, należą m. in. mikrosfery, oraz nanocząstki <sup>183</sup>.

## II ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Większość kompleksów białkowych, które działają jako naturalne aktywatory proteasomów (PA), ma wspólną konserwatywną sekwencję tripeptydową HbYX na swoich C-końcach. Motyw ten oddziałuje z hydrofobowymi aminokwasami znajdującymi się w kieszeniach  $\alpha$  zarówno drożdżowego, jak i eukariotycznego proteasomu 20S, w celu allosterycznego otwierania bramy katalitycznej, ułatwiając w ten sposób degradację białek<sup>184, 185</sup>. W swojej pracy zajęłam się syntezą peptydów – potencjalnych aktywatorów proteasomu – których sekwencje stanowiły zmodyfikowane fragmenty białkowych aktywatorów tego enzymu: kompleksu 19S oraz białka Blm10, zawierające charakterystyczny motyw C-końcowy. Prace nad takimi peptydowymi aktywatorami proteasomu mogłyby w przyszłości przyczynić się do opracowania specyficznych terapeutyków, stosowanych w leczeniu chorób związanych z odkładaniem się białek.

Jak udowodniono w wielu badaniach, proteasom 20S odpowiedzialny jest za trawienie białek wykazujących tendencję do agregacji, tj. białek wewnątrznieuporzędowanych oraz tych, które uległy uszkodzeniu na skutek działania stresu oksydacyjnego. Dlatego też w swojej pracy sprawdziłam wpływ otrzymanych modulatorów na trawienie takich białkowych modelowych substratów 20S.

Niestety peptydy, pomimo iż często stanowią wysoce specyficzne, pozbawione cytotoksyczności związki, wciąż uważane są za słabych kandydatów na leki ze względu na ich krótki okres półtrwania w organizmie oraz słabe zdolności do penetrowania błony komórkowej. Z tego powodu podjęłam próbę znalezienia peptydu, który nie tylko będzie stymulował proteasom *in vitro*, ale również we wnętrzu komórek, przenikając barierę błony cytoplazmatycznej.

**W związku z powyższym za główne cele mojej pracy przyjąłm:**

- 1. Określenie wymogów strukturalnych względem peptydowych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S, wywodzących się z białkowych modulatorów jego aktywności, poprzez projektowanie, syntezę oraz badania aktywności tych związków.**
- 2. Zbadanie stabilności peptydowych aktywatorów i syntezę peptydomimetyków o potencjalnie podwyższonej stabilności.**

**3. Sprawdzenie wpływu najlepszych związków na trawienie białek będących substratami proteasomu 20S.**

**4. Zbadanie wpływu otrzymanych związków na aktywność proteasomu w żywych komórkach.**

Niezbędne do zrealizowania postawionych celów zadania badawcze można podzielić na:

1. Projektowanie peptydowych modulatorów proteasomu.
2. Syntezę oraz oczyszczanie związków.
3. Badania aktywności *in vitro* otrzymanych peptydów z wykorzystaniem krótkich substratów peptydowych (w tym oczyszczanie proteasomu 20S do badań *in vitro*).
4. Badania stabilności otrzymanych związków.
5. Wybór białkowych substratów 20S poprzez badanie siły powinowactwa białek do proteasomu 20S oraz badania zdolności otrzymanych aktywatorów do pobudzania trawienia tych białek przez proteasom.
6. Badania aktywności związków w lizatach komórkowych oraz w żywych komórkach (w tym hodowla komórek, przygotowanie lizatów komórkowych, synteza substratu TAS3 do badania aktywności związków w żywych komórkach).
7. Ocena cytotoksyczności związków.

### III BADANIA WŁASNE. Prezentacja i omówienie wyników

#### 4. Uwagi ogólne

Wszystkie badania prezentowane poniżej zostały wykonane w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych, a ich wyniki wyraziłam jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SEM (prezentowane jako słupki błędów na wykresach). Szczegółowe opisy wykonania poniższych eksperymentów, a także sposobów ewaluacji wyników zawarłam w punkcie: V – METODOLOGIA.

W trakcie badań prowadzonych w ramach mojego doktoratu, ale również z obserwacji poczynionych przez cały zespół badawczy wynika, iż aktywność proteolityczna proteasomu może zmieniać się wraz z partią krwi, z której był izolowany, mimo iż każdorazowo pozyskiwano ją z tego samego źródła - Banku Krwi Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Dodatkowo czas przechowywania wyizolowanego i oczyszczonego enzymu różnił się w zależności od oczyszczanej partii, co mogło istotnie wpływać na jego aktywność proteolityczną. Jednakże, pomimo iż bezwzględne wartości stopnia aktywacji proteasomu przez badane peptydy potrafią się różnić, wzajemna relacja między efektywnością działania poszczególnych modulatorów pozostawała zachowana.

### IIIA CZĘŚĆ PIERWSZA – peptydy wywodzące się z regulatora 19S

#### 5. Wybór i optymalizacja struktury aktywatora ludzkiego proteasomu 20S

##### 5.1. Wpływ peptydów wywodzących się z C-końcowych fragmentów podjednostek Rpt1-6 regulatora 19S na aktywność proteasomu 20S wyizolowanego z ludzkiej krwi

Poszukując związków zdolnych do stymulacji aktywności proteasomu 20S w komórkach, swoją uwagę skupiałam początkowo na regionie wiążącym naturalnego białkowego regulatora proteasomu, 19S, który, jak wykazano, stymuluje otwarcie bramki 20S poprzez mechanizm zależny od sekwencji HbYX.

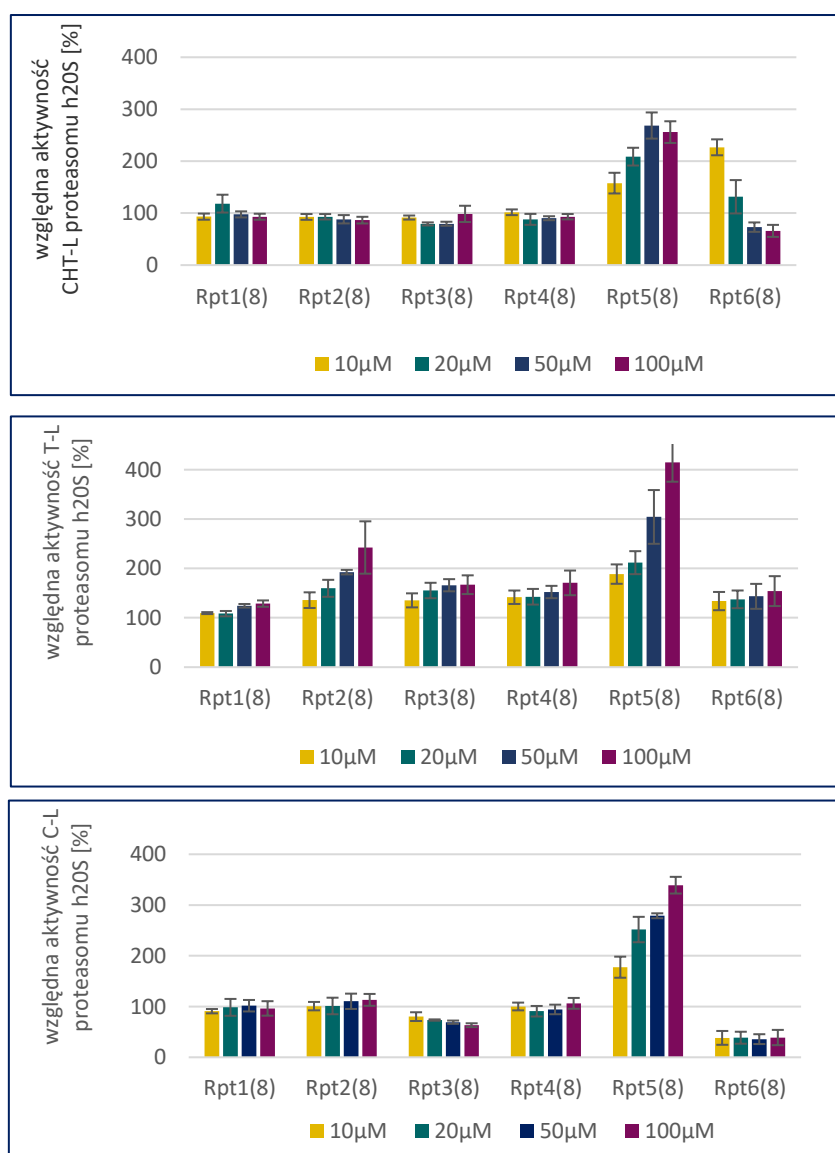
Pierwsze badania przeprowadzone przez Smitha i in.<sup>184</sup> wykazały, iż tylko peptydy pochodzące z podjednostek Rpt2 oraz Rpt5 regulatora 19S, o długości min. 7 aminokwasów, wzmacniają aktywność króliczego proteasomu. Podobne wyniki uzyskała grupa Gestwickiego, stwierdzając, że do zaktywowania proteasomu niezbędne jest sześć C-końcowych aminokwasów pochodzących z podjednostki Rpt5; taka długość pozwalała uzyskać efekt aktywacyjny porównywalny z peptydem o długości siedmiu reszt. Peptydy o sekwencjach 4-5-resztowych wykazywały natomiast o wiele słabszy wpływ na aktywność proteasomu 20S<sup>150</sup>. W innych badaniach wykazano, iż peptyd wywodzący się z podjednostki Rpt5 skutecznie konkuruje z toksycznymi oligomerami amyloidu  $\beta$  o miejsce wiązania z proteasomem 20S, zapobiegając w ten sposób inhibicji tego enzymu, która prowadzi do neuropatii<sup>10</sup>. Jednocześnie, przeprowadzone w ostatnich latach badania strukturalne z wykorzystaniem mikroskopii krioelektronowej dowodziły, że do otwarcia bramy proteasomu nie wystarczają oddziaływania podjednostek Rpt2 i Rpt5. Nawet znalezienie się w kieszeni między podjednostkami  $\alpha$  enzymu trzeciej z podjednostek regulatora 19S zakończonych motywem HbYX – podjednostki Rpt3, nie dawało jeszcze efektu otwartej bramy, który wystąpił dopiero gdy w kieszeni wiążącej zadokowała się pozbawiona tego motywu podjednostka Rpt6<sup>186, 187, 188</sup>. Te nowe informacje, jak też brak wyników na temat wpływu peptydów Rpt na ludzki proteasom, skłoniły mnie do podjęcia się zadania określenia wpływu peptydów pochodzących z C-końcowych fragmentów podjednostek Rpt1-Rpt6 na proteasom 20S człowieka. Aby sprawdzić, czy dalsze przedłużenie sekwencji nie wzmocni efektu aktywacyjnego, początkowo zsyntetyzowałam 8-aminokwasowe analogi ATP-az wywodzących się z regulatora 19S (związki Rpt1-6(8), Tabela 3) i przetestowałam ich wpływ na aktywność proteolityczną ludzkiego 20S przy użyciu krótkich fluorogenicznych substratów peptydowych.

Tabela 3 Sekwencje peptydów Rpt1-6(8) wywodzących się z 6 ATP-az regulatora 19S

Nazwa peptydu	Sekwencja
Rpt1(8)	TPRYMTYN
Rpt2(8)	GTPEGLYL
Rpt3(8)	EQEHEFYK
Rpt4(8)	SKLDYKPV
Rpt5(8)	KANLQYYA
Rpt6(8)	MSIKKLWK



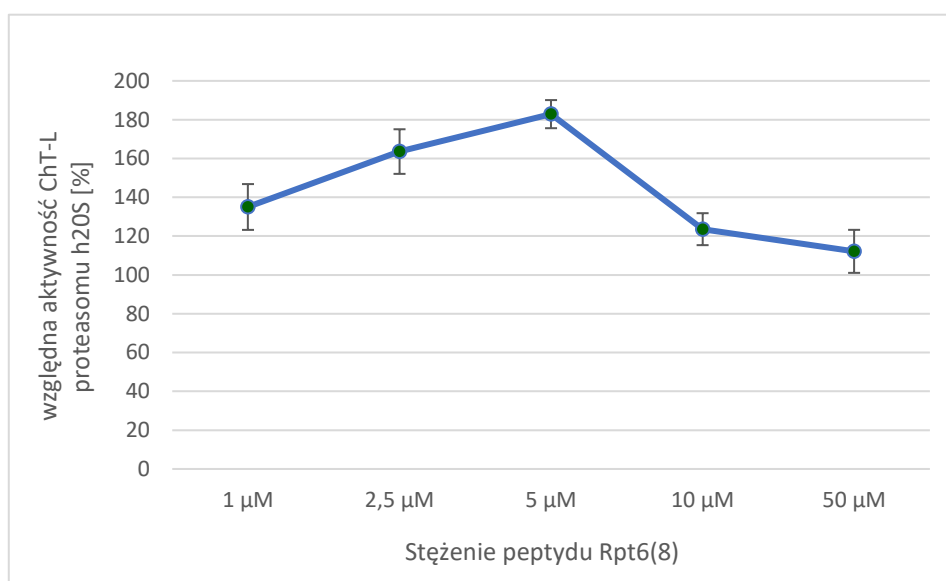
Substraty te zawierają jako grupę reporterową 7-amino-4-metylokumarynę (AMC) i odpowiadają każdemu z miejsc katalitycznych w 20S: Suc-LLVY-AMC identyfikuje aktywność chymotrypsynopodobną (ChT-L), Boc-LRR-AMC - trypsynopodobną (T-L) a Z- LLE-AMC - kaspazopodobną (C-L). Otrzymane związki porównałam na podstawie ich względnej zdolności do stymulowania hydrolizy wyżej wymienionych sond aktywności.



Rys. 17 Wpływ peptydów Rpt1-6(8) na aktywność proteasomu h20S

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że tylko peptyd pochodzący z C-końca białka Rpt5(8) był w stanie pobudzać wszystkie trzy aktywności ludzkiego proteasomu 20S (w najwyższym badanym stężeniu aktywność ChT-L ok. 2,5-krotnie, T-L – 4-krotnie oraz C-L – 3-krotnie), natomiast peptyd Rpt2(8) dwukrotnie

stymulował aktywność trypsynopodobną w stężeniu 50 i 100  $\mu\text{M}$ , ale nie pobudzał aktywności ChT-L ludzkiego proteasomu, pomimo iż był on w stanie aktywować proteasom bydlęcy<sup>138</sup>. Związki Rpt2(8), Rpt3(8) oraz Rpt5(8) posiadają na C-końcu charakterystyczny motyw HbYX (zaznaczony na zielono w Tabeli 3), jednakże nie obserwuje się pobudzania aktywności proteasomu przez peptyd Rpt3(8), co pokrywa się z wynikami otrzymanymi przez grupę DeMartino<sup>140</sup>. Z kolei związek Rpt6(8), pomimo braku motywu, który uważany jest za niezbędny do aktywacji proteasomu, pobudzał aktywność chymotrypsynopodobną, jednakże wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia peptydu obserwowano spadek tego efektu [Rys. 17]. W związku z powyższym, związek ten przebadalam również w niższych stężeniach [Rys. 18].



Rys. 18 Wpływ peptydu Rpt6(8) na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu h20S

Otrzymanie w odpowiedzi na zastosowaną dawkę krzywej dzwonowej sugeruje obecność drugorzędowego miejsca wiązania tego peptydu, które wywiera efekt inhibujący względem aktywności ChT-L. Podobny efekt zaobserwowano wcześniej w przypadku peptydów bogatych w prolinę i argininę<sup>144</sup> oraz krótkich peptydów pochodzących z białka Tat HIV-1<sup>189</sup>.

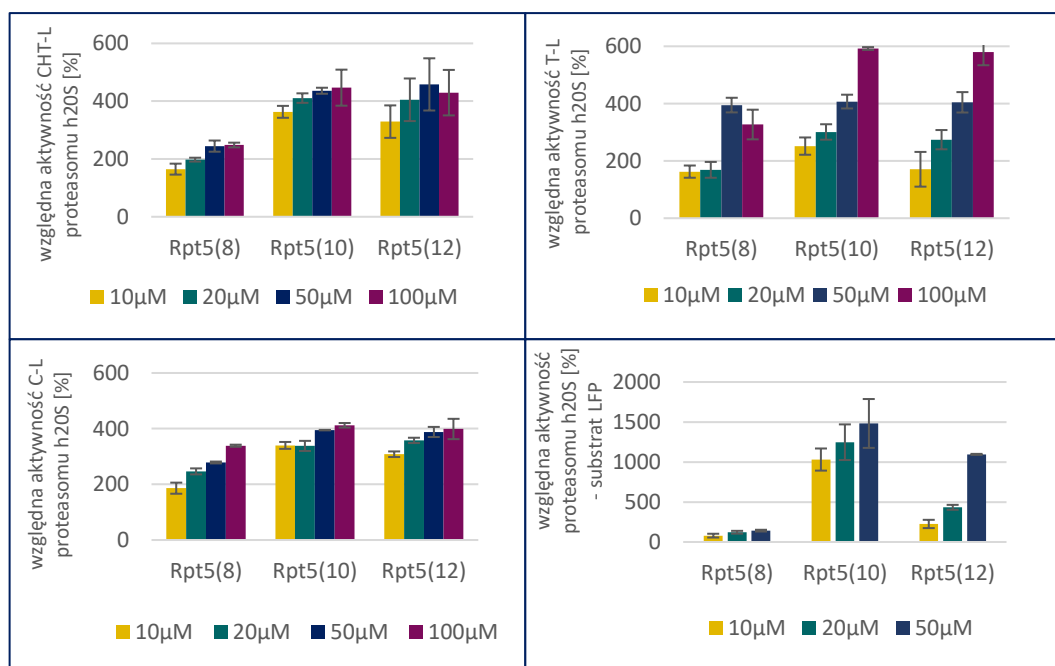
## 5.2. Badanie znaczenia długości łańcucha peptydowego związku Rpt5 dla aktywności ludzkiego proteasomu 20S

Kolejnym krokiem było zbadanie wpływu długości łańcucha peptydowego na właściwości aktywujące związków poprzez wydłużanie ich sekwencji w kierunku N-końca. W tym celu peptyd o najsilniejszych właściwościach stymulujących – Rpt5

zsyntezowałam w postaci dłuższych analogów - 10 i 12 aminokwasowych (Tabela 4). Peptydy te przebadalam przy użyciu trzech krótkich substratów fluorogenicznych odpowiadających trzem aktywnościom proteasomu 20S oraz na dłuższym substracie fluorogenicznym – LFP (Mca-AKVYPYPMEDap(Dnp)-NH<sub>2</sub>). Substrat LFP posiada lepsze właściwości różnicujące wpływ modulatorów, co wynika z dłuższej sekwencji niż w przypadku klasycznych, 3-4 aminokwasowych substratów, które są trawione również przez latentny proteasom.

Tabela 4 Sekwencje peptydów wywodzących się z natywnej sekwencji C-końcowego fragmentu podjednostki Rpt5 regulatora 19S

Nazwa peptydu	Sekwencja
Rpt5(8)	KANLQYYA
Rpt5(10)	KKKANLQYYA
Rpt5(12)	QAKKKANLQYYA



Rys. 19 Wpływ peptydów Rpt5(8), Rpt5(10) oraz Rpt5(12) na aktywność proteasomu h20S

Peptyd Rpt5 w wersji 10-aminokwasowej był w stanie pobudzać aktywności chymotrypsynopodobną i trypsynopodobną proteasomu 2 razy silniej od swojego 8-resztowego analogu w stężeniach 10, 20 oraz 100 μM, natomiast peptydaza kaspazopodobna pobudzana była około 1,5 raza mocniej. Dalsze wydłużanie sekwencji Rpt5 w kierunku N-końca nie powodowało znaczących zmian w jego właściwościach oznaczanych z wykorzystaniem krótkich substratów proteasomu. Natomiast dłuższy

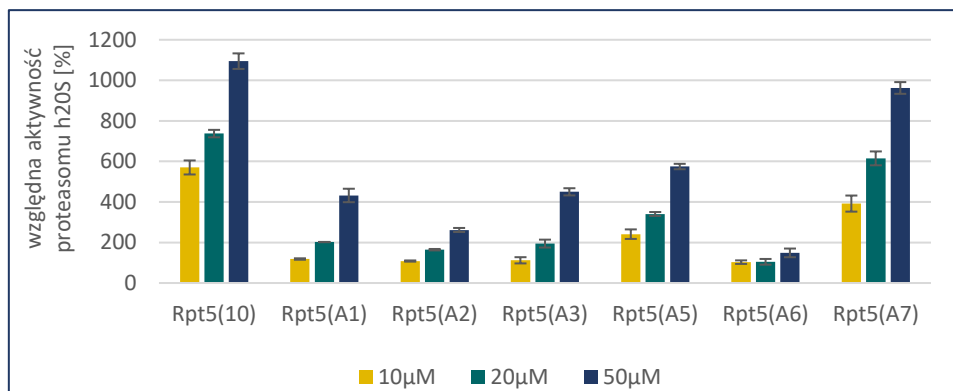
substrat - LFP - był trawiony przez proteasom o wiele słabiej w obecności 8- i 12-aminokwasowej wersji Rpt5 niż w obecności 10-resztowego peptydu. Podczas gdy peptyd Rpt5(10) w stężeniu 50  $\mu$ M powodował ok. 15-krotne pobudzenie proteasomu do trawienia substratu LFP, peptyd Rpt5(12) w tym samym stężeniu wykazywał 10-krotne zwiększanie aktywności enzymu. Najslabszym aktywatorem był natomiast wyjściowy Rpt5(8), który tylko 1,5-krotnie aktywował h20S [Rys. 19]. Tak zróżnicowane wyniki otrzymane dla substratu LFP mogą sugerować, iż do zaindukowania otwarcia bramy proteasomu na tyle szeroko, aby mógł do niej wnikać większy substrat, niezbędna jest obecność trzech lizyn znajdujących się w natywnej sekwencji aktywatora Rpt5(10), które zapewne stabilizują oddziaływanie peptydu z enzymem. Wydłużenie tego peptydu o kolejne aminokwasy być może osłabia to oddziaływanie, co również objawia się jako osłabienie zdolności aktywujących (peptyd Rpt5(12)).

### 5.3. Skan alaninowy sekwencji peptydu Rpt5(10)

W celu identyfikacji w peptydzie Rpt5(10) reszt aminokwasowych kluczowych dla zapewnienia interakcji z proteasomem i powodujących pobudzenie jego aktywności, posłużyłam się metodą skanu alaninowego. Metoda ta polega na systematycznym podstawianiu grup bocznych poszczególnych aminokwasów łańcucha peptydowego, grupą metylową. Skanowaniu alaniną poddałam pierwsze 7 reszt aminokwasowych peptydu Rpt5(10), pozostawiając w ten sposób charakterystyczny motyw HbYX w nienaruszonej postaci (Tabela 5). Otrzymane analogi przebadalam wykorzystując jako substrat proteasomu LFP, aby lepiej rozróżnić efekt specyficzny od niespecyficznego [Rys. 20].

Tabela 5 Sekwencje związków zaprojektowanych w ramach skanowania alaniną peptydowego aktywatora Rpt5(10)

Nazwa peptydu	Sekwencja
Rpt5(10)	KKKANLQYYA
Rpt5(A1)	AKKANLQYYA
Rpt5(A2)	KAKANLQYYA
Rpt5(A3)	KKKANLQYYA
Rpt5(A5)	KKKAAALQYYA
Rpt5(A6)	KKKANALQYYA
Rpt5(A7)	KKKANLQYYA



Rys. 20 Wpływ analogów peptydu Rpt5(10) zawierających podstawienia alaniną w pozycjach 1-3 oraz 5-7 na aktywność proteasomu h20S

Otrzymane wyniki pokazały, że tylko podstawienie siódmej pozycji w peptydzie Rpt5(10) nie powodowało znaczącego spadku właściwości aktywujących – peptyd Rpt5(A7) w stężeniu 50 μM niemal 10-krotnie aktywował proteasom, podczas gdy Rpt5(10) pobudzał enzym 11-krotnie w stosunku do kontroli. Pozostałe analogi wykazywały zmniejszoną aktywność w stosunku do peptydu macierzystego. Największy spadek aktywności wystąpił w przypadku peptydu Rpt5(A6), który całkowicie utracił zdolność do pobudzania 20S. W pozycji 6 pierwotnie znajdowała się leucyna, która podobnie do alaniny posiada hydrofobowy łańcuch boczny, jednak jest on bardziej rozbudowany i to zapewne miało znaczenie dla aktywowania enzymu. Pierwsze 3 reszty peptydu Rpt5(10) to zasadowe reszty lizyny, których podstawienie alaniną niemal 3-krotnie osłabiło zdolności aktywacyjne. Pozycja 5, w której natywnie występowała asparagina, również słabo tolerowała obecność alaniny, co objawiało się ok. 2-krotnym spadkiem aktywności [Rys.20].

Badania te pozwoliły mi wyznaczyć miejsca w peptydzie Rpt5(10), których modyfikacja mogłaby spowodować polepszenie właściwości aktywujących modulatora.

#### 5.4. Wpływ charakteru chemicznego łańcuchów bocznych aminokwasów w pozycjach 1-7 peptydu Rpt5(10) na pobudzanie aktywności proteasomu 20S

Allosteryczne modulatory wykazują swoje właściwości na skutek licznych oddziaływań pomiędzy nimi a docelowym białkiem/enzymem. Do takich oddziaływań zaliczyć można oddziaływania jonowe, które występują pomiędzy zjonizowanymi formami grup aminowych lub guanidynowych aminokwasów zasadowych, a karboksylanami aminokwasów o kwasowych łańcuchach bocznych. Innym rodzajem oddziaływań stabilizujących wiązanie modulatora z enzymem mogą być oddziaływania

hydrofobowe, a także oddziaływania van der Waalsa. Kolejnym ważnym typem oddziaływań są wiązania wodorowe, które mogą tworzyć się zarówno pomiędzy atomami wodoru i tlenu wiązania amidowego występującego w peptydach i białkach, jak również łańcuchami bocznymi aminokwasów, które posiadają donory lub akceptory tych wiązań.

W kolejnym etapie badań postanowiłam więc sprawdzić jak charakter łańcucha bocznego aminokwasów (kwasowy, zasadowy, obojętny) w pozycjach 1-7 peptydu Rpt5(10), wpływa na jego właściwości aktywujące. Sekwencje zsyntezowanych peptydów prezentuje Tabela 6.

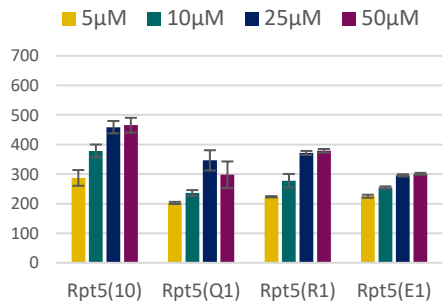
Tabela 6 Sekwencje analogów peptydu Rpt5(10) zawierających podstawienia resztami o charakterze zasadowym/kwasowym/obojętnym w pozycjach 1-7

Nazwa peptydu	Sekwencja	Nr pozycji podstawianej w peptydzie Rpt5(10)
Rpt5(R1)	RKKANLQYYA	1
Rpt5(E1)	EKKANLQYYA	
Rpt5(Q1)	QKKANLQYYA	
Rpt5(R2)	KRKANLQYYA	2
Rpt5(E2)	KEKANLQYYA	
Rpt5(Q2)	KQKANLQYYA	
Rpt5(E3)	KKEANLQYYA	3
Rpt5(Q3)	KKQANLQYYA	
Rpt5(K4)	KKKKNLQYYA	4
Rpt5(D4)	KKKDNLQYYA	
Rpt5(N4)	KKKNLQYYA	
Rpt5(K5)	KKKAKLQYYA	5
Rpt5(D5)	KKKADLQYYA	
Rpt5(K6)	KKKANKQYYA	6
Rpt5(D6)	KKKANLQYYA	
Rpt5(K7)	KKKANLKYA	7
Rpt5(D7)	KKKANLDYYA	

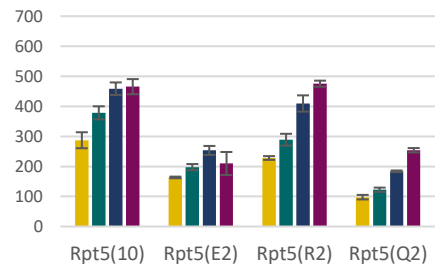
Wszystkie otrzymane peptydy przebadalam pod kątem aktywacji 3 peptydaz proteasomu. Otrzymane wyniki z podziałem na poszczególne pozycje w peptydzie Rpt5(10) prezentują wykresy przedstawione na rysunku 21.

POZYCJA 1

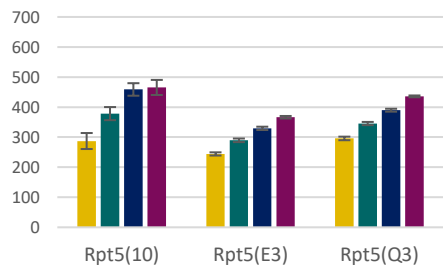
względna aktywność CHT-L proteasomu 20S [%]



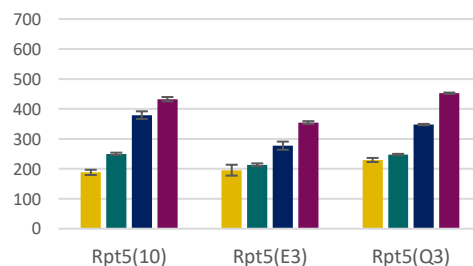
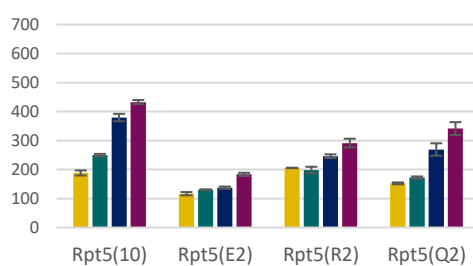
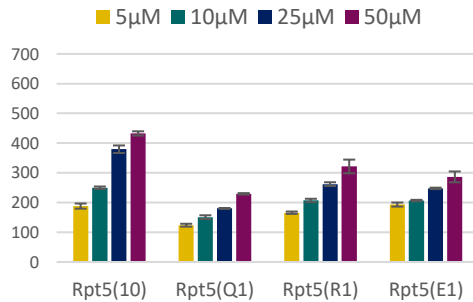
POZYCJA 2



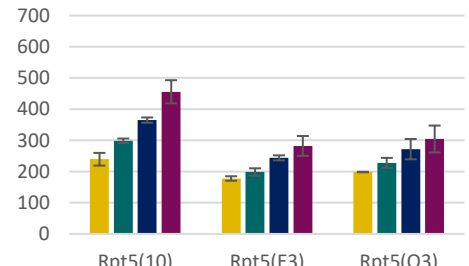
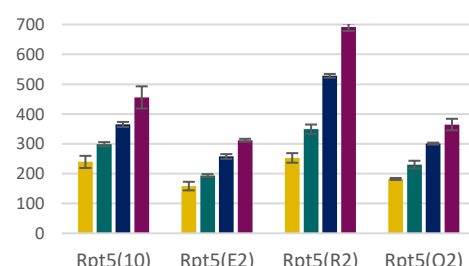
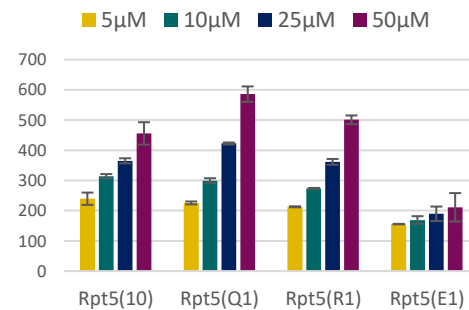
POZYCJA 3



względna aktywność T-L proteasomu 20S [%]



względna aktywność C-L proteasomu 20S [%]





Rys. 21 Wpływ podstawienia pozycji 1-7 peptydu Rpt5(10) aminokwasami o różnym charakterze chemicznym łańcucha bocznego (kwasowym, zasadowym, obojętnym) na aktywność h2OS



Wyniki badań wskazują, że podstawienie pozycji 1 (Lys) kwasową resztą Glu spowodowało osłabienie aktywności wszystkich 3 peptydaz proteasomu. Negatywny wpływ na zdolność stymulacji peptydaz ChT-L oraz T-L (co widoczne było szczególnie dla aktywatorów w stężeniach 5 i 10  $\mu\text{M}$  w przypadku aktywności ChT-L oraz 25 i 50  $\mu\text{M}$  dla T-L) miało również podstawienie resztą glutaminy, a także inną resztą zasadową tj. argininą. Grupa guanidynowa argininy jest być może zbyt rozbudowana aby umożliwić tak skuteczne pobudzenie enzymu jak natywnie występująca w tej pozycji lizyna. Jedynie aktywność kaspazopodobna nie była wrażliwa na podstawienia Arg oraz Gln w tej pozycji.

Reszta zasadowa wydaje się być krytyczna w pozycji 2, ponieważ ani reszta kwasowa (Glu), ani obojętna (Gln) nie były tolerowane, co widoczne było dla aktywności ChT-L oraz C-L. Fakt ten został dodatkowo potwierdzony podobnymi do związku macierzystego skłonnościami aktywacyjnymi peptydu Rpt5(R2), który w badanej pozycji posiadał resztę Arg i tak jak peptyd Rpt5(10) pobudzał ok. 5-krotnie aktywność ChT-L proteasomu.

Wymagania co do pozycji 3 okazały się bardziej liberalne. Reszta kwasowa Glu wydaje się być tam najgorzej tolerowana, jednakże i tak nie zmienia znacząco zdolności otrzymanych analogów do stymulacji aktywności h20S. Jedynie peptydaza C-L traciła swoje zdolności w obecności peptydów z Glu lub Gln w pozycji 3, dla których aktywność proteasomu była 2 razy słabsza niż w obecności peptydu macierzystego.

Największy wpływ na szybkość hydrolizy substratów miały modyfikacje w pozycji 4. Podstawienie naturalnie występującej alaniny kwasem asparaginowym znacznie zmniejszyło zdolność peptydu do stymulacji każdej z peptydaz ludzkiego proteasomu 20S (dla peptydaz T-L i ChT-L ok. 2-krotnie), podczas gdy Asn i Lys spowodowały wzrost aktywności ChT-L. Największy efekt stymulujący zaobserwowano w przypadku peptydu Rpt5(K4), który przy stężeniu 25  $\mu\text{M}$  wykazywał 1,5-krotny wzrost zdolności do stymulacji aktywności ChT-L i 2,5-krotny aktywności C-L w stosunku do macierzystego związku.

Pozycja 5 nie wydaje się być bardzo wrażliwa na podstawienia innych reszt niż natywnie występująca asparagina. Jedynie aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu jest silniej pobudzana przez peptyd posiadający w tym miejscu resztę zasadową.

Zastąpienie natywnej Leu resztą Asp w pozycji 6 spowodowało całkowitą utratę właściwości aktywujących przez ten peptyd, jednakże zamiana hydrofobowego łańcucha

leucyny na dodatnio naładowany łańcuch boczny lizyny spowodowała silniejsze aktywowanie podjednostki katalitycznej proteasomu o charakterze chymotrypsynopodobnym. Nie zaobserwowano jednak podobnego efektu w odniesieniu do pozostałych peptydaz proteasomu.

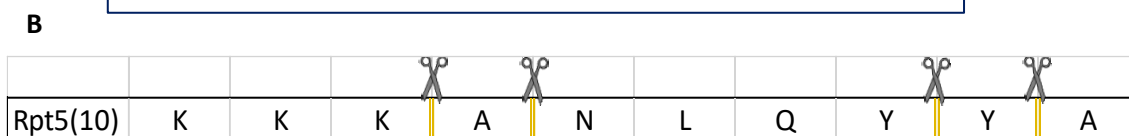
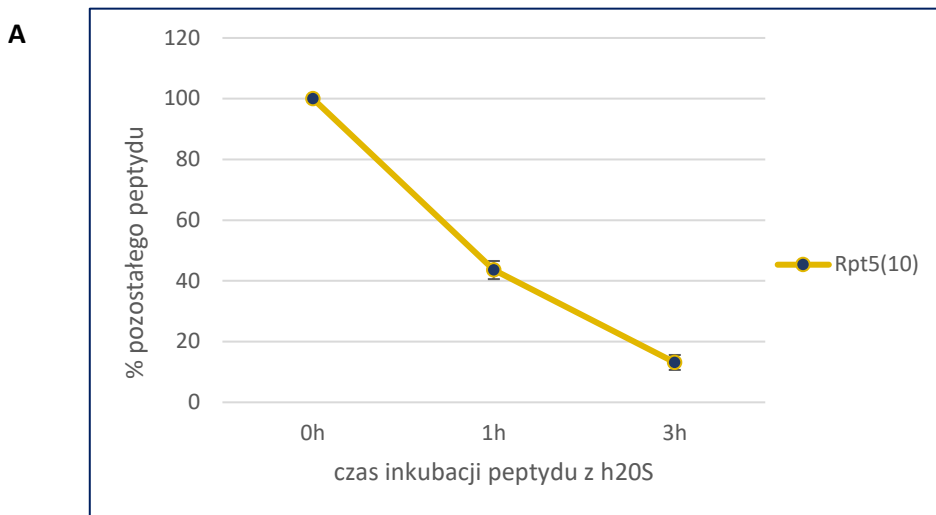
Podstawienia pozycji siódmej, w której znajdowała się glutamina, nie spowodowały zmiany właściwości aktywujących peptydu, co koreluje z wynikami otrzymanymi w wyniku skanowania alaninowego peptydu Rpt5(10). Możliwe, że reszta ta nie oddziałuje bezpośrednio z proteasomem i nie jest niezbędna do allosterycznej aktywacji enzymu.

Znaczący spadek aktywności trypsynopodobnej obserwowano natomiast po wprowadzeniu reszty kwasowej w pozycjach: 2, 4 oraz 6. Co ciekawe, żaden z syntezowanych analogów nie wykazywał znacząco silniejszego od wyjściowego peptydu Rpt5(10) pobudzania peptydazy T-L [Rys. 21].

## 5.5. Poprawa właściwości aktywujących oraz stabilności proteolitycznej aktywatora Rpt5(10)

### 5.5.1 Testy stabilności peptydu Rpt5(10) w ludzkim osoczu / w obecności proteasomu 20S oraz identyfikacja miejsc degradacji wiązania peptydowego przez h20S

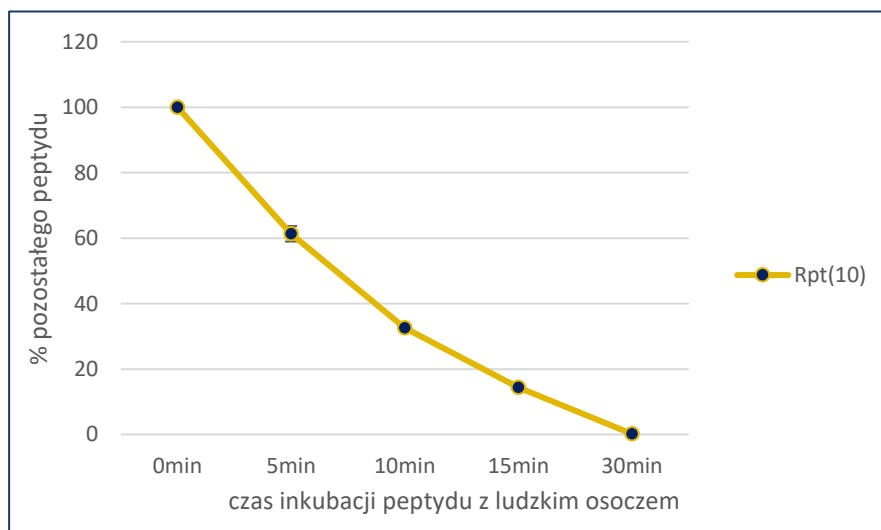
Peptydy będące potencjalnymi aktywatorami proteasomu są zarazem jego naturalnymi substratami, które są trawione równolegle z fluorogenicznymi sondami do badania jego aktywności. Z tego względu, jednym z celów tej pracy było wprowadzenie modyfikacji, które zwiększyłyby odporność proteolityczną aktywatora, zarówno względem samego proteasomu, jak i innych proteaz obecnych w komórkach, wydłużając w ten sposób czas jego działania w badaniach *in vivo*. Pierwszym krokiem było więc sprawdzenie stabilności oraz zidentyfikowanie miejsc cięcia peptydu Rpt5(10) w obecności ludzkiego proteasomu 20S za pomocą chromatografii HPLC oraz LC-MS. Procent pozostałego niestrawionego peptydu po 1h i 3h inkubacji z proteasomem w 37 °C przedstawia Rys. 22A. Na rysunku 22B nożyczkami zaznaczono wiązanie peptydowe trawione przez proteasom po 3h inkubacji.



Rys. 22 Szybkość hydrolizy peptydu Rpt5(10) przez proteasom (A); miejsca trawienia peptydu Rpt5(10) przez h2O5 (B)

Proteasom trawił peptyd Rpt5(10) po zasadowej reszcie Lys3 oraz po hydrofobowych resztach Ala4, Tyr8 oraz Tyr9. Reszta Tyr9 stanowi nienaruszalną składową motyw HbYX, która umożliwia oddziaływanie z kieszeniami  $\alpha$  proteasomu, dlatego w kolejnych badaniach peptyd modyfikowałam tylko w pozostałych trzech miejscach degradacji.

Te same testy wykonałam dla peptydu Rpt5(10) w obecności ludzkiego osocza, stosując krótsze czasy inkubacji ze względu na niską stabilność peptydu [Rys. 23].



Rys. 23 Zależność stopnia hydrolizy peptydu Rpt5(10) od czasu inkubacji z ludzkim osoczem

Peptyd Rpt5(10) wykazywał wysoką podatność na degradację. W obecności proteasomu, po 1h inkubacji z enzymem, w niestrawionej postaci pozostawało go ok. 40%. Podobny odsetek tego związku obserwowany był po zaledwie 10 min inkubacji z ludzkim osoczem.

### 5.5.2. Wpływ modyfikacji wprowadzonych do sekwencji peptydu Rpt5(10) na właściwości aktywujące oraz stabilność proteolityczną aktywatorów

Zwykle wiązanie amidowe peptydu jest stabilne, a jego hydroliza wymaga trudnych warunków z udziałem stężonych kwasów lub zasad w podwyższonej temperaturze. Możliwe jest jednak rozcięcie takiego wiązania w łagodnych warunkach, w temperaturze pokojowej lub nawet niższej w obecności odpowiedniego enzymu proteolitycznego. Jednym z kluczowych powodów, dla których sekwencja peptydowa może być podatna na degradację proteolityczną, są łańcuchy boczne aminokwasów białkowych, które zawierają motywy rozpoznawane przez endogenne proteazy. Polepszenie stabilności peptydu Rpt5(10) powinno również poprawić jego właściwości aktywujące, poprzez wydłużenie czasu działania, zarówno w badaniach na izolowanym proteasomie, jak i w komórkach. Z tego powodu zdecydowałam się na wprowadzenie zamienników w postaci nienaturalnych aminokwasów w peptydzie Rpt5(10) w miejscu trawienia tego peptydu, tj. w pozycji trzeciej, czwartej oraz ósmej. Kolejnym typem modyfikacji była zamiana wiązania peptydowego pomiędzy resztami Ala4 i Asn5 na jego zredukowaną formę.

Ogółem zaprojektowałam 6 peptydomimetyków z wprowadzonymi następującymi zmianami (Tabela 7):

W pozycji trzeciej: zamiast Lys3 → Cit3 / Har3

W pozycji czwartej: zamiast Ala4 →  $\beta$ Ala4 / Abu4 / A $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH]N\*

W pozycji ósmej: zamiast Tyr8 → Nle8

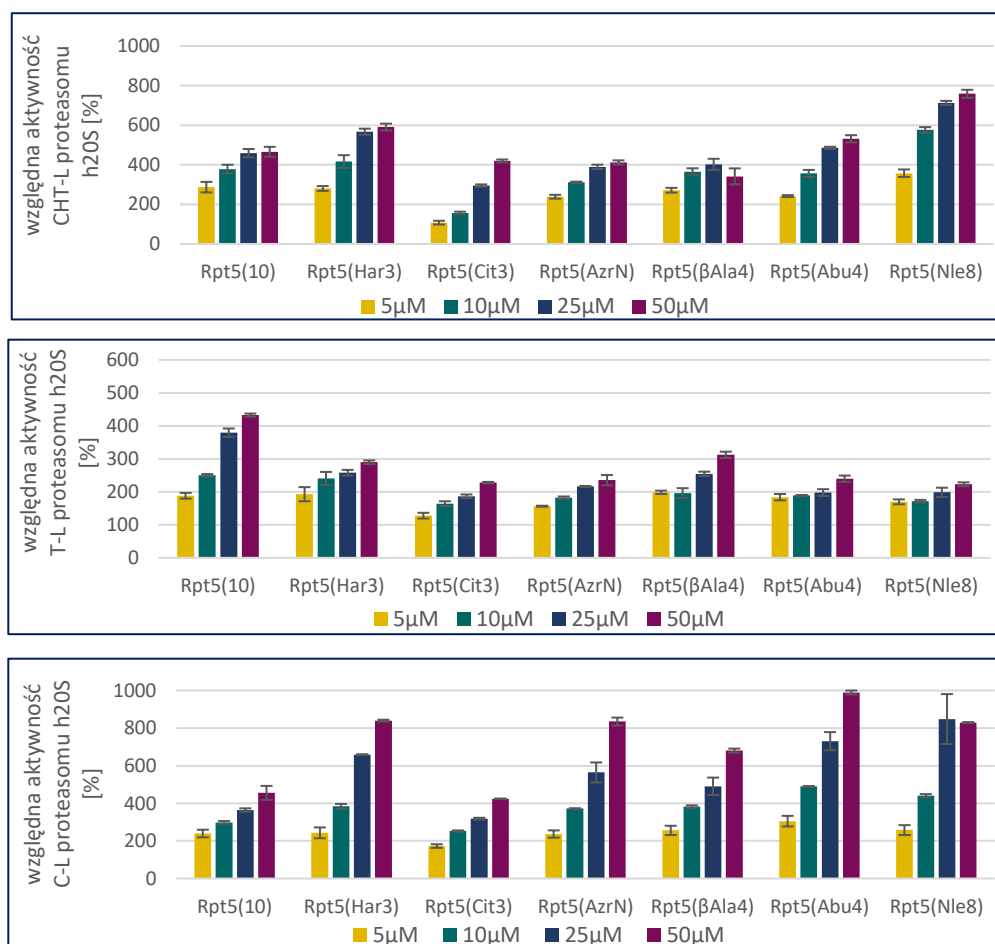
\*(nazwany AzrN)

Tabela 7 Sekwencje analogów peptydu Rpt5(10) zawierających podstawienia nienaturalnymi aminokwasami

Nazwa peptydu	Sekwencja
Rpt5(10)	KKKANLQYYA
Rpt5(Cit3)	KKCitANLQYYA
Rpt5(Har3)	KKHarANLQYYA
Rpt5( $\beta$ Ala4)	KKK $\beta$ ANLQYYA
Rpt5(Abu4)	KKKAbuNLQYYA
Rpt5(AzrN)	KKKAzrNLQYYA
Rpt5(Nle8)	KKKANLQNleYA

### 5.5.2.1. Właściwości aktywujące peptydomimetyków opartych o sekwencję aktywatora Rpt5(10)

Aby sprawdzić czy zsyntezowane analogi charakteryzują się lepszymi właściwościami, wszystkie peptydy z wprowadzonymi modyfikacjami przebadalam w kierunku aktywacji proteasomu 20S, wykorzystując trzy krótkie substraty fluorogeniczne (Suc-LLVY-AMC, Boc-LRR-AMC, Z-LLE-AMC) [Rys.24].



Rys. 24 Wpływ analogów peptydu Rpt5(10) zawierających modyfikacje w pozycjach 3, 4 i 8 na trzy aktywności proteasomu h20S

Zamiana Lys w pozycji trzeciej na Har spowodowała polepszenie właściwości aktywujących w odniesieniu do peptydaz ChT-L oraz C-L (widoczne przy stężeniach 25 i 50  $\mu\text{M}$  aktywatorów), natomiast wstawienie w to miejsce cytruliny, która pomimo strukturalnego podobieństwa do argininy nie posiada zasadowego łańcucha bocznego, skutkowało niewielkim obniżeniem aktywności. Jest to zapewne związane z charakterem wiązań wodorowych tworzonych przez te aminokwasy. Podczas gdy łańcuchy boczne zasadowych Har oraz Lys posiadają tylko atomy będące donorami wiązania wodorowego, cytrulina może oddziaływać zarówno jako donor, jak i akceptor takiego wiązania.

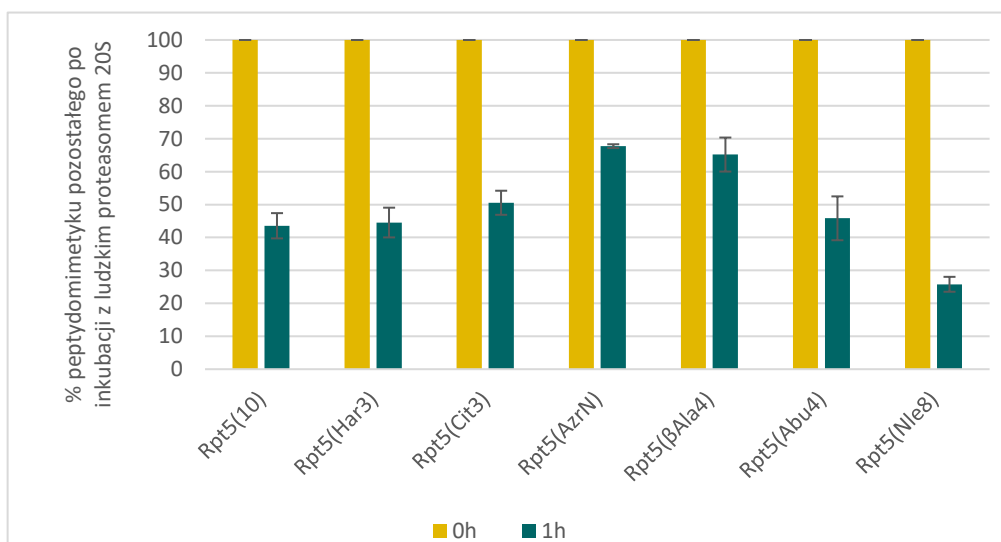
Związki Rpt5(Har3), Rpt5(Abu4) oraz Rpt5(Nle8) w stężeniach 25 i 50  $\mu\text{M}$  wpływały na poprawę aktywności chymotrypsynopodobnej, zaś peptydy Rpt5(Har3), Rpt5(AzrN), Rpt5(Abu4) oraz Rpt5(Nle8) w stężeniach 10, 25 i 50  $\mu\text{M}$  znacznie wpłynęły na aktywność peptydazy kaspazopodobnej proteasomu 20S. Co ciekawe, żaden z analogów nie stymulował aktywności trypsynopodobnej bardziej niż Rpt5(10).

Zsyntezowałam 3 analogi peptydu Rpt5(10) ze zmienioną pozycją czwartą, gdzie natywnie występowała alanina: Abu4,  $\beta\text{Ala4}$  oraz peptyd ze zredukowanym wiązaniem peptydowym pomiędzy Ala4 i Asn5 (AzrN). Wszystkie te podstawienia spowodowały poprawę aktywności kaspazopodobnej proteasomu i niewielkie obniżenie efektu aktywacyjnego pozostałych dwóch peptydaz. Peptyd ze zredukowanym wiązaniem peptydowym również posiadał nieco słabsze zdolności do aktywacji podjednostek  $\beta 5$  i  $\beta 2$ , co jest zapewne związane ze zwiększoną giętkością łańcucha peptydowego, która wynika z utraty planarności charakterystycznej dla wiązania amidowego. Dodatkowo brak grupy karbonylowej w zredukowanym wiązaniu peptydowym może ograniczać tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy aktywatorem a enzymem. Reszta Tyr8 peptydu odpowiada reszcie hydrofobowej Hb w charakterystycznym motywie HbYX. Interesującym jest fakt, że zamiana Tyr na również hydrofobową Nle, spowodowała poprawę właściwości aktywujących, czyniąc związek jednocześnie najsilniejszym z otrzymanych aktywatorów, który w najwyższym badanym stężeniu 50  $\mu\text{M}$  był w stanie 8-krotnie pobudzać aktywności chymotrypsyno- oraz kaspazopodobną proteasomu 20S. Możliwe więc, że w tym miejscu preferowany jest mniej rozbudowany hydrofobowy łańcuch boczny [Rys. 24].

### 5.5.2.2. Odporność mimetyków peptydu Rpt5(10) na degradację proteasomalną

Ze względu na dużą podatność Rpt5(10) na trawienie przez proteasom oraz proteazy obecne w ludzkim osoczu, związki otrzymane w celu zwiększenia odporności na degradację poddałam analogicznym testom stabilności. Badania te podyktowane były chęcią sprawdzenia, czy aktywność badanych związków koreluje z ich odpornością na degradację proteasomalną.

Wszystkie badane peptydy były trawione przez proteasom w mniejszym lub większym stopniu. Do analogów najbardziej odpornych na degradację proteasomalną należały: Rpt5(AzrN) oraz Rpt5( $\beta$ Ala4), które po 1h inkubacji z enzymem pozostawały niestrawione w min. 60% [Rys.25]. Wyniki te korelują z potencjałem aktywującym tych związków – im silniejszy aktywator, tym szybsza jego degradacja przez h2OS. Potwierdza to allosteryczny mechanizm działania zaprojektowanych modulatorów. Najprawdopodobniej wiązanie się związku z proteasomem zwiększa stopień otwarcia  $\alpha$ -bramy, co jednocześnie ułatwia także jego wnikanie do wnętrza komory katalitycznej i uleganie degradacji.

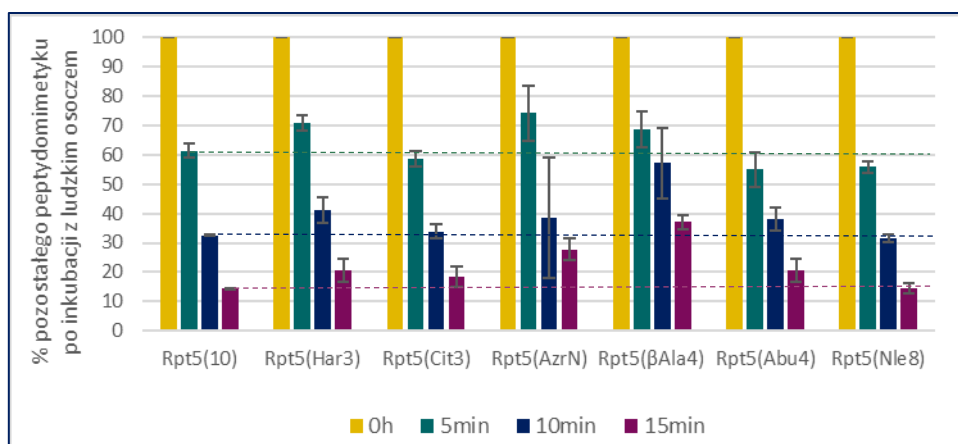


Rys. 25 Stabilność peptydomimetyków wywodzących się z aktywatora Rpt5(10) względem ludzkiego proteasomu 20S

### 5.5.2.3. Stabilność peptydomimetyków w ludzkim osoczu

Peptydomimetyki przebadłam również pod kątem stabilności w ludzkim osoczu. Związki te wykazywały stabilność zbliżoną lub wyższą od wyjściowego aktywatora Rpt5(10). Największe polepszenie stabilności zaobserwowałam dla związków Rpt5( $\beta$ Ala4) oraz Rpt5(AzrN), które po 15 min inkubacji z osoczem pozostawały

niestrawione w ok. 30% [Rys.26]. Wprowadzenie modyfikacji takich jak  $\beta$ -aminokwasy lub zredukowane wiązanie peptydowe znacząco wpływa na strukturę drugorzędową, co może być kluczem dla zapewnienia stabilności takiego peptydu/peptydomimetyku.



Rys. 26 Stabilność analogów aktywatora Rpt5(10) w ludzkim osoczu

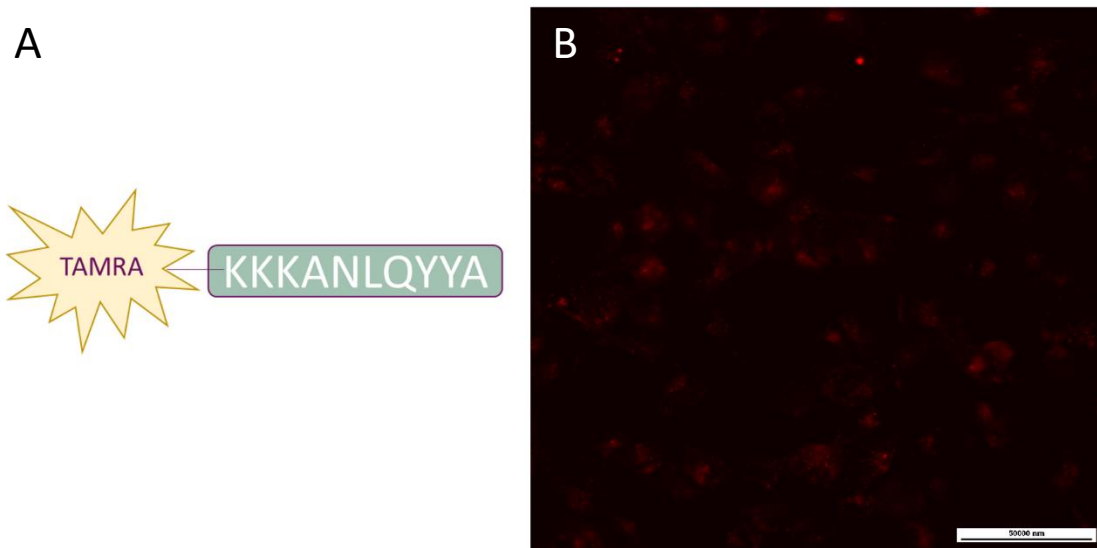
## 6. Badania możliwości wykorzystania otrzymanych aktywatorów w testach komórkowych

### 6.1. Badanie zdolności peptydu Rpt5(10) oraz jego analogu z przyłączoną sekwencją CPP do penetrowania błony komórek HEK 293T

Jedną z wad stosowania peptydów jako leków jest ich słaba zdolność do penetrowania błony komórkowej, dlatego ważnym celem mojej pracy było sprawdzenie czy peptyd Rpt5(10) jest w stanie samoistnie przenikać błonę komórek HEK 293T. Peptyd ten, posiadając zasadowe aminokwasy (trzy reszty lizyny) na swoim *N*-końcu, mógłby działać w sposób zbliżony do kationowych CPP. W celu sprawdzenia tej hipotezy do peptydu przyłączyłam znacznik TAMRA [Rys. 27A], aby umożliwić jego detekcję w komórkach pod mikroskopem fluorescencyjnym. Znacznik ten przyłączyłam do *N*-końca peptydu Rpt5(10).

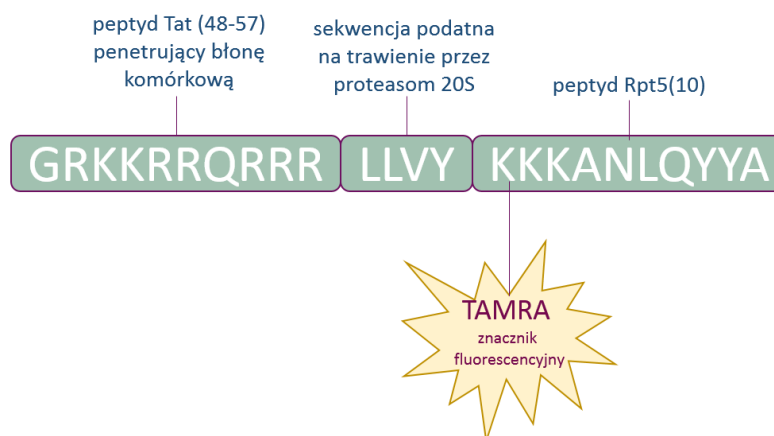
Dodatkowo w peptydzie tym wymieniłam przeciwjon (z trifluoroctanowego na chlorkowy) w celu uniknięcia cytotoksyczności. Po inkubacji tak przygotowanego związku z komórkami HEK 293T, stwierdziłam niewielką zdolność peptydu Rpt5(10) do przenikania błony komórkowej [Rys. 27B].





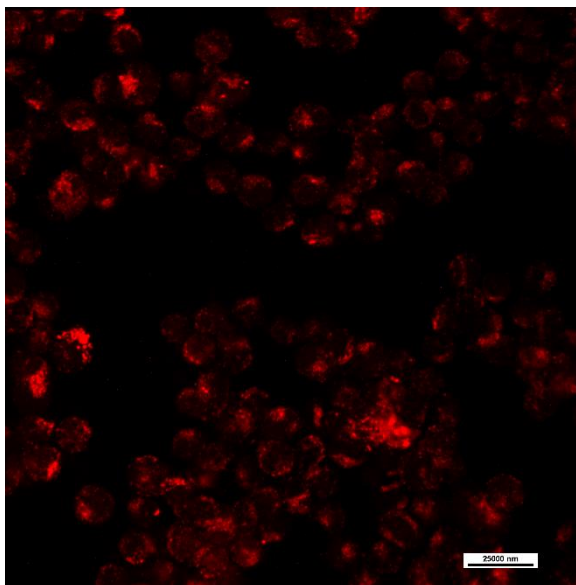
Rys. 27 A - sekwencja peptydu Rpt5(10) z przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym TAMRA; B - zdjęcie z mikroskopu konfokalnego przedstawiające komórki HEK 293T po inkubacji z peptydem Rpt5(10) wyznakowanym fluorescencyjnie (zaznaczona skala – 50000 nm)

W związku z powyższym postanowiłam zmodyfikować peptyd Rpt5(10), przyłączając do jego *N*-końca sekwencję peptydu penetrującego Tat(48-57), poprzedzoną sekwencją podatną na trawienie przez proteasom 20S, tak aby część aktywna była uwalniana w komórce [Rys. 28].



Rys. 28 Schemat przedstawiający sekwencję peptydu Rpt5(10) z przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym TAMRA oraz sekwencją penetrującą Tat(48-57)

Zdjęcie poniżej [Rys. 29] prezentuje komórki inkubowane z peptydem Tat-Rpt5(10). Na jego podstawie mogę stwierdzić, że peptyd z przyłączonym fragmentem Tat(48-57) jest w stanie penetrować błonę komórek HEK 293T, dlatego też postanowiłam wykorzystać go w badaniach komórkowych.



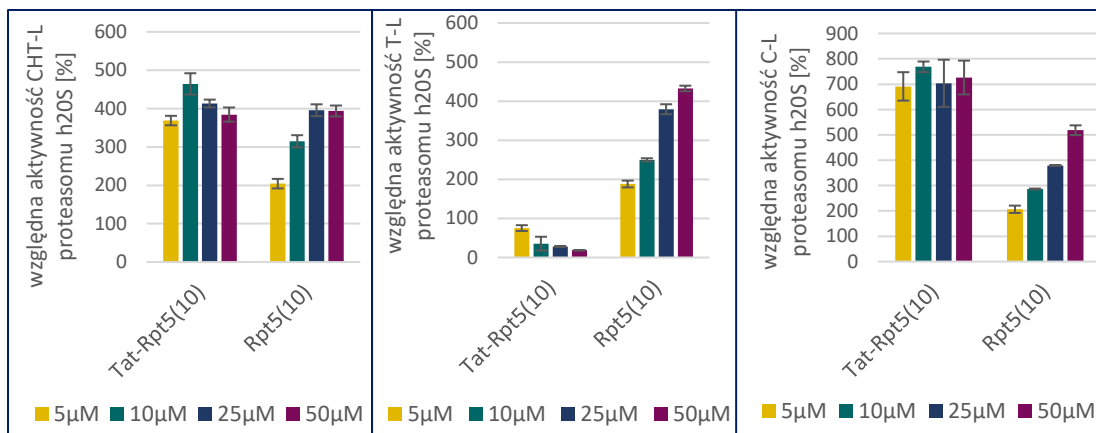
Rys. 29 Zdjęcie z mikroskopu konfokalnego przedstawiające komórki HEK 293T po inkubacji z peptydem Tat-Rpt5(10) wyznakowanym fluorescencyjnie (zaznaczona skala – 25000 nm)

## 6.2. Badanie wpływu peptydu Tat-Rpt5(10) na aktywność proteasomu 20S

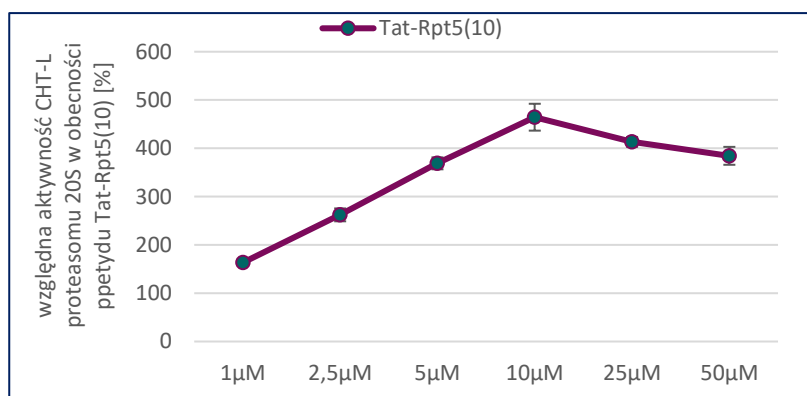
Ze względu na fakt, iż przyłączenie sekwencji Tat(48-57) do peptydu Rpt5(10) mogło wpłynąć na jego właściwości aktywujące, w dalszej części swoich badań sprawdziłam wpływ peptydu Tat-Rpt5(10) (bez przyłączonego znacznika TAMRA) na pobudzenie aktywności wyizolowanego z krwi proteasomu. Peptyd ten został przebadany w kierunku aktywacji wszystkich trzech peptydaz proteasomu: ChT-L, C-L oraz T-L.

Przedstawione poniżej wyniki pokazują, że peptyd Tat-Rp5(10) silniej stymulował aktywności ChT-L oraz C-L proteasomu aniżeli sam peptyd Rpt5(10) [Rys. 30]. Ze względu na zauważalny spadek aktywności peptydu Tat-Rpt5(10) w wyższych stężeniach, przebadałam go również w zakresie niższych stężeń na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu [Rys. 31]. Otrzymana krzywa zależności stopnia aktywacji od dawki modulatora odzwierciedla krzywą otrzymaną dla samego peptydu Tat<sup>189</sup> i prawdopodobnie jest wynikiem wiązania peptydów pochodzących z trawienia aktywatora Tat-Rpt5(10) do proteasomu, w miejscu innym niż modulator, co może powodować osłabienie efektu aktywującego. Interesujący jest również wpływ związku Tat-Rpt5(10) na aktywność trypsynopodobną proteasomu. Sekwencja Tat, posiadająca aż 8 aminokwasów zasadowych, może silnie oddziaływać z podjednostką katalityczną  $\beta 2$

proteasomu blokując tym samym dostęp dla substratu, stąd też możemy obserwować zależny od stężenia efekt inhibujący tego peptydu.



Rys. 30 Wpływ peptydu Rpt5(10) oraz jego analogu z przyłączoną sekwencją penetrującą Tat(48-57) na aktywności ChT-L, T-L oraz C-L proteasomu h2OS

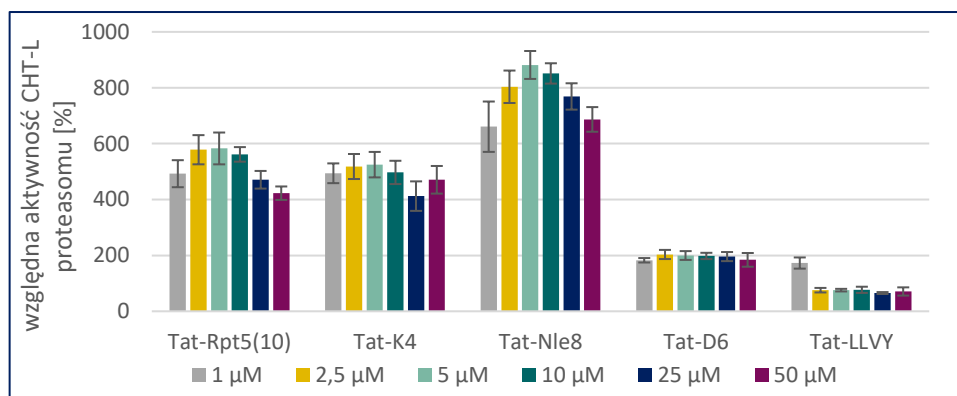


Rys. 31 Wpływ peptydu Tat-Rpt5(10) na aktywność chymotrypsynopodobną h2OS - szerszy zakres badanych stężeń

### 6.3. Badanie wpływu analogów Rpt5(10) z przyłączoną sekwencją CPP na aktywność proteasomu

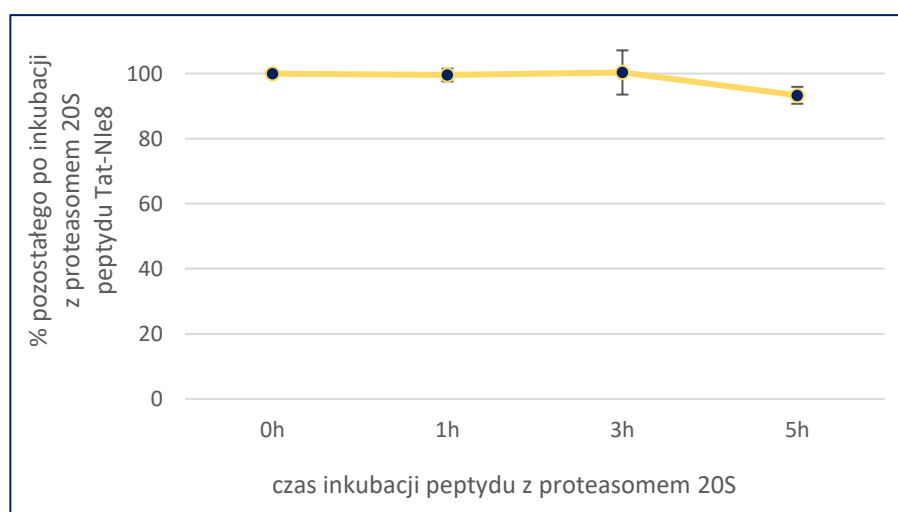
Ze względu na zachęcające wyniki aktywności otrzymane dla peptydu Tat-Rpt5, postanowiłam zsyntezować jeszcze 3 inne peptydy składające się z sekwencji aktywatora oraz fragmentu Tat-LLVY. Były to analogi peptydów: Rpt5(K4), Rpt5(Nle8) oraz Rpt5(D6). Dwa pierwsze związki to dobre aktywatory proteasomu, z kolei peptyd Rpt5(D6) został wybrany jako kontrola ze względu na brak właściwości stymulujących. Zsyntezowałam również peptyd Tat-LLVY, aby upewnić się, że za efekt stymulujący odpowiada część farmakoforowa, a nie fragment Tat. Peptydy te poddałam badaniom aktywności na izolowanym proteasomie [Rys. 32].

Otrzymane wyniki pokazały, że przyłączenie sekwencji Tat do peptydów Rpt5(10), Rpt5(K4), Rpt5(Nle8) wpływa na ich właściwości aktywujące, powodując osiągnięcie maksymalnego efektu aktywacji już przy stężeniu 5  $\mu\text{M}$ , a nie 50  $\mu\text{M}$  jak miało to miejsce dla samych sekwencji aktywnych. Najlepszym aktywatorem z przyłączoną sekwencją penetrującą był peptyd Tat-Nle8. Z kolei, peptyd Rpt5(D6) nawet po przyłączeniu Tat nie wykazał znaczących właściwości stymulujących w żadnym z badanych stężeń, podobnie jak Tat-LLVY.



Rys. 32 Wpływ peptydów z przyłączoną sekwencją Tat(48-57) na aktywność chymotrypsynopodobną h20S

Ze względu na zaobserwowanie silniejszego wpływu aktywujących peptydów z przyłączoną sekwencją penetrującą w stosunku do ich macierzystych analogów, postanowiłam sprawdzić, czy za efekt ten może odpowiadać ich zwiększona stabilność. W tym celu przebadalam odporność najsilniejszego z aktywatorów – Tat-Nle8 na trawienie przez proteasom 20S [Rys. 33].

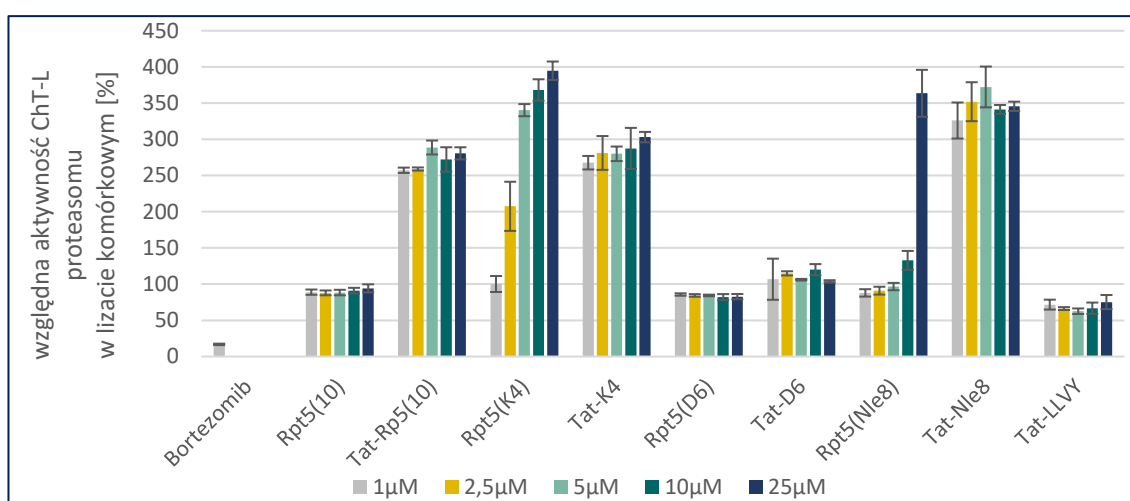


Rys. 33 Stabilność peptydu Tat-Nle8 w obecności proteasomu 20S

Badanie stabilności peptydu Tat-Nle8 potwierdziło, iż posiada on o wiele lepszą odporność na trawienie przez h20S niż jego wyjściowy analog – Rpt(Nle8). Degradacja tego peptydu przez 20S widoczna jest dopiero po 5h inkubacji z enzymem. Przyłączenie więc sekwencji penetrującej nie tylko wpływa na zdolności tych peptydów do przenikania błony komórkowej, ale również intensyfikuje ich zdolności aktywacyjne proteasom i poprawia stabilność.

W celu potwierdzenia, że peptydy zarówno z, jak i bez przyłączonej sekwencji Tat są na tyle stabilne, aby zaktywować proteasom w obecności innych białek komórkowych, postanowiłam wykonać analogiczne testy aktywności, ale w lizacie komórkowym.

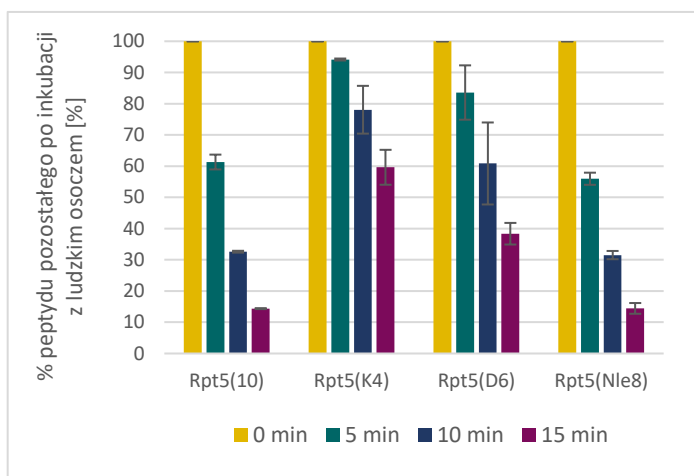
Peptyd Rpt5(10) nie był w stanie zaktywować proteasomu w lizacie komórkowym [Rys. 34]. Jest to zapewne związane z jego wysoką podatnością na degradację proteolityczną. Natomiast peptyd Tat-Rpt5(10) aktywował proteasom ok. 3-krotnie przy stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Peptyd ten, posiadając o wiele dłuższą sekwencję od macierzystego Rpt5(10), był zapewne w stanie dłużej przetrwać w trudnych warunkach jakie stanowi lizat komórkowy zawierający szereg białek zdolnych do proteolizy wiązań peptydowych.



Rys. 34 Wpływ peptydów oraz ich analogów z przyłączoną sekwencją Tat(48-57) na aktywność proteasomu w lizacie komórek HEK 293T

Z peptydów nieposiadających sekwencji penetrującej, proteasom w lizacie komórkowym najsilniej aktywował związek Rpt5(K4). Koreluje to z wynikami badań stabilności tych peptydów w ludzkim osoczu, gdyż peptyd ten wykazywał najlepszą odporność na degradację proteolityczną i prawdopodobnie dlatego był też w stanie najsilniej zaktywować proteasom w lizacie komórkowym [Rys. 34, 35]. Peptyd Rpt5(D6), pomimo iż również posiada dobrą stabilność w osoczu [Rys. 35], nie

aktywował proteasomu w lizacie, ponieważ jak wykazały wcześniejsze badania, nie posiada on zdolności do stymulowania enzymu.

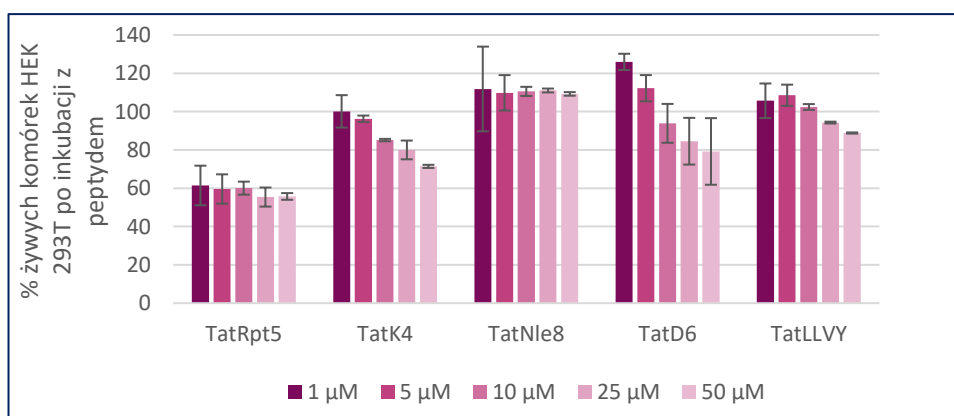


Rys. 35 Stabilność analogów Rpt5(10) w ludzkim osoczu

Z peptydów posiadających przyłączoną sekwencję CPP najsilniejszym aktywatorem proteasomu w lizacie komórkowym był niezmiennie peptyd Tat-Nle8. Peptyd Tat-LLVY, podobnie jak w przypadku badań na izolowanym proteasomie, nie stymulował enzymu również w lizacie komórkowym.

#### 6.4. Testy cytotoksyczności peptydów z przyłączonym fragmentem Tat

Pierwszym krokiem w badaniach przeprowadzonych na żywych komórkach było sprawdzenie aktywności cytotoksycznej związków: Tat-Rpt5(10), Tat-Nle8, Tat-K4 oraz Tat-D6. Żywotność komórek HEK 293T sprawdzałam wykonując standardowy test MTT [Rys. 36].



Rys. 36 Żywotność komórek HEK 293T, określona na podstawie testu MTT wykonanego po ich inkubacji z peptydami zawierającymi sekwencję Tat(48-57)

Najsilniejsze właściwości cytotoksyczne względem komórek linii HEK 293T wykazywał peptyd Tat-Rpt5(10), który zmniejszał przeżywalność komórek do ok. 60%

już przy najniższym badanym stężeniu tj. 1  $\mu\text{M}$ . Związek Tat-Nle8 nie powodował umieralności komórek nawet w maksymalnej dawce, tj. 50  $\mu\text{M}$ , natomiast Tat-D6 oraz Tat-K4 w tym stężeniu powodowały śmierć ok. 20-30% badanych komórek.

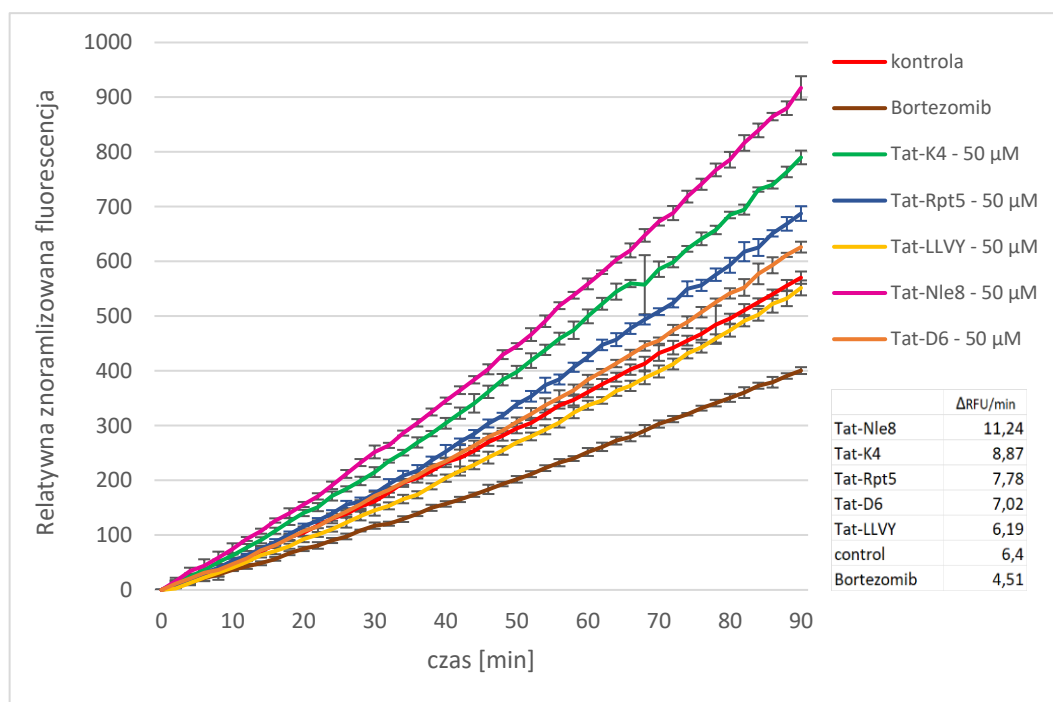
### 6.5. Badania aktywności peptydów w żywych komórkach HEK 293T z wykorzystaniem sondy TAS3

Do sprawdzenia wpływu otrzymanych związków na aktywność proteasomu w komórkach HEK 293T wykorzystywałam substrat TAS3. Substrat ten zsyntezowałam według protokołu opisanego w literaturze<sup>190</sup>. Jego niewątpliwymi zaletami są: zdolność do przenikania błony komórkowej oraz odporność na trawienie przez inne proteazy obecne w komórce, co czyni go wysoce specyficzną sondą aktywności proteasomu.

Kontrolę stanowiła aktywność proteasomu bez dodatku modulatora. W celu potwierdzenia obecności enzymu w badanej linii komórkowej, jako dodatkową kontrolę zastosowałam 10  $\mu\text{M}$  roztwór inhibitora proteasomu - Bortezomibu, który preinkubowałam z komórkami przez okres 30 min. Wykresy przedstawiają przyrost fluorescencji (RFU) uwolnionego w wyniku trawienia przez proteasom fragmentu substratu w zależności od czasu pomiaru (min). W tabeli umieszczonej na rysunku 37 przedstawione są przyrosty jednostek fluorescencji na minutę dla każdego z badanych aktywatorów (w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ ).

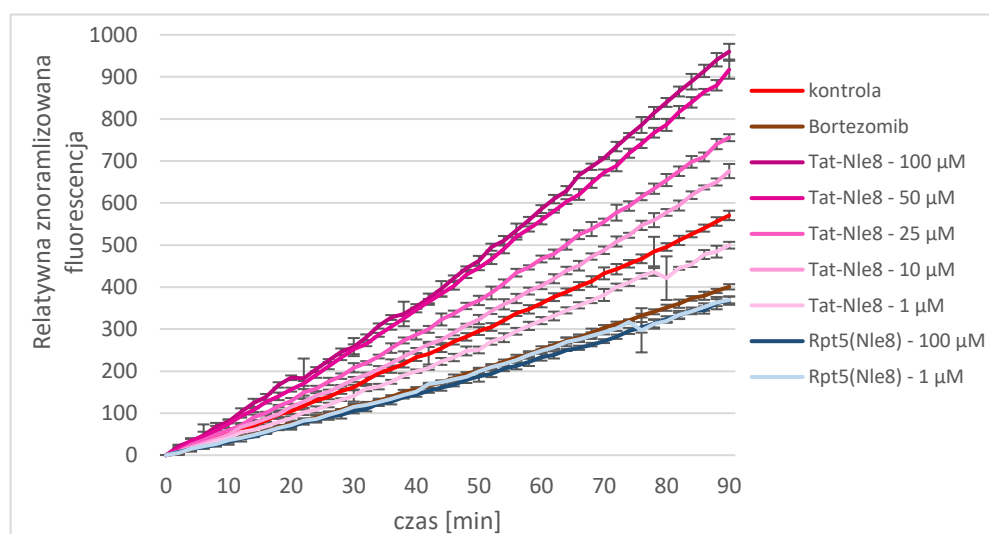
Związkiem, który najsilniej pobudzał trawienie TAS3 przez proteasom był peptyd Tat-Nle8. Peptyd ten w stężeniu 50  $\mu\text{M}$  zwiększał aktywność proteasomu o ok. 75% w stosunku do kontroli. Aktywacja przy tym stężeniu była również widoczna w przypadku peptydów Tat-K4 oraz Tat-Rpt5, jednak podobnie jak w badaniach na izolowanym enzymie, efekt ten był znacząco słabszy od zdolności stymulujących peptydomimetyku Tat-Nle8 [Rys. 37].

Najlepszy z otrzymanych aktywatorów, peptyd Tat-Nle8, pobudzał proteasom w komórkach w sposób zależny od dawki, przy czym słaba aktywacja (niespełna 20%) widoczna była już przy stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Wyniki te nie tylko udowadniają, iż peptydomimetyk ten był w stanie pokonać barierę błony komórkowej, ale również pokazują, że związki o charakterze peptydowym są w stanie aktywować proteasom w żywych komórkach.



Rys. 37 Wpływ peptydów zawierających sekwencję penetrującą Tat(48-57) na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu w żywych komórkach HEK 293T

Wyjściowy peptyd Rpt5(Nle8) nie wykazywał podobnego efektu w komórkach, ze względu na słabe zdolności do przenikania błony komórek HEK 293T [Rys. 38].

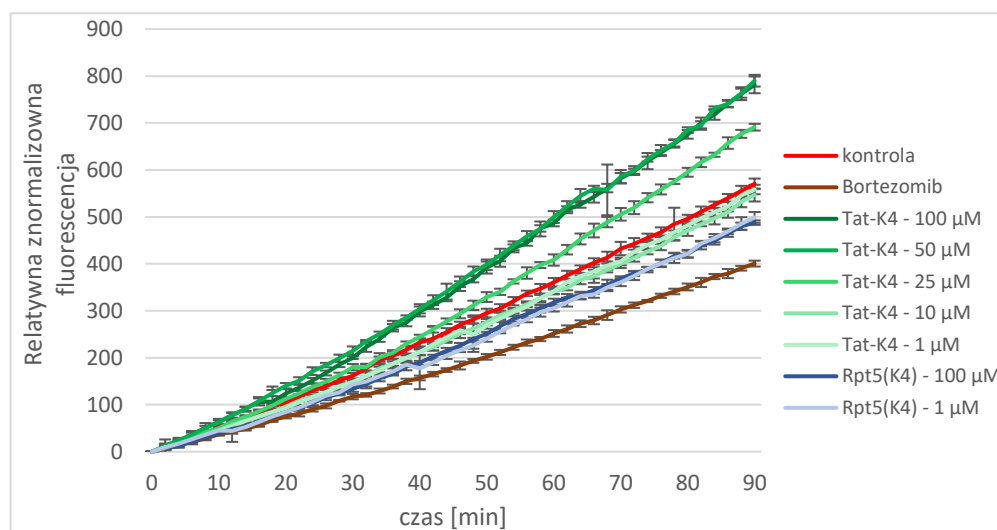


Rys. 38 Wpływ peptydów Rpt5(Nle8) oraz Tat-Nle8 na aktywność ChT-L proteasomu w żywych komórkach HEK 293T

Aktywacja zależna od stężenia była również widoczna w obecności peptydu Tat-K4, co koreluje z poprzednimi wynikami, jednakże efekt stymulujący był zauważalny dopiero przy stężeniu 25 μM. Pomimo iż sama sekwencja aktywna tego peptydu (związek

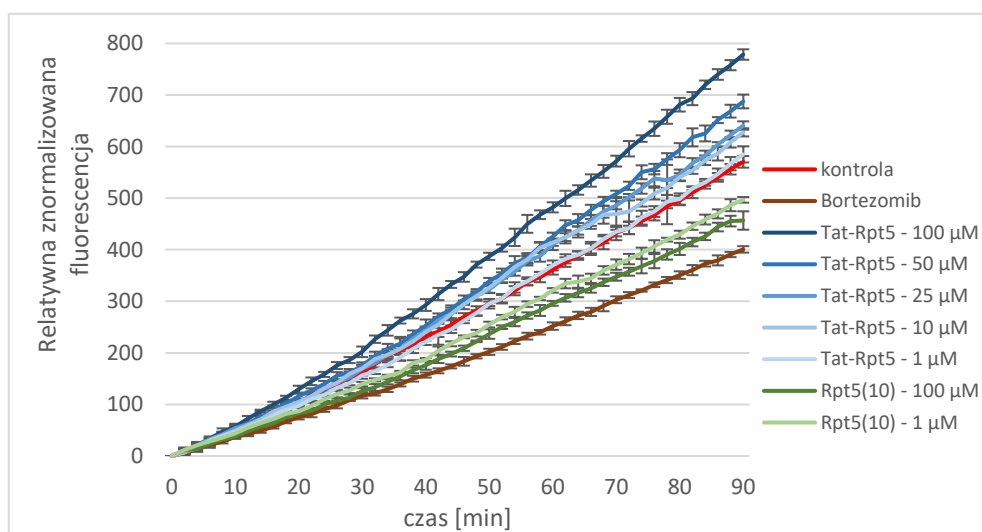


Rpt5(K4)) była w stanie aktywować proteasom również w lizacie komórkowym, nie zaobserwowałam podobnego efektu w żywych komórkach HEK 293T [Rys. 39].



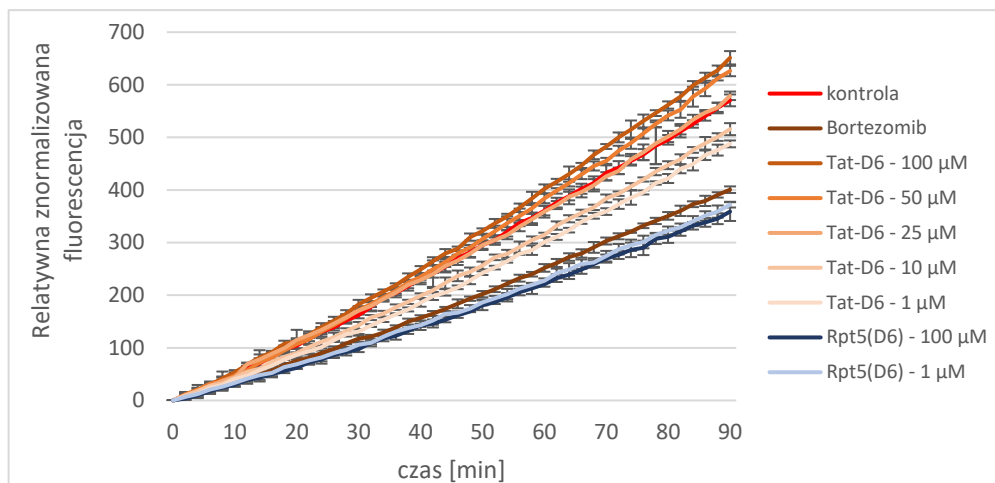
Rys. 39 Wpływ peptydów Rpt5(K4) oraz Tat-K4 na aktywność ChT-L proteasomu w żywych komórkach HEK 293T

W przypadku związku Tat-Rpt5, efekt aktywujący był dobrze widoczny dopiero w przypadku zastosowania stężenia 50  $\mu\text{M}$  tego związku [Rys. 40].



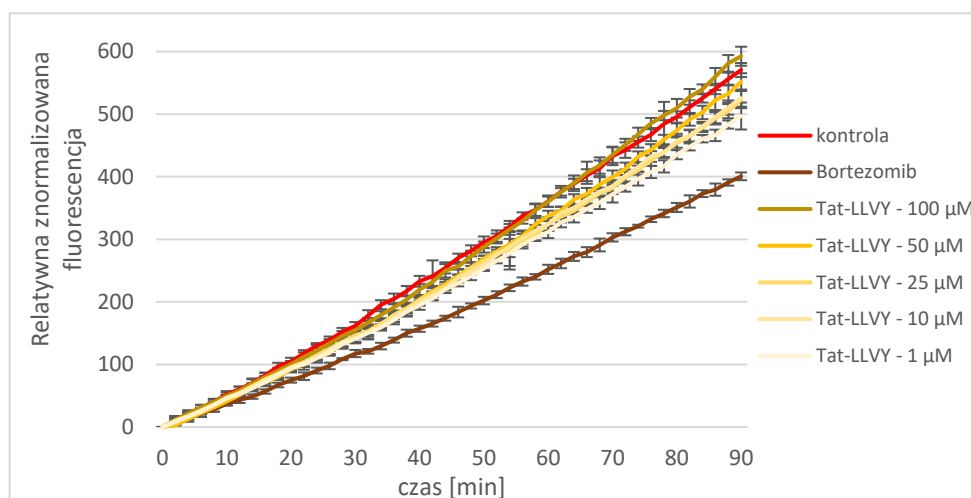
Rys. 40 Wpływ peptydów Rpt5(10) oraz Tat-Rpt5 na aktywność ChT-L proteasomu w żywych komórkach HEK 293T

Peptyd Tat-D6, tak jak się spodziewano, nie pobudzał aktywności proteasomu, podobnie jak jego wyjściowy analog bez przyłączonej sekwencji penetrującej – peptyd Rpt5(D6). [Rys.41].



Rys. 41 Wpływ peptydów Rpt5(D6) oraz Tat-D6 na aktywność ChT-L proteasomu w żywych komórkach HEK 293T

Wszystkie peptydy nieposiadające przyłączonej sekwencji penetrującej Tat nie powodowały zmian aktywności enzymu, co jest zgodne z faktem, iż nie są one w stanie przenikać błony cytoplazmatycznej komórek HEK 293T. Również sam peptyd Tat-LLVY nie stymulował proteasomu w żywych komórkach HEK 293T [Rys. 42].



Rys. 42 Wpływ peptydu Tat-LLVY na aktywność ChT-L proteasomu w żywych komórkach HEK 293T

Wyniki te nie tylko potwierdzają zdolności aktywatorów z przyłączoną sekwencją Tat do penetrowania błony komórkowej, ale przede wszystkim udowadniają, iż możliwe jest zaktywowanie proteasomu w żywych komórkach przez selektywny peptydowy modulator. Stanowi to duży krok w badaniach nad aktywatorami proteasomu 20S, ponieważ jak dotąd w żywych komórkach badano tylko związki małowcząsteczkowe, które posiadają wiele wad w stosunku do modulatorów peptydowych [Rys.12].

## IIIB CZĘŚĆ DRUGA – peptydy wywodzące się z białkowego aktywatora Blm10

Przedstawione powyżej wyniki badań otrzymanych przez mnie peptydowych aktywatorów proteasomu potwierdziły ich zdolności do pobudzania proteasomu do trawienia peptydowych substratów, nie tylko *in vitro*, ale również w żywych komórkach. Wyniki naszych niedawnych badań udowodniły również, iż wprowadzenie motywu HbYX do sekwencji peptydów bogatych w prolinę i argininę (ang. PR peptides), znanych jako inhibitory proteasomu 20S, przekształca te związki w silne aktywatory enzymu. Aktywatory PR stymulowały 20S do efektywnego rozkładu modelowych substratów białkowych *in vitro*, a także pobudzały aktywność enzymu w fibroblastach <sup>145 144</sup>. Ponadto, peptydowy aktywator Blm-pep, którego sekwencja wywodzi się z białka Blm10, również skutecznie stymulował wszystkie trzy aktywności enzymu <sup>147</sup>. Wykryształizowany kompleks aktywatora Blm-pep z drożdżowym proteasomem y20S (PDB: 5NIF) pozwolił na znalezienie miejsca wiązania C-końca tego peptydu z enzymem. Pięć C-terminalnych reszt peptydu (sekwencja: RSYYA) znaleziono pomiędzy podjednostkami  $\alpha 5$  i  $\alpha 6$  drożdżowego 20S, gdzie wiązał się również C-koniec białka Blm 10 (PDB: 4V7O). Jednocześnie ustalone zostało, że tak krótki fragment nie wystarcza do uzyskania aktywacji proteasomu <sup>147</sup>.

Bazując na powyższej wiedzy, postanowiłam wykorzystać sekwencję RSYYA jako bazową i dobudować do niej łańcuchy peptydowe, które wzmocniłyby zdolności aktywacyjne związków. Celem moich badań było określenie wymagań dla N-końca aktywatora, który skutecznie oddziaływałby z enzymem i powodował pobudzenie jego aktywności do trawienia zarówno krótkich peptydowych substratów, jak również modelowych białek.

## 7. Poszukiwanie optymalnej sekwencji aktywatora

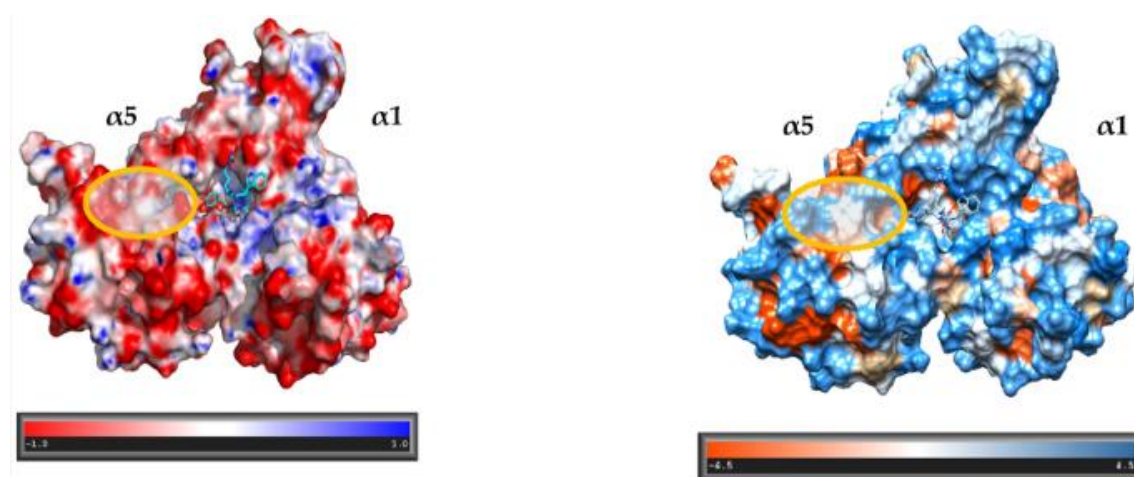
### 7.1. Modelowanie molekularne

Sekwencje peptydów zostały zaprojektowane w oparciu o wcześniej otrzymane (przez dr Małgorzatę Giżyńską) aktywator Blm-pep, który z kolei wywodzi się z sekwencji naturalnego aktywatora proteasomu – białka Blm10 <sup>137</sup>. W strukturach krystalicznych kompleksów Blm-pep oraz Blm10 z drożdżowym proteasomem

(odpowiednio PDB: 5NIF oraz 4V7O), C-końce tych aktywatorów znajdują się pomiędzy podjednostkami  $\alpha 5$  i  $\alpha 6$  drożdżowego 20S. Dlatego też punktem startowym modelowania molekularnego (wykonanego przez dr hab. Artura Giełdonia) było wykorzystanie struktury krystalicznej Blm10 z drożdżowym proteasomem 20S (PDB: 4V7O) oraz struktury krystalicznej proteasomu ludzkiego (PDB: 4R3O) i zadokowanie fragmentu białka Blm10 pomiędzy podjednostkami  $\alpha 5/\alpha 1$  ludzkiego proteasomu, czyli w kieszeni odpowiadającej tej, w której wiązały się peptydowy aktywator i białko Blm10 w drożdżowym ortologu.

Następnie przeanalizowano trzy możliwe długości linkera, który powinien łączyć *N*-końcowy fragment potencjalnego aktywatora z siedmioma *C*-końcowymi resztami Blm10 zadokowanymi we wspomnianej kieszeni, tak aby umożliwić oddziaływanie z podjednostką  $\alpha 5$  [Rys. 43], które określono jako niezbędne do wywołania aktywacji 20S przez białko Blm10<sup>137</sup>. W toku modelowania obliczono, iż długość łańcucha, która jest niezbędna do efektywnego oddziaływania z enzymem wynosi ok. 10Å. W oparciu o analizy powierzchni hydrofobowej oraz elektrostatycznej potencjalnego miejsca wiązania zaprojektowano trzy sekwencje peptydowe [Tabela 8], w których jako linker zastosowano odpowiednio 2, 3 lub 4 reszty glicyny.

Cztery *N*-końcowe reszty tych peptydów, poprzedzające wspomniane linkery, wybrano na podstawie interakcji możliwych do utworzenia z podjednostką  $\alpha 5$  proteasomu [Rys. 43] (peptydy: M3-6, M1-1 oraz M2-6). Sekwencje tych peptydów zawiera Tabela 8.



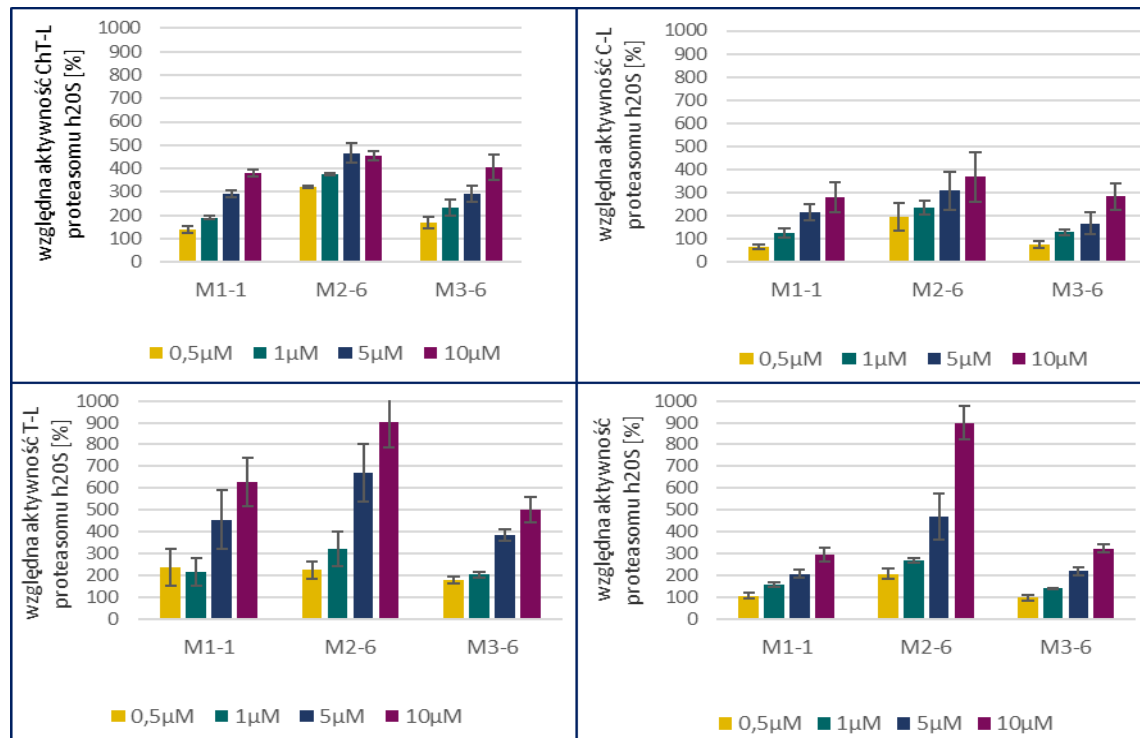
Rys. 43 Fragment pierścienia alfa proteasomu 20S. Widoczna część ligandu znajduje się pomiędzy podjednostkami  $\alpha 5$  i  $\alpha 1$  (odpowiadającymi odpowiednio  $\alpha 5$  i  $\alpha 6$  w y20S). Po lewej: powierzchnia elektrostatyczna generowana przez APBS po prawej: powierzchnia hydrofobowa (hydrofobowość aminokwasów wyrażona została w skali Kyte'a-Doolittle'a). Na żółto zaznaczono najbardziej prawdopodobny kierunek ułożenia *N*-końca potencjalnego aktywatora<sup>148</sup>

Białko Blm10 w miejscu C-końcowego aminokwasu posiada hydrofobową resztę alaniny. Pozycja ta została zastąpiona we wszystkich analogach resztą seryny w celu umożliwienia tworzenia wiązania wodorowego z resztą Gly76 podjednostki  $\alpha 1$  proteasomu, wzmacniając tym samym oddziaływanie z dnem kieszeni wiążącej  $\alpha 5/\alpha 1$ .

Tabela 8 Sekwencje modulatorów różniących się długością linkera, zaprojektowanych przy użyciu modelowania molekularnego

Nazwa peptydu	Sekwencja
M1-1	SDVSGGGLWRSYYS
M2-6	KNSNPeg2LWRSYYS
M3-6	SESVGGGLWRSYYS

Ze względu na problemy w syntezie oraz oczyszczaniu peptydów, które w sekwencji posiadają 4 kolejne reszty glicyny, do syntezy użyto pochodnej Fmoc-NH-Peg2-CH<sub>2</sub>-COOH o długości łańcucha zbliżonej do tetrapeptydu. Taki hydrofilowy linker, oprócz odpowiedniej długości, niwelował dodatkowo problemy z rozpuszczalnością peptydów w wodzie.



Rys. 44 Wpływ modulatorów o różnej długości linkera łączącego C-koniec peptydu (oparty o sekwencję Blm10) z N-koncem zaprojektowanym przy użyciu modelowania molekularnego

Związki te zostały przebadane w kierunku aktywacji wszystkich trzech peptydaz proteasomu z zastosowaniem krótkich substratów fluorogenicznych [Rys. 44].

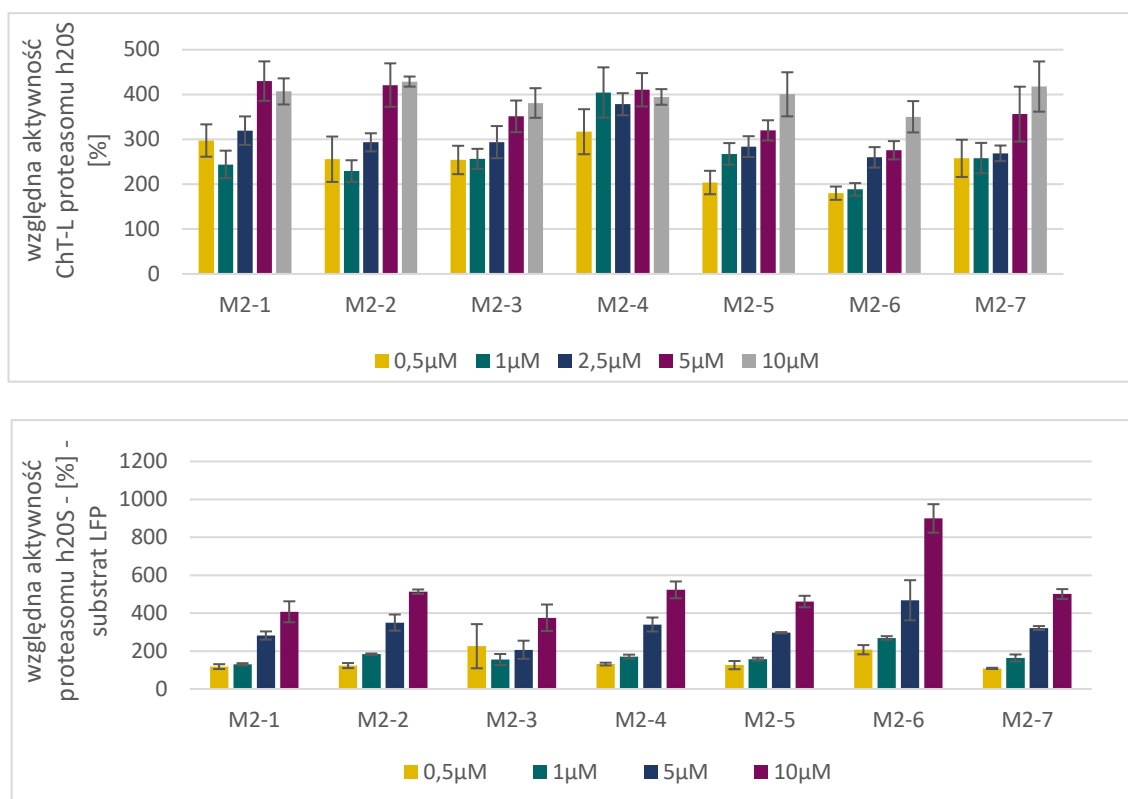
Niezależnie od użytego substratu, najlepszym aktywatorem okazał się peptyd z najdłuższym linkerem tj. M2-6. Związek ten najefektywniej stymulował wszystkie 3 peptydazy proteasomu. W najniższym badanym stężeniu, w którym peptydy M1-1 oraz M3-6 nie wykazywały pobudzania aktywności ChT-L, peptyd M2-6 pobudzał ją aż 3-krotnie. Peptydaza trypsynopodobna proteasomu w obecności aktywatora M2-6 w stężeniu 10  $\mu$ M była pobudzana aż 9 razy w stosunku do kontroli. Podobny efekt związek ten wywierał pobudzając enzym do trawienia substratu LFP [Rys. 44, prawy dolny panel].

Następnie ponownie zadokowano siedem C-końcowych reszt białka Blm10, tym razem w innych kieszeniach tworzonych przez sąsiadujące podjednostki alfa ludzkiego proteasomu 20S, tj.  $\alpha$ 3/ $\alpha$ 6,  $\alpha$ 6/ $\alpha$ 2,  $\alpha$ 2/ $\alpha$ 4,  $\alpha$ 4/ $\alpha$ 7,  $\alpha$ 7/ $\alpha$ 5,  $\alpha$ 1/ $\alpha$ 3 i zaprojektowano związki, które potencjalnie mogły wiązać się w różnych kieszeniach proteasomu na skutek oddziaływań utworzonych przez ich N-końcowe reszty z różnymi podjednostkami  $\alpha$  [Tabela 9]. W związkach tych wykorzystano linker Peg2, który w badaniach poprzedniej serii peptydów okazał się optymalny pod względem długości.

Tabela 9 Sekwencje modulatorów zaprojektowanych poprzez dokowanie fragmentu białka Blm10 w kieszeniach utworzonych przez sąsiadujące podjednostki  $\alpha$  proteasomu

Nazwa peptydu	Sekwencja	Kieszon pierścienia $\alpha$ proteasomu 20S
M2-1	LNENPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 3/ $\alpha$ 6
M2-2	YSQEPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 6/ $\alpha$ 2
M2-3	SQSLPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 2/ $\alpha$ 4
M2-4	ENSKPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 4/ $\alpha$ 7
M2-5	LESEPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 7/ $\alpha$ 5
M2-6	KNSNPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 5/ $\alpha$ 1
M2-7	NNSEPeg2LWRSYYS	$\alpha$ 1/ $\alpha$ 3

Peptydy te przebadalam pod kątem aktywacji h20S, aby sprawdzić, czy potencjalna zmiana kieszeni wiążącej wpływa na siłę wywieranego przez peptydomimetyk efektu aktywującego proteasom. Do testów użyłam krótkiego substratu fluorogenicznego odpowiadającego aktywności ChT-L proteasomu 20S oraz substratu LFP.



Rys. 45 Wpływ na aktywność proteasomu peptydów zaprojektowanych w celu sprawdzenia ich potencjalnego oddziaływania z różnymi podjednostkami  $\alpha$  enzymu

Aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu najsilniej stymulował peptyd M2-4, który w najniższym badanym stężeniu (0,5  $\mu$ M) aktywował proteasom ok. 3-krotnie. Peptyd ten w pozycji pierwszej posiadał resztę kwasu glutaminowego, a w pozycji czwartej zasadową lizynę. Wyjściowy aktywator M2-6 posiadał w tych pozycjach Lys1 oraz Asn4. Możliwe więc, że ze względu na odmienne charaktery tych aminokwasów, peptydy te wiązały się w różnych kieszeniach proteasomu. Z kolei substrat LFP był najchętniej trawiony przez 20S w obecności peptydu M2-6, a pozostałe związki nie wykazywały większych różnic w stymulowaniu enzymu, tj. w stężeniu 10  $\mu$ M wszystkie aktywowały proteasom do trawienia substratu LFP ok. 4-krotnie w stosunku do kontroli [Rys. 45].

Ze względu na fakt, iż w stosunku do pozostałych związków peptyd M2-6 silniej pobudzał h2OS do trawienia dłuższego substratu peptydowego, postanowiłam zsyntezować kolejne analogi tego aktywatora.

## 7.2. Ocena krytycznego znaczenia poszczególnych reszt w peptydzie M2-6 dla właściwości aktywujących proteasom

Aby sprawdzić, które reszty w peptydzie M2-6 najsilniej odpowiadają za jego zdolność do stymulacji proteasomu, zsyntezowałam kolejną pulę aktywatorów, podstawiając wybrane reszty w jego sekwencji [Tabela 10].

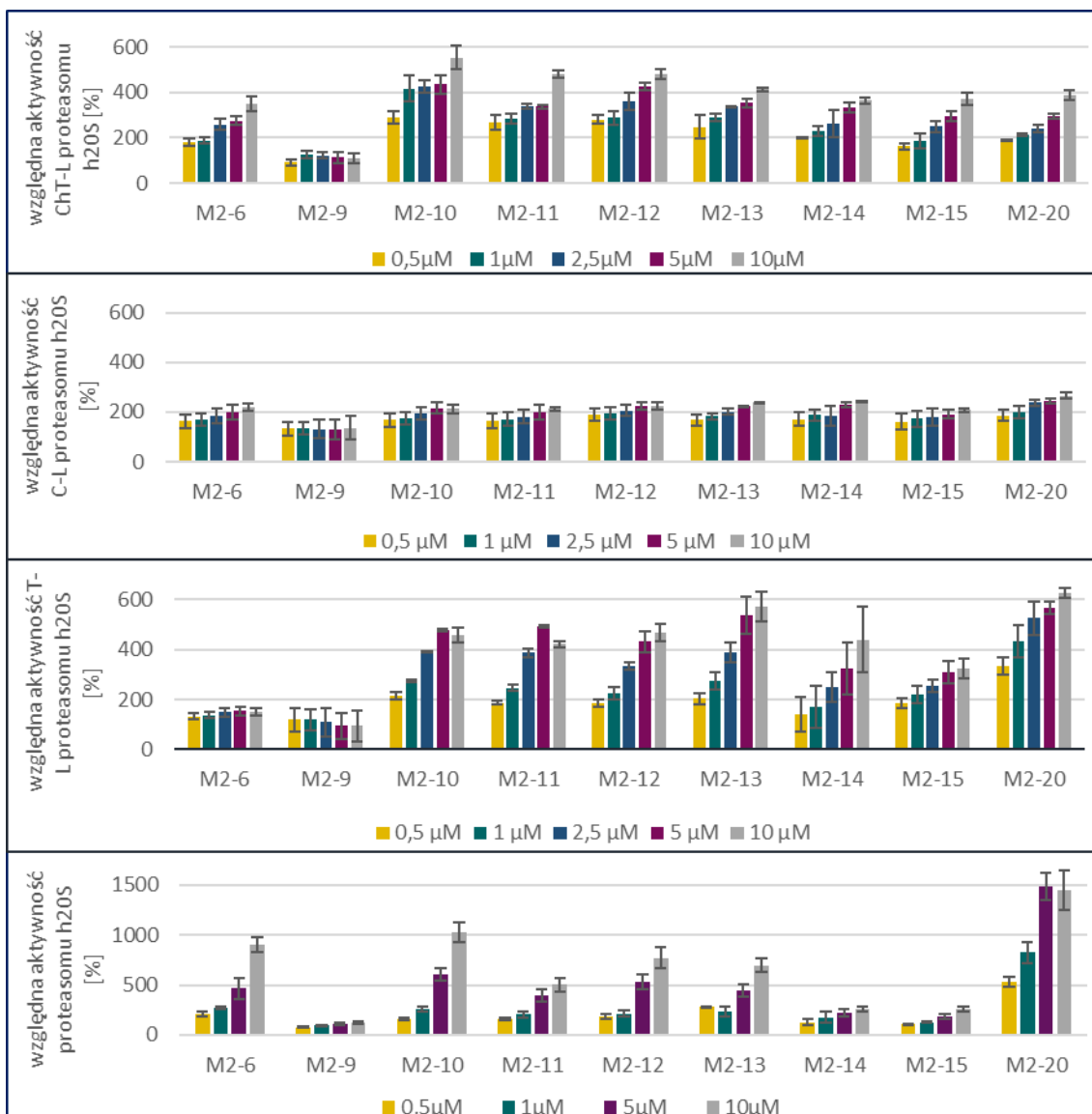
W związku z tym, iż peptyd M2-6 różnił się aminokwasami w pozycjach 1 i 4 od związku M2-4 (który najsilniej stymulował aktywność ChT-L), postanowiłam sprawdzić wpływ tych reszt na aktywność peptydu M2-6. W tym celu zsyntezowałam peptydy M2-13, M2-14 oraz M2-20. Pierwsze dwa w miejscu Lys1 (obecnej w peptydzie M2-6) posiadały kwasową resztę Glu (M2-14) oraz obojętną Leu (M2-13), natomiast peptyd M2-20 różnił się pozycją czwartą, gdzie zamiast asparaginy wstawiłam zasadową lizynę. Dodatkowo zsyntezowałam jeszcze dwa analogi peptydu M2-6: peptyd M2-11 oraz M2-12. Pierwszy z nich w miejscu Ser3 posiadał resztę Glu3. W peptydzie M2-12 natomiast zamieniłam resztę Leu6 na kwas asparaginowy, co miało umożliwić tworzenie mostka solnego z resztami Lys/Arg, znajdującymi się nieopodal kieszeni  $\alpha 1/\alpha 5$ , a tym samym stabilizować oddziaływanie z enzymem. Taką samą modyfikację posiadały peptydy M2-9, M2-10 oraz M2-15. Dodatkowo w peptydzie M2-9 wymieniłam L-tyrozynę w pozycji 10 na izomer D, aby sprawdzić czy taka zmiana konfiguracji wpłynie na funkcję motywu HbYX obecnego w peptydzie. Peptyd M2-10 oprócz wspomnianej reszty Asp w pozycji 6 posiadał homoargininę w miejscu Lys1. Zamiana ta miała na celu sprawdzenie czy wydłużenie łańcucha bocznego w tej pozycji spowoduje poprawienie właściwości aktywujących peptydomimetyku. W peptydzie M2-15 zasadową argininę w pozycji 8 zastąpiłam nienaturalną cytruliną, co pomogło ocenić wpływ charakteru łańcucha bocznego w tym miejscu na właściwości aktywujące peptydu [Tabela 10]. Aktywność powyższych peptydów przebadalam stosując krótkie substraty odpowiadające trzem aktywnościom proteasomu oraz substrat LFP [Rys. 46].



Tabela 10 Sekwencje peptydów zaprojektowanych w celu dalszej optymalizacji struktury potencjalnego aktywatora proteasomu 20S

Nazwa peptydu	Sekwencja
M2-6	KNSNPeg2LWRSYYS
M2-9	KNSNPeg2DWRSdYYS
M2-10	HarNSNPeg2DWRSYYS
M2-11	KNENPeg2LWRSYYS
M2-12	KNSNPeg2DWRSYYS
M2-13	LNSNPeg2LWRSYYS
M2-14	ENSNPeg2LWRSYYS
M2-15	KNSNPeg2DWCitSYYS
M2-20	KNSKPeg2LWRSYYS

Aktywność badanych związków znacząco różniła się w zależności od użytego substratu. Peptydaza chymotrypsynopodobna 20S była najsilniej pobudzana w obecności związków M2-10 oraz M2-12, które w najwyższym badanym stężeniu aktywowały ją ok. 5-krotnie. Oba te peptydy posiadały zasadowy aminokwas w pozycji 1 (Har lub Lys) oraz asparaginę w pozycji 6. Peptyd M2-20 w zakresie niskich stężeń (0,5 – 2,5  $\mu\text{M}$ ) najsilniej pobudzał aktywność T-L. Substrat LFP był również najchętniej trawiony w obecności peptydu M2-20, dla którego obserwowałam aż 14-krotne polepszenie aktywności proteasomu (w stosunku do aktywności enzymu bez dodatku modulatora) przy zastosowaniu aktywatora w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Z kolei peptyd M2-14, zawierający kwas glutaminowy w pozycji 1, wywierał znikomy wpływ na trawienie tego substratu. Możliwe, że obecne w pozycji pierwszej i czwartej reszty zasadowe w peptydzie M2-20 są niezbędne do pobudzania aktywności T-L proteasomu a także do szerszego otwierania bramy proteasomu, przez co powodują lepsze trawienie dłuższego substratu LFP.



Rys. 46 Wpływ aktywatorów opartych o strukturę białka Blm10 na aktywność enzymu (osobno peptydazę ChT-L, C-L i T-L oraz aktywność multi-peptydazową, scharakteryzowaną z wykorzystaniem substratu LFP)

Peptyd M2-9, zawierający D-tyrozynę w pozycji 10, utracił całkowicie zdolność do aktywacji proteasomu, co widoczne było dla wszystkich badanych substratów. Świadczy to o wysokiej specyficzności miejsca wiązania C-końca aktywatorów przez enzym.

## 8. Badania na substratach białkowych

### 8.1. Badanie oddziaływania białek z proteasomem 20S za pomocą mikroskalowej termoforezy kapilarnej

Krótkie substraty fluorogeniczne, ze względu na dostępność i łatwość stosowania, są często używane do oceny potencjału aktywacyjnego związków względem proteasomu 20S. Substraty takie, pomimo wielu zalet, nie naśladują jednak w pełni endogennych substratów proteasomu jakimi są białka. Aby ocenić zdolności wybranych na podstawie wcześniejszych testów peptydomimetyków do stymulowania proteasomu do degradacji substratów białkowych wykorzystałam dwa białka, różniące się rozmiarem oraz budową przestrzenną:  $\alpha$ -synukleinę oraz ludzką enolazę. Ta pierwsza należy do białek wewnątrznie nieuporządkowanych i nie posiada ściśle określonej struktury trzeciorzędowej. Występuje głównie w mózgu, a w mniejszych ilościach w sercu, mięśniach i innych tkankach. W stanach patologicznych, np. chorobie Parkinsona, agregaty  $\alpha$ -synukleiny tworzą nierozpuszczalne włókna w tzw. ciałach Lewy'ego<sup>191</sup>. Ludzka enolaza jest natomiast białkiem o ściśle uporządkowanej strukturze trzeciorzędowej, występującym głównie w dojrzałych neuronach<sup>192</sup>. Za modelowe substraty przyjęto dwa wspomniane białka w ich natywnej oraz utlenionej formie. Takie uszkodzone na skutek stresu oksydacyjnego białka stanowią główne cele proteasomu 20S. Aby ocenić przydatność modelowych białek jako substratów proteasomu, przeprowadziłam eksperymenty powinowactwa, wykorzystując technikę mikroskalowej termoforezy kapilarnej. Wybór tej metody podyktowany był faktem, iż nie wymaga ona dużych ilości białka docelowego, co stanowi duże ułatwienie w przypadku pracy z trudnym do oczyszczenia multikompleksem jakim jest proteasom 20S.

W celu wykonania eksperymentów MST białka wyznakowałam przy użyciu zestawu NT647 zalecanego przez firmę Nanotemper. Ruchliwość termoforetyczną białek znakowanych fluorescencyjnie rejestrowałam przy różnych stężeniach proteasomu 20S (w serii rozcieńczeń od 1965 do 0,06 nM). Stężenie znakowanego białka utrzymywałam na stałym poziomie 250 nM dla natywnej i utlenionej  $\alpha$ -synukleiny oraz 125 nM i 25 nM odpowiednio dla natywnej i utlenionej enolazy. Wraz ze wzrostem stężenia proteasomu zaobserwowałam spadek intensywności sygnału MST dla  $\alpha$ -synukleiny, utlenionej synukleiny i utlenionej enolazy, co wskazywało na rosnącą liczbę cząsteczek wiążących

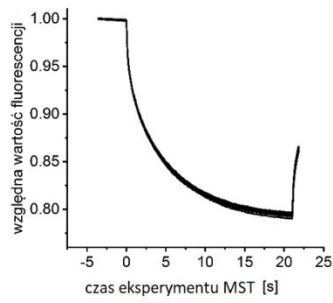
się z enzymem [Rys. 47]. Dane te wykorzystałam do obliczenia siły powinowactwa, wyrażonej jako  $EC_{50}$  [Tabela 11].

Tabela 11 Wartości  $EC_{50}$  dla poszczególnych kompleksów białek z proteasomem 20S, wyliczone na podstawie krzywych otrzymanych w wyniku przeprowadzonych eksperymentów MST

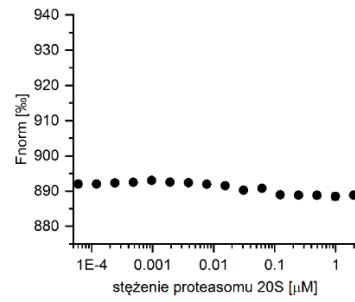
<b>kompleks</b>	<b><math>EC_{50}</math> [nM]</b>
natywna enolaza + 20S	-
utleniona enolaza + 20S	$87,8 \pm 12,9$
natywna $\alpha$ -synukleina + 20S	$32,3 \pm 1,3$
utleniona $\alpha$ -synukleina + 20S	$67,6 \pm 8,9$

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdziłam ok. 2-krotnie silniejsze powinowactwo natywnej synukleiny do proteasomu od jej utlenionej formy [Tabela 11]. Utleniona enolaza wykazywała powinowactwo silniejsze niż utleniona synukleina, natomiast jej natywna forma nie wiązała się z proteasomem.

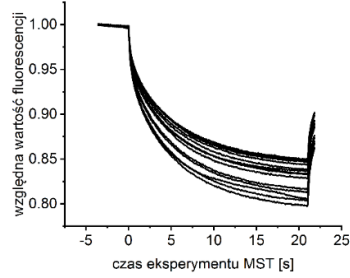
A



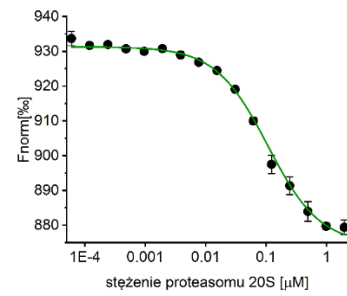
B



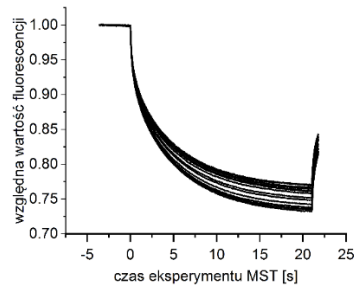
C



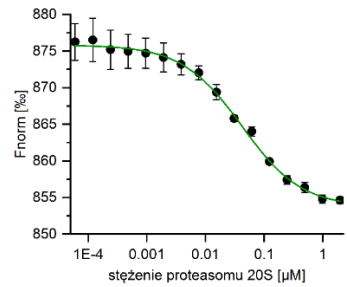
D



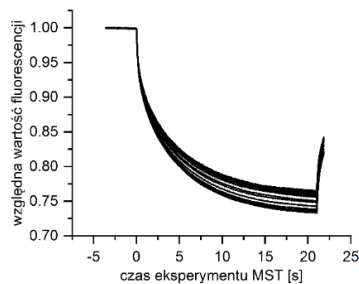
E



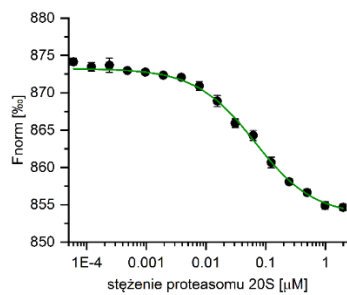
F



G



H



Rys. 47 Po lewej: surowe krzywe MST dla miareczkowania proteasomem 20S (w zakresie stężeń od 0,06 do 1965 nM): (A) enolazy, (C) utlenionej enolazy, (E)  $\alpha$ -synukleiny, (G) utlenionej  $\alpha$ -synukleiny -. Po prawej: Znormalizowana fluorescencja wykreślona w funkcji rosnącego stężenia 20S, w celu określenia powinowactwa białek (enolazy (B), utlenionej enolazy (D),  $\alpha$ -synukleiny (F), utlenionej  $\alpha$ -synukleiny (H)). Krzywe MST dopasowano za pomocą równania Hilla w programie OriginLab®, a wartości EC50 obliczono w oparciu o wyniki uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów.

## 8.2. Sprawdzenie wpływu otrzymanych modulatorów na trawienie białek przez proteasom 20S

Aby sprawdzić, czy otrzymane przeze mnie aktywatory proteasomu są w stanie pobudzać enzym aby był w stanie szybciej trawić substraty białkowe (utlenione i natywne formy enolazy oraz  $\alpha$ -synukleiny), przeprowadzono elektroforezę, wykorzystując wcześniej wybrane białka jako potencjalne substraty proteasomu. Badania te zostały wykonane przez dr Przemysława Karpowicza.

Do testów wybrałam peptydy, które wykazywały najbardziej obiecujące właściwości podczas badań aktywności na substratach peptydowych, tj. związki: M2-2, M2-4, M2-6, M2-7, M2-10, M2-11, M2-12, M2-13, M2-14, M2-15 oraz M2-20. Peptyd M2-9 został odrzucony, ponieważ nie był on w stanie pobudzać żadnej z peptydaz proteasomu. Podobnie peptydy M2-1, M2-3 oraz M2-5 odrzuciłam, ponieważ nie były w stanie pobudzać enzymu do trawienia substratu LFP, a substrat Suc-LLVY-AMC był w ich obecności trawiony porównywalnie lub słabiej niż w obecności pozostałych związków.

Względne ilości niestrawionych białek określano na podstawie elektroforetycznego rozdziału próbek białek po ich inkubacji z modulatorami (w stężeniach 1 i 10  $\mu$ M) i proteasomem 20S lub z samym proteasomem (kontrola). Pod wykresami przedstawiono reprezentatywne elektroforegramy SDS-PAGE z prążkami wybarwionymi reagentem Coomassie-Blue.

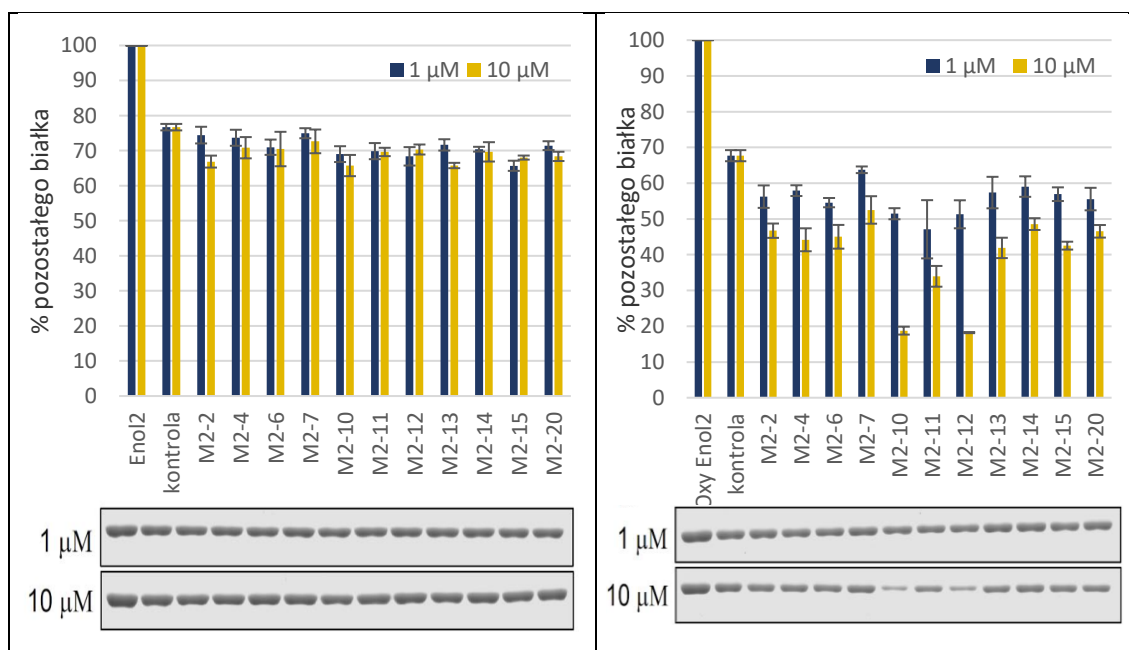
Proteasom niepoddany działaniu aktywatorów (kontrola) trawił białka z różną skutecznością, pozostawiając ok. 60% niestrawionych utlenionej i natywnej  $\alpha$ -synukleiny, 70% utlenionej enolazy i niespełna 80% natywnej enolazy [Rys. 48]. Słabsze trawienie enolazy w natywnej konformacji w stosunku to reszty białek wynika prawdopodobnie z faktu, iż nie wiąże się ona do proteasomu 20S, co wykazano w testach MST.

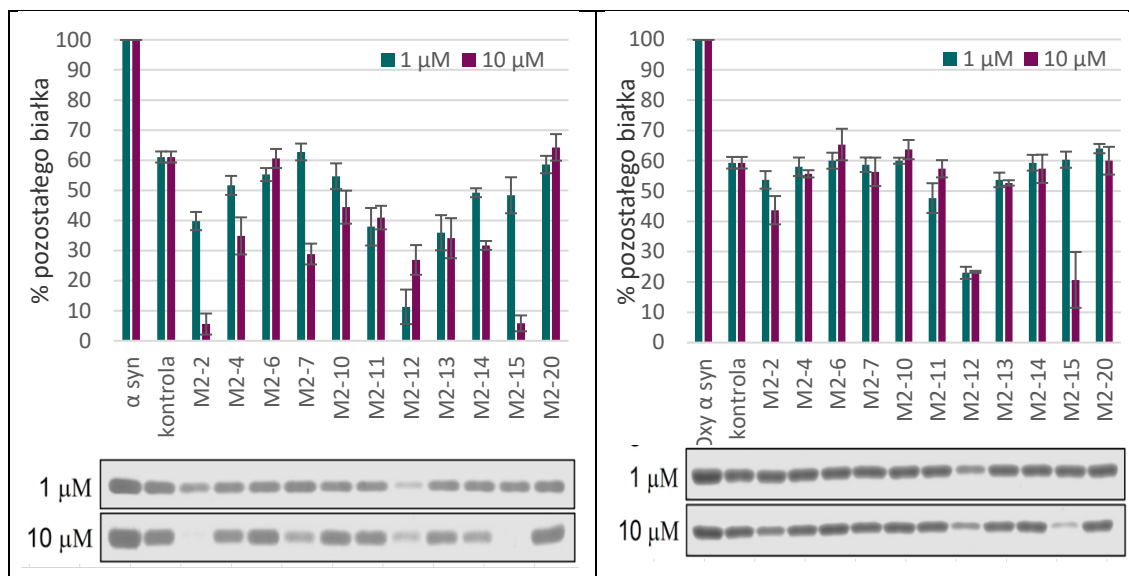
W stężeniu 10  $\mu$ M związki M2-10 oraz M2-12 znacząco (ok. 3-krotnie w stosunku do kontroli) przyspieszały degradację utlenionej enolazy przez proteasom 20S, podczas gdy żaden z badanych modulatorów nie był w stanie pobudzić enzymu do trawienia enolazy w natywnej formie. Co ciekawe, peptyd M2-15, który nie wyróżniał się silnymi właściwościami aktywującymi w badaniach z użyciem krótkich substratów, niespodziewanie silnie pobudzał enzym do trawienia zarówno natywnej, jak i utlenionej  $\alpha$ -synukleiny, przyspieszając ich degradację odpowiednio ok. 6- i 3-krotnie [Rys. 48].

Natywna  $\alpha$ -synukleina była trawiona prawie całkowicie w obecności peptydomimetyku M2-2 oraz M2-15 w stężeniu 10  $\mu$ M oraz w obecności 1  $\mu$ M M2-12. Trawienie utlenionej  $\alpha$ -synukleiny najsilniej pobudzały zaś związki M2-12 oraz M2-15 w stężeniu 10  $\mu$ M [Rys. 48].

Peptydy M2-2, M2-7, M2-11, M2-13 oraz M2-14 oraz M2-15 pobudzały tylko trawienie synukleiny i jej utlenionej formy, a nie były w stanie pobudzić enzymu do trawienia większego białka jakim jest enolaza. Utleniona enolaza była natomiast silniej trawiona w obecności M2-10 i M2-12, co może świadczyć, iż są to najsilniejsze modulatory i powodują szersze otwieranie bramy katalitycznej enzymu. Ciekawym jest również fakt, iż peptyd M2-12 silniej pobudzał trawienie natywnej synukleiny w stężeniu 1  $\mu$ M aniżeli 10  $\mu$ M [Rys. 48]. Efekt taki może być pokłosiem wiązania modulatora w tym samym miejscu, w którym wiąże się to białko, a zatem jego wyższe stężenie może utrudniać aktywację proteasomu przez hydrofobowe rejony białka.

Pomimo iż peptyd M2-20 skutecznie stymulował proteasom do trawienia substratów peptydowych, nie zaobserwowałam podobnego efektu w przypadku badań przeprowadzonych na białkach. Związek ten wyróżnia się obecnością zasadowej reszty w pozycji 4, a dodatkowo nie posiada kwasu asparaginowego w pozycji 6, który posiadały modulatory skutecznie pobudzające enzym do trawienia synukleiny i utlenionej enolazy, takie jak: M2-10, M2-12 oraz M2-15.





Rys. 48 Wpływ modulatorów wywodzących się z białka Bim10 na trawienie przez proteasom: A - enolazy (enol2); B - utlenionej enolazy (oxy enol2); C -  $\alpha$ -synukleiny ( $\alpha$  syn); D - utlenionej  $\alpha$ -synukleiny (oxy  $\alpha$ syn).

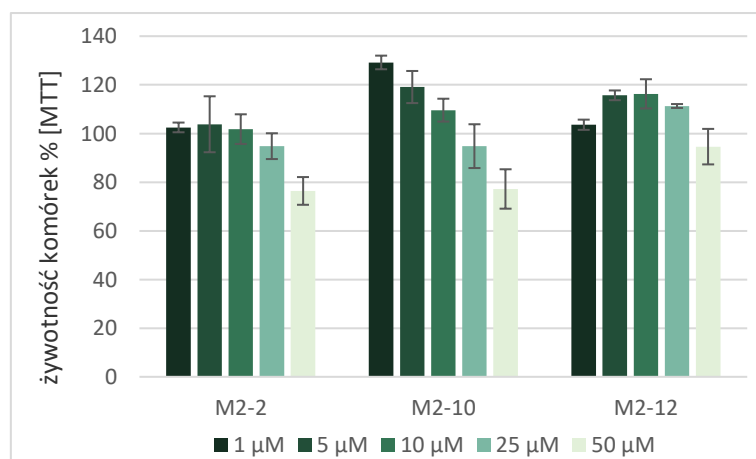
## 9. Badania komórkowe

### 9.1. Testy aktywności cytotoksycznej wybranych aktywatorów

Bazując na otrzymanych wynikach aktywności proteasomu *in vitro*, wybrałam 3 reprezentatywne aktywatory enzymu do badań aktywności w lizacie komórkowym. Były to peptydy: M2-2, M2-10 oraz M2-12. Dla związków tych wykonałam testy cytotoksyczności w stosunku do komórek HEK 293T.

Aktywność cytotoksyczną związków sprawdziłam w zakresie stężeń od 1 do 50  $\mu$ M. Wszystkie z badanych peptydomimetyków nie wykazywały znaczącego efektu cytotoksycznego w stosunku do linii komórkowej HEK 293T. Najmniejsza zaobserwowana przeżywalność komórek wynosiła ok. 80% przy stężeniu 50  $\mu$ M związków M2-2 oraz M2-10. Odsetek żywych komórek obliczano w odniesieniu do kontroli traktowanej jako 100% przeżywalności, którą stanowiły komórki inkubowane z DMEM [Rys. 49].

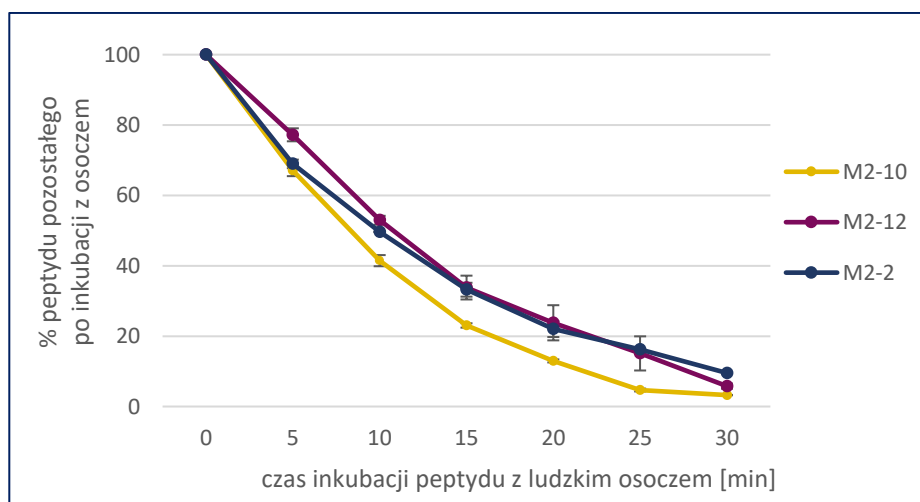




Rys. 49 Żywotność komórek HEK 293T po inkubacji z peptydami M2-2, M2-10 oraz M2-12 w stężeniach 1, 5, 10, 25 oraz 50  $\mu\text{M}$

## 9.2. Stabilność wybranych związków w obecności ludzkiego osocza

Przed przystąpieniem do badań na lizacie komórkowym, sprawdziłam również stabilność proteolityczną wybranych związków w obecności ludzkiego osocza, jednakże nie zaobserwowałam znaczących różnic w podatności związków na degradację przez enzymy obecne w plazmie [Rys. 50].

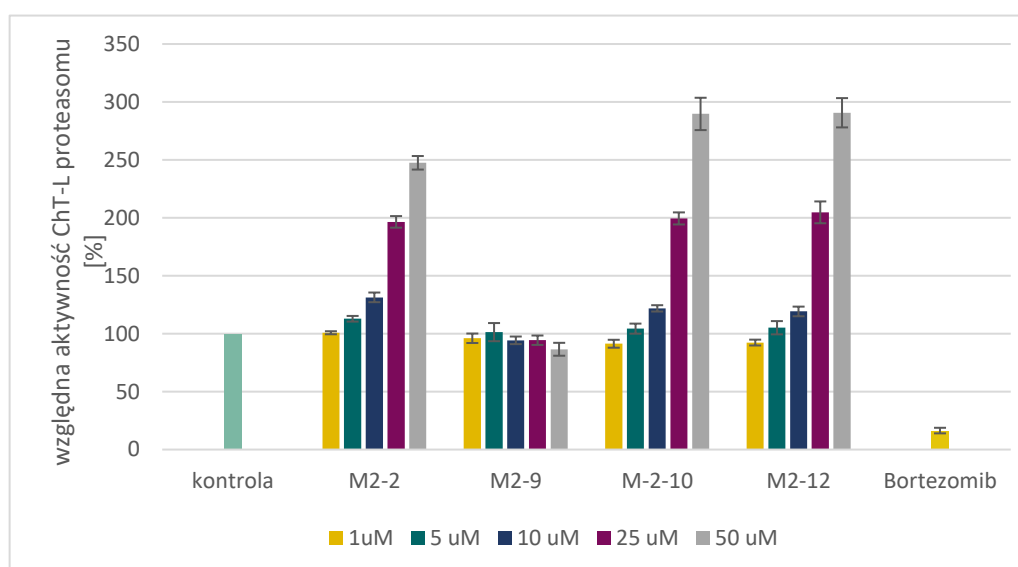


Rys. 50 Zależność stopnia hydrolizy peptydów M2-2, M2-10 oraz M2-12 od czasu inkubacji z ludzkim osoczem.

### 9.3. Badania wpływu wybranych peptydomimetyków na aktywność proteasomu w lizacie komórkowym

Ze względu na obiecujące wyniki badań związków wywodzących się z sekwencji białka Blm10, postanowiłam przeprowadzić testy aktywności wybranych peptydomimetyków w lizacie komórkowym.

Peptydy przebadalam na lizacie komórkowym linii HEK 293T. Jako negatywną kontrolę zastosowałam selektywny inhibitor proteasomu – Bortezomib. Dodatkowo do badań tych wybrałam również peptyd M2-9, który nie stymulował żadnej z aktywności proteasomu podczas badań na izolowanym enzymie, w celu potwierdzenia tego efektu w ekstrakcie komórkowym.



Rys. 51 Wpływ peptydów M2-2, M2-9, M2-10 oraz M2-12 na aktywność proteasomu w lizacie komórek HEK 293T. Jako kontrolę przyjęto aktywność proteasomu w lizacie bez dodatku modulatora, jako kontrolę negatywną – aktywność proteasomu w obecności 1 μM roztworu jego inhibitora – Bortezomibu

Peptydy M2-10 oraz M2-12 wykazywały właściwości aktywujące proteasom, rosnące wraz ze wzrostem stężenia aktywatora. W stężeniu 50 μM związek M2-2 był w stanie aktywować proteasom ok. 2,5-krotnie, podczas gdy M2-10 oraz M2-12 w tym stężeniu zwiększały jego aktywność ok. 3-krotnie w stosunku do kontroli. Peptyd M2-9 nie wykazywał efektu stymulującego w żadnym z badanych stężeń. Wyniki te pokrywają się zarówno z testami aktywności przeprowadzonymi wcześniej na izolowanym proteasomie z użyciem krótkich substratów fluorogenicznych, jak i na substratach białkowych [Rys. 51].

Badania te udowodniły więc, iż bazując na sekwencji naturalnego białkowego aktywatora proteasomu 20S – białka Blm10, udało się zaprojektować peptydomimetyki,

które pobudzały enzym *in vitro* do trawienia substratów peptydowych i białkowych, ale również były w stanie zaktywować proteasom w bardziej skomplikowanym medium jakie stanowi lizat komórkowy.

## IV PODSUMOWANIE

Choroby neurodegeneracyjne, których główną cechą stanowi postępujące obumieranie struktur w obrębie układu nerwowego, wciąż należą do nieuleczalnych schorzeń. W większości przypadków komórki nerwowe nie posiadają zdolności powielania oraz regeneracji. Do dzisiaj więc leczenie chorób neurodegeneracyjnych polega jedynie na spowalnianiu lawiny pojawiających się objawów, a nie eliminowaniu ich przyczyn. Dodatkowe utrudnienie stanowi fakt, iż objawy utrudniające normalne funkcjonowanie człowieka pojawiają się dopiero, gdy znaczna część neuronów ulegnie degradacji. Dlatego w leczeniu tych schorzeń tak ważnym czynnikiem jest odkrycie źródła obumierania neuronów i eliminowanie go na wczesnym etapie. Wiele lat badań nad chorobami takimi jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona oraz stwardnienie zanikowe boczne pozwoliło ustalić, iż śmierć komórek nerwowych ściśle koreluje z gromadzeniem się nieprawidłowo sfałdowanych białek, które tworząc następnie toksyczne agregaty kierują komórkę na drogę apoptozy. Modulowanie aktywności proteasomu, jako maszyny molekularnej odpowiedzialnej za trawienie większości białek komórkowych, stało się więc jednym z potencjalnych sposobów leczenia chorób neurodegeneracyjnych, a także zapobiegania ich postępowi. Hipoteza o roli proteasomu w neurodegeneracji podsycona jest faktem, iż tak jak choroby te postępują wraz z wiekiem, tak też zmienia się liczba zarówno różnych proteasomów, jak i ich naturalnych aktywatorów w komórkach. W młodych, zdrowych organizmach około 20-30% komórkowego proteasomu 20S występuje jako kompleks z regulatorem 19S, a ponad 60% występuje w jego wolnej postaci. Pozostałe 10% jest związane z aktywatorami specyficznymi dla UIPS: PA28 i PA200. Wiadomo jednak, że zawartość proteasomów zmienia się wraz z wiekiem. W miarę starzenia się organizmu w miejsce ubywającego proteasomu 26S przybywa wolnego 20S. Taki obniżony poziom 26S jest kluczowym składnikiem spadku aktywności proteasomów w komórkach<sup>7</sup>. Ze względu na fakt, iż jednocześnie w starzejących się komórkach zwiększa się pula proteasomu 20S, a jest on odpowiedzialny za degradację większości uszkodzonych, rozfałdowanych białek, wprowadzenie jego zewnętrznego aktywatora mogłoby doprowadzić do skuteczniejszego usuwania białek takich jak np.  $\alpha$ -synukleina lub białko tau, których złogi znaleziono w strukturach nerwowych pacjentów ze stwierdzoną postępującą utratą neuronów.

Proteasom 20S, będąc ponad 700kDa maszyną molekularną, złożoną z aż 28 podjednostek, stanowi nie lada wyzwanie dla projektowania modulatorów jego aktywności. Pomimo iż w zasadzie odkryto już mechanizmy działania białkowych aktywatorów tego enzymu, zaprojektowanie małowcząsteczkowego związku, który wykazywałby podobny efekt w komórkach nadal nie przyniosło zadowalających rezultatów. Dobrą opcją wydaje się wyszukiwanie fragmentów sekwencji naturalnych białkowych aktywatorów 20S, które oddziałują z enzymem powodując otwieranie bramy katalitycznej. Trzeba natomiast mieć na uwadze, że fragmenty te, należące do grupy peptydów, pomimo iż prawdopodobnie będą wyróżniały się wysoką specyficnością, to będą też trawione przez proteasom równoległe z jego substratami. Dodatkowo większość peptydów nie pokonuje naturalnie bariery błony komórkowej.

Realizując postawione w tej pracy cele, zaprojektowałam i zsyntezowałam szereg małowcząsteczkowych aktywatorów proteasomu. Wszystkie związki otrzymałam wykorzystując metodologię Fmoc oraz automatyczny syntezyzator mikrofalowy. Otrzymane peptydy/peptydomimetyki przebadalam pod kątem aktywacji h20S. Wyniki te uzyskałam wykorzystując substraty peptydowe oraz modelowe białka, dla których określiłam powinowactwo do enzymu. Proteasom użyty w badaniach izolowałam z ludzkich erytrocytów wykorzystując protokół opracowany przez współpracowników z Katedry Chemii Biomedycznej. Badania komórkowe prowadziłam we współpracy z dr hab. Magdaleną Wysocką oraz dr Ewą Wiczerzak, wykorzystując m. in. substrat TAS3, który uprzednio zsyntezowałam. Modelowanie molekularne dla kompleksu proteasomu z białkiem B1m10 przeprowadził dr hab. Artur Giełdoń.

Otrzymane przeze mnie związki można podzielić na dwie zasadnicze grupy:

- I - aktywatory wywodzące się z regulatora 19S,
- II – aktywatory oparte o sekwencję białka B1m10.

Badania nad związkami z grupy I pozwoliły mi na znalezienie sekwencji zdolnej do aktywacji h20S oraz wyznaczenia jej optymalnej długości – 10 reszt aminokwasowych (peptyd Rpt5(10)). Następnie używając techniki skanowania alaniną udało mi się udowodnić wysoką specyficzność modulatora proteasomu, a także ustalić krytyczność poszczególnych pozycji w aktywatorze Rpt5(10). Idąc dalej sprawdziłam jak charakter aminokwasów w poszczególnych pozycjach wpływa na właściwości aktywacyjne względem ludzkiego proteasomu 20S. Najbardziej wrażliwymi miejscami w sekwencji

aktywatora Rpt5(10) były pozycje 2, 4 i 6, których podstawienie resztami o charakterze zasadowym spowodowało otrzymanie najlepszych aktywatorów. Zsyntezowałam również sześć peptydomimetyków, które w większości wykazywały lepszą aktywność niż wyjściowy aktywator Rpt5(10), a także podwyższoną stabilność zarówno w obecności proteasomu, jak i w ludzkim osoczu. Najlepszym aktywatorem z grupy I okazał się peptydomimetyk z nienaturalną resztą norleucyny w pozycji 8, gdzie pierwotnie znajdowała się tyrozyna. Związek ten nie wykazywał jednak stabilności w stosunku do 20S, najprawdopodobniej właśnie ze względu na swoje silne właściwości aktywujące. Peptyd ten stymulował proteasom zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w lizacie komórkowym. Dzięki przyłączeniu sekwencji penetrującej Tat(48-57) udało mi się wprowadzić modulator do wnętrza komórek HEK 293T oraz wykazać, że aktywator ten jest w stanie zaktywować proteasom w żywych komórkach, co do tej pory nie zostało udowodnione dla peptydowych aktywatorów enzymu.

Tworzenie II puli związków, opartych o aktywator Blm10, zaczęłam od syntezy trzech peptydów różniących się długością linkera, który łączy C-koniec znaleziony w strukturze krystalicznej drożdżowego 20S z peptydem Blm-pep, z N-końcem, który może układać się na różne sposoby w okolicy kieszeni  $\alpha 5/\alpha 1$ . Linkery posiadały długość od 2 do 4 reszt aminokwasowych. Sekwencje znajdujące się na N-końcach tych peptydów zostały zaprojektowane przez dr hab. Artura Giełdonia poprzez analizę powierzchni otoczenia najbardziej prawdopodobnego kierunku układania się łańcucha aktywatora. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, iż najefektywniej działa peptyd z linkerem 4-aminokwasowym (w roli którego użyłam pochodnej Peg2). W związku z powyższym zsyntezowałam kolejną serię związków, zaprojektowanych poprzez dokowanie C-końca peptydu Blm-pep z owym linkerem w 7 kieszeniach utworzonych przez kolejne podjednostki  $\alpha$  ludzkiego 20S. Proteasom 20S najsilniej trawił substraty w obecności peptydów M2-4 oraz M2-6, które wiązać się powinny kolejno w kieszeniach  $\alpha 4/\alpha 7$  oraz  $\alpha 5/\alpha 1$ . W związku z tym, iż peptydy te posiadały zgoła odmienne aminokwasy w pozycjach 1 i 4 (Glu1 vs Lys1 oraz Lys4 vs Asn4) można podejrzewać, iż rzeczywiście związały się w różnych miejscach enzymu, pobudzając jego aktywność na skutek innych mechanizmów allosterycznych. Ze względu na fakt, iż peptyd M2-6 wykazywał najsilniejszy efekt aktywujący podczas badań z substratem LFP, w kolejnym etapie badań zsyntezowałam szereg peptydomimetyków opartych o jego sekwencję. Dzięki temu udało mi się znaleźć kilka związków, które jeszcze silniej pobudzały proteasom do trawienia

peptydowych substratów. Jak wiadomo, 20S w żywych organizmach odpowiada za trawienie uszkodzonych na skutek stresu oksydacyjnego i/lub nieprawidłowo sfałdowanych białek. W związku z tym postanowiłam sprawdzić, czy najsilniejsze aktywatory otrzymane przeze mnie są w stanie pobudzać również trawienie takich białkowych substratów. W tym celu przeprowadziłam testy mikroskalowej termoforezy kapilarnej, potwierdzając, iż  $\alpha$ -synukleina oraz jej utleniona forma, a także utleniona enolaza wykazują powinowactwo do proteasomu 20S i najpewniej są jego substratami. Tych modelowych białek użyto następnie w testach aktywności peptydomimetyków, które zostały przeprowadzone przez dr Przemysława Karpowicza. Tylko nieliczne z testowanych związków (peptydy M2-10 oraz M2-12 i M2-15) były w stanie pobudzić proteasom do trawienia białek, których oddziaływanie z 20S potwierdzono w testach MST, natomiast żaden z nich nie był w stanie na tyle zaktywować enzym, aby doprowadzić do degradacji natywnej enolazy. W ten sposób udało mi się potwierdzić, iż możliwe jest zaktywowanie proteasomu 20S do efektywniejszej degradacji uszkodzonych lub nieprawidłowo sfałdowanych białek, które enzym trawi selektywnie, pozostawiając prawidłowo pofałdowane białka w nienaruszonej postaci. Biorąc pod uwagę fakt, iż pula proteasomu 20S zwiększa się wraz z wiekiem, a uszkodzone białka (których ilość z wiekiem także rośnie) stanowią przyczynę większości chorób neurodegeneracyjnych, jest to obiecujący wynik, stanowiący podwalinę do tworzenia leków ograniczających spowodowane agregacją białek obumieranie neuronów w stanach patologicznych.

## V METODOLOGIA

### 10. Otrzymywanie związków

#### 10.1. Synteza potencjalnych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S

Rozpuszczalniki, nośniki stałe, odczynniki sprzęgające, pochodne aminokwasowe oraz inne komercyjnie dostępne odczynniki chemiczne, niezbędne do przeprowadzenia syntez, zostały zakupione m. in. w firmach: Fluka, Acros Organics, Iris-Biotech, Chem-Impex, Fluorochem, Sigma-Aldrich, Bachem, GL Biochem, Rapp Polymere, POCh, Merck Millipore, Genaxxon, Selwa Lab.

Wszystkie peptydy syntezowałam przy wykorzystaniu metodologii Fmoc. W celu zautomatyzowania i przyspieszenia procesu, do syntez użyłam automatycznego syntezyzatora mikrofalowego firmy CEM Corporation, z wykorzystaniem procedur zalecanych przez producenta.

Wszystkie nośniki stałe jakie wykorzystałam umożliwiły otrzymanie peptydu z C-kończącą wolną grupą karboksylową: TentaGel®R PHB i Fmoc-Ser-TentaGel®R PHB (Rapp Polymere), 2-chlorotrytyl chloride resin (2CTC) (IRIS Biotech) oraz Cl-TCP(Cl) ProTide i Cl-MPA ProTide Resin (CEM Corporation). Jedynie sonda TAS3 została zsyntezowana z zastosowaniem żywicy TentaGel®R RAM, która po odszczepieniu od nośnika uwalnia peptyd w postaci C-końcowego amidu.

#### 10.2. Procedury osadzania pierwszego aminokwasu na nośniku stałym

M1: MSNT/N-metyloimidazol

Jedną z metodą wykorzystywanych do przyłączania C-końcowego aminokwasu do żywicy TentaGel® R PHB była metoda estrów aktywnych z wykorzystaniem MSNT oraz Melm. W tym celu Fmoc-pochodną aminokwasową (5 eq w stosunku do stopnia osadzenia żywicy) rozpuszczałam w minimalnej objętości DCM (w przypadku problemów z rozpuszczalnością dodawałam kilka kropel THF), a następnie dodawałam MSNT (5 eq) oraz Melm (3,75 eq) i mieszałam aż do całkowitego rozpuszczenia reagentów. Tak przygotowaną mieszaninę dodawałam do namoczonej w DCM żywicy. Reakcję prowadziłam ok. 1,5h, delikatnie wytrząsając zawartość naczynia. Po tym czasie rozpuszczalnik i nadmiar reagentów odsączałam, a żywicę z przyłączonym pierwszym



aminokwasem przemywałam według schematu: 3 x DCM, 3 x DMF, 2 x MeOH, 2 x Et<sub>2</sub>O. Po wysuszeniu żywicy w eksykatorze sprawdzałam stopień osadzenia według protokołu opisanego w punkcie 10.3.

#### M2: HATU/DIEA

Drugą metodą osadzania pierwszego aminokwasu na nośniku TentaGel® R PHB była metoda wykorzystująca sole uroniowe. Metodę tę stosowałam w przypadku, gdy sposób M1 nie dawał dobrych rezultatów. W tym celu, rozpuszczoną w DMF i zaktywowaną uprzednio za pomocą HATU (2,85 eq) i DIEA (6 eq) pochodną aminokwasową (3 eq) dodawałam do namoczonych w DMF ziaren żywicy. Reakcję prowadziłam ok. 2h. Po tym czasie nadmiar reagentów odsączałam, żywicę przemywałam kolejno DMF, DCM, DMF, MeOH i Et<sub>2</sub>O, a po jej wysuszeniu powtórnie sprawdzałam stopień osadzenia.

#### M3: KI/DIEA

Pierwszy aminokwas na żywicach Cl-MPA ProTide oraz Cl-TCP(Cl) ProTide osadzałam przy użyciu automatycznego syntezyzatora mikrofalowego. Do przyłączania pochodnej do nośnika używałam 1 M DIEA z 0,125 M KI w DMF. Przyłączanie pierwszego aminokwasu prowadziłam w dwóch etapach z zastosowaniem 10 eq aminokwasu w stosunku do stopnia osadzenia żywicy [Tabela 12].

Tabela 12 Parametry przyłączania pierwszego aminokwasu do żywic Cl-MPA ProTide oraz Cl-TCP(Cl) ProTide.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [min]	Moc [W]
1	80	1	75
2	90	9	20

#### M4: DIEA

C-końcowy aminokwas na żywicy 2-chlorotrytylowej osadzałam według następującego schematu: do namoczonej w DMF żywicy dodawałam 0,6 eq Fmoc-aminokwasu rozpuszczonego w DMF z dodatkiem 2,4 eq DIEA i wytrząsałam 1,5h w temperaturze pokojowej. W celu zablokowania nieprzereagowanych grup na żywicy, całość dwukrotnie (2 x 2 min) przemywałam mieszaniną DCM:MeOH:DIEA (17:2:1; v:v:v). Następnie roztwór odsączałam, a żywicę przemywałam kolejno: 3 x DMF,

3 x DCM, 3 x DMF, 1 x DCM. Tak przygotowaną żywicę z osadzonym pierwszym aminokwasem przemywałam 3 x DCM i suszyłam w eksykatorze.

### 10.3. Określanie stopnia osadzenia żywicy

Stopień osadzenia żywicy mierzyłam dla żywic: TentaGel®R PHB oraz 2-CTC, do których pierwszy aminokwas przyłączałam stosując syntezę manualną, bez użycia automatycznego syntezyzatora. Stopień ten wyznaczałam mierząc absorbancję adduktu dibenzofulwen-piperydyna, powstałego na skutek deprotekcji grupy  $\alpha$ -aminowej aminokwasu. Do dokładnie odważonej próbki suchej żywicy (4-6 mg) dodawałam 1 ml 30% roztworu piperydyny w DMF i wytrząsałam 30 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie żywicę odsączałam, przesącz wprowadzając do 25 ml kolby miarowej. Kolbę tę uzupełniałam metanolem, a zawartość mieszałam. Pomiaru absorbancji dokonywałam przy długości fali 301 nm, jako odnośnik stosując analogiczny roztwór piperydyny w DMF/MeOH bez dodatku peptydydożywicy. Ze zmierzonej wartości absorbancji obliczałam stopień osadzenia nośnika według wzoru:

$$\text{stopień osadzenia} = \frac{A * V * 10^6}{\epsilon * l * m_z}$$

gdzie:

A	absorbancja
V	objętość próbki (dm <sup>3</sup> )
$\epsilon$	molowy współczynnik ekstynkcji (7800 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
l	długość drogi optycznej (cm)
$m_z$	masa próbki żywicy (mg)

W przypadku żywic Fmoc-Ser-TentaGel®R PHB, Cl-TCP(Cl), ProTide oraz Cl-MPA ProTide za stopień osadzenia przyjmowałam wartość podaną przez producenta żywicy.

### 10.4. Elongacja łańcucha peptydowego przy pomocy automatycznego syntezyzatora mikrofalowego

Do syntez prowadzonych przy pomocy automatycznego syntezyzatora mikrofalowego Liberty Blue stosowałam protokoły dostarczone przez producenta. Peptydy syntezowałam w skalach 0,05 oraz 0,1 mmol, w atmosferze azotu. Standardowe acylowanie odbywało się przy użyciu 5 eq Fmoc-pochodnej aminokwasu oraz

mieszaniny: 5 eq DIC i 5 eq Oxyma w DMF. Wyjątek stanowiły syntezy na żywicy Cl-TCP(Cl) ProTide , gdzie roztwór Oxyma/DMF wzbogacałam 0,1 M dodatkiem DIEA. Usunięcie osłony Fmoc z grupy aminowej aminokwasów odbywało się za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF. Standardowy cykl sprzęgania reszt aminokwasowych w automatycznym syntezatorze przedstawia Tabela 13.

Tabela 13 Parametry przyłączania kolejnych reszt aminokwasowych w automatycznym syntezatorze mikrofalowym (CEM).

<b>Etap</b>	<b>Ilość cykli</b>	<b>Reagent</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Moc [W]</b>
Deprotekcja	1	20% piperydyna/DMF	75	15	155
	2	20% piperydyna/DMF	90	50	30
Przemywanie	1-4	4 x DMF	-	4 x 17	-
Acylowanie	1	0,2 M Fmoc-Aa-OH, 0,5 M DIC, 1 M OXYMA	75	15	170
	2		90	110	30

W celu przyłączenia Fmoc-Arg(Pbf)-OH stosowałam podwójne sprzęganie [Tabela 14].

Tabela 14 Parametry przyłączania reszt Fmoc-Arg(Pbf)-OH w automatycznym syntezatorze mikrofalowym (CEM).

<b>Etap</b>	<b>Ilość cykli</b>	<b>Reagent</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Moc [W]</b>
Deprotekcja	1	20% piperydyna/DMF	75	15	155
	2	20% piperydyna/DMF	90	50	30
Przemywanie	1-4	4 x DMF	-	4 x 17	-
Acylowanie 1	1	0,2 M Fmoc-Aa-OH, 0,5 M DIC, 1 M OXYMA	25	1500	0
	2		75	120	30
Przemywanie	1	DMF	-	17	-
Acylowanie 2	1	0,2 M Fmoc-Aa-OH, 0,5 M DIC, 1 M OXYMA	25	1500	0
	2		75	120	30

Do syntezy na skalę 0,05 mmola używałam 2-krotnie rozcieńczonych roztworów aktywatorów, tj. 0,25 M DIC oraz 0,5 M OXYMA.

Sprzęganie na żywicy 2-chlorotrytylowej prowadziłam zgodnie z zaleceniami producenta w niższej temperaturze, ale z wydłużonym czasem sprzęgania [Tabela 15].

Tabela 15 Parametry przyłączania kolejnych reszt aminokwasowych w automatycznym synteźatorze mikrofalowym podczas syntezy na żywicy 2-CTC.

<b>Etap</b>	<b>Ilość cykli</b>	<b>Reagent</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Moc [W]</b>
Deprotekcja	1	20% piperydyna/DMF	75	15	155
	2	20% piperydyna/DMF	90	50	30
Przemywanie	1-4	4 x DMF		4 x 17	
Acylowanie	1	0,2 M Fmoc-Aa-OH, 0,5 M	25	120	0
	2	DIC, 1 M OXYMA	50	240	30

W przypadku syntez analogów zawierających sekwencję Tat, ze względu na problemy w syntezie zasadowego fragmentu tych peptydów, jako odczynniki sprzęgające zastosowałam 5 eq HATU z 5 eq DIEA w DMF. W przypadku tych związków cykl podwójnego sprzęgania zastosowałam zarówno do reszt Arg, jak i licznie występujących reszt Lys.

Tabela 16 zawiera szczegóły dotyczące syntez poszczególnych związków.

Tabela 16 Parametry syntez poszczególnych peptydów

Nazwa peptydu	Rodzaj nośnika stałego	Metoda osadzania pierwszego aminokwasu	Stopień osadzenia żywicy [mmol/g]	Ilość użytej do syntezy żywicy [g]	Masa surowego produktu [mg]	Wydajność otrzymywania surowego produktu [%]
Rpt1(8)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	72	69
Rpt2(8)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	41	48
Rpt3(8)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	70	63
Rpt4(8)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	53	56
Rpt5(8)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	66	68
Rpt6(8)	TentaGel® R PHB	M1	0,05	1	24	46
Rpt5(10)	2CTC	M4	0,25	0,4	99	81
Rpt5(12)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	68	48
Rpt5(A1)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	70	60
Rpt5(A2)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	81	69
Rpt5(A3)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	75	64
Rpt5(A5)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	60	51
Rpt5(A6)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	83	70
Rpt5(A7)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	55	47
Rpt5(Q1)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	74	60
Rpt5(E1)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	80	65
Rpt5(R1)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	74	59
Rpt5(E2)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,125	53	86
Rpt5(R2)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,125	50	80
Rpt5(Cit2)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,125	30	48
Rpt5(Q2)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,125	17	28
Rpt5(Har3)	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	50	39
Rpt5(Cit3)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,313	49	78
Rpt5(E3)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,313	60	97

Nazwa peptydu	Rodzaj nośnika stałego	Metoda osadzania pierwszego aminokwasu	Stopień osadzenia żywicy [mmol/g]	Ilość użytej do syntezy żywicy [g]	Masa surowego produktu [mg]	Wydajność otrzymywania surowego produktu [%]
Rpt5(Q3)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,313	56	85
Rpt5(D4)	2CTC	M4	0,39	0,128	49	77
Rpt5(AzrN)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	92	76
Rpt5(N4)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	82	65
Rpt5(K4)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,313	59	92
Rpt5( $\beta$ Ala4)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,313	72	117
Rpt5(Abu4)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	90	73
Rpt5(K5)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	65	52
Rpt5(D5)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	72	59
Rpt5(D6)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,313	60	98
Rpt5(K6)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	70	56
Rpt5(K7)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	55	45
Rpt5((D7)	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	65	54
Rpt5(Nle8)	2CTC	M3	0,39	0,128	50	85
M1-1	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	76	50
M3-6	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	80	54
M2-1	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	72	45
M2-2	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	76	47
M2-3	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	69	45
M2-4	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	75	48
M2-5	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	87	55
M2-6	Cl-TCP(Cl) ProTide	M3	0,4	0,25	98	63
M2-7	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	101	65
M2-9	TentaGel® R PHB	M1+M2	0,11	0,454	66	85
M2-10	TentaGel® R PHB	M1+M2	0,11	0,454	59	74

Nazwa peptydu	Rodzaj nośnika stałego	Metoda osadzania pierwszego aminokwasu	Stopień osadzenia żywicy [mmol/g]	Ilość użytej do syntezy żywicy [g]	Masa surowego produktu [mg]	Wydajność otrzymywania surowego produktu [%]
M2-11	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	120	75
M2-12	Fmoc-Ser-TentaGel® R PHB	-	0,19	0,526	119	76
M2-13	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	83	54
M2-14	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	65	42
M2-15	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	88	56
M2-20	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	70	44
Tat-Rpt5	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	120	39
Tat-K4	2CTC	M4	0,36	0,140	60	38
Tat-Nle8	2CTC	M4	0,36	0,28	175	57
Tat-D6	2CTC	M4	0,36	0,140	81	52
Tat-LLVY	2CTC	M4	0,29	0,345	160	85
Tat-(TAMRA)Rpt5	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,625	60	17
TAMRA-Rpt5	Cl-MPA ProTide	M3	0,16	0,312	45	51

## 10.5. Odszczepianie peptydów z nośnika

Wszystkie zsyntezowane peptydy odszczepiałam od nośnika z równoczesnym usunięciem osłon grup funkcyjnych z łańcuchów bocznych poszczególnych aminokwasów. W tym celu peptydyłożywicę traktowałam kwasem trifluoroctowym wraz z dodatkiem zmiataczy karbokationów. Stosowałam mieszaninę: TFA:TIS:fenol:woda w stosunku objętościowym: 88:5:5:2. Żywicę zalewałam przygotowaną mieszaniną w ilości 1 ml mieszaniny na 100 mg żywicy z przyłączonym peptydem, po czym całość delikatnie wytrząsałam w temperaturze pokojowej przez 2 do 3 godzin, w zależności od sekwencji peptydu. Po tym czasie żywicę odsączałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a przesącz zawierający uwolniony peptyd zatężalałam przy pomocy wyparki obrotowej. Do tak odparowanego przesącza dodawałam schłodzony wcześniej eter dietylowy w celu wytrącenia peptydu. Zawiesinę peptydu w Et<sub>2</sub>O wirowałam przez 15 min z prędkością 4000 x g w 4 °C. Procedurę wirowania powtarzałam 3 razy, każdorazowo przemywając peptyd świeżą porcją rozpuszczalnika. Następnie eter dekantowałam znad strąconego peptydu, a pozostały osad rozpuszczałam w wodzie i poddawałam liofilizacji.

## 11. Synteza peptydów zawierających zredukowane wiązanie peptydowe

### 11.1. Utlenianie Fmoc-aminoalkoholu do odpowiedniego aldehydu przy pomocy odczynnika Dess-Martina

Do Fmoc-alaninolu, rozpuszczonego w nasyconym wodą DCM, dodawałam odczynnik utleniający Dess-Martina<sup>193, 194</sup> (2,1 eq). Zawiesinę taką pozostawiałam na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej, kontrolując postęp reakcji za pomocą analizy TLC (układ rozwijający: 2,5% MeOH w DCM). W przypadku gdy zaobserwowałam brak dalszego postępu reakcji, w celu jej przyśpieszenia dodawałam po kilka porcji DCM nasyconego wodą. Po całkowitym przereagowaniu Fmoc-aminoalkoholu, mieszaninę reakcyjną rozcieńczałam za pomocą eteru dietylowego, następnie dodawałam do niej roztwór tiosiarczanu sodu (11 eq) w nasyconym wodorowęglanie sodu. Całość energicznie mieszałam przez 10 min, aż do zaobserwowania rozdzielania faz. Wyizolowaną warstwę wodną ekstrahowałam kolejną porcją eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne przemyłam według schematu:



- 1 x nasycony roztwór wodorowęglanu sodu;
- 2 x woda
- 2 x nasycony roztwór chlorku sodu.

Tak przemytą warstwę organiczną suszyłam nad bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Po odsączeniu środka suszącego roztwór odparowałam na wyparce obrotowej, a pozostały osad przechowywałam pod argonem w temperaturze 4°C.

## 11.2. Przyłączanie otrzymanego aldehydu do żywicy z osadzonym peptydem z utworzeniem wiązania iminowego, połączone z redukcją wiązania iminowego za pomocą NaBH<sub>3</sub>CN

W celu przyłączenia otrzymanego Fmoc-alaninalu (3 eq) do peptydydożywicy z wolną N-końcową grupą aminową, aldehyd ten rozpuszczałam w DMF i dodawałam do peptydydożywicy namoczonej wcześniej w roztworze: kwas octowy: diglym: DMF (1:5:94). Taką mieszaninę umieszczałam w reaktorze mikrofalowym (moc:150 W, temp. 80°C), ciągle ją mieszając przy wykorzystaniu wbudowanego mieszadła magnetycznego. Po otrzymaniu negatywnego wyniku testu chloranilowego na obecność wolnych grup aminowych <sup>195</sup>, powstałe wiązanie iminowe poddawałam reakcji redukcji. W tym celu dodawałam cyjanoborowodorek sodu (3 eq) rozpuszczony w minimalnej objętości suchego tetrahydrofuranu. Reakcję prowadziłam w reaktorze mikrofalowym, w tych samych warunkach co poprzednio, przez 6 min. Następnie, po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej, żywicę z przyłączoną pochodną przemywałam 3 x DMF i 2 x MeOH. Przyłączanie kolejnych reszt do peptydu prowadziłam według standardowych procedur w automatycznym synteźatorze mikrofalowym.

## 12. Synteza peptydów znakowanych fluorescencyjnie

### 12.1. Przyłączanie barwnika fluorescencyjnego do grupy aminowej peptydu

Znacznik fluorescencyjny 5(6)-TAMRA-SE (Genaxxon Bioscience) przyłączałam do peptydu na żywicy. Najpierw wykonywałam deprotekcję grupy aminowej, do której następnie przyłączany był znacznik. W przypadku peptydu Rpt5(10) była to N-końcowa grupa aminowa, z której osłonę Fmoc usuwałam przy pomocy 20% roztworu piperidyny w DMF (2 x 30 min). Po kilkukrotnym przemyciu peptydydożywicy za pomocą DMF, efektywność deprotekcji potwierdziłam testem chloranilowym.

W przypadku peptydu Tat-Rpt5(10), znacznik przyłączany był do grupy aminowej łańcucha bocznego Lys15 tego peptydu. Grupa ε-aminowa Lys15 była osłonięta za pomocą grupy Mtt (a nie jak zwykle osłoną Boc), aby umożliwić selektywną deprotekcję łańcucha bocznego tej reszty. W celu odszczepienia osłony Mtt, peptydyżywicę namoczyłam w DMF (30 min). Następnie przemyłam ją 3 x DCM, odsączyłam rozpuszczalnik, zalałam mieszaniną: TFA:AcOH:DCM 2:1:7 (v/v/v) i całość wytrząsałam przez 1h. Po tym czasie odsączyłam reagenty, a peptydyżywicę przemyłam: 3 x DCM, 3 x 2% DIEA/DCM, 3 x DCM, 3 x DMF. Następnie wykonałam test chloranilowy w celu potwierdzenia obecności wolnej grupy aminowej.

Znacznik TAMRA z przyłączonym wysoce reaktywnym estrem sukcynoimidowym, dołączałam do wolnej grupy aminowej peptydu stosując 3-krotne sprzęganie. Pierwszy raz z użyciem 2 eq TAMRA oraz 6 eq DIEA rozpuszczonych w DMF, wytrząsając całość przez 24h. Po tym czasie żywicę przemyłam kilkakrotnie DMF i wykonałam jeszcze dwa sprzęgania znacznika do peptydyżywicy, używając każdorazowo 1 eq TAMRA oraz 3 eq DIEA w DMF (2 x 24h). Po tym czasie żywicę dokładnie przemyłam DMF i DCM, a następnie wysuszyłam w eksykatorze.

### 13. Synteza sondy TAS3

Substrat do badań aktywności proteasomu w komórkach HEK 293T zsyntezowałam manualnie według procedury opisanej w literaturze <sup>190</sup>. Do syntezy użyłam 1g żywicy TentaGel R RAM o stopniu osadzenia 0,18 mmol/g, którą uprzednio namoczyłam w DMF przez 1h. Następnie usunęłam osłonę grupy aminowej za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF. Deprotekcję przeprowadziłam dwukrotnie po 10 min, każdorazowo zalewając żywicę świeżą porcją roztworu piperydyny. Po przemyciu żywicy trzykrotnie DMF, pobrałam niewielką ilość ziaren i przeprowadziłam test chloranilowy na obecność wolnej grupy aminowej. Następnie do odsączonych ziaren żywicy dodałam roztwór sporządzony przez zmieszanie 4 ml 2 M roztworu kwasu bromooctowego w DMF z 4 ml 1 M DIC w DMF. Całość wytrząsałam 20 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie odmyłam nadmiar reagentów (3 x DMF) i dodałam 7 ml 1 M roztwór *N,N'*-dimetylo-1,3-propanodiaminy w DMF. Sprzęganie prowadziłam przez 1h w temperaturze 37°C. W analogiczny sposób przyłączyłam kolejne dwie aminy (3-metoksypropyloaminę oraz ponownie *N,N'*-dimetylo-1,3-propanodiaminę), każdorazowo monitorując przebieg reakcji za pomocą testu chloranilowego. Do peptoidu

na żywicę przyłączyłam następnie Fmoc-Gly-OH (214 mg; 4 eq) stosując jako odczynnik sprzęgający mieszaninę HATU (257 mg; 3,75 eq) i DIEA (0,25 ml; 8 eq) w DMF. Reakcję prowadziłam 3h w 37°C, po czym przemyłam ziarna żywicy i wykonałam deprotekcję 20% roztworem piperidyny. W następnej kolejności do wolnej grupy aminowej przyłączyłam bezwodnik bursztynowy (180 mg; 10 eq), stosując roztwór piperidyny (0,174 ml; 12 eq) w 10% DMF w DCM i prowadząc reakcję przez 24h. W celu przyłączenia rodamininy, peptydyżywicę przemyłam 5 ml roztworu Proton-sponge® (1,8-bis(dimetyloamino)naftalen, 1,54 g; 40 eq) z DIEA (1,25 ml; 40 eq) w 10 ml DMF. Następnie, w celu aktywacji grupy karboksylowej, do żywicy dodałam COMU (77 mg; 1eq) rozpuszczony w świeżej porcji roztworu Proton-sponge® z DIEA (5 ml) i wytrząsałam przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie roztwór uzupełniłam o chlorek rodamininy 110 (Inter-Chem, 660 mg; 10 eq) rozpuszczony w minimalnej objętości DMF i wytrząsałam przez 3h w temperaturze 60°C. Następnie w takich samych warunkach (czas i temperatura) dołączyłam resztę Fmoc-Phe(NO<sub>2</sub>)-OH (778 mg; 10 eq), używając COMU (771 mg; 10 eq) jako aktywatora. Kolejne trzy reszty aminokwasowe (Val-Leu-Leu) dołączyłam stosując: 6eq odpowiedniego Fmoc-aminokwasu, 6eq COMU, 12eq DIEA w DMF i wytrząsając mieszaninę przez 1h w 37°C. Po każdym sprzęganiu żywicę przemywałam 3 x DCM, 3 x DMF i wykonywałam deprotekcję za pomocą 20% roztworu piperidyny. Po końcowej deprotekcji, peptyd odłączyłam od nośnika stosując mieszaninę: 95% TFA, 2,5% DCM, 2,5% TIS (2h, temp. pokojowa). Otrzymany w wyniku odparowania mieszaniny odszczepiającej surowy produkt niezwłocznie rozpuściłam w 0,1% wodnym roztworze TFA i poddałam oczyszczaniu stosując wysokosprawną chromatografię cieczową na fazach odwróconych (warunki oczyszczania zawiera Tabela 17).

## 14. Oczyszczanie zsyntezowanych surowych peptydów

Oczyszczanie otrzymanych peptydów prowadziłam z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (RP-HPLC) z wykorzystaniem semipreparatywnego chromatografu złożonego z dwóch pomp Knauer K-1001 i detektora UV K-2500 (Knauer) lub zaopatrzonego w detektor UV preparatywnego HPLC zawartego w chromatografie CombiFlash EZ Prep.. Detekcja odbywała się przy długości fali 223 nm. W zależności od otrzymanej ilości surowego

peptydu, jego charakteru, a także dostępności aparatury do oczyszczania stosowałam kolumny chromatograficzne:

A: Jupiter Proteo C12, 250 x 21,2 mm, 90 Å, 4 µm (Phenomenex);

B: Kinetex C18, 250 x 21,2 mm, 100 Å, 5 µm (Phenomenex);

C: Kromasil-100, C8, 250 x 10 mm, 5 µm.

Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 14 ml/min dla kolumn A i B, oraz 10 ml/min dla kolumny C.

Wszystkie związki oczyszczałam w liniowym gradiencie eluentów. Fazę ruchomą stanowił odpowiednio dobrany gradient rozpuszczalników A i B, gdzie:

A: 0,1% TFA w H<sub>2</sub>O (v/v);

B: 80% CH<sub>3</sub>CN w 0,08% wodnym roztworze TFA.

Szczegóły dotyczące metod oczyszczania poszczególnych związków zostały zawarte w Tabeli 17.

Tabela 17 Sposoby oraz wydajności oczyszczania poszczególnych peptydów

Nazwa peptydu	Ilość oczyszczanego peptydu [mg]	Gradient rozpuszczalników	Kolumna	Masa oczyszczonego produktu [mg]	Wydajność oczyszczania [%]
Rpt1(8)	72	5-45 %B / 60 min	A	37	51
Rpt2(8)	41	5-45 %B / 60 min	A	15	37
Rpt3(8)	70	5-45 %B / 60 min	A	44	63
Rpt4(8)	53	5-45 %B / 60 min	A	24	45
Rpt5(8)	66	5-45 %B / 60 min	A	30	45
Rpt6(8)	24	5-45 %B / 60 min	C	14	58
Rpt5(10)	99	5-45 %B / 60 min	A	35	35
Rpt5(12)	68	5-60 %B / 90 min	A	20	29
Rpt5(A1)	70	5-40 %B / 60 min	B	23	33
Rpt5(A2)	81	5-40 %B / 60 min	B	25	31
Rpt5(A3)	75	5-40 %B / 60 min	B	28	37
Rpt5(A5)	60	5-40 %B / 60 min	B	19	32
Rpt5(A6)	83	5-40 %B / 60 min	B	30	36
Rpt5(A7)	55	5-40 %B / 60 min	B	18	33
Rpt5(Q1)	74	10-40 %B / 60 min	A	9	12
Rpt5(E1)	80	10-40 %B / 90 min	A	41	51
Rpt5(R1)	74	10-40 %B / 90 min	A	22	30
Rpt5(E2)	53	5-45 %B / 60 min	A	15	28
Rpt5(R2)	50	5-45 %B / 90 min	A	18	36
Rpt5(Cit2)	30	10-50 %B / 90 min	C	10	33
Rpt5(Q2)	17	10-50 %B / 60min	C	10	59
Rpt5(Har3)	50	10-50 %B / 90 min	A	25	50
Rpt5(Cit3)	49	10-50 %B / 90 min	A	19	39
Rpt5(E3)	65	10-40 %B / 90 min	A	33	51
Rpt5(Q3)	66	10-40 %B / 90 min	A	30	46
Rpt5(D4)	49	10-30 %B / 60 min	A	18	37

Nazwa peptydu	Ilość oczyszczanego peptydu [mg]	Gradient rozpuszczalników	Kolumna	Masa oczyszczonego produktu [mg]	Wydajność oczyszczania [%]
Rpt5(AzrN)	92	10-45 %B / 90 min	A	33	36
Rpt5(K4)	59	10-40 %B / 90 min	A	21	36
Rpt5(N4)	82	10-40 %B / 90 min	A	45	55
Rpt5( $\beta$ Ala4)	72	10-30 %B / 60 min	A	31	43
Rpt5(Abu4)	90	10-40 %B / 60min	A	36	40
Rpt5(K5)	65	10-40 %B / 90 min	A	28	43
Rpt5(D5)	72	10-40 %B / 90 min	A	35	49
Rpt5(D6)	60	10-40 %B / 90min	A	21	35
Rpt5(K6)	70	10-40 %B / 90 min	A	38	54
Rpt5(K7)	55	10-40 %B / 90 min	A	21	38
Rpt5(D7)	65	10-40 %B / 90 min	A	40	62
Rpt5(Nle8)	50	10-40 %B / 90min	B	38	76
M1-1	76	10-50 %B / 60 min	A	21	28
M3-6	80	10-50 %B / 60 min	A	27	34
M2-1	72	10-50 %B / 90 min	A	19	26
M2-2	76	10-50 %B / 90 min	A	17	22
M2-3	69	10-50 %B / 90 min	A	21	30
M2-4	75	10-50 %B / 90 min	A	22	29
M2-5	87	10-50 %B / 90 min	A	23	26
M2-6	98	10-50 %B / 90 min	B	31	32
M2-7	101	10-50 %B / 90 min	B	35	35
M2-9	66	10-40 %B / 90 min	A	14	21
M2-10	59	10-40 %B / 90 min	A	15	25
M2-11	120	10-40 %B / 90 min	B	36	30
M2-12	119	10-40 %B / 90 min	B	31	26
M2-13	83	10-40 %B / 90 min	A	22	27
M2-14	65	10-40 %B / 90 min	A	16	25

<b>Nazwa peptydu</b>	<b>Ilość oczyszczanego peptydu [mg]</b>	<b>Gradient rozpuszczalników</b>	<b>Kolumna</b>	<b>Masa oczyszczonego produktu [mg]</b>	<b>Wydajność oczyszczania [%]</b>
M2-15	88	10-40 %B / 90 min	A	23	26
M2-20	70	10-40 %B / 90 min	A	25	36
Tat-Rpt5	120	10-40 %B / 90 min	B	35	29
Tat-K4	60	10-30 %B / 90 min	B	5	8
Tat-Nle8	175	5-45 %B / 120 min	B	32	18
Tat-D6	81	10-30 %B / 90 min	B	6	7
Tat-LLVY	160	10-40 %B / 90 min	B	51	32
Tat-(TAMRA)Rpt5	60	10-30 %B / 90 min	B	5	8
TAMRA-Rpt5	75	10-30 %B / 90 min	A	15	20

## 15. Charakterystyka otrzymanych związków

Surowe oraz oczyszczone peptydy były poddane charakterystyce za pomocą:

- RP-HPLC z użyciem:

a) chromatografów:

CH1: Varian ProStar 240 (Varian Medical Systems, Inc.);

CH2: Shimadzu LC-20AD z detektorem PDA (Shimadzu);

CH3: Nexera UHPLC z detektorem PDA (Shimadzu).

b) kolumn analitycznych:

K1: Luna C8, 250 x 4,6 mm, 100 Å, 5 µm (Phenomenex);

K2: Jupiter Proteo C12, 250 x 4,6 mm, 90 Å, 4 µm (Phenomenex);

K3: Kinetex XB-C18, 250 x 4,6 mm, 100 Å, 5 µm (Phenomenex);

K4: Kinetex XB-C18, 100 x 2,1 mm, 100 Å, 2,6 µm (Phenomenex).

- spektrometrii mas:

MS1: MALDI-ToF: spektrometr mas Biflex III (Bruker) na matrycy CCA (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy) oraz DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy)

MS2: ESI LC-MS IT ToF: tandemowy spektrometr mas LC-20A (Shimadzu) z kolumną JupiterProteo, 150 x 2 mm, 90 Å, 4 µm (Phenomenex).

Szczegółowe dane dotyczące charakterystyki poszczególnych związków znajdują się w Tabeli 18.



Tabela 18 Charakterystyka poszczególnych peptydów

Nazwa peptydu	Czas retencji [min]	Gradient rozpuszczalników	Kolumna	Chromatograf	Rodzaj analizy MS	Masa obliczona [Da]	Obserwowane m/z
Rpt1(8)	11,02	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1044,46	1044,27 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt2(8)	14,23	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	848,42	848,27 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt3(8)	11,22	5-100 %B / 30 min	K1	CH1	MS2	1108,47	1108,27 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt4(8)	10,80	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	948,52	948,35 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(8)	12,62	5-100 %B / 30 min	K1	CH1	MS2	969,48	969,31 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt6(8)	13,84	5-100 %B / 30 min	K1	CH1	MS2	1032,61	1032,42 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(10)	11,54	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1225,67	1225,36 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(12)	10,82	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1424,77	1424,47 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(A1)	12,09	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1168,61	1168,55 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(A2)	12,12	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1168,61	1168,43 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(A3)	12,06	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1168,61	1168,43 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(A5)	11,50	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1182,67	1182,45 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(A6)	10,01	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1183,62	1183,42 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(A7)	12,08	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1168,65	1168,45 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Q1)	11,01	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1225,64	1225,59 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(E1)	11,26	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1226,62	1226,49 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(R1)	11,38	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1253,68	1253,63 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(E2)	11,39	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1226,62	1226,50 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(R2)	10,99	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1253,68	1253,56 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Cit2)	11,33	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1254,66	1254,68 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Q2)	11,75	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1225,64	1225,57 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Har3)	11,00	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS1	1267,69	1267,50 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Cit3)	11,25	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1254,66	1254,62 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(E3)	11,41	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1226,62	1226,51 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Q3)	11,29	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1225,64	1225,50 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(D4)	11,16	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1269,66	1269,59 ([M] <sup>+</sup> )

Nazwa peptydu	Czas retencji [min]	Gradient rozpuszczalników	Kolumna	Chromatograf	Rodzaj analizy MS	Masa obliczona [Da]	Obserwowane m/z
Rpt5(AzrN)	11,23	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS1	1211,67	1211,66 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(N4)	11,09	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1268,68	1268,53 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(K4)	11,11	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1282,74	1282,64 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(βAla4)	10,81	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1225,67	1225,69 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Abu4)	7,95	5-100 %B / 15 min	K2	CH1	MS2	1239,73	1239,68 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(K5)	14,71	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1239,72	1239,60 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(D5)	4,01	5-100 %B / 15 min	K4	CH3	MS2	1226,66	1226,54 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(D6)	10,14	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1227,61	1227,57 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(K6)	8,45	5-100 %B / 15 min	K2	CH1	MS2	1240,68	1240,54 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(K7)	10,62	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1225,71	1225,59 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(D7)	4,02	5-100 %B / 15min	K4	CH3	MS2	1212,64	1212,53 ([M] <sup>+</sup> )
Rpt5(Nle8)	11,95	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1175,69	1175,62 ([M] <sup>+</sup> )
M1-1	13,81	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1532,68	1532,65 ([M] <sup>+</sup> )
M3-6	14,76	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1489,67	1489,65 ([M] <sup>+</sup> )
M2-1	15,03	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1588,83	1588,56 ([M] <sup>+</sup> )
M2-2	15,35	5-100 %B / 30 min	K3	CH2	MS2	1625,80	1625,52 ([M] <sup>+</sup> )
M2-3	14,53	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1533,82	1533,54 ([M] <sup>+</sup> )
M2-4	13,13	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1576,83	1576,55 ([M] <sup>+</sup> )
M2-5	13,92	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1576,82	1576,53 ([M] <sup>+</sup> )
M2-6	14,16	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1561,82	1561,71 ([M] <sup>+</sup> )
M2-7	13,36	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1562,78	1562,49 ([M] <sup>+</sup> )
M2-9	11,57	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1563,77	1563,63 ([M] <sup>+</sup> )
M2-10	14,70	5-100 %B / 30 min	K3	CH2	MS2	1605,79	1605,51 ([M] <sup>+</sup> )
M2-11	12,90	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1603,83	1603,76 ([M] <sup>+</sup> )
M2-12	11,76	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1563,76	1563,59 ([M] <sup>+</sup> )
M2-13	13,75	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS1	1546,81	1547,81 ([M+H] <sup>+</sup> )
M2-14	13,52	5-100 %B / 30 min	K3	CH1	MS2	1562,77	1562,70 ([M] <sup>+</sup> )
M2-15	12,48	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1564,75	1564,63 ([M] <sup>+</sup> )

Nazwa peptydu	Czas retencji [min]	Gradient rozpuszczalników	Kolumna	Chromatograf	Rodzaj analizy MS	Masa obliczona [Da]	Obserwowane m/z
M2-20	12,67	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1575,88	1575,60 ([M] <sup>+</sup> )
Tat-Rpt5	11,74	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	3091,86	3091,89 ([M] <sup>+</sup> )
Tat-K4	11,46	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	3148,92	3148,68 ([M] <sup>+</sup> )
Tat-Nle8	12,66	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	3041,88	3041,68 ([M] <sup>+</sup> )
Tat-D6	11,55	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	3093,80	3093,62 ([M] <sup>+</sup> )
Tat-LLVY	10,03	5-100 %B / 60 min	K2	CH1	MS2	1884,19	1884,08 ([M] <sup>+</sup> )
Tat-(TAMRA)Rpt5	9,84	5-100 %B / 15 min	K2	CH1	MS1	3504,31	3505,20 ([M+H] <sup>+</sup> )
TAMRA-Rpt5	16,04	5-100 %B / 30 min	K2	CH1	MS2	1783,29	1782,76 ([M] <sup>+</sup> )

## 16. Badania biologiczne otrzymanych peptydów

### 16.1. Badanie zdolności modulujących otrzymanych peptydów względem ludzkiego proteasomu 20S

Otrzymane związki przebadalam pod kątem modulowania aktywności ludzkiego proteasomu 20S *in vitro*, wykorzystując zarówno krótkie (3-4-aminokwasowe), jak i dłuższy (10-aminokwasowy) peptydowy substrat fluorogeniczny oraz modelowe białka.

#### 16.1.1. Badania aktywności z użyciem peptydowych substratów fluorogenicznych

Zsyntezowane przeze mnie potencjalne aktywatory proteasomu identyfikowałam przez użycie tri/tetrapeptydów stanowiących fluorogeniczne substraty enzymu. Krotność, z jaką otrzymane przeze mnie związki pobudzały aktywność enzymu, obliczałam na podstawie pomiaru fluorescencji uwolnionej w wyniku trawienia substratu grupy AMC, gdzie 100% stanowiła aktywność proteasomu bez dodatku modulatora. Ze względu na to, że takie krótkie substraty są trawione również przez latentny 20S, w niektórych badaniach posłużyłam się dodatkowo dłuższym substratem peptydowym (LFP) <sup>196</sup>, którego działanie opiera się na zjawisku przeniesienia energii wzbudzenia elektronowego (FRET). Substrat ten lepiej różnicował aktywność proteasomu w obecności różnych aktywatorów, ponieważ w przeciwieństwie do krótkich substratów tylko w niewielkim stopniu jest on trawiony przez latentny enzym. Donor fluorescencji w tym peptydzie stanowi grupa Mca, natomiast akceptorem jest reszta Dpa(Dnp). Wzrost fluorescencji obserwowałam, gdy w wyniku hydrolizy substratu para donorowo-akceptorowa oddalała się od siebie.

##### 16.1.1.1. Przygotowanie substratów do badań

Badania wpływu poszczególnych peptydów na daną aktywność proteasomu 20S wykonałam przy użyciu specyficznych substratów fluorogenicznych firmy Enzo Life Science lub/oraz dłuższego peptydowego substratu LFP, zsyntezowanego na potrzeby badań przez dr Małgorzatę Giżyńską [Tabela 19].

Tabela 19 Substraty używane do badań aktywności proteasomu 20S

Substrat	Aktywność
Suc-LLVY-AMC	ChT-L
Boc-LRR-AMC	T-L
Z-LLE-AMC	C-L
LFP (Mca-AKVYPYPMEDap(Dnp)-NH <sub>2</sub> )	-

#### Substraty Enzo:

50 mM podstawowe roztwory substratów w DMSO przygotowywałam z zakupionych naważek i przechowywałam w -20°C. Następnie, tuż przed wykonaniem badań biologicznych, rozcieńczałam je do stężenia 10 mM (ostateczne stężenie w badanej próbce wynosiło 100 µM).

#### Substrat LFP:

Substrat LFP rozcieńczałam do stężenia 50 mM za pomocą DMSO, w którym przechowywałam go w -20°C. Przed pomiarami substrat rozcieńczałam do końcowego stężenia 2 mM (ostateczne stężenie w badanej próbce wynosiło 20 µM).

#### 16.1.1.2. Przygotowanie proteasomu do badań

Proteasom 20S potrzebny do badań izolowałam z ludzkich erytrocytów według procedury opisanej w punkcie 19 i przechowywałam w -20°C. Tak otrzymany proteasom o stężeniu 1 mg/ml rozcieńczałam początkowo do stężenia 0,5 mg/ml za pomocą buforu: 50 mM TRIS/HCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7, a następnie do stężenia „work” – 0,2 mg/ml, za pomocą buforu: 50 mM TRIS/HCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 20% glicerol, pH 7. Następnie, tuż przed wykonaniem analiz, h20S rozcieńczałam do stężenia 0,1 mg/ml za pomocą buforu: 50 mM TRIS/HCl, 20% glicerol, pH 7. Ostateczne stężenie enzymu w badanej próbce wynosiło 1,25 nM.

#### 16.1.1.3. Przygotowanie związków do badań

Zsyntezowane i oczyszczane związki rozpuszczałam do podstawowego stężenia 10 mM za pomocą DMSO, a następnie serią rozcieńczeń do stężeń: 5 mM, 2 mM, 1 mM,

0,5 mM, 0,2 mM, 0,1 mM. Ostateczne stężenie modulatora w badanej próbce wynosiło od 1  $\mu$ M do 50  $\mu$ M.

#### 16.1.1.4. Przeprowadzenie badań

Analizy prowadziłam na 96-dolkowych płytkach (Costar) w objętości 100  $\mu$ l. Bufor do badań stanowił 50 mM TRIS/HCl o pH 8. Kolejność i objętości dodawanych składników przedstawia Tabela 20. Za kontrolę przyjąłm aktywność proteasomu bez dodatku modulatora (zamiast związku dodano 1  $\mu$ l DMSO, w którym wszystkie peptydy były rozpuszczone).

Tabela 20 Reagenty używane podczas badań aktywności modulatorów. Kolejność dodawania poszczególnych składników roztworu pomiarowego była zgodna z kolejnością kolumn (kolumny kolejno od lewej do prawej)

	TRIS/HCl pH 8	h2OS [0,1 mg/ml]	DMSO	Badany związek	Substrat
<b>Kontrola</b>	97 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	-	1 $\mu$ l
<b>Próba</b>	97 $\mu$ l	1 $\mu$ l	-	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

Tak przygotowane roztwory poddawałam pomiarom na spektrofluorymetrze Tecan Infinite M200 Pro w temperaturze 37°C. Odczyt fluorescencji uwalnianej w wyniku proteolizy AMC dokonywany był co 2 min przez 1h w zakresie długości fali od 380 nm (wzbudzenie) do 460 nm (emisja). W przypadku substratu LFP stosowałam natomiast długości fali: 332 nm (wzbudzenie) do 398 nm (emisja).

#### 16.1.1.5. Ewaluacja wyników

Do analizy wybierałam linowe zakresy wzrostu fluorescencji. Na podstawie otrzymanych wartości obliczałam aktywność proteasomu z dodatkiem modulatora względem aktywności katalitycznej enzymu nie poddanego dodatkowej stymulacji (kontrola), którą przyjąłm za 100%. Eksperymenty wykonałam w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych, a ich wyniki wyraziłam jako średnie arytmetyczne z tych pomiarów  $\pm$  SEM.

## 16.1.2. Badania aktywności z użyciem modelowych białek

### 16.1.2.1. Utlenianie białek

Utlenione białka zastosowano w testach MST i badaniach wpływu modulatorów na degradację substratów białkowych przez proteasom. Komercyjnie dostępne roztwory podstawowe natywnej ludzkiej enolazy 2 (Novus Biologicals) i  $\alpha$ -synukleiny (rPeptide) rozcieńczono za pomocą ddH<sub>2</sub>O do stężenia 0,5 mg/ml i inkubowano z 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 2 godziny w temperaturze 30°C. Reakcje utleniania zatrzymywano przez dodanie DTT do końcowego stężenia 12,5 mM, a następnie roztwory utlenionych białek dializowano przez noc do 10 mM buforu Tris o pH 7,4 zawierającego 50 mM KCl i 2,5 mM MgSO<sub>4</sub> (enolaza) lub 20 mM buforu Tris o pH 7,4 zawierającego 100 mM NaCl (synukleina). Stan utlenienia  $\alpha$ -synukleiny i enolazy określono odpowiednio za pomocą spektrometru masowego MALDI TOF/TOF 5800+ (AB-Sciex) i spektrometru masowego TripleTOF 6600+ ze źródłem nanojonów OptiFlow® ESI (Sciex).

### 16.1.2.2. Badania aktywności z wykorzystaniem substratu białkowego

Badania wpływu wybranych modulatorów na zdolności trawienia substratów białkowych przez proteasom 20S zostały wykonane przez dr Przemysława Karpowicza.

Enolazę i jej utlenioną formę (20 pmol) rozpuszczono w 20 mM Tris o pH 7,4. Natywną i utlenioną  $\alpha$ -synukleinę (340 pmol) rozpuszczono w 20 mM HEPES o pH 7,4. Ludzki proteasom 20S był wstępnie aktywowany 0,01% SDS, co jest stosowane w badaniach *in vitro*, aby rozluźnić zwartą strukturę enzymu. Próbkę przygotowano przez zmieszanie H<sub>2</sub>O, białka i DMSO (kontrola) lub modulatora rozpuszczonego w DMSO. Całkowita objętość próbki wynosiła 10  $\mu$ l. Stężenie końcowe rozpuszczalnika organicznego nie przekroczyło 0,05%. Stosunek 20S:białko wynosił odpowiednio 1:20 dla enolazy i 1:340 dla  $\alpha$ -synukleiny. Próbkę inkubowano w 37°C przez 3 h, jedynie w przypadku natywnej  $\alpha$ -synukleiny, ze względu na jej szybszą degradację przez proteasom, czas ten skrócono do 1 h. Reakcję zatrzymano używając 4 x bufor Laemmli, a następnie ogrzewano próbkę w 75°C przez 10 min w celu denaturacji białek. W przypadku  $\alpha$ -synukleiny, ze względu na wyższą zawartość białka w inkubowanych próbkach, etap ten poprzedzony był rozcieńczeniem mieszaniny reakcyjnej za pomocą 25  $\mu$ l buforu testowego. Wyniki analizowano elektroforetycznie po nałożeniu 8  $\mu$ l każdej próbki na 10% (dla enolazy) lub 12% (dla synukleiny) żel SDS-PAGE.

Procent niestrawionych białek obliczono z żeli wybarwionych odczynnikiem InstantBlue™. Ilościową analizę obrazu przeprowadzono za pomocą oprogramowania do analizy Quantity One® 1-D (Bio-Rad). Intensywność prążków białka inkubowanego z modulatorem i h20S lub tylko z h20S porównano z intensywnością prążka odpowiadającego samemu białku, uznana za 100%. Eksperymenty wykonano w co najmniej trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z tych pomiarów ± SEM.

## 16.2. Badania stabilności peptydów

### 16.2.1. Badania stabilności proteolitycznej wybranych modulatorów w ludzkim osoczu

Badania stabilności wybranych peptydomimetyków w ludzkim osoczu przeprowadziłam inkubując peptydy (końcowe stężenie peptydu 0,1 mM) z osoczem (Merck) w temperaturze 37°C, przy jednoczesnym wytrząsaniu (300 rpm). Czasy inkubacji wynosiły odpowiednio: 0, 5, 10, 15, 30 min. Po określonym czasie reakcję zatrzymywałam poprzez dodanie kwasu trichlorooctowego (ostateczne stężenie TCA – 3%), energicznie mieszałam za pomocą wytrząsarki typu „vortex” i pozostawiałam w łaźni lodowej na ok. 30 min. Następnie próbki wirowałam (10 min, 14000 x g, 4°C) w celu oddzielenia supernatantu od wytrąconych białek. Postęp hydrolizy peptydów monitorowałam przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej (chromatograf: CH3, kolumna: K4,  $\lambda = 223$  nm) w liniowym gradiencie 5-100% B w 30 min (układ A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 80% ACN + 0,08% TFA). Ilość niezdegradowanego peptydu, pozostałego po inkubacji z osoczem obliczałam na podstawie pola powierzchni piku, za 100% przyjmując powierzchnię piku w próbce kontrolnej.

### 16.2.2. Badanie szybkości i miejsc trawienia wybranych modulatorów przez proteasom 20S

Aby sprawdzić kinetykę i miejsca trawienia peptydowych modulatorów przez proteasom 20S, peptydy te inkubowałam z enzymem w temperaturze 37°C. Stężenie trawionych peptydów wynosiło 0,25 mM, a enzymu: 0,0125 mg/ml. Inkubację prowadziłam w buforze 25 mM TRIS/HCl o pH 8 przez 3h. Próbkę pobierałam w czasie 0h, 1h, 3h, każdorazowo zatrzymując proteolizę poprzez dodanie 2,5  $\mu$ l 20% roztworu TFA w wodzie (ostateczne stężenie 0,5%). Następnie podatność aktywatorów na proteolizę oceniałam za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej



(chromatograf: CH2, kolumna: K3), obserwując powstające produkty degradacji oraz zanikanie piku pochodzącego od niestrawionego peptydu. Dla modulatora Rpt5(10) próbki te zostały również poddane analizie masowej (ESI MS IT-ToF) w celu ustalenia wiązań peptydowych trawionych przez enzym.

## 17. Badania komórkowe

### 17.1. Hodowla komórek

Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystałam linię komórkową HEK 293T otrzymaną z Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego dzięki uprzejmości dr hab. Karoliny Pierzynowskiej. Komórki hodowałam w temperaturze 37°C w atmosferze wysyczonej parą wodną i wzbogaconej 5% CO<sub>2</sub>. Jako medium hodowlane zastosowałam pożywkę DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz mieszaniny penicyliny (100 jednostek/ml) i streptomycyny (100 µg/ml).

### 17.2. Badanie potencjału wybranych modulatorów proteasomu 20S do przenikania błony komórkowej

Testy przenikania związków przez błonę komórkową wykonała dr hab. Magdalena Wysocka. Komórki wysiano na 24-dołkowej płytce (30 x 10<sup>4</sup> komórek na dołek). Po 48h pożywkę wymieniono na DMEM wzbogacony fluorescencyjnie wyznakowanymi peptydami w stężeniu 10 µM. Po 24h inkubacji pożywkę zawierającą związki usunięto, a dołki przemyto 3-krotnie buforem PBS. Do przemytych komórek dodano pożywkę hodowlaną wolną od czerwieni fenolowej (FluoroBrite™ DMEM, ThermoFisher Scientific). Następnie komórki zbadano za pomocą mikroskopu konfokalnego Nikon Eclipse TI2 (Nikon Instruments Inc.) przy użyciu czerwonego filtra, odpowiadającego cząsteczce fluorescencyjnej TAMRA przyłączonej do badanych związków. Otrzymane obrazy scalono i przeprowadzono kolokalizację barwnika fluorescencyjnego.

### 17.3. Badania aktywności cytotoksycznej peptydów w stosunku do linii komórkowej HEK 293T

Testy cytotoksyczności badanych związków wykonałam z pomocą dr Ewy Wiczerzak. Cytotoksyczność badanych związków zbadalam za pomocą testu MTT.

W tym celu komórki HEK 293T wysiałam na 96-dołkowej płytce ( $7 \times 10^3$  komórek na dołek) i inkubowałam przez 2 dni w  $37^\circ\text{C}$  z 5%  $\text{CO}_2$ . Następnie pożywkę hodowlaną zastąpiłam pożywką uzupełnioną o badane związki w odpowiednich stężeniach (roztwory podstawowe peptydów przygotowałam w sterylnej wodzie). Komórki inkubowałam przez 24 godziny, a następnie medium wymieniłam na 10x stężony roztwór MTT (Acros Organics) w buforze PBS (po 250  $\mu\text{l}$  na dołek), tak aby jego końcowe stężenie wyniosło 0,5 mg/ml. Po 4 godz. inkubacji w  $37^\circ\text{C}$ , medium usunęłam, a kryształ purpurowego formazanu (wytworzonego w wyniku redukcji MTT przez metabolicznie aktywne komórki) rozpuściłam w DMSO (po 150  $\mu\text{l}$  na dołek) i oznaczyłam ilościowo, mierząc absorbancję przy 570 nm z filtrem odniesienia 690 nm.

#### 17.4. Badania aktywności proteasomu w lizacie komórek HEK 293T

Testy aktywności proteasomu w lizacie komórkowym w obecności otrzymanych związków przeprowadziłam analogicznie do testów prowadzonych na izolowanym z krwi enzymie. Badania prowadziłam w buforze 50 mM Tris/HCl o pH 8 na 96-dołkowych płytkach do pomiaru fluorescencji firmy Costar®. Objętość reakcyjna każdej próby wynosiła 100  $\mu\text{l}$ . Stężenie białek w lizacie oznaczyłam za pomocą testu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™), zgodnie z zaleceniami producenta. Ostateczne stężenie białek w badanych próbkach wynosiło 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Do badań użyłam substratu Suc-LLVY-AMC (Enzo) w ostatecznym stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . Roztwory podstawowe substratu, badanych związków oraz Bortezomibu (Tebubio) przygotowałam w DMSO. Aby wyeliminować niespecyficzny wpływ DMSO na aktywność proteasomu, jego stężenie w badanych próbkach utrzymywałam na stałym poziomie – 2%. Ostateczne stężenie Bortezomibu wynosiło 1  $\mu\text{M}$ . Aktywność badanych związków obliczyłam na podstawie wartości fluorescencji grupy AMC, uwolnionej w wyniku trawienia substratu przez proteasom. Pomiaru dokonywano co 2 min, przez 1h, na spektrofluorymetrze Infinite M200Pro (Tecan), w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , rejestrując intensywność fluorescencji w zakresie 380-460 nm. Względną aktywność proteasomu obliczyłam w stosunku do kontroli, którą stanowiła aktywność proteasomu 20S bez dodatku modulatora, przyjęta jako 100%. Do obliczeń wybierałam każdorazowo liniowy zakres pomiaru. Badania przeprowadziłam w 3 niezależnych powtórzeniach, uśredniłam, a jako wynik podałam wartość średniej  $\pm$  SEM.

## 17.5. Badania aktywności proteasomu w komórkach HEK 293T z wykorzystaniem sondy TAS3

Do badań na żywych komórkach użyłam substratu TAS3 opisanego w literaturze<sup>190</sup>. Sonda ta charakteryzuje się wysoką odpornością na hydrolizowanie przez inne proteazy obecne w żywych komórkach, dlatego jej stosowanie eliminuje konieczność używania niespecyficzných inhibitorów tych enzymów. TAS3 składa się z sekwencji podatnej na selektywne trawienie przez proteasom, po której odcięciu w komórkach emitowany jest sygnał fluorescencyjny wynikający z obecności cząsteczki Rodaminy 110. Rodamina, charakteryzuje się lepszymi właściwościami fluorescencyjnymi niż AMC, dzięki czemu nie musi być stosowana w wysokich stężeniach, które wiązałyby się z cytotoksycznością. Ostatni segment sondy TAS3 stanowi fragment poprawiający zdolność do przenikania błony komórkowej przez substrat.

W przypadku badań aktywności prowadzonych na żywych komórkach kontrolę, przyjętą jako 100%, stanowił poziom fluorescencji TAS3 wykazywany przez komórki HEK 293T, które nie zostały potraktowane żadnym z aktywatorów. Jako kontrolę negatywną, potwierdzającą obecność enzymu w komórkach, przyjęto poziom fluorescencji TAS3 w obecności inhibitora proteasomu – Bortezomibu. Bortezomib należy do rodziny silnych, odwracalnych inhibitorów proteasomu i jako lek Velcade® znalazł zastosowanie w leczeniu szpiczaka mnogiego<sup>197</sup>. Wyniki zaprezentowano jako średnie arytmetyczne z wyników uzyskanych z min. 3 niezależnych pomiarów  $\pm$  SEM.

Badania wpływu otrzymanych związków na aktywność proteasomu w komórkach HEK 293T prowadziłam zgodnie z protokołem opisanym w literaturze<sup>198</sup>. W tym celu komórki wysiałam na czarnej 96-dołkowej płytce ( $7 \times 10^3$  komórek na dołek) i inkubowałam przez 2 dni w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>. Peptydy rozpuściłam w sterylnej wodzie przygotowując ich roztwory podstawowe. Następnie odciągnęłam pożywkę hodowlaną, a do odpowiednich dołków z komórkami dodałam:

- 10  $\mu$ M roztwór Bortezomibu w DMEM,
- peptydy o stężeniach 1, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M w DMEM,
- DMEM (kontrola).

Bortezomib z komórkami preinkubowałam 30 min, po czym do reszty dołków dodałam peptydy w DMEM lub sam DMEM i inkubowałam kolejne 30 min (w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie zawartość dołków wymieniłam na odpowiednio:

- 10 µM Bortezomib rozpuszczony w 10 µM TAS3 w buforze KRBH\*,
- peptydy o stężeniach 1, 10, 25, 50, 100 µM rozpuszczone w buforze KRBH zawierającym 10 µM TAS3,
- 10 µM roztwór TAS3 w buforze KRBH (kontrola).

\* Skład buforu KRBH:

- 30 mM HEPES o pH 7,4,
- 10 mM wodorowęglan sodu,
- 120 mM chlorek sodu,
- 4 mM fosforan potasu,
- 1 mM siarczan magnezu,
- 1 mM chlorek wapnia.

Tak przygotowaną płytkę niezwłocznie umieszczałam w spektrofluorymetrze Tecan Infinite M200Pro i co 2 min przez okres 2h rejestrowałam intensywność fluorescencji fragmentu sondy TAS3 zawierającego cząsteczkę rodaminy, uwolnionej w wyniku trawienia substratu przez proteasom. Długości fali wzbudzenia oraz emisji wynosiły odpowiednio: 485 nm oraz 535 nm. Do obliczeń wykorzystywałam wartości fluorescencji z ostatnich 90 min pomiaru tj. najbardziej liniowy zakres analizy. Porównanie nachylenia wykresów fluorescencji badanych próbek w stosunku do nachylenia wykresu otrzymanego dla próbki kontrolnej pozwoliło określić spadek lub wzrost aktywności proteasomu w komórkach. Z równania prostych wyznaczyłam również wartości średnich przyrostów fluorescencji  $\Delta$ RFU/min.

## 18. Badanie oddziaływania białek z proteasomem za pomocą mikroskalowej termoforezy

### 18.1. Znakowanie białek fluoroforem

Enolazę,  $\alpha$ -synukleinę i ich utlenione formy znakowałam przy użyciu zestawu Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation Amine Reactive, NT-647

(Nanotemper), zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Proces znakowania prowadziłam w 50 mM buforze HEPES o pH 7,4, w stosunku białko:NT-647 1:2. Czas inkubacji wynosił 60 min dla enolazy i 30 min dla  $\alpha$ -synukleiny, w 21°C. Po znakowaniu nadmiar odczynnika fluorescencyjnego usunęłam stosując kolumny dołączone przez producenta i 20 mM bufor Tris-HCl o pH 7,2, zawierający 200 mM NaCl i 10% glicerol. Otrzymane znakowane białka zatężyłam na kolumnach Amicon 3K Spin Columns (Merck). Stężenia białka określałam mierząc absorbancję przy 280 nm, stosując spektrofotometr UV/Vis (DU730 Beckman Coulter).

## 18.2. Przeprowadzenie testów MST

Oddziaływanie znakowanych fluorescencyjnie, natywnych i utlenionych białek z proteasomem 20S zbadalam przy użyciu mikroskalowej termoforezy (NanoTemper Monolith NT.115). Stężenie znakowanego białka utrzymywałam na stałym poziomie 250 nM dla natywnej i utlenionej  $\alpha$ -synukleiny oraz 125 nM i 25 nM odpowiednio dla natywnej i utlenionej enolazy. Znakowane białka mieszałam z 16 różnymi stężeniami h20S (w zakresie od 1965 do 0,06 nM), przygotowanymi w serii rozcieńczeń, i inkubowałam przez 60 min (enolaza) lub 30 min ( $\alpha$ -synukleina) w ciemności, w 22°C, w szklanych kapilarach (Monolith NT Premium Capillaries, Nanotemper). Jako bufor testowy zastosowałam 20 mM Tris-HCl o pH 7,2, zawierający 10% glicerolu, 0,5 mM DTT, 0,5 mM NaN<sub>3</sub>, 0,125 mM EDTA i 100 mM NaCl. Eksperymenty termoforetyczne przeprowadzono laserem IR o natężeniu promieniowania 20% dla natywnej enolazy oraz natywnej i utlenionej  $\alpha$ -synukleiny oraz 40% dla utlenionej enolazy. Krzywe MST dopasowałam metodą Hilla, stosując oprogramowanie Origin Pro2021. Wartości EC50 obliczyłam na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych eksperymentach.

## 19. Pozyskiwanie proteasomu 20S z ludzkich erytrocytów

Proteasom niezbędny do przeprowadzenia badań izolowałam z ludzkich erytrocytów w oparciu o protokół opracowany przez dr Julię Witkowską. Krew, z której izolowałam enzym, pochodziła z Banku Krwi Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

W celu izolacji erytrocytów, do krwi dodawałam roztwór PBS w stosunku 1:1 i wirowałam przez 15 min w temperaturze 20°C przy prędkości obrotów 600 x g. Przemycanie prowadziłam 3-krotnie, każdorazowo odrzucając supernatant i dodając do

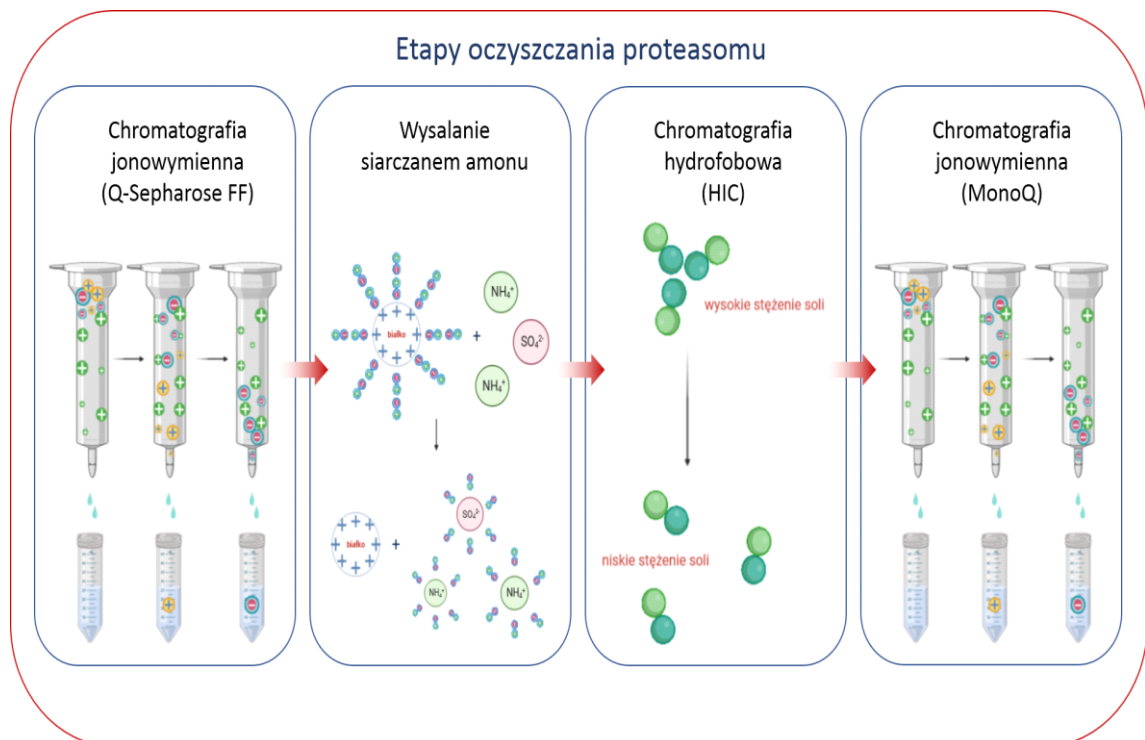
pozostałości świeżą porcją PBS. Po ostatnim przemywaniu, ostrożnie, stosując długą igłę, odciągałam warstwę erytrocytów znajdującą się na dnie probówki wirówkowej, w celu dokładnego oddzielenia jej od wierzchniej warstwy osocza i kożuszka leukocytno-płytkowego. Tak przygotowane erytrocyty poddawałam lizie osmotycznej.

### 19.1. Liza osmotyczna erytrocytów

Lizę erytrocytów przeprowadziłam stosując bufor lizujący zawierający: 30 mM Tris/HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1,6 mM DTT. Do odwirowanych wcześniej erytrocytów dodawałam 1,5-krotny nadmiar buforu lizującego i poddawałam je lizie w temp. 4°C przez 1h, stosując wytrząsarkę kołyskową. Następnie całość wirowałam (27 000 x g, 4°C, 30 min) w celu oddzielenia osadu niezlizowanych erytrocytów i błon komórkowych. Supernatant zawierający lizat erytrocytowy zlewałam do sterylnych falkonów i przechowywałam w temperaturze -20°C.

### 19.2. Oczyszczanie białka

Na oczyszczanie ludzkiego proteasomu ze zlizowanych erytrocytów składały się cztery etapy [Rys. 53]:



Rys. 52 Schemat obrazujący etapy oczyszczania proteasomu 20S z ludzkich erytrocytów

### 19.2.1. Chromatografia jonowymienna na złożu Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)

Wszystkie etapy oczyszczania były prowadzone w temperaturze 4°C. Oczyszczanie na kolumnie wypełnionej Q-Sepharose FF prowadziłam przy przepływie grawitacyjnym, z zastosowaniem 1 ml złoża na 5 ml lizatu. Na przemycie buforem lizującym złoże nanosiłam lizat. Następnie przez kolumnę przepuszczałam kolejne porcje buforu lizującego w celu odmycia hemoglobiny. Kiedy przesącz się odbarwił, złoże przemywałam 3 buforami, stosując skokowy gradient stężenia soli:

Bufor 1: 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol, 100 mM NaCl

Bufor 2: 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol, 400 mM NaCl

Bufor 3: 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol, 1M NaCl

Elucję prowadziłam przemywając kolumnę wybranym buforem 3-krotnie, stosując każdorazowo 2-krotny nadmiar eluentu w stosunku do objętości złoża. Wymycie proteasomu następowało przy pierwszym przemywaniu buforem zawierającym 400 mM stężenie soli NaCl.

### 19.2.2. Wysalanie siarczanem (VI) amonu

Następnym krokiem w oczyszczaniu było wysolenie frakcji zawierającej proteasom, zebranej podczas chromatografii na złożu Q-Sepharose. Siarczan amonu dodawałam stopniowo przez 30 min, ciągle mieszając, w ilości 11,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 50 ml roztworu. Następnie próbkę z dodanym siarczanem amonu pozostawiłam na mieszadle magnetycznym przez 1h. Po tym czasie całość zwirowałam (27000 x g), zdekantowałam supernatant i dodałam do niego stopniowo kolejną porcję siarczanu amonu (12,1 g / 50 ml próbki). Po upływie 1h od dodania soli, powtórzyłam wirowanie, zdekantowałam supernatant, a pellet zawiesiłam w buforze dializującym (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol). Przeprowadziłam dializę w kasetce dializacyjnej 10K MWCO.

### 19.2.3. Chromatografia oddziaływań hydrofobowych na kolumnie HiPrep Phenyl FF (High Sub) (Cytiva)

W kolejnym etapie oczyszczania przeprowadziłam chromatografię hydrofobową (HIC) stosując kolumnę HiPrep Phenyl FF oraz chromatograf AKTA Pure (Cytiva). W tym celu próbkę zawierającą proteasom wyciągnęłam z kasetki dializacyjnej za pomocą strzykawki z igłą i przenieśliam do sterylnego falkonu. Do zmierzonej objętości próbki dodałam siarczan(VI) amonu do stężenia równego 1,2 M. Tak przygotowaną próbkę naniosałam na kolumnę przemytą uprzednio buforem A (5 objętości kolumny), a następnie układem złożonym z 40% buforu A i 60% buforu B (8 objętości kolumny). Elucję białka prowadziłam z zastosowaniem malejącego gradientu soli  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 60-100% buforu B (10 objętości kolumny), gdzie: bufor A stanowił 1,2 M siarczan(VI) amonu w 20 mM Tris/HCl, 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerolu. Bufor B miał identyczny skład jak bufor A, ale bez dodatku soli amonowej. Zebrane frakcje zawierające enzym h20S zateżyłam przy użyciu filtra do wirowania Amicon® o wartości granicznej 50K MWCO i pojemności 15 ml. Tak zagęszczoną próbkę przenieśliam do kasetki dializacyjnej i przeprowadziłam dializę do buforu: 20 mM Tris/HCl, 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerolu, 25 mM NaCl.

### 19.2.4. Chromatografia jonowymienna na kolumnie Mono-Q (GE Healthcare)

Próbkę zawierającą proteasom naniosałam na kolumnę Mono-Q 5/50 GL. Do oczyszczania zastosowałam gradient liniowy: 25 mM - 400 mM NaCl w 20 mM Tris-HCl o pH 7,6, zawierającym 25 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT i 5% glicerolu (30 x objętość kolumny, z szybkością przepływu 1 ml/min). Proteasom 20S eluował przy około 340 mM NaCl. Frakcje zawierające proteasom zbierałam i dializowałam wobec buforu 20 mM Tris-HCl o pH 7,2, zawierającego 1 mM EDTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 mM DTT i 10% glicerolu. Po zateżeniu za pomocą filtra wirówkowego o punkcie odcięcia 100 kDa (Amicon Ultra-0.5 ml), stężenie białka wyznaczyłam metodą Bradforda. Następnie proteasom rozcieńczyłam do stężenia 1 mg/ml. Roztwór proteasomu o tym stężeniu przechowywałam w temperaturze  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  w buforze o składzie: 50% glicerol, 20 mM Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 mM DTT.



### 19.2.5. Charakterystyka oczyszczonego proteasomu 20S

Czystość wyizolowanego proteasomu 20S sprawdzałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE, na żelu poliakrylamidowym (4% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający) w układzie Laemmli. W skład buforu elektrodowego wchodziły 0,025 M TRIS, 0,192 M glicyna oraz 0,1% SDS. Jako markera masy używałam PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa). Żel rozwijałam stosując napięcie 80 V przez pierwszą godzinę, a następnie 130 V. Do zwizualizowania podjednostek proteasomu rozdzielonych na żelu za pomocą elektroforezy stosowałam barwnik Coomassie Brilliant Blue.

## VI BIBLIOGRAFIA

1. Labbadia, J. & Morimoto, R. I. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem* **84**, 435–464 (2015).
2. Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. & Balch, W. E. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu Rev Biochem* **78**, 959–991 (2009).
3. Muchowski, P. J. & Wacker, J. L. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* **6**, 11–22 (2005).
4. Yim, W. W.-Y. & Mizushima, N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov* **6**, 6 (2020).
5. Saez, I. & Vilchez, D. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age related Diseases. *Curr Genomics* **15**, 38–51 (2014).
6. Carrard, G., Bulteau, A.-L., Petropoulos, I. & Friguier, B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1461–74 (2002).
7. Opoku-Nsiah, K. A. & Gestwicki, J. E. Aim for the core: suitability of the ubiquitin-independent 20S proteasome as a drug target in neurodegeneration. *Transl Res* **198**, 48–57 (2018).
8. Manasanch, E. E. & Orłowski, R. Z. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 417–433 (2017).
9. Fricker, L. D. Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **60**, 457–476 (2020).
10. Thibaudeau, T. A. & Smith, D. M. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol Rev* **71**, 170–197 (2019).
11. Wilk, S. & Orłowski, M. Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase: Isolation and Specificity of the Bovine Pituitary Enzyme. *J Neurochem* **35**, 1172–1182 (1980).
12. Jung, T., Catalgol, B. & Grune, T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med* **30**, 191–296 (2009).
13. Bi, M., Du, X., Jiao, Q., Chen, X. & Jiang, H. Expanding the role of proteasome homeostasis in Parkinson's disease: beyond protein breakdown. *Cell Death Dis* **12**, 154 (2021).
14. Śledź, P. *et al.* Structure of the 26S proteasome with ATP- $\gamma$ S bound provides insights into the mechanism of nucleotide-dependent substrate translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7264–7269 (2013).
15. Unno, M. *et al.* The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure* **10**, 609–618 (2002).
16. Löwe, J. *et al.* Crystal Structure of the 20 S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution. *Science (1979)* **268**, 533–539 (1995).
17. Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V. & Goldberg, A. L. Proteasome Active Sites Allosterically Regulate Each Other, Suggesting a Cyclical Bite-Chew Mechanism for Protein Breakdown. *Mol Cell* **4**, 395–402 (1999).

18. Groll, M. *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062–7 (2000).
19. Latham, M. P., Sekhar, A. & Kay, L. E. Understanding the mechanism of proteasome 20S core particle gating. *PNAS* **111**, 5532–5537 (2014).
20. Bard, J. A. M. *et al.* Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem* **87**, 697–724 (2018).
21. Seemüller, E. *et al.* Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. *Science (1979)* **268**, 579–582 (1995).
22. Schmidtke, G. *et al.* Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J* **15**, 6887–6898 (1996).
23. Seemuller, E., Lupas, A. & Baumeister, W. Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**, 468–470 (1996).
24. Osmulski, P. A., Hochstrasser, M. & Gaczynska, M. A Tetrahedral Transition State at the Active Sites of the 20S Proteasome Is Coupled to Opening of the  $\alpha$ -Ring Channel. *Structure* **17**, 1137–1147 (2009).
25. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157–62 (1967).
26. Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. & Huber, R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**, 295–317 (1999).
27. Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.-M. & Krüger, E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9241–6 (2005).
28. Seifert, U. *et al.* Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* **142**, 613–624 (2010).
29. Tripathi, S. C., Vedpathak, D. & Ostrin, E. J. The Functional and Mechanistic Roles of Immunoproteasome Subunits in Cancer. *Cells* **10**, 3587 (2021).
30. Kitamura, A. *et al.* A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *JCI* **121**, (2011).
31. Pickering, A. M. & Davies, K. J. A. Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 $\alpha$  $\beta$ , Pa28 $\gamma$  and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch Biochem Biophys* **523**, 181–190 (2012).
32. Ferrington, D. A. & Gregerson, D. S. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation *Prog Mol Biol Transl Sci* **109**, 75–112 (2012).
33. Gaczynska, M., Goldberg, A. L., Tanaka, K., Hendil, K. B. & Rock, K. L. Proteasome Subunits X and Y Alter Peptidase Activities in Opposite Ways to the Interferon- $\gamma$ -induced Subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* **271**, 17275–17280 (1996).
34. Noda, C., Tanahashi, N., Shimbara, N., Hendil, K. B. & Tanaka, K. Tissue Distribution of Constitutive Proteasomes, Immunoproteasomes, and PA28 in Rats. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 348–354 (2000).

35. Murata, S. *et al.* Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science (1979)* **316**, 1349–1353 (2007).
36. Xing, Y., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Thymoproteasome subunit- $\beta$ 5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *PNAS* **110**, 6979–6984 (2013).
37. Abi Habib, J., Lesenfans, J., Vigneron, N. & Van den Eynde, B. J. Functional Differences between Proteasome Subtypes. *Cells* **11**, 421 (2022).
38. Ciechanover, A. Reprint of “A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes”. *Biochem Biophys Res Commun* **425**, 565–570 (2012).
39. Kerscher, O., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159–180 (2006).
40. Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1695**, 55–72 (2004).
41. Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203–229 (2012).
42. Schulman, B. A. & Wade Harper, J. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: The apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 319–331 (2009).
43. Wijk, S. J. L. & Timmers, H. T. M. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *The FASEB Journal* **24**, 981–993 (2010).
44. Wasilko, D. J., Huang, Q. & Mao, Y. Insights into the ubiquitin transfer cascade catalyzed by the Legionella effector SidC. *Elife* **7**, (2018).
45. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO Journal* **19**, 94–102 (2000).
46. Braten, O. *et al.* Numerous proteins with unique characteristics are degraded by the 26S proteasome following monoubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E4639–47 (2016).
47. Amerik, A. Y. & Hochstrasser, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1695**, 189–207 (2004).
48. Ding, Q., Dimayuga, E. & Keller, J. N. Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid Redox Signal* **8**, 163–172 (2006).
49. Wilkinson, K. D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *The FASEB Journal* **11**, 1245–1256 (1997).
50. Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179–186 (1986).
51. Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. *Science* **234**, 364–368 (1986).
52. Johnson, E. S., Ma, P. C. M., Ota, I. M. & Varshavsky, A. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**, 17442–56 (1995).
53. Pflieger, C. M. & Kirschner, M. W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* **14**, 655–65 (2000).

54. Shiber, A. & Ravid, T. Chaperoning Proteins for Destruction: Diverse Roles of Hsp70 Chaperones and their Co-Chaperones in Targeting Misfolded Proteins to the Proteasome. *Biomolecules* **4**, 704–724 (2014).
55. Ju, D. & Xie, Y. Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent. *J Biol Chem* **279**, 23851–4 (2004).
56. Hanna, J., Meides, A., Zhang, D. P. & Finley, D. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell* **129**, 747–59 (2007).
57. Hill, C. P., Masters, E. I. & Whitby, F. G. The 11S Regulators of 20S Proteasome Activity. in *Curr Top Microbiol* **268**, 73–89 (2002).
58. Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G. & Rechsteiner, M. Pa200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO Journal* **21**, 3516–3525 (2002).
59. Cascio, P. Pa28 $\gamma$ : New insights on an ancient proteasome activator. *Biomolecules* **11**, 1–23 (2021).
60. Zhou, P. REG $\gamma$ : A Shortcut to Destruction. *Cell* **124**, 256–257 (2006).
61. Förster, A. *et al.* The 1.9 Å Structure of a Proteasome-11S Activator Complex and Implications for Proteasome-PAN / PA700 Interactions. *Mol Cell* **18**, 589–599 (2005).
62. Hill, C. P. *et al.* Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115–20 (2000).
63. Förster, A., Whitby, F. G. & Hill, C. P. The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J* **22**, 4356–64 (2003).
64. Savulescu, A. F. & Glickman, M. H. Proteasome activator 200: The HEAT is on. *Mol Cell Proteomics* **10**, 3–10 (2011).
65. Marques, A. J., Glanemann, C., Ramos, P. C. & Dohmen, R. J. The C-terminal extension of the  $\beta$ 7 subunit and activator complexes stabilize nascent 20 S proteasomes and promote their maturation. *J Biol Chem* **282**, 34869–34876 (2007).
66. Li, X., Kusmierczyk, A. R., Wong, P., Emili, A. & Hochstrasser, M. beta-Subunit appendages promote 20S proteasome assembly by overcoming an Ump1-dependent checkpoint. *EMBO J* **26**, 2339–49 (2007).
67. Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A. & Enenkel, C. Bim3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep* **4**, 959–63 (2003).
68. Guan, H. *et al.* Cryo-EM structures of the human PA200 and PA200-20S complex reveal regulation of proteasome gate opening and two PA200 apertures. *PLoS Biol* **18**, (2020).
69. Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. Why are 'natively unfolded' proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**, 415–427 (2000).
70. Xue, B., Dunker, A. K. & Uversky, V. N. Orderly order in protein intrinsic disorder distribution: disorder in 3500 proteomes from viruses and the three domains of life. *J Biomol Struct Dyn* **30**, 137–149 (2012).
71. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F. & Jones, D. T. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J Mol Biol* **337**, 635–645 (2004).

72. Romero, P. *et al.* Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**, 38–48 (2001).
73. Jorda, J., Xue, B., Uversky, V. N. & Kajava, A. V. Protein tandem repeats - The more perfect, the less structured. *FEBS Journal* **277**, 2673–2682 (2010).
74. Uversky, V. N., Oldfield, C. J. & Dunker, A. K. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* **37**, 215–46 (2008).
75. Mendoza-Velásquez, J. J. *et al.* Autonomic Dysfunction in  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Front. Neurol* **10**, 363 (2019).
76. Tsvetkov, P. *et al.* Thermo-resistant intrinsically disordered proteins are efficient 20S proteasome substrates. *Mol Biosyst* **8**, 368–373 (2012).
77. Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J. & Davies, K. J. A. Ubiquitin Conjugation Is Not Required for the Degradation of Oxidized Proteins by Proteasome. *J Biol Chem* **278**, 311–318 (2003).
78. Sahu, I. *et al.* Signature activities of 20S proteasome include degradation of the ubiquitin-tag with the protein under hypoxia. *bioRxiv* (2019).
79. Myers, N. *et al.* The Disordered Landscape of the 20S Proteasome Substrates Reveals Tight Association with Phase Separated Granules. *Proteomics* **18**, 1–21 (2018).
80. Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N. & Thomas, P. J. Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**, 408–411 (2003).
81. Smith, D. M. Could a Common Mechanism of Protein Degradation Impairment Underlie Many Neurodegenerative Diseases? *J Exp Neurosci* **12**, 117906951879467 (2018).
82. Dal Vechio, F. H., Cerqueira, F., Augusto, O., Lopes, R. & Demasi, M. Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation. *Free Radic Biol Med* **67**, 304–313 (2014).
83. Zondler, L. *et al.* Proteasome impairment by  $\alpha$ -synuclein. *PLoS One* **12**, e0184040 (2017).
84. Dos Santos, S. L., Petropoulos, I. & Friguet, B. The oxidized protein repair enzymes methionine sulfoxide reductases and their roles in protecting against oxidative stress, in ageing and in regulating protein function. *Antioxidants* **7**, 1–22 (2018).
85. Ngo, J. K., Pomatto, L. C. D. & Davies, K. J. A. Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging. *Redox Biol* **1**, 258–264 (2013).
86. Jung, T. & Grune, T. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life* **60**, 743–752 (2008).
87. Jung, T., Höhn, A. & Grune, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol* **2**, 99–104 (2014).
88. Wang, X., Yen, J., Kaiser, P. & Huang, L. Regulation of the 26S Proteasome Complex During Oxidative Stress. *Sci Signal* **3**, (2010).
89. Pickering, A. M. *et al.* The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J* **432**, 585–594 (2010).

90. Kotamraju, S. *et al.* Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: Potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **40**, 1034–1044 (2006).
91. Abi Habib, J. *et al.* Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. *Sci Rep* **10**, 15765 (2020).
92. Reichmann, D., Voth, W. & Jakob, U. Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress. *Mol Cell* **69**, 203–213 (2018).
93. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006).
94. San Martín, Á. *et al.* Knots can impair protein degradation by ATP-dependent proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 9864–9869 (2017).
95. Li, J., Powell, S. R. & Wang, X. Enhancement of proteasome function by PA28  $\gamma$  overexpression protects against oxidative stress. *The FASEB Journal* **25**, 883–893 (2011).
96. Li, X. *et al.* Specific SKN-1 / Nrf Stress Responses to Perturbations in Translation Elongation and Proteasome Activity. *PLoS Genet* **7**, 9–11 (2011).
97. Pickering, A. M., Staab, T. A., Tower, J., Sieburth, D. & Davies, K. J. A. A conserved role for the 20S proteasome and Nrf2 transcription factor in oxidative stress adaptation in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **216**, 543–553 (2013).
98. Wang, X. *et al.* The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **292**, 16310–16320 (2017).
99. Hipp, M. S., Kasturi, P. & Hartl, F. U. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 421–435 (2019).
100. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Proteostasis and aging. *Nat Med* **21**, 1406–15 (2015).
101. Carrard, G., Dieu, M., Raes, M., Toussaint, O. & Friguet, B. Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 728–39 (2003).
102. Keller, J. N., Huang, F. F. & Markesbery, W. R. Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience* **98**, 149–156 (2000).
103. Torres, C., Lewis, L. & Cristofalo, V. J. Proteasome Inhibitors Shorten Replicative Life Span and Induce a Senescent-Like Phenotype of Human Fibroblasts. *J Cell Physiol* **853**, 845–853 (2006).
104. Chondrogianni, N. *et al.* Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem* **278**, 28026–37 (2003).
105. Ponnappan, U., Zhong, M. & Trebilcock, G. U. Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: A role in immune senescence. *Cell Immunol* **192**, 167–174 (1999).
106. Hawse, J. R., Hejtmancik, J. F., Horwitz, J. & Kantorow, M. Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract and clear human lenses and aged human lenses. *Exp Eye Res* **79**, 935–940 (2004).

107. Arata, Y. *et al.* Defective induction of the proteasome associated with T-cell receptor signaling underlies T-cell senescence. *Genes to Cells* **24**, 801–813 (2019).
108. Ponnappan, U. Ubiquitin–proteasome pathway is compromised in CD45RO+ and CD45RA+ T lymphocyte subsets during aging. *Exp Gerontol* **37**, 359–367 (2002).
109. Taylor, R. C. & Dillin, A. Aging as an Event of Proteostasis Collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004440–a004440 (2011).
110. Zabel, C. *et al.* Proteasome and oxidative phosphorylation changes may explain why aging is a risk factor for neurodegenerative disorders. *J Proteomics* **73**, 2230–2238 (2010).
111. Tonoki, A. *et al.* Genetic Evidence Linking Age-Dependent Attenuation of the 26S Proteasome with the Aging Process. *Mol Cell Biol* **29**, 1095–1106 (2009).
112. Huang, Q. & Figueiredo-Pereira, M. E. Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications. *Apoptosis* **15**, 1292–1311 (2010).
113. Matsuda, N. & Tanaka, K. Does Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System or the Autophagy-Lysosome Pathway Predispose Individuals to Neurodegenerative Disorders such as Parkinson ' s Disease ? *J Alzheimers Dis* **19**, 1–9 (2010).
114. Shibatani, T. & Ward, W. F. Sodium dodecyl sulfate (sds) activation of the 20s proteasome in rat liver. *Arch Biochem Biophys* **321**, 160–166 (1995).
115. Dahlmann, B., Rutschmann, M., Kuehn, L. & Reinauer, H. Activation of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle by fatty acids or sodium dodecyl sulphate. *Biochem J* **228**, 171–177 (1985).
116. Watanabe, N. & Yamada, S. Activation of 20S Proteasomes from Spinach Leaves by Fatty Acids. *Plant Cell Physiol* **37**, 147–151 (1996).
117. Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A. J. & Gonos, E. S. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res* **10**, 157–172 (2007).
118. Huang, L., Ho, P. & Chen, C.-H. Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Lett* **581**, 4955–4959 (2007).
119. Huang, L., Ho, P. & Chen, C.-H. Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Lett* **581**, 4955–4959 (2007).
120. Trader, D. J., Simanski, S., Dickson, P. & Kodadek, T. Establishment of a suite of assays that support the discovery of proteasome stimulators. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**, 892–899 (2017).
121. Mena, I. R. D. E., Mahillo, E., Arribas, J. & Castano, J. G. Kinetic mechanism of activation by cardiolipin ( diphosphatidylglycerol ) of the rat liver multicatalytic proteinase. *Biochem J* **97**, 93–97 (1993).
122. Coleman, R. A. *et al.* Analysis of chain length, substitution patterns, and unsaturation of AM-404 derivatives as 20S proteasome stimulators. *Bioorg Med Chem Lett* **29**, 420–423 (2019).
123. Jones, C. L., Njomen, E., Sjögren, B., Dexheimer, T. S. & Tepe, J. J. Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins. *ACS Chem Biol* **12**, 2240–2247 (2017).



124. George, D. E. & Tepe, J. J. Advances in Proteasome Enhancement by Small Molecules. *Biomolecules* **11**, 1789 (2021).
125. Fiolek, T. J., Keel, K. L. & Tepe, J. J. Fluspirilene Analogs Activate the 20S Proteasome and Overcome Proteasome Impairment by Intrinsically Disordered Protein Oligomers. *ACS Chem Neurosci* **12**, 1438–1448 (2021).
126. Wang, N. *et al.* Ursolic acid ameliorates amyloid  $\beta$ -induced pathological symptoms in *Caenorhabditis elegans* by activating the proteasome. *Neurotoxicology* **88**, 231–240 (2022).
127. Shi, K.-N., Li, P.-B., Su, H.-X., Gao, J. & Li, H.-H. MK-886 protects against cardiac ischaemia/reperfusion injury by activating proteasome-Keap1-NRF2 signalling. *Redox Biol* **62**, 102706 (2023).
128. Jones, C. L., Njomen, E., Sjögren, B., Dexheimer, T. S. & Tepe, J. J. Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins. *ACS Chem Biol* **12**, 2240–2247 (2017).
129. Commission, I. J. & Nomenclature, B. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **138**, 9–37 (1984).
130. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can Med Assoc J* **12**, 141–6 (1922).
131. Bozovičar, K. & Bratkovič, T. Evolving a Peptide: Library Platforms and Diversification Strategies. *Int J Mol Sci* **21**, 215 (2019).
132. Lloyd-Williams, P., Albericio, F. & Giralt, E. Solid-Phase Peptide Synthesis. in *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* **374**, 19–93 (CRC Press, 2020).
133. Sharma, K., Sharma, K. K., Sharma, A. & Jain, R. Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. *Drug Discov Today* **28**, 103464 (2023).
134. Usmani, S. S. *et al.* THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLoS One* **12**, e0181748 (2017).
135. Wodak, S. J. *et al.* Allosterity in Its Many Disguises: From Theory to Applications. *Structure* **27**, 566–578 (2019).
136. Gaczynska, M. & Osmulski, P. A. Harnessing Proteasome Dynamics and Allosterity in Drug Design. *Antioxid Redox Signal* **21**, 2286–2301 (2014).
137. Sadre-Bazzaz, K., Whitby, F. G., Robinson, H., Formosa, T. & Hill, C. P. Structure of a Blm10 Complex Reveals Common Mechanisms for Proteasome Binding and Gate Opening. *Mol Cell* **37**, 728–735 (2010).
138. Gillette, T. G., Kumar, B., Thompson, D., Slaughter, C. A. & Demartino, G. N. Differential Roles of the COOH Termini of AAA Subunits of PA700 ( 19 S Regulator ) in Asymmetric Assembly and Activation of the 26 S Proteasome . *J Biol Chem* **283**, 31813–31822 (2008).
139. Yu, Y. *et al.* Interactions of PAN's C-termini with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome–ATPase interactions *EMBO J* **29**, 692–702 (2010).

140. Kumar, B., Kim, Y.-C. & DeMartino, G. N. The C Terminus of Rpt3, an ATPase Subunit of PA700 (19 S) Regulatory Complex, Is Essential for 26 S Proteasome Assembly but Not for Activation. *J Biol Chem* **285**, 39523–39535 (2010).
141. Thomas, T. A. & Smith, D. M. Proteasome activator 28 $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ) allosterically activates trypsin-like proteolysis by binding to the  $\alpha$ -ring of the 20S proteasome. *J Biol Chem* **298**, 102140 (2022).
142. Yu, Z. *et al.* Allosteric coupling between  $\alpha$ -rings of the 20S proteasome. *Nat Commun* **11**, 4580 (2020).
143. Huang, X. *et al.* The RTP site shared by the HIV-1 Tat protein and the 11S regulator subunit alpha is crucial for their effects on proteasome function including antigen processing. *J Mol Biol* **323**, 771–82 (2002).
144. Gaczynska, M., Osmulski, P. A., Gao, Y., Post, M. J. & Simons, M. Proline- and Arginine-Rich Peptides Constitute a Novel Class of Allosteric Inhibitors of Proteasome Activity. *Biochemistry* **42**, 8663–8670 (2003).
145. Giżyńska, M. *et al.* Proline- and Arginine-Rich Peptides as Flexible Allosteric Modulators of Human Proteasome Activity. *J Med Chem* **62**, 359–370 (2019).
146. Gao, Y. *et al.* Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I $\kappa$ B $\alpha$  degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest* **106**, 439–448 (2000).
147. Witkowska, J. *et al.* Crystal structure of a low molecular weight activator Blm-pep with yeast 20S proteasome – insights into the enzyme activation mechanism. *Sci Rep* **7**, 6177 (2017).
148. Cekała, K. *et al.* Peptidomimetics Based on C-Terminus of Blm10 Stimulate Human 20S Proteasome Activity and Promote Degradation of Proteins. *Biomolecules* **12**, 777 (2022).
149. Chuah, J. J. Y., Rexroad, M. S. & Smith, D. M. High resolution structures define divergent and convergent mechanisms of archaeal proteasome activation. *Commun Biol* **6**, 733 (2023).
150. Opoku-Nsiah, K. A. *et al.* The Y $\Phi$  motif defines the structure-activity relationships of human 20S proteasome activators. *Nat Commun* **13**, 1226 (2022).
151. Mathur, D. *et al.* PEPlife: A Repository of the Half-life of Peptides. *Sci Rep* **6**, 36617 (2016).
152. Lucana, M. C. *et al.* Protease-Resistant Peptides for Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutics. *Pharmaceutics* **13**, 2065 (2021).
153. Gilon, T., Loyter, A. & Gilon, C. Systematic solid-phase synthesis of linear pseudooligolysines containing multiple adjacent CH<sub>2</sub>NH amide bond surrogates: potential agents for gene delivery. *J Pept Res* **58**, 36–44 (2001).
154. Kjeldsen, F. & Zubarev, R. A. Effects of Peptide Backbone Amide-to-EsterBond Substitution on the Cleavage Frequency in Electron Capture Dissociation and Collision-Activated Dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom* **22**, 1441–1452 (2011).
155. Proulx, C. *et al.* Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med Chem* **3**, 1139–64 (2011).

156. Chingle, R., Proulx, C. & Lubell, W. D. Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications. *Acc Chem Res* **50**, 1541–1556 (2017).
157. Feng, Z. & Xu, B. Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches. *Biomol Concepts* **7**, 179–187 (2016).
158. Frackenpohl, J., Arvidsson, P. I., Schreiber, J. V. & Seebach, D. The Outstanding Biological Stability of  $\alpha$ - and  $\omega$ -Peptides toward Proteolytic Enzymes: An In Vitro Investigation with Fifteen Peptidases. *ChemBioChem* **2**, 445–455 (2001).
159. Werner, H. M., Cabalteja, C. C. & Horne, W. S. Peptide Backbone Composition and Protease Susceptibility: Impact of Modification Type, Position, and Tandem Substitution. *ChemBioChem* **17**, 712–718 (2016).
160. White, C. J. & Yudin, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat Chem* **3**, 509–24 (2011).
161. Ricardo, M. G. *et al.* Multicomponent Peptide Stapling as a Diversity-Driven Tool for the Development of Inhibitors of Protein-Protein Interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **59**, 5235–5241 (2020).
162. Dougherty, P. G. *et al.* Enhancing the Cell Permeability of Stapled Peptides with a Cyclic Cell-Penetrating Peptide. *J Med Chem* **62**, 10098–10107 (2019).
163. Hamley, I. W. PEG–Peptide Conjugates. *Biomacromolecules* **15**, 1543–1559 (2014).
164. Boylan, N. J. *et al.* Conjugation Site Heterogeneity Causes Variable Electrostatic Properties in Fc Conjugates. *Bioconjug Chem* **24**, 1008–1016 (2013).
165. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3–26 (2001).
166. Kwon, Y.-U. & Kodadek, T. Quantitative comparison of the relative cell permeability of cyclic and linear peptides. *Chem Biol* **14**, 671–7 (2007).
167. Dougherty, P. G., Sahni, A. & Pei, D. Understanding Cell Penetration of Cyclic Peptides. *Chem Rev* **119**, 10241–10287 (2019).
168. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett* **587**, 1693–702 (2013).
169. Xu, J. *et al.* Cell-penetrating peptide: a means of breaking through the physiological barriers of different tissues and organs. *J Control Release* **309**, 106–124 (2019).
170. Perkins, A., Cochrane, A. W., Ruben, S. M. & Rosen, C. A. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J Acquir Immune Defic Syndr (1988)* **2**, 256–63 (1989).
171. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* **272**, 16010–7 (1997).
172. Futaki, S. *et al.* Arginine-rich Peptides. *J Biol Chem* **276**, 5836–5840 (2001).
173. Säälik, P. *et al.* Protein Cargo Delivery Properties of Cell-Penetrating Peptides. A Comparative Study. *Bioconjug Chem* **15**, 1246–1253 (2004).

174. El-Andaloussi, S., Johansson, H. J., Lundberg, P. & Langel, Ü. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J Gene Med* **8**, 1262–1273 (2006).
175. Torchilin, V. P., Rammohan, R., Weissig, V. & Levchenko, T. S. TAT peptide on the surface of liposomes.pdf. *PNAS* **98**, 8786–8791 (2001).
176. Richard, J. P. *et al.* Cell-penetrating Peptides. *JBiol Chem* **278**, 585–590 (2003).
177. Thorén, P. E. G. *et al.* Uptake of analogs of penetratin, Tat(48–60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 100–107 (2003).
178. Nakase, I. *et al.* Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement. *Molecular Therapy* **10**, 1011–1022 (2004).
179. Wadia, J. S., Stan, R. V & Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* **10**, 310–315 (2004).
180. Cudic, M. *et al.* Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides (N.Y.)* **23**, 2071–83 (2002).
181. Hirose, H. *et al.* Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Molecular Therapy* **20**, 984–993 (2012).
182. Albert, R. *et al.* SDZ CO 611: a highly potent glycosylated analog of somatostatin with improved oral activity. *Life Sci* **53**, 517–25 (1993).
183. Bruno, B. J., Miller, G. D. & Lim, C. S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Ther Deliv* **4**, 1443–1467 (2013).
184. Smith, D. M. *et al.* Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* **27**, 731–44 (2007).
185. Rabl, J. *et al.* Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases. *Mol Cell* **30**, 360–368 (2008).
186. Wehmer, M. *et al.* Structural insights into the functional cycle of the ATPase module of the 26S proteasome. *PNAS* **114**, 1305–1310 (2017).
187. Ding, Z. *et al.* High-resolution cryo-EM structure of the proteasome in complex with ADP-*AlFx*. *Cell Res* **27**, 373–385 (2017).
188. Eisele, M. R. *et al.* Expanded Coverage of the 26S Proteasome Conformational Landscape Reveals Mechanisms of Peptidase Gating. *Cell Rep* **24**, 1301-1315.e5 (2018).
189. Osmulski, P. A. *et al.* New Peptide-Based Pharmacophore Activates 20S Proteasome. *Molecules* **25**, 1439 (2020).
190. Zerfas, B. L., Coleman, R. A., Salazar-Chaparro, A. F., Macatangay, N. J. & Trader, D. J. Fluorescent Probes with Unnatural Amino Acids to Monitor Proteasome Activity in Real-Time. *ACS Chem Biol* **15**, 2588–2596 (2020).
191. Kim, W. S., Kågedal, K. & Halliday, G. M. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimers Res Ther* **6**, 73 (2014).
192. Haque, A., Polcyn, R., Matzelle, D. & Banik, N. L. New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci* **8**, 33 (2018).

193. Dess, D. B. & Martin, J. C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. *J Org Chem* **48**, 4155–4156 (1983).
194. Myers, A. G. *et al.* Synthesis of highly epimerizable N-protected  $\alpha$ -amino aldehydes of high enantiomeric excess. *Tetrahedron Lett* **41**, 1359–1362 (2000).
195. Vojkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept Res* **8**, 236–237 (1995).
196. Smith, D. M. *et al.* ATP Binding to PAN or the 26S ATPases Causes Association with the 20S Proteasome, Gate Opening, and Translocation of Unfolded Proteins. *Mol Cell* **20**, 687–698 (2005).
197. Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J. & P. Dou, Q. Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* **11**, 239–253 (2011).
198. Coleman, R. A., Mohallem, R., Aryal, U. K. & Trader, D. J. Protein degradation profile reveals dynamic nature of 20S proteasome small molecule stimulation. *RSC Chem Biol* **2**, 636–644 (2021).

## VII Streszczenie

Zdrowe komórki charakteryzuje obecność złożonej, dobrze funkcjonującej sieci składającej się z enzymów proteolitycznych oraz białek opiekuńczych, które utrzymują stan homeostazy. System proteasomalny jest odpowiedzialny za degradację ubikwitynowanych białek, białek wewnątrznie nieuporządkowanych, czy też takich, które uległy uszkodzeniom na skutek m. in. stresu oksydacyjnego. W okresie starzenia, zarówno zewnętrznych, jak i endogennych czynników wpływających na uszkodzanie białek przybywa. Taki zależny od wieku spadek zdolności komórek do utrzymania proteostazy jest uważany za główny czynnik powodujący związane z wiekiem dysfunkcje komórkowe, w tym odkładanie toksycznych agregatów białkowych, które ściśle powiązane z szeregiem chorób, w szczególności tych związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego. Zauważono również, iż wraz z wiekiem postępuje rozkład proteasomu 26S, z jednoczesnym wzrostem ilości proteasomu 20S, jednakże nie obserwowano przy tym zwiększonej aktywności 20S. Można zatem wnioskować, iż starzenie wpływa na powstawanie nowej puli proteasomu 20S, niezwiązanego z jego swoistymi regulatorami, takimi jak 19S, 11S lub białko Blm10. Z tego powodu kuracja polegająca na wprowadzeniu egzogennych modulatorów jego aktywności wydaje się być obiecującym sposobem zapobiegania odkładaniu toksycznych białek. Do tej pory uwaga badaczy skupiała się na poszukiwaniu aktywatorów 20S głównie wśród związków małowcząsteczkowych, które ze względu na większą stabilność oraz biodostępność wydają się być atrakcyjniejszymi farmaceutykami od związków peptydowych. Trzeba natomiast mieć na uwadze ich niską selektywność oraz często wysoką toksyczność. Dlatego też w swojej pracy zajęłam się poszukiwaniem sekwencji peptydowych stymulatorów proteasomu 20S opartych o natywne białka regulujące jego aktywność oraz sprawdzeniem ich potencjału do pobudzania proteasomu *in vitro* oraz *in cellulo*.

W pierwszym etapie mojej pracy skupiałam się na sekwencjach wywodzących się z C-końców podjednostek Rpt regulatora 19S, które, jak donosi literatura, biorą aktywny udział w tzw. bramkowaniu proteasomu. Z 6 zsyntezowanych związków najbardziej obiecującym okazał się peptyd Rpt5(8), w związku z czym w dalszych badaniach skupiałam się na optymalizacji jego sekwencji. W tym celu sprawdziłam kluczowość poszczególnych reszt aminokwasowych w tym peptydzie wydłużając jego sekwencję, stosując metodę skanowania alaninowego oraz syntezując bibliotekę związków

z podstawieniami aminokwasów o różnym charakterze łańcuchów bocznych. Badania te pozwoliły stwierdzić, iż optymalna długość aktywatora wynosi 10 reszt (związek Rpt5(10)), przy czym w pozycjach 1, 2 i 4 tego peptydu preferowane są reszty zasadowe, natomiast pozycja 7 wydaje się być najbardziej liberalna pod względem charakteru akceptowanych reszt. W kolejnym etapie sprawdziłam stabilność peptydu Rpt5(10) względem ludzkiego proteasomu 20S oraz enzymów obecnych w ludzkim osoczu. Po 1h inkubacji w obecności h2O<sub>2</sub>, analog ten pozostawał niestrawiony w ok. 40%, natomiast już po 10 min inkubacji z plazmą pozostawało go niewiele ponad 30%. Z tego powodu zsyntezowałam 6 kolejnych związków, opartych o strukturę peptydu Rpt5(10), co zaowocowało otrzymaniem najsilniejszego aktywatora – związku Rpt5(Nle8). Peptyd ten jednak nie wykazywał stabilności wyższej od peptydu macierzystego. Silniejszą odporność na degradację zaobserwowałam natomiast dla peptydów, w których modyfikowana była pozycja 4 (związki: Rpt5(Abu4), Rpt5( $\beta$ Ala4) oraz Rpt5(AzrN)).

W związku z tym, iż udało mi się otrzymać obiecujące aktywatory h2O<sub>2</sub>, postanowiłam sprawdzić, czy będą one w stanie wywołać podobny efekt w żywych komórkach. W tym celu sprawdziłam zdolność peptydu Rpt5(10) do przenikania błony komórkowej. Peptyd ten, posiadając 3 zasadowe reszty lizyny na *N*-końcu, mógłby wykazywać działanie podobne do kationowych CPP, jednakże przenikał on przez błonę jedynie w niewielkim stopniu. Sprawdziłam więc, czy przyłączenie sekwencji Tat(48-57) umożliwi przenikanie peptydu do wnętrza komórek. Jak się okazało, tak zmodyfikowana sekwencja z powodzeniem pokonała barierę błony komórkowej, a dodatkowo silniej pobudzała peptydazę ChT-L izolowanego proteasomu 20S. Zachęcona wynikami tych badań, zsyntezowałam jeszcze 3 podobne analogi, zawierające sekwencję penetrującą przyłączoną do dwóch z najsilniejszych otrzymanych aktywatorów: Rpt5(K4) oraz Rpt5(Nle8), a także peptydu Rpt5(D6), który nie wykazywał potencjału stymulującego. Wszystkie cztery związki przebadalam pod kątem pobudzania aktywności ChT-L proteasomu w lizacie komórek HEK 293T. Otrzymane wyniki korelowały z wcześniejszymi rezultatami badań na izolowanym enzymie, tj. związki Tat-Rpt5(10), Tat-K4 oraz Tat-Nle8 aktywowały enzym jeszcze skuteczniej od ich analogów bez przyłączonej sekwencji CPP, przy czym niezmiennie najsilniejszym modulatorem był peptyd zawierający resztę Nle8. Dodatkowo udało się wykluczyć, iż za efekt aktywujący odpowiada sekwencja Tat(48-57), ponieważ zarówno analogiczny związek pozbawiony

sekwencji aktywatora (Tat-LLVY), jak i peptyd Tat-D6 nie były w stanie pobudzić enzymu do skuteczniejszej degradacji substratu.

Ostatnim etapem tej części badań było sprawdzenie, czy otrzymane przeze mnie związki będą w stanie zaktywować proteasom w żywych komórkach HEK 293T. W tym celu posłużyłam się sondą TAS3, którą charakteryzuje dobra odporność na inne niż proteasom enzymy komórkowe. Otrzymane wyniki badań potwierdziły, że peptyd Tat-Nle8 stanowi najsilniejszy z przebadanych przeze mnie modulatorów proteasomu. Dodatkowo był on na tyle stabilny by zaktywować proteasom w obliczu szeregu białek proteolitycznych obecnych w żywych komórkach. Stanowi to niewątpliwy sukces, gdyż peptydy często są dyskwalifikowane jako leki ze względu na swoją niską stabilność proteolityczną oraz brak zdolności przenikania błony komórkowej. Dodatkowo, związki te nie wykazywały dużego efektu cytotoksycznego względem linii HEK 293T, co również powoduje, że są obiecującymi kandydatami do dalszych badań.

Druga część wyników, jakie przedstawiłam w tej pracy, dotyczyła peptydów wywodzących się z białka Blm10. Peptydy te zaprojektowano w oparciu o modelowanie molekularne, tak aby ustalić najbardziej optymalną długość linkera łączącego C- i N-końcowe fragmenty peptydowe oraz określić sekwencję rejonu N-końcowego umożliwiającą oddziaływanie z podjednostką  $\alpha 5$  proteasomu 20S. Badania na substratach peptydowych pozwoliły ustalić, że długość łącznika powinna wynosić 4 reszty aminokwasowe. W celu ułatwienia syntezy oraz zwiększenia rozpuszczalności peptydów zastąpiłam je ugrupowaniem Peg2. N-końcowy segment zaprojektowanego modulatora miał natomiast sekwencję: Lys-Asn-Ser-Asn (peptyd M2-6).

Następnie zaprojektowano jeszcze 6 związków poprzez zadokowanie C-końca białka Blm10 w pozostałych kieszeniach utworzonych przez podjednostki  $\alpha$  proteasomu i wyznaczenie sekwencji czterech N-końcowych aminokwasów, które potencjalnie mogłyby oddziaływać z otoczeniem w poszczególnych kieszeniach (związki M2-1, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-7). Badania przeprowadzone na dłuższym substracie peptydowym (LFP), który ze względu na słabsze trawienie przez latentny proteasom lepiej różnicuje potencjalne aktywatory, wykazały, że najsilniejszym modulatorem nadal pozostaje związek M2-6, zaprojektowany w celu oddziaływania z podjednostką  $\alpha 5$ . Z tego powodu, w dalszej części badań zajęłam się optymalizacją sekwencji tego właśnie peptydomimetyku. W tym celu sprawdziłam podstawienie Lys1 resztą kwasową (Glu)



oraz resztą posiadającą obojętny, hydrofobowy łańcuch boczny (Leu). Peptydy te znacząco silniej od M2-6 stymulowały tylko aktywność trypsynopodobną proteasomu, w przypadku pozostałych substratów efekt był porównywalny lub słabszy od wyjściowego analogu. Najsilniejszymi modulatorami okazały się peptydy M2-10 oraz M2-20. Ten pierwszy w pozycji pierwszej posiadał nienaturalną resztę homoargininy oraz kwas asparaginowy w pozycji 6, gdzie natywnie występowała leucyna. Związek ten najsilniej stymulował aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu. Analog M2-20, różniący się od wyjściowego peptydu M2-6 jedynie jedną resztą, posiadając Lys4 zamiast Asn4, okazał się najsilniej pobudzać proteasom do trawienia dłuższego substratu LFP oraz substratu peptydazy T-L. Związkiem, który całkowicie utracił zdolności do aktywacji enzymu okazał się peptyd M2-9, który w pozycji 10 posiadał tyrozynę o konfiguracji D, która spowodowała zapewne zablokowanie wiązania C-końca w kieszeni  $\alpha$  proteasomu.

Ponieważ krótkie fluorogeniczne substraty nie odzwierciedlają w pełni roli proteasomu w komórkach, postanowiłam sprawdzić, czy otrzymane przeze mnie związki będą w stanie zaktywować enzym do trawienia białek. Jak wiadomo, proteasom 20S nie posiada przyłączonej części regulatorowej 19S, w związku z czym nie jest w stanie rozfałdowywać dużych, ustrukturyzowanych białek, a odpowiada głównie za trawienie białek uszkodzonych lub wewnętrznie nieuporządkowanych. Aby ocenić zdolność enzymu do oddziaływania z białkami wybranymi do testów aktywności, przeprowadziłam testy powinowactwa stosując termoforezę mikroskalową. Eksperymenty te pozwoliły zaobserwować wiązanie się białek utlenionych oraz natywnej (należącej do grupy białek wewnętrznie nieuporządkowanych)  $\alpha$ -synukleiny do proteasomu 20S. Z kolei natywna enolaza, posiadająca uporządkowaną strukturę, nie wykazywała powinowactwa do 20S. Otrzymane przeze mnie modulatory również nie były w stanie pobudzać enzymu do trawienia tego białka, jednakże chętnie pobudzały go do trawienia białek uszkodzonych oksydacyjnie oraz natywnej synukleiny, co daje nadzieję na wykorzystanie ich w przyszłości jako leków wzmacniających usuwanie jedynie białek o potencjale agregacyjnym. Wśród otrzymanych aktywatorów znacząco wyróżnił się peptyd M2-12, który silnie przyspieszał degradację zarówno natywnej i utlenionej  $\alpha$ -synukleiny, jak i utlenionej enolazy. Także związek M2-2 silnie pobudzał proteasom do trawienia natywnej  $\alpha$ -synukleiny.

Wspomniane peptydy M2-2, M2-12 oraz związek M2-10 poddałam również testom cytotoksyczności. Efekt uszkodzający komórki był widoczny tylko przy zastosowaniu wysokiego stężenia modulatorów (50  $\mu$ M). Pomimo stosunkowo słabej odporności na degradację w ludzkim osoczu (ok. 20-30% niestrawionego peptydu po 15 min inkubacji), wszystkie 3 związki były w stanie zaktywować proteasom również w lizacie komórkowym.

## VIII SUMMARY

Healthy cells are characterized by the presence of a complex, well-functioning network consisting of proteolytic enzymes and chaperones that maintain a state of homeostasis. The proteasomal system is responsible for degradation of redundant proteins marked by a ubiquitin tag, intrinsically disordered proteins or proteins that have been damaged under conditions such as oxidative stress. During aging, both external and endogenous factors influencing protein damage increase. Such an age-dependent decline in the ability of cells to maintain proteostasis is believed to be a major contributor to age-related cellular dysfunctions, including the deposition of toxic protein aggregates, which have been closely linked to a number of diseases, particularly those associated with nervous system malfunctions. It has also been reported that the disassembly of the 26S proteasome progresses with age, with a concomitant increase in the amount of the 20S proteasome; however, increased 20S activity was not observed. Therefore, it can be concluded that aging drives the formation of a new pool of the 20S proteasome, which is not bound to its specific regulators such as 19S, 11S or Bln10 protein. For this reason, treatment involving the introduction of exogenous modulators of its activity appears to be a promising way to prevent the accumulation of toxic proteins. To date, researchers' attention has focused on the search for 20S activators mainly among small-molecule compounds, which appear to be more attractive pharmaceuticals than peptides due to their greater stability and bioavailability. On the other hand, one should keep in mind their low selectivity and often high toxicity. Therefore, in my studies I focused on searching for peptide stimulators based on native proteins that regulate 20S proteasome activity and verified their potential to stimulate the enzyme *in vitro* and *in cellulo*.

In the first stage of my work, I focused on sequences derived from the C-terminus of the Rpt subunits of the 19S regulator, which are reported to be actively involved in opening the proteasome gate. Based on activity results, of the 6 compounds synthesized, the Rpt5(8) peptide turned out to be the most promising, so in further studies I focused on optimizing its sequence. In the course of my research, I verified the impact of individual amino acid residues in this peptide by elongating its sequence, using the alanine scanning method and synthesizing a library of compounds with the side chains of different character. These studies led to the conclusion that the optimal length of the activator is 10 residues (compound Rpt5(10)), with basic residues most preferred at

positions 1, 2 and 4 of this peptide, while position 7 seems to be the most liberal in terms of accepted residues. In the next step, I tested the stability of the Rpt5(10) peptide in the presence of the human 20S proteasome and in human plasma. After 1h of incubation with h20S, this analog remained undigested at about 40%, while after just 10 min of incubation with plasma, a little over 30% remained. For this reason, I synthesized 6 new analogs based on the structure of the Rpt5(10) peptide, which resulted in the most potent activator - the Rpt5(Nle8) compound. Unfortunately, this peptide did not show stability higher than the parent peptide. In contrast, I observed stronger resistance to degradation in peptides in which position 4 was modified (compounds Rpt5(Abu4), Rpt5( $\beta$ Ala4) and Rpt5(AzrN)).

In view of obtaining promising h20S activators, I decided to check if they would be able to show a similar effect in living cells. Therefore, I tested the ability of the Rpt5(10) peptide to penetrate the cell membrane. This peptide, having 3 basic lysine residues at its *N*-terminus, could act similarly to cationic CPPs, however, it penetrated the membrane only to a small extent. Thus I checked whether attaching the Tat(48-57) sequence would make the peptide capable of penetrating cells. As it turned out, such a modified sequence successfully overcame the cell membrane barrier and, in addition, more strongly stimulated the ChT-L peptidase of the isolated 20S proteasome. Encouraged by the results of these studies, I synthesized 3 more analogs, containing a penetrating sequence attached to two of the most potent activators obtained: Rpt5(K4) and Rpt5(Nle8), as well as the peptide Rpt5(D6), which exhibited no stimulatory potential. I tested all four compounds for stimulation of ChT-L proteasome activity in HEK 293T cell lysate. The outcome of these assays correlated with previous results obtained on the isolated enzyme: the compounds Tat-Rpt5(10), Tat-K4 and Tat-Nle8 activated the enzyme even more effectively than their analogs without the attached CPP sequence. Again, the strongest modulator was the peptide containing Nle8 residue. In addition, it was possible to rule out that the Tat(48-57) sequence was responsible for the activating effect, as both the analogous compounds: lacking the activator sequence Tat-LLVY and Tat-D6 peptide were unable to stimulate the enzyme to degrade the substrate.

The final step in this part of the study was to check if the obtained compounds would be able to activate the proteasome in live HEK 293T cells. For this purpose, I used the TAS3 probe, which has good resistance to other cellular enzymes. The results obtained confirmed that the Tat-Nle8 peptide is the most potent of the proteasome

modulators. Moreover, it was stable enough to activate the proteasome despite a number of proteolytic enzymes present in living cells. This can be considered a success as peptides are often disqualified as drugs due to their low proteolytic stability and lack of ability to penetrate the cell membrane. In addition, the compounds did not show a large cytotoxic effect against the HEK 293T line, which also makes them promising candidates for further research.

The second part of my work concerned peptides derived from the Blm10 protein. These compounds were designed based on molecular modeling to determine the most optimal linker length connecting the *C*- and *N*-terminal segments, as well as the *N*-terminal sequence allowing interaction with the  $\alpha 5$  subunit of the 20S proteasome. Studies using peptide substrates determined that the linker length should be 4 amino acid residues. In order to facilitate the synthesis and increase the solubility of the peptides, I exchanged them into one Peg2 moiety. The *N*-terminal region of the designed modulator consisted of the sequence: Lys-Asn-Ser-Asn (peptide M2-6).

Six more compounds were then designed by docking the *C*-terminus of the Blm10 protein into the pockets formed by the  $\alpha$  subunits of the proteasome, and determining the sequences of the four *N*-terminal amino acids that could potentially interact with the environment in each pocket (compounds M2-1, M2-2, M2-3, M2-4, M2-5, M2-7). Studies performed using a longer peptide substrate (LFP), which, due to its weaker digestion by the latent proteasome, better differentiates potential activators, showed that compound M2-6 designed to interact with the  $\alpha 5$  subunit remains the strongest modulator. For this reason, I decided to optimize the sequence of this particular peptidomimetic. For this purpose, I substituted Lys1 with an acidic residue (Glu) and a residue having a neutral hydrophobic side chain (Leu). These peptides more strongly than M2-6 stimulated only the trypsin-like activity of the proteasome, for the other substrates the effect was comparable or weaker than the parent compound. The strongest modulators were the peptides M2-10 and M2-20. The former had an unnatural homoarginine residue in first position and aspartic acid in position 6, where leucine was natively present. This compound most strongly stimulated the chymotrypsin-like activity of the proteasome. M2-20 analogue differing from the starting M2-6 peptide by only one residue, Lys4 instead of Asn4, most strongly stimulated the proteasome to digest the longer LFP substrate and the substrate of T-L peptidase. The compound that completely lost its ability to activate the enzyme turned out to be the M2-9 peptide, which had a D-tyrosine at

position 10, which presumably caused blocking of the C-terminal binding in the  $\alpha$  pocket of the proteasome.

Since short fluorogenic substrates do not fully reflect the role the proteasome plays in cells, I decided to check if the compounds I obtained would be able to activate the enzyme for protein digestion. Since the 20S proteasome lacks an attached 19S regulatory moiety, and is therefore unable to unfold large, structured proteins, it is mainly responsible for digesting damaged or intrinsically disordered proteins. To assess the enzyme's ability to interact with the proteins selected for activity assays, I performed affinity tests using microscale thermophoresis. These tests allowed to observe the binding of oxidized proteins and native (belonging to the group of intrinsically disordered proteins)  $\alpha$ -synuclein to the 20S proteasome. In contrast, a native enolase, possessing a folded structure, showed no affinity for 20S. The modulators I obtained were also unable to stimulate the enzyme to digest this protein, however, they readily stimulated it to digest oxidatively damaged proteins and native synuclein. It gives hope for future use of such peptides as drugs to enhance the removal of only those proteins with aggregation potential. Of particular note is the peptide M2-12, which strongly accelerated the degradation of both native and oxidized  $\alpha$ -synuclein and oxidized enolase. Also promising is the compound M2-2, which strongly stimulated the proteasome to digest native  $\alpha$ -synuclein.

I also subjected the aforementioned peptides M2-2, M2-12 and compound M2-10 to cytotoxicity tests. The cell-damaging effect was visible only at high concentrations of the modulators (50  $\mu$ M). Despite the relatively poor degradation resistance in human plasma (about 20-30% undigested peptide after 15 min of incubation), all 3 compounds were able to activate the proteasome in cell lysate.

## IX Wykaz dorobku naukowego

### Udział w projektach badawczych

**1. Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2020** pt. „*Stabilne proteolitycznie aktywatory peptydomimetyczne proteasomu 20S oparte na sekwencji białka 19S RP*”

BMN 539-T070-B488-20

Kierownik projektu: Katarzyna Cekała

Termin realizacji: 02.2020- 01.2021

**2. Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2018** pt. „*Poszukiwanie miejsca oddziaływania peptydowego aktywatora ludzkiego proteasomu 20S na podstawie skanowania L-alaniną*”

BMN 538-8720-B268-18

Kierownik projektu: Katarzyna Cekała

Termin realizacji: 02.2018- 01.2019

**3. Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2017** pt. *Synteza oraz badania biologiczne peptydów pochodzących z białka VCP (Valosin Containing Protein) jako potencjalnych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S*”

BMN 538-8720-B744-17

Kierownik projektu: Katarzyna Cekała

Termin realizacji: 02.2017- 01.2018

**4. Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2016** pt. „*Synteza i badania peptydów z jednostek Rpt kompleksu regulatorowego jako potencjalnych modulatorów ludzkiego proteasomu 20S*”

BMN 538-8725-B380-16

Kierownik projektu: Katarzyna Cekała

Termin realizacji: 02.2016- 01.2017

**5. Projekt Narodowego Centrum Badań i Rozwoju** pt. „*Nowe związki o działaniu przeciwnowotworowym zaburzające funkcje telomerów*”

STRATEGMED3/306853/9/NCBR/2017

Kierownik projektu: Maciej Bagiński

Termin realizacji: 2017-2020

**6. Projekt NAWA-Polskie Powroty 2018**

PPN/PPO/2018/1/00071/U/00001

Kierownik projektu: Sławomir Lach

Termin realizacji: 2020-2022

### Publikacje oryginalne

1. **Cekała, K.**, Trepczyk, K., Witkowska, J., Jankowska, E., Wieczerek, E. (2024). *Rpt5-derived analogs stimulate human proteasome activity in cells and degrade proteins forming toxic aggregates in age-related diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 25, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms25094663>
2. **Cekała, K.**, Trepczyk, K., Sowik, D., Karpowicz, P., Giełdoń, A., Witkowska, J., Giżyńska, M., Jankowska, E., Wieczerek, E. (2022). *Peptidomimetics based on C-terminus of Blm10 stimulate human 20S proteasome activity and promote degradation of proteins*. Biomolecules, 12, 1–13. <https://doi.org/10.3390/biom12060777>
3. Maciejewska, N., Olszewski, M., Jurasz, J., Serocki, M., Dzierżyńska, M., **Cekała, K.**, Wieczerek, E., Baginski, M. (2022). *Novel chalcone-derived pyrazoles as potential therapeutic agents for the treatment of non-small cell lung cancer*. Scientific Reports, 12, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07691-6>
4. Fidor, A., **Cekała, K.**, Wieczerek, E., Cegłowska, M., Kasprzykowski, F., Edwards, C., Mazur-Marzec, H. (2021). *Nostocyclopeptides as new inhibitors of 20S proteasome*. Biomolecules, 11, 1–10. <https://doi.org/10.3390/biom11101483>
5. Czerwonka, A., Fiołka, M. J., **Cekała, K.**, Jankowska, E., Zając, A., Rzeski, W. (2020). *Pro-apoptotic action of protein-carbohydrate fraction isolated from coelomic fluid of the earthworm Dendrobaena veneta against human colon adenocarcinoma cells*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 126, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110035>
6. Skibiszewska, S., Żaczek, S., Dybala-Defratyka, A., **Cekała, K.**, Jankowska, E. (2020). *Influence of short peptides with aromatic amino acid residues on aggregation properties of serum amyloid A and its fragments*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 681, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108264>
7. **Cekała, K.**, Kropidłowska, M., Wieczerek, E. (2017). *Metody chemicznej ligacji w syntezie peptydów i białek - część II*. Wiadomości Chemiczne, 71, 747-761.
8. Kropidłowska, M., **Cekała, K.**, Wieczerek, E. (2017). *Metody chemicznej ligacji w syntezie peptydów i białek - część I*. Wiadomości Chemiczne, 71, 727-746



Komunikaty naukowe (prezentacje plakatowe)

1. Fidor A., **Cekała K.**, Wieczerek E., Ceglowska M., Kasprzykowski F., Edwards C., Mazur-Marzec H.: *Baltic Sea Nostoc edaphicum CCNP1411 as a source of 20S proteasome inhibitors*, 2021, 39th International Conference of the Polish Phycological Society "Contemporary taxonomy of algae" 2021, poster
2. **Jędrzejewska K. (Cekała)**, Machowicz D., Jankowska E., Wieczerek E.: *Identification of peptidic Rpt5(10) proteasome activator - binding sites by alanine scan*, 2020, 7th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium 2020, poster
3. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Machowicz D., Jankowska E., Wieczerek E.: *Proteolytically stable peptidomimetic activators of 20S proteasome based on 19S RP protein sequence*, 2020, Chemistry and Biology of Peptides: Gordon Research Seminar "The Next Generation of Peptide Tools and Therapeutics" 2020, poster
4. Skibiszewska S., **Jędrzejewska K.**, Jankowska E.: *Effect of point modifications on the process of oligomerization and aggregation of human serum amyloid A*, 2020, 7th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium 2020, poster
5. Dzierżyńska M., Sikorska E., Fularczyk M., **Jędrzejewska K.**, Mulkiewicz E., Sawicka J., Wyrzykowski D., Małuch I., Kasprzykowski F., Rodziewicz-Motowidło S.: *Synthesis and SAR studies of antibacterial peptidyl derivatives based upon the binding site of human cystatin*, 2019, AMPERE NMR School 2019, poster
6. **Jędrzejewska K.**, Fularczyk M., Kropidłowska M., Mazur-Marzec H., Wieczerek E.: *NMR structure determination of two new cyanopeptolins from the cyanobacterium Nostoc edaphicum CCNP1411*, 2019, AMPERE NMR School 2019, poster
7. **Jędrzejewska K.**, Machowicz D., Kropidłowska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Structure-activity relationship studies of Rpt5(10) peptidic proteasome activator by alanine scan*, 2019, 25th Polish Peptide Symposium 2019, poster
8. Fularczyk M., Dzierżyńska M., Sawicka J., **Jędrzejewska K.**, Rodziewicz-Motowidło S., Kasprzykowski F.: *Design of peptide hydrogel based on RADA16-I peptide*, 2018, Chemistry As INnowating Science 2018, poster
9. Fularczyk M., Dzierżyńska M., Sawicka J., **Jędrzejewska K.**, Rodziewicz-Motowidło S., Kasprzykowski F.: *Hydrożele peptydowe w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej*, 2018, II Konferencja Doktorantów Pomorza "BioMed Session" 2018, poster
10. Fularczyk M., Dzierżyńska M., Sawicka J., **Jędrzejewska K.**, Rodziewicz-Motowidło S., Kasprzykowski F.: *pH-sensitive self-assembling peptide hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine: design and synthesis*, 2018, 25th Young Research Fellow Meeting 2018, poster
11. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Fularczyk M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Stimulation of 20S proteasome activity by peptides derived from Cdc48 protein*, 2018, 25th Young Research Fellow Meeting 2018, poster
12. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Giżyńska M., Fularczyk M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Studies of  $\alpha$ -synuclein interaction with human 20S proteasome by MicroScale Thermophoresis*, 2018, Chemistry As INnowating Science 2018, poster
13. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Karpowicz P., Fularczyk M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Wpływ analogów peptydu "Rpt5" na aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S*, 2018, II Konferencja Doktorantów Pomorza "BioMed Session" 2018, poster

14. Kropidłowska M., **Jędrzejewska K.**, Giżyńska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Can we find modulators of proteasome activity among polyphenols?*, 2018, Chemistry As INnowating Science 2018, poster
15. Kropidłowska M., Pierzynowska K., Wityk P., **Jędrzejewska K.**, Giżyńska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Poszukiwanie modulatorów aktywności proteasomu wśród związków polifenolowych*, 2018, II Konferencja Doktorantów Pomorza "BioMed Session" 2018, poster
16. Kropidłowska M., **Jędrzejewska K.**, Mazur-Marzec H., Kasprzykowski F., Karska N., Witkowska J., Giżyńska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Study and synthesis of nostocyclopeptides produced by Nodularia spumigena as potential inhibitors 20S proteasome activity*, 2018, 25th Young Research Fellow Meeting 2018, poster
17. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *The influence of the chain length of peptides derived from 19S RP on 20S proteasome activity*, 2017, Scientific meeting "Allostery and Molecular Machines" 2017, referat wygłoszony
18. Bojko M., Spodzieja M., Fularczyk M., **Jędrzejewska K.**, Magiera K., Holak T., Dubin G., Rodziewicz-Motowidło S.: *Searching for potential peptide inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 complex*, 2017, Bioinnovation International Summit 2017 2017, poster
19. Fularczyk M., Dzierżyńska M., **Jędrzejewska K.**, Sawicka J., Bojko M., Rodziewicz-Motowidło S., Kasprzykowski F.: *Design and synthesis of new peptide hydrogels for medical and related application*, 2017, Bioinnovation International Summit 2017 2017, poster
20. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Fularczyk M., Bojko M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Modulation of 20S proteasome activity by peptides derived from VCP (Valosin-Containing Protein)*, 2017, Bioinnovation International Summit 2017 2017, poster
21. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Stimulation of 20S proteasome activity by C-terminal peptides derived from Rpt subunits of 19S regulatory particle*, 2017, 24th Polish Peptide Symposium 2017, poster
22. Kropidłowska M., **Jędrzejewska K.**, Mazur-Marzec H., Kasprzykowski F., Jankowska E., Wieczerek E.: *Peptides produced by Nodularia spumigena as potential modulators of 20S proteasome activity*, 2017, 24th Polish Peptide Symposium 2017, poster
23. Fularczyk M., Karska N., **Jędrzejewska K.**, Kasprzykowski F., Lipińska A., Rodziewicz-Motowidło S.: *Synteza oraz badania konformacyjne fragmentu białka UL 49.5 bydłęcego herpeswirusa typu 1*, 2016, XIX Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2016, poster
24. **Jędrzejewska K.**, Kropidłowska M., Fularczyk M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Modulation of 20S proteasome activity by peptides derived from Rpt units of 19S regulator*, 2016, XIX Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2016, poster
25. Kropidłowska M., **Jędrzejewska K.**, Żygowska J., Świerżewska S., Giżyńska M., Jankowska E., Wieczerek E.: *Searching for modulators of proteasome activity among phenolic acids*, 2016, 2nd Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics 2016, poster
26. Kropidłowska M., **Jędrzejewska K.**, Wieczerek E.: *Zastosowanie metody hydrazydowej w ligacji fragmentów peptydowych*, 2015, XVIII Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2015, poster