



Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Karolina Trepczyk

**Projektowanie i synteza stabilnych proteolitycznie  
i przenikających przez błony komórkowe aktywatorów  
ludzkiego proteasomu 20S oraz zbadanie ich wpływu  
na aktywność tego enzymu w modelach komórkowych  
chorób neurodegeneracyjnych**

Promotor:

dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

*Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Biomedycznej*

**Gdańsk 2024**

**Poniższa praca prawdopodobnie nie powstałaby bez udziału wielu osób,  
którym za wszystko pragnę szczerze podziękować.**

Przede wszystkim serdecznie dziękuję mojej promotor  
**dr hab. Elżbiecie Jankowskiej, prof. UG** za przekazaną wiedzę  
oraz zarażenie pasją do nauki.

Dziękuję za nieocenione wsparcie, dobre słowo, każdą uwagę,  
pomoc w przygotowaniu poniższej rozprawy.

Pani Profesor – nie mogłam sobie wymarzyć lepszej Pani Promotor.

Jest Pani wzorem do naśladowania!

Dziękuję również wszystkim koleżankom i kolegom  
z **Katedry Chemii Biomedycznej** za pomoc i serdeczną atmosferę. Szczególnie pragnę  
podziękować moim koleżankom – współlokatorkom z pokoju A113 – **Darii oraz Kasi** –  
za wszystkie przeprowadzone dyskusje, rozmowy dające siłę w trudnych momentach.

Największe podziękowania należą się **mojej Rodzinie**. Bez was nie byłabym tu gdzie jestem  
teraz. Mamo, Tato, Siostró - dziękuję, że zawsze mnie wspieracie, pocieszacie i dopingujecie.

Osobne podziękowania kieruję do **mojego męża Dawida**. Wiesz, że podziękowania oraz  
przemowy nie są moją mocną stroną. Dziękuję Ci za siłę jaką mi dajesz, że we mnie  
wierzysz. Dzięki Tobie wiem, że zawsze dam radę. Dziękuję, że wysłuchujesz moich  
chemicznych historii, problemów i starasz się pomóc w znalezieniu rozwiązania choć chemia  
jest dla Ciebie bardzo odległą dyscypliną.

Dziękuję mojej maleńkiej **córeczce Idalii**, która pisała ze mną tą rozprawę będąc w brzuszku.

Dziękuję również Narodowemu Centrum Nauki za możliwość realizacji zaprezentowanych w  
poniższej pracy badań w ramach finansowania projektu Preludium Bis 1 2019/35/O/NZ7/00227

# Spis treści

<b>Streszczenie</b> .....	6
<b>Summary</b> .....	9
<b>Wykaz skrótów stosowanych w pracy</b> .....	11
<b>I. Wstęp literaturowy</b> .....	14
<b>1. Wprowadzenie</b> .....	14
<b>2. Proteasom 20S</b> .....	15
2.1. Struktura proteasomu 20S.....	15
2.2. Mechanizm rozpoznawania i degradacji substratów przez proteasom 20S.....	17
<b>3. Funkcje proteasomu</b> .....	21
3.1. Szlak ubikwityna – proteasom.....	22
3.2. Degradacja przez proteasom.....	24
3.3. Mechanizm proteolizy.....	25
<b>4. Regulatory aktywności proteasomu</b> .....	27
4.1. Regulator 19S.....	27
4.1.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez 19S.....	28
4.2. Regulator 11S.....	30
4.2.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez regulator 11S.....	32
4.3. Aktywator PA200.....	32
4.3.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez PA200.....	33
4.4. Blm10.....	35
4.4.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez Blm10.....	36
4.5. Aktywacja proteasomu przez motyw HbYX.....	37
<b>5. Dysfunkcje proteasomalnego systemu degradacji białek</b> .....	<b>39</b>
5.1. Wpływ procesów starzenia na aktywność proteasomu.....	39
5.2. Choroby neurodegeneracyjne.....	41
<b>6. Powstrzymywanie neurodegeneracji poprzez aktywację proteasomu</b> .....	<b>44</b>
6.1. Bezpośrednia aktywacja proteasomu.....	44
6.2. Pośrednia aktywacja proteasomu.....	50
6.2.1. Aktywacja poprzez nadekspresję jednostek proteasomu.....	50
6.2.1. Aktywacja proteasomu przez stymulację aktywności kinaz.....	51
<b>7. Zastosowanie peptydów jako leki</b> .....	<b>53</b>
7.1. Opracowywanie nowych leków peptydowych.....	55
7.2. Modyfikacje zwiększające stabilność proteolityczną peptydu.....	57

7.3.	Modyfikacje polepszające przenikalność przez błony komórkowe.....	60
7.3.1.	<i>Mechanizm działania CPP</i> .....	62
<b>II.</b>	<b>Cel pracy</b> .....	<b>64</b>
<b>III.</b>	<b>Metodologia przeprowadzonych badań</b> .....	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>Uwagi ogólne</b> .....	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>Synteza pochodnych aminokwasowych</b> .....	<b>67</b>
<b>3.</b>	<b>Synteza peptydów i peptydomimetyków</b> .....	<b>68</b>
3.1.	Osadzanie pierwszego aminokwasu na nośniku stałym.....	68
3.2.	Sprawdzenie stopnia osadzenia pierwszego aminokwasu na żywicy. ....	69
3.3.	Synteza manualna peptydomimetyków.....	69
3.4.	Synteza z wykorzystaniem automatycznego syntezyatora mikrofalowego .....	70
3.5.	Wprowadzenie do sekwencji wiązania peptoidowego lub <i>N</i> -metylowanych aminokwasów .....	72
3.5.1.	<i>Wprowadzenie wiązania peptoidowego do sekwencji</i> .....	72
3.5.2.	<i>Wprowadzenie <i>N</i>-metylowanych aminokwasów do sekwencji</i> .....	73
3.6.	Synteza Bis1 .....	74
3.7.	Synteza Bis1-tat .....	75
3.8.	Synteza Bis2.....	75
3.9.	Synteza Bis3.....	76
3.10.	Synteza Bis4.....	76
3.11.	Dołączanie fluoroforu NBD do sekwencji.....	77
3.12.	Synteza substratu fluorescencyjnego Dabcyl-EDANS .....	77
3.13.	Synteza sondy fluorescencyjnej TAS3 .....	77
3.14.	Odszczepianie peptydów/peptydomimetyków z nośnika .....	78
<b>4.</b>	<b>Oczyszczanie i charakterystyka peptydów i peptydomimetyków</b> .....	<b>80</b>
<b>5.</b>	<b>Badania strukturalne (dichroizm kołowy)</b> .....	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>Oczyszczanie ludzkiego proteasomu</b> .....	<b>84</b>
6.1.	Izolacja erytrocytów z krwi.....	84
6.2.	Wysalanie siarczanem(VI) amonu .....	84
6.3.	Oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej (kolumna HiTrap CaptoQ).....	85
6.4.	Oczyszczanie za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych (kolumna HiPrep Phenyl FF).....	85
6.5.	Oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej (kolumna Mono-Q)	85
6.6.	Zatężanie oczyszczonego proteasomu .....	86

<b>7.</b>	<b>Badania biologiczne otrzymanych związków .....</b>	<b>86</b>
7.1.	Badanie wpływu otrzymanych związków na aktywność ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem substratów z fluoroforem AMC oraz substratu Dabcyl-EDANS .....	86
7.2.	Ocena stabilności otrzymanych związku w ludzkim osoczu .....	87
7.3.	Badania komórkowe.....	87
7.3.1.	<i>Hodowla komórek.....</i>	87
7.3.2.	<i>Badanie przenikalności znakowanych związków przez błony komórkowe .....</i>	88
7.3.3.	<i>Wpływ otrzymanych związków na przeżywalność hodowli komórkowej.....</i>	88
7.3.4.	<i>Badanie wpływu otrzymanych związków na proteasom w lizacie komórkowym... ..</i>	89
7.3.5.	<i>Badanie wpływu otrzymanych związków na aktywność proteasomu z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej TAS3. ....</i>	89
7.4.	Badanie zdolności wybranych aktywatorów do pokonywania bariery krew-mózg.....	90
7.5.	Badanie wpływu otrzymanych aktywatorów na zdolność proteasomu h20S do trawienia substratów białkowych.....	92
7.6.	Badanie oddziaływania wybranych aktywatorów z proteasomem za pomocą techniki MST (Microscale thermophoresis). ....	92
7.7.	Badania degradacji $\alpha$ -synukleiny w mysim modelu komórkowym choroby Parkinsona.....	93
7.7.1	<i>Izolacja oraz hodowla komórek hipokampalnych .....</i>	93
7.7.2	<i>Indukowanie agregatów <math>\alpha</math>-synukleiny w komórkach oraz wprowadzenie aktywatorów do hodowli komórkowej.....</i>	93
7.7.3	<i>Immunobarwienie .....</i>	94
<b>IV.</b>	<b>Badania własne. Prezentacja i omówienie wyników .....</b>	<b>95</b>
<b>1.</b>	<b>Aktywność zsyntezowanych peptydomimetyków B1m względem ludzkiego proteasomu 20S.....</b>	<b>95</b>
<b>2.</b>	<b>Stabilność proteolityczna otrzymanych aktywatorów w ludzkim osoczu. 108</b>	
<b>3.</b>	<b>Wpływ wprowadzenia CPP do sekwencji aktywatorów na zdolność do aktywacji proteasomu 20S oraz stabilność.....</b>	<b>112</b>
<b>4.</b>	<b>Zdolność peptydomimetyków B1m do przenikania przez błonę komórkową oraz ich cytotoksyczność.....</b>	<b>117</b>
<b>5.</b>	<b>Pobudzanie przez peptydomimetyki B1m aktywności proteasomu w lizatach komórkowych oraz wewnątrz komórek HEK293T.....</b>	<b>124</b>
<b>6.</b>	<b>Zdolność aktywatorów do pokonywania bariery krew-mózg.....</b>	<b>129</b>
<b>7.</b>	<b>Stymulacja proteasomu 20S przez otrzymane peptydomimetyki B1m do wydajniejszego trawienia substratów białkowych.....</b>	<b>130</b>
<b>8.</b>	<b>Termoforeza mikroskalowa (MST) – badanie oddziaływania aktywatorów z proteasomem 20S. ....</b>	<b>133</b>

<b>9.</b>	<b>Degradacja <math>\alpha</math>-synukleiny w mysim modelu komórkowym choroby Parkinsona.....</b>	<b>136</b>
<b>V.</b>	<b>Podsumowanie.....</b>	<b>139</b>
<b>VI.</b>	<b>Dorobek naukowy .....</b>	<b>143</b>
<b>VII.</b>	<b>Literatura cytowana.....</b>	<b>146</b>
	<b>Wykaz rysunków.....</b>	<b>163</b>
	<b>Wykaz tabel .....</b>	<b>167</b>

## Streszczenie

Choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera, Parkinsona) związane są z zaburzeniami funkcjonowania i stopniowym obumieraniem neuronów. W ostatnich latach liczba osób chorych znacznie wzrosła, dlatego choroby neurodegeneracyjne uważane są za plagę XXI wieku. Szacuje się, iż liczba pacjentów z chorobą Alzheimera potroi się do 2050 roku, jest to m.in. konsekwencją wydłużającej się średniej długości życia. W związku z brakiem skutecznych form leczenia, trudnościami we wczesnym wykrywaniu choroby, a także kosztami opieki, choroby neurodegeneracyjne stanowią poważny globalny problem społeczno-ekonomiczny.

Cechą charakterystyczną chorób neurodegeneracyjnych jest odkładanie się uszkodzonych białek (białka tau oraz amyloidu  $\beta$  w chorobie Alzheimera,  $\alpha$ -synukleiny w przypadku choroby Parkinsona), które w zdrowych komórkach są usuwane przez systemy proteolityczne.

W fizjologicznych warunkach za degradację błędnie ukształtowanych struktur białkowych odpowiedzialny jest m.in. proteasom 20S – multiproteaza składająca się z 28 podjednostek, tworzących cztery heptameryczne, współosiowo ułożone pierścienie. Znajdujące się na zewnątrz pierścienie  $\alpha$  nie są aktywne proteolitycznie. Ich główną funkcją jest kontrola dostępu do centrów aktywnych, znajdujących się wewnątrz kanału katalitycznego. Aktywność proteolityczną w przypadku eukariotów wykazują trzy podjednostki  $\beta$  każdego z pierścieni:  $\beta$ 1 (kaspazopodobną),  $\beta$ 2 (trypsynopodobną),  $\beta$ 5 (chymotrypsynopodobną).

Niestety, z upływem czasu wydajność enzymatyczna proteasomu spada, co ułatwia rozwój chorób neurodegeneracyjnych. Wyniki ostatnich badań przekonują, że stosowanie małocząsteczkowych modulatorów w celu aktywacji proteasomu może zapobiegać akumulacji uszkodzonych białek i może być skuteczną strategią terapeutyczną.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza stymulatorów proteasomu zdolnych do przenikania przez błony komórkowe oraz stabilnych w warunkach proteolitycznych. Modulatory te zaprojektowane zostały w oparciu o sekwencję aktywatora BIm-pep. Chcąc uzyskać modulatory o podwyższonej odporności na działanie enzymów proteolitycznych wykonano syntezę modulatorów z wprowadzonymi modyfikacjami w postaci wiązania peptoidowego lub *N*-metylowanych aminokwasów. Zsyntezowano również aktywatory posiadające zduplikowany C-końcowy fragment macierzystego

modulatora, chcąc w ten sposób uzyskać związki zdolne do wiązania się w dwóch sąsiadujących kieszeniach proteasomu 20S.

W pierwszym etapie przeprowadzono badania aktywności otrzymanych aktywatorów. Potwierdziły one, iż wprowadzenie modyfikacji w rejonie *N*-końca sekwencji nie wpłynęło negatywnie na zdolność do aktywacji proteasomu 20S, w przeciwieństwie do zmian w fragmencie *C*-końcowym. W kolejnym etapie przeprowadzono badania stabilności proteolitycznej w ludzkim osoczu, które wykazały, że uzyskane peptydomimetyczne analogi charakteryzują się zwiększoną stabilnością w porównaniu z wyjściowymi związkami. Za pomocą analizy MS wykazano, iż w miejscu występowania modyfikacji nie zachodzi proces degradacji. Następnie, w celu uzyskania aktywatorów zdolnych do wnikania do wnętrza komórki, do wybranych sekwencji dołączono fragment peptydowy penetrujący błony komórkowe (ang. *Cell penetrating peptide*, CPP): tat lub 6r. Poprzez zsyntezowanie znakowanych fluoroforem NBD sekwencji aktywator-CPP, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej zweryfikowano przenikalność komórkową otrzymanych związków. Na uzyskanych obrazach widoczna była fluorescencja pochodząca od aktywatorów z fluoroforem NBD wewnątrz komórek HEK293T. W kolejnych etapach badań wykazano, że związki nie są cytotoksyczne dla komórek, co sprawdzono za pomocą testu oceny cytotoksyczności MTT.

Wybrane aktywatory z sekwencją CPP były zdolne do stymulowania proteasomu w hodowli komórkowej, co potwierdzono za pomocą badania aktywności enzymu w lizacie komórkowym oraz wewnątrz komórek, dzięki wykorzystaniu specyficznej dla proteasomu 20S, przenikającej do komórek, fluorescencyjnej sondy TAS3.

Efektywność wybranych aktywatorów przetestowano z użyciem modelowych substratów białkowych. Badane związki były w stanie stymulować proteasomu 20S do wydajniejszego trawienia białka tau oraz  $\alpha$ -synukleiny. Aktywatory z dołączoną sekwencją CPP były również w stanie pokonywać barierę krew-mózg, podczas gdy przenikalność związku wyjściowego osiągała poziom kontroli negatywnej. W kolejnym etapie zostały przeprowadzone badania wykorzystujące technikę MST, które potwierdziły występowanie oddziaływań pomiędzy peptydomimetykami a proteasomem 20S.

Dla wybranych aktywatorów zostały przeprowadzone testy na mysim embrionalnym modelu komórkowym. Związki A1-tat, A1-6r oraz Bis1-tat były zdolne do stymulowania



proteasomu do wydajnej degradacji  $\alpha$ -synukleiny w komórkach hipokampalnych. Ponadto, po siedmiu dniach inkubacji, związki te nie spowodowały obniżenia przeżywalności komórek neuronalnych.

Otrzymane aktywatory ze względu na wysoki poziom aktywacji proteasomu, stabilność w warunkach proteolitycznych oraz zdolność do wnikania do komórek, posiadają pożądane cechy, które umożliwiają terapeutyczne zastosowanie. Modulatory Bln mogłyby przywracać proteostazę u pacjentów cierpiących na powiązane z wiekiem schorzenia, objawiające się akumulacją uszkodzonych białek.

## Summary

Neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease, Parkinson's disease) are associated with impaired functioning and gradual death of neurons. In recent years, the number of people affected by these diseases has increased significantly, which is why neurodegenerative diseases are considered the plague of the 21st century. It is estimated that the number of patients with the Alzheimer's disease will triple by 2050, mainly as a consequence of increasing life expectancy. Due to the lack of effective treatment, difficulties in early detection of the disease, and the costs of care, neurodegenerative diseases constitute a serious global socio-economic problem.

A characteristic feature of neurodegenerative diseases is the deposition of damaged proteins (tau protein and amyloid  $\beta$  in Alzheimer's disease,  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease), which are removed in healthy cells by proteolytic systems.

In physiological conditions, the degradation of incorrectly shaped protein structures is performed, among others, by 20S proteasome - a multiprotease consisting of 28 subunits forming four heptameric, coaxially arranged rings. The  $\alpha$  rings located outside are not proteolytically active. Their main function is to control access to active sites located inside the catalytic channel. Proteolytic activity in eukaryotes is demonstrated by three  $\beta$  subunits of each ring:  $\beta$ 1 (caspase-like),  $\beta$ 2 (trypsin-like),  $\beta$ 5 (chymotrypsin-like).

Unfortunately, over time, the enzymatic efficiency of the proteasome decreases, which facilitates the development of neurodegenerative diseases. The results of recent studies demonstrate that the use of small-molecule modulators to activate the proteasome can prevent the accumulation of damaged proteins and may be an effective therapeutic strategy.

The aim of this doctoral dissertation was the synthesis of proteasome stimulators capable of penetrating cell membranes and stable under proteolytic conditions. These modulators were designed based on the Blm-pep activator sequence. In order to obtain modulators with increased resistance to the action of proteolytic enzymes, modulators with modifications such as peptoid bonds or N-methylated amino acids were introduced. Activators having duplicated the C-terminal fragment of the parent modulator were also synthesized in order to obtain compounds capable of binding in two adjacent pockets of the 20S proteasome.

In the first stage, the activity of the obtained activators was tested. It was confirmed that the introduction of modifications in the N-terminal region of the sequence did not negatively affect the ability to activate the 20S proteasome, unlike changes in the C-terminal fragment. In the next stage, proteolytic stability tests in human plasma were performed, which showed that the obtained peptidomimetic analogues are characterized by increased stability compared to the starting compounds. MS analysis verified that there is no degradation at the site of modification. Then, in order to obtain activators capable of penetrating cells, a cell penetrating peptide fragment (CPP): tat or 6r was added to the selected sequences. Using the activator-CPP sequences labeled with the NBD fluorophore, the cellular permeability of the obtained compounds was assessed by fluorescence microscopy. The obtained images showed fluorescence coming from NBD fluorophore inside HEK293T cells. In the subsequent stages of the research, it was demonstrated that the compounds were not cytotoxic to cells, which was verified using the MTT cytotoxicity assessment test.

The activators with the CPP sequence were able to stimulate the proteasome in cell culture, which was confirmed by testing the enzyme activity in cell lysate and inside the cells, using the 20S proteasome-specific, cell-permeable, fluorescent TAS3 probe.

The effectiveness of selected activators was tested using model protein substrates. The tested compounds were able to stimulate the 20S proteasome to digest tau protein and  $\alpha$ -synuclein more efficiently. Activators with the CPP sequence attached were also able to cross the blood-brain barrier, while the permeability of the starting compound reached the level of the negative control. In the next stage of the research, studies using the MST technique were carried out, which confirmed the existence of interactions between the peptidomimetics and the 20S proteasome.

For selected activators, tests were performed on a mouse embryonic cell model. Compounds A1-tat, A1-6r and Bis1-tat were able to stimulate the proteasome to efficiently degrade  $\alpha$ -synuclein in hippocampal cells. Moreover, after seven days of incubation, these compounds did not reduce the survival of neuronal cells.

Due to the high level of proteasome activation, stability in proteolytic conditions and the ability to penetrate cells, the obtained activators have desirable features that enable their therapeutic use. Blm modulators could restore proteostasis in patients suffering from age-related diseases characterized by the accumulation of damaged proteins.

## Wykaz skrótów stosowanych w pracy

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, 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:

ACN – acetonitryl

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

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

BAA – kwas bromooctowy

Boc – grupa *tert*-butoksykarbonylowa

CD – dichroizm kołowy (ang. *circular dichroism*)

ChT-L – aktywność chymotrypsynopodobna proteasomu

COMU – heksafluorofosforan (1-cyjano-2-etoksy-2-oksoetylidenoaminoksy)dimetyloaminomorfolinokarbenu

CPP – peptyd penetrujący błony komórkowe, (ang. *Cell penetrating peptide*)

DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenylindol

DCM – dichlorometan

DIC – diizopropylkarbodiimid

DIPEA – diizopropylloetyloamina

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

DMEM – pożywka do hodowli komórkowej, (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMF – dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DPDS – 2,2'-dipirydylodisulfid

DTT – ditiotreitol

DUB – enzym deubikwitynujący, (ang. *Deubiquitinating Enzyme*)

EC50 – połowiczne maksymalne skuteczne stężenie, (ang. *Half Maximal Effective Concentration*)

EDTA – kwas wersenowy

Fmoc – grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa

eq. – równoważnik molowy

HATU – heksafluorofosforan 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametyluroniowy

HCTU – heksafluorofosforan O-(1H-6-chlorobenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy

HD – choroba Huntingtona, (ang. *Huntington's Disease*)

HEK-293 – linia embrionalnych komórek ludzkiej nerki (ang. *human embryonic kidney 293*)

HEPES – kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy

HOBt – 1-hydroksybenzotriazol

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa, (ang. *high-performance liquid chromatography*)

IFN- $\gamma$  – interferon gamma

KBRH – roztwór Krebsa-Ringera, buforowany HEPES, (ang. *Krebs-Ringer bicarbonate HEPES*)

LBs – ciała Lewy'ego (ang. *Lewy Bodies*)

MeOH – metanol

MIm – metyloimidazol

Msnt – 1-(mezytyleno-2-sulfonylo)-3-nitro-1,2,4-triazol

MST – technika mikroskalowej termoforezy

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy

NBD – 4-chloro-7-nitrobenzofurazan

NHS – normalna ludzka surowica

NMP – N-metylopirolidon

Nrf2 – czynnik transkrypcyjny (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

Oxyrna – (hydroksyimino)cyjanooctan etylu

PBL – ekstrakt lipidowy mózgu

PBS – bufor fosforanowy z solą fizjologiczną

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

PFA – paraformaldehyd

PFF – pre-formowane fibryle, (ang. *preformed fibrils*)

PEG – poli(glikol etylenowy)

PGPH – aktywność kaspazopodobna proteasomu

RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz

SDS – dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – elektroforeza żelowa w warunkach denaturujących

SH – SY5Y - komórki ludzkiej linii neuroblastoma

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

TCA – kwas trichlorooctowy

TIPSI – triizopropylosilan

TFA – kwas trifluorooctowy

TFPh – tetrafluorofenol

TNF – czynnik martwicy nowotworu

T-L – aktywność trypsynopodobna proteasomu

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

UHPLC – ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa

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

$\alpha$ -syn –  $\alpha$ -synukleina

y20S – drożdżowy proteasom 20S

# I. Wstęp literaturowy

## 1. Wprowadzenie

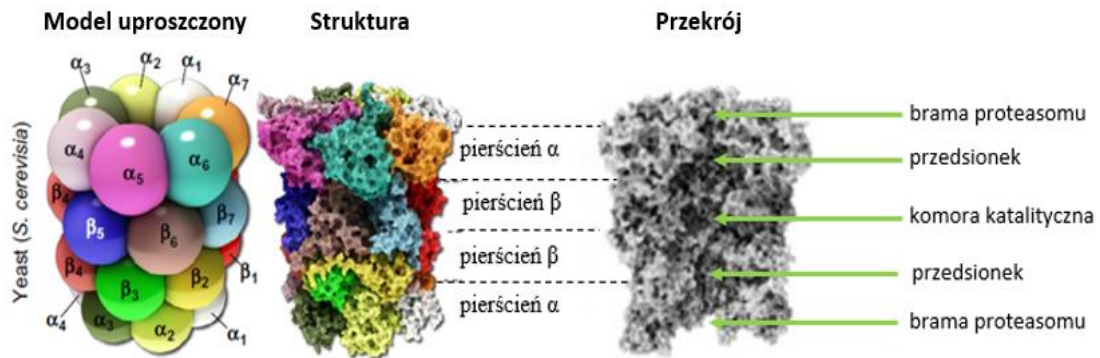
Proteom komórkowy podlega ciągłym procesom modyfikacji i adaptacji, aby prawidłowo reagować na zmieniające się warunki. Synteza, fałdowanie oraz degradacja białek są ściśle skoordynowanymi i regulowanymi mechanizmami. Degradacja odbywa się głównie przez kompleks proteasomowy, który eliminuje wewnątrzkomórkowe, nieprawidłowo sfałdowane, zbędne lub uszkodzone białka. Przez lata proces degradacji przypisywano głównie szlakowi proteasom 26S-ubikwityna. Jednakże obecnie jest oczywiste, że rdzeń proteasomu - 20S, który składa się z dwóch zewnętrznych pierścieni  $\alpha$  i dwóch wewnętrznych pierścieni  $\beta$ , bierze udział w dwóch uzupełniających się strategiach degradacyjnych. W organizmach zdrowych codziennie usuwanych jest 3-5% białek, a w stanach patologicznych liczba ta wzrasta. Degradacja białek jest kluczowym czynnikiem nie tylko w homeostazie białek oraz kontrolowaniu poziomu krótkotrwałych białek regulatorowych, ale także w zapobieganiu akumulacji uszkodzonych białek. Nieprawidłowe działanie tego mechanizmu może prowadzić do różnych chorób, w tym nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych, związanych z postępującymi uszkodzeniami neuronów. Do grupy chorób neurodegeneracyjnych, które dotykają miliony pacjentów na całym świecie, zalicza się m.in. chorobę Alzheimera oraz Parkinsona. Niestety, do tej pory nie ma efektywnych środków terapeutycznych, które mogłyby zatrzymać lub spowolnić postęp tych chorób. Kluczową wspólną cechą tych schorzeń jest oligomeryzacja i agregacja specyficznych, wewnętrznie nieuporządkowanych białek (IDP), tworzących złogi neuronalne. W usuwaniu tych patogennych białek pośredniczy proteasom 20S. Liczba proteasomów nie jest stała i może zmieniać się pod wpływem np. działania stresu lub akumulacji agregatów białkowych. Czynniki te wpływają również na aktywność tego enzymu. Obiecującą strategią terapeutyczną mogłaby być aktywacja proteasomu przy użyciu syntetycznych związków. Liczne badania wykazują, że krótkie peptydy wywodzące się z regulatorów 19S i PA200, zawierające ich C-końcowy motyw HbYX (reszta hydrofobowa - tyrozyna - dowolna reszta aminokwasowa) są w stanie stymulować proteasom 20S.

## 2. Proteasom 20S

### 2.1. Struktura proteasomu 20S

Usuwanie błędnie ukształtowanych oraz uszkodzonych białek odbywa się zwykle poprzez degradację proteolityczną. Najważniejszy, wewnątrzkomórkowy układ proteolityczny znajduje się głównie w cytozolu, gdzie jego zawartość wynosi około 1% wszystkich białek, w niewielkiej ilości występuje również w retikulum endoplazmatycznym oraz strukturach jądrowych [1]. Centralną częścią tego systemu proteolitycznego jest proteasom 20S, będący rdzeniem katalitycznym w kilku różnych strukturach, w których jest on uzupełniony o cząstki aktywatorowe. Jego obecność zidentyfikowano we wszystkich komórkach wielu najstarszych bakterii oraz w komórkach zwierzęcych i roślinnych. Proteasom 20S to cylindryczna struktura o wymiarach 100Å x 160Å, kształtem przypominająca wąską beczułkę. Zbudowany jest z 28 podjednostek, tworzących cztery homologiczne pierścienie, ułożone w kolejności  $\alpha\beta\alpha$  [2], [3], [4] (Rysunek 1). Jak dotąd opisane zostały dwie podstawowe formy proteasomu: pierwotna (prokariotyczna), odkryta w bakteriach Archea, takich jak *Thermoplasma acidophilum*, oraz ewolucyjnie wyższa forma występująca w komórkach eukariotycznych [5]. Obie formy proteasomu posiadają taki sam układ heptamerycznych pierścieni. W przypadku prokariotycznej formy proteasomu każdy z pierścieni zbudowany jest z takich samych podjednostek  $\alpha$  oraz  $\beta$ , natomiast u Eukaryota proteasom 20S zbudowany jest łącznie z 14 różnych podjednostek:  $\alpha_1$ - $\alpha_7$  oraz  $\beta_1$ - $\beta_7$ . Średnia masa cząsteczkowa pojedynczej podjednostki wynosi pomiędzy 20 a 30 kDa, zaś masa cząsteczkowa całej struktury wynosi około 700 kDa. Wewnętrzna część proteasomu jest podzielona na dwa przedsionki, znajdujące się pomiędzy pierścieniami  $\alpha$  i  $\beta$  i prowadzące do komory katalitycznej tworzonej przez pierścienie  $\beta$ . N-końcowe fragmenty zewnętrznych pierścieni  $\alpha$  tworzą bramę proteasomu, kontrolującą dostęp substratów do wewnętrznej komory katalitycznej. Podjednostki  $\alpha$  są w stanie zmienić zarówno specyficzność, jak i aktywność proteasomu, wiążąc na swojej powierzchni białka regulatorowe lub inne modulatory allosteryczne. Połączenie regulatora z pierścieniem  $\alpha$  powoduje zmiany konformacyjne, skutkujące otwarciem bramy, co umożliwia wnikanie substratów do komory katalitycznej oraz ich degradację [6], [7].





Rysunek 1. Model uproszczony oraz struktura krystaliczna eukariotycznego proteasomu 20S.

Centra enzymatyczne u eukariotów zlokalizowane są w trzech parach podjednostek  $\beta$ :  $\beta_1/\beta_1'$ ,  $\beta_2/\beta_2'$ ,  $\beta_5/\beta_5'$ , a każda z nich wykazuje inną preferencję substratową:

$\beta_1$  – aktywność kaspazopodobna (ang. *caspase-like*, C-L), wiązanie peptydowe hydrolizowane jest po aminokwasach o charakterze kwasowym [8];

$\beta_2$  – aktywność trypsynopodobna (ang. *trypsin-like activity*, T-L), wiązanie peptydowe hydrolizowane jest po aminokwasach o charakterze zasadowym;

$\beta_5$  – aktywność chymotrypsynopodobna (ang. *chymotrypsin-like activity*, ChT-L), wiązanie peptydowe hydrolizowane jest po hydrofobowych resztach aminokwasowych [9].

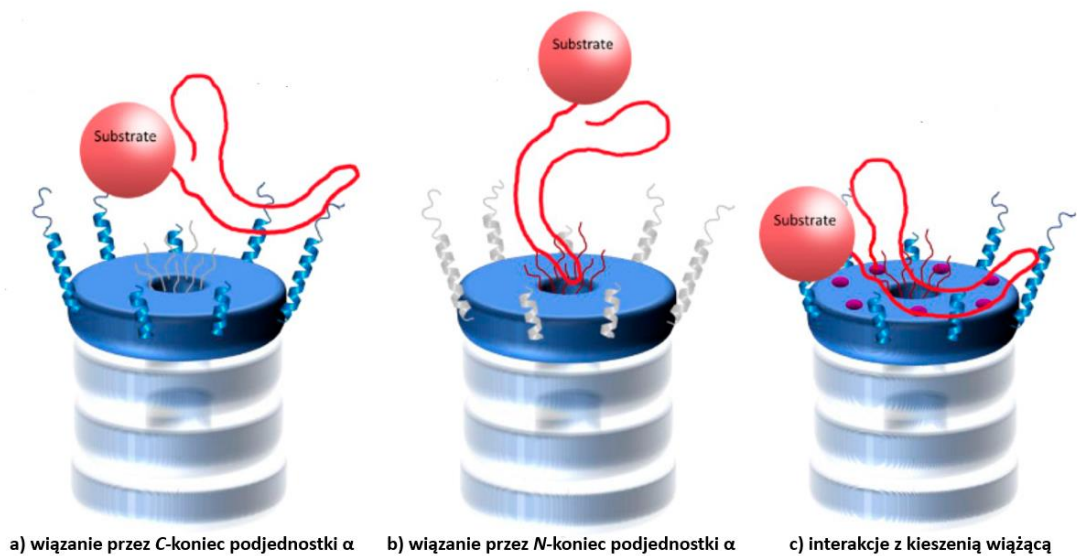
Różnica w specyficzności substratowej wynika z budowy reszty aminokwasowej znajdującej się na dnie kieszeni substratowej S1, w pozycji 45. W kieszeni wiążącej  $\beta_1$  obecna jest Arg45, co zapewnia jej charakter zasadowy, przyczyniając się do aktywności kaspazopodobnej. Podjednostka  $\beta_1$  dodatkowo posiada zdolność do hydrolizy wiązań po resztach aminokwasowych zawierających rozgałęzione łańcuchy boczne (aktywność BrAAP ang. *branched chain amino acid preferring*). Aktywność trypsynopodobna podjednostki  $\beta_2$  wynika z obecności w kieszeni substratowej Gly45, która zapewnia dużo przestrzeni dla zasadowych reszt aminokwasowych z długimi łańcuchami bocznymi. Obecność w kieszeni S1 podjednostki  $\beta_5$  metioniny w pozycji 45 (Met45) sprawia, że ma ona charakter apolarny, co związane jest z aktywnością chymotrypsynopodobną. Reszta Met45 jest mobilna, co daje możliwość zmiany rozmiaru kieszeni, przyczyniając się do różnych preferencji substratowych podjednostki  $\beta_5$ , m.in. hydrolizy wiązania peptydowego między obojętnymi i małymi resztami (ang. *small neutral amino acid preferring*, SNAAP) oraz po resztach aminokwasowych zawierających rozgałęzione

łańcuchy boczne (BrAAP) [10], [11], [12]. W przypadku prokariotów każda podjednostka  $\beta$  wykazuje aktywność chymotrypsynopodobną [13], [14].

## 2.2. Mechanizm rozpoznawania i degradacji substratów przez proteasom 20S

Preferowanymi substratami degradowanymi przez proteasom 20S są białka nieprawidłowo sfałdowane lub nieustrukturyzowane [15]. Za sygnał kierujący substrat do degradacji przez 20S uważa się nieustrukturyzowany, hydrofobowy fragment sekwencji. Wiele białek posiada takie fragmenty, ukryte wewnątrz struktury, bądź chronione przez np. białka opiekuńcze [16]. Odsłonięcie takiego fragmentu kieruje białko do degradacji. Opisano również, iż białko po utlenieniu lub w wyniku uszkodzenia przez stres oksydacyjny staje się substratem proteasomu 20S [17]. Dostęp do kanału katalitycznego odbywa się przez bramę tworzoną przez przeplatające się, wydłużone  $N$ -końce podjednostek  $\alpha$ . Prawdopodobnie po związaniu białkowego substratu dochodzi do zmian konformacyjnych, które powodują przesunięcie równowagi w stronę otwartej formy proteasomu. Każda z siedmiu podjednostek  $\alpha$  posiada na  $C$ -końcu helisę zakończoną skierowaną na zewnątrz pętlą, potencjalnie zapewniając w ten sposób miejsca do asocjacji proteasomu 20S z substratem białkowym (Rysunek 2) [18], [19]. Średnia długość  $C$ -końców wynosi od 15 do 40 reszt aminokwasowych, najdłuższe należą do podjednostek  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  (powyżej 30 reszt aminokwasowych). Kolejnym potencjalnym miejscem oddziaływania substratów z 20S są kieszenie wiążące znajdujące się pomiędzy podjednostkami  $\alpha$ . Udokumentowano, iż kieszenie te wiążą aktywatory zawierające motyw HbYX (Hb – hydrofobowa reszta aminokwasowa, Y – tyrozyna, X – dowolna reszta aminokwasowa) na  $C$ -końcach sekwencji, co wywołuje otwarcie bramy proteasomu. Po wejściu przez bramkowany kanał proteasomu, substrat musi najpierw przemieścić się przez przedsionek, aby później wejść przez otwór wyznaczony przez pierścień  $\beta$  do komory katalitycznej [20]. Średnica tego otworu wynosi około 2,5 nm; obecność kolejnego zwężenia, mimo że jest ono szersze niż brama w pierścieniu  $\alpha$ , zapewnia kolejną możliwość interakcji substratu z proteasomem w celu translokacji w kierunku kanału katalitycznego. Jedna z grup badawczych wykazała, że aktywne podjednostki  $\beta$  przyczyniają się do ciągłego ruchu substratu do wnętrza kanału. Substrat przeciągany jest przez wąski otwór, co prowadzi do rozrywania wiązań wodorowych kolejno po sobie [21]. Szerokość komory katalitycznej wynosi około 5-6 nm. Miejsca katalityczne skierowane są do wnętrza komory. Tylko sześć podjednostek  $\beta$  z czternastu

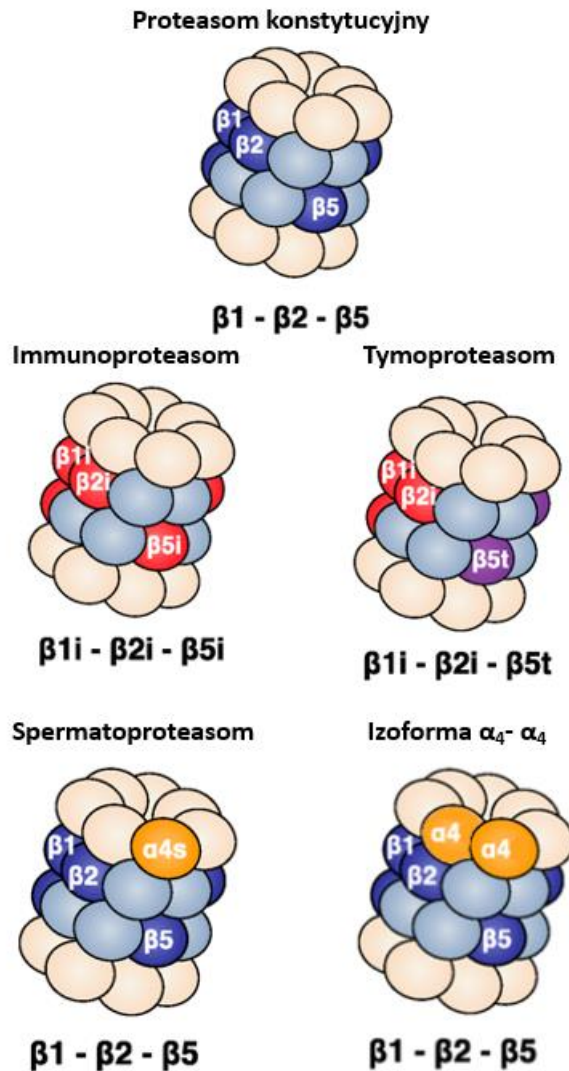
posiada aktywną treoninę na *N*-końcu. Dzięki ich działaniu proteasom może rozszczepić większość wiązań peptydowych. Podjednostki  $\beta_1$  oraz  $\beta_{1'}$  ułożone są jedna nad drugą w przeciwieństwie do podjednostek  $\beta_2/\beta_{2'}$  oraz  $\beta_5/\beta_{5'}$ . Rozluźniony układ podjednostek w podwójnym pierścieniu  $\beta$  pozostawia pewną lukę w podjednostkach  $\beta_4$ , które nie są aktywne proteolitycznie. Być może ta „przerwa proteolityczna” umożliwia częściowe rozszczepienie substratów i powstanie dłuższych produktów peptydowych, które zachowują informację dla dalszej ścieżki [15].



Rysunek 2. Modelowe mechanizmy wiązania substratu przez proteasom 20S [19].

### 2.3. Typy proteasomu

Niewielkie modyfikacje w strukturze konstytucyjnego proteasomu 20S w komórkach eukariotycznych przyczyniają się do powstawania innych podtypów tego enzymu, które posiadają zmienioną specyficzność substratową i/lub odmienne funkcje (Rysunek 3).



Rysunek 3. Uproszczone modele podtypów proteasomu.

Specjalna, indukowalna forma proteasomu 20S nazywana jest immunoproteasomem (i20S). W komórkach odpornościowych, takich jak limfocyty typu B i T, komórki dendrytyczne oraz makrofagi, podjednostki katalityczne  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_5$  są zastępowane przez  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$ ,  $\beta_{5i}$ , tworząc immunoproteasomy. W komórkach nieimmunologicznych i20S powstaje poprzez działanie cytokin prozapalnych, m.in. IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  lub czynnika martwicy nowotworu (TNF). Immunoproteasom charakteryzuje się niższą aktywnością kaspazopodobną oraz wyższą trypsynopodobną i chymotrypsynopodobną. Główną funkcją i20S jest stymulacja układu immunologicznego. Ponieważ i20S wykazuje zwiększoną skłonność do hydrolizowania wiązania po hydrofobowych resztach aminokwasowych oraz resztach o charakterze zasadowym, jest bardziej wydajny niż konstytucyjny proteasom w wytwarzaniu peptydów antygenowych prezentowanych przez cząsteczki MHC-I, które wykazują wysokie powinowactwo do peptydów

zawierających reszty zasadowe lub hydrofobowe na C-końcu [22], [23]. Jest to możliwe, ponieważ podjednostki  $\beta_{1i}$  oraz  $\beta_{5i}$  w i20S charakteryzują się inną budową kieszeni substratowych niż konstytucyjny proteasom, co przyczynia się do odmiennych specyficzności substratowych. Podjednostka  $\beta_{1i}$  hydrolizuje wiązania głównie po resztach aminokwasowych z rozgałęzionymi łańcuchami bocznymi, ponieważ jej kieszeń substratowa S1 ma mniejszy rozmiar i jest bardziej hydrofobowa, co wynika z podstawienia argininy w pozycji 45 leucyną. Na zmienione preferencje substratowe ma wpływ także kieszeń S3 podjednostki  $\beta_{1i}$ . Podstawienie treoniny w pozycji 22 alaniną i alaniny w pozycji 27 waliną w podjednostce  $\beta_{1i}$  oraz podstawienie tyrozyny w pozycji 114 histydyną w sąsiadującej podjednostce  $\beta_{2i}$  skutkuje zmniejszeniem rozmiaru oraz zwiększeniem polarności kieszeni S3 w  $\beta_{1i}$  [24]. Kieszeń substratowa S1 podjednostki  $\beta_{5i}$ , tak jak  $\beta_5$ , ma charakter apolarny, jednakże jest większa, co ułatwia dostęp dużym, hydrofobowym resztom substratu. Kieszeń S3 tej podjednostki preferuje również reszty aminokwasowe o większym rozmiarze oraz bardziej hydrofilowe, ze względu na podstawienie alaniny w pozycji 27 seryną [25], [26].

Kolejną specyficzną podjednostką proteasomu jest  $\beta_{5T}$ , która została odkryta u myszy w komórkach nabłonka grasicy [25].  $\beta_{5T}$  odgrywa ważną rolę w pozytywnej selekcji tymocytów, w związku z tym termin tymoproteasom został zaproponowany do nazwania proteasomu zawierającego podjednostki:  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$ ,  $\beta_{5T}$  [26]. Tymoproteasom odpowiada za generowanie krótkich antygenowych oligopeptydów prezentowanych przez MHC-I na powierzchni komórki, co prowadzi do pozytywnej selekcji komórek CD8<sup>+</sup> T. Biorąc pod uwagę mechanizm pozytywnej selekcji limfocytów CD8<sup>+</sup> T, tymoproteasom o zmniejszonej aktywności chymotrypsynopodobnej, która wynika z polarnej budowy kieszeni S1 [27] może generować ligandy MHC klasy I o niskim powinowactwie, które mogą być wymagane do zapewnienia interakcji o niskiej sile wiązania między kompleksem peptyd-MHC a TCR (receptor komórek T). Możliwe jest również, że tymoproteasom wytwarza zestaw wyspecjalizowanych peptydów, które indukują pozytywną selekcję CD8<sup>+</sup> T, niezależnie od siły wiązania przeciwciała z antygenem.

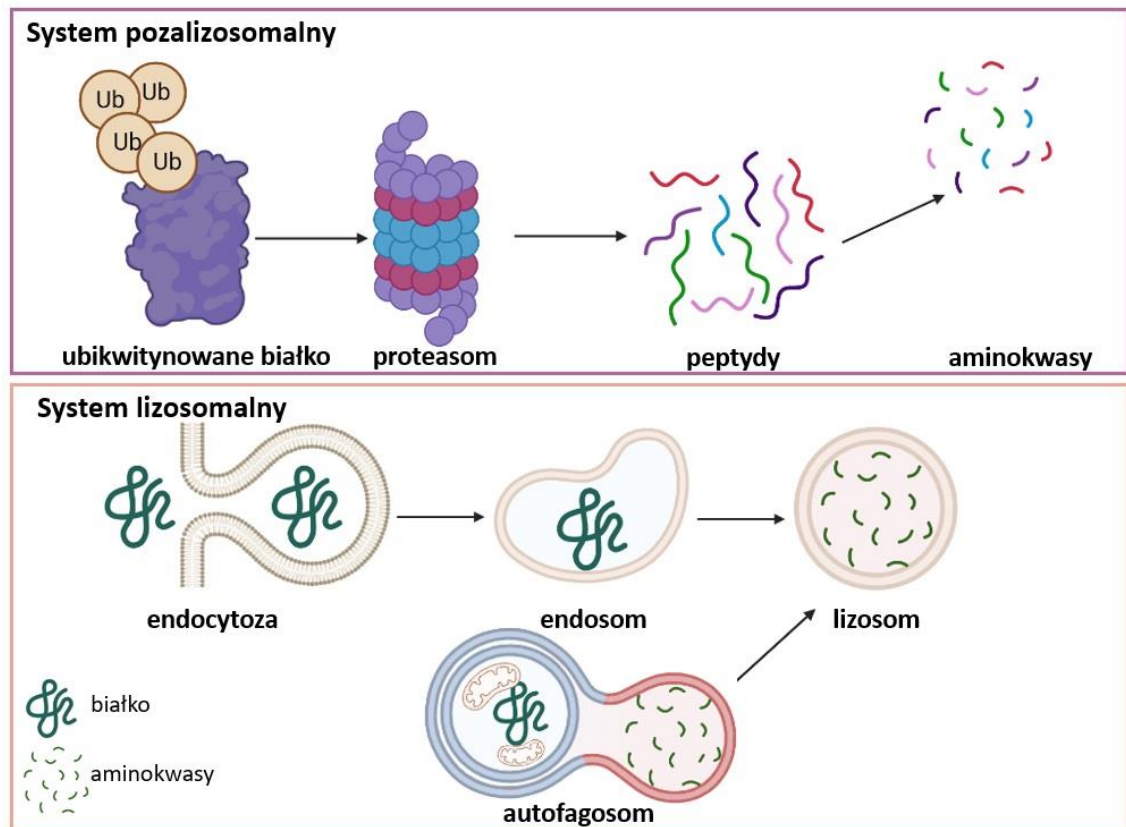
Kolejny typ proteasomu to spermatoproteasom, który posiada unikalną kombinację podjednostek  $\alpha$ . Komora katalityczna spermatoproteasomu jest identyczna z komorą w proteasomie konstytucyjnym. Jedyna różnica polega na pierścieniu  $\alpha$ , który zawiera alternatywną podjednostkę  $\alpha_4 - \alpha_{4s}$  [28], [29]. Podjednostka ta nie modyfikuje aktywności katalitycznej proteasomu i występuje w dojrzałych plemnikach ssaków. Podjednostka  $\alpha_{4s}$

jest niezbędna do prawidłowego tworzenia proteasomu w jądrach, do zależnej od acetylacji degradacji histonów rdzeniowych w spermatocytach oraz do prawidłowego przebiegu mejozy w męskich komórkach rozrodczych [30], [31].

Izoforma  $\alpha_4$ - $\alpha_4$ , w przeciwieństwie do pozostałych podtypów proteasomu, nie zawiera w składzie zmodyfikowanej podjednostki. Posiada natomiast dodatkową podjednostkę  $\alpha_4$  w miejscu podjednostki  $\alpha_3$ . Komórki, w których obecna jest izoforma  $\alpha_4$ - $\alpha_4$  cechują się większą odpornością na działanie stresu oksydacyjnego spowodowanego działaniem jonów metali [32], [33], [34].

### 3. Funkcje proteasomu

Głównym składnikiem budulcowym organizmu są białka. Pełnią one ważną rolę w przebiegu różnych reakcji biochemicznych, ulegając ciągle przemianom w procesach degradacji oraz biosyntezy. Bardzo istotne dla utrzymania homeostazy komórkowej jest usuwanie białek błędnie ukształtowanych lub uszkodzonych [35]. Komórki są chronione przed zmodyfikowanymi białkami dzięki dwóm naturalnym mechanizmom kontrolującym jakość białek: molekularnemu systemowi białek opiekuńczych oraz systemowi degradacji białek. Eukarionty mają dwa główne szlaki degradacji białek [36]. Pierwszym z nich jest układ lizosomalny, który usuwa białka wnikaające do komórki w wyniku endocytozy, a także angażuje się w degradację ulegających autofagocytzie białek wewnątrzkomórkowych (Rysunek 4) [37]. Drugim systemem komórkowym jest system pozalizosomalny, w którym główną rolę odgrywają proteasomy. Jest to droga eliminacji uszkodzonych białek, które powstały w wyniku różnych mutacji, nadmiaru ciepła, zaburzeń translacji, działania wolnych rodników [38]. Substratami proteasomu są też białka krótko żyjące, takie jak: czynniki transkrypcyjne oraz białka regulatorowe, które sterują cyklem komórkowym. Kinazy zależne od cykliny (CDK) są niezbędne do progresji cyklu komórkowego. Cykliny i inhibitory CDK regulują aktywność tych kinaz, a te białka reguluje proteasom. Gdy zostaje zakłócona aktywność proteasomu, następuje zatrzymanie cyklu komórkowego [39]. Do substratów proteasomu należą też onkogeny oraz supresory nowotworowe. W komórkach nowotworowych funkcja homeostatyczna jest rozregulowana, co prowadzi do hiperaktywacji proteasomu. Ta szeroka gama substratów powoduje, że proteasom kontroluje przebieg wielu procesów komórkowych, takich jak transkrypcja, naprawa DNA, reakcja na stres, czy apoptoza [40].



Rysunek 4. Szlaki degradacji białek.

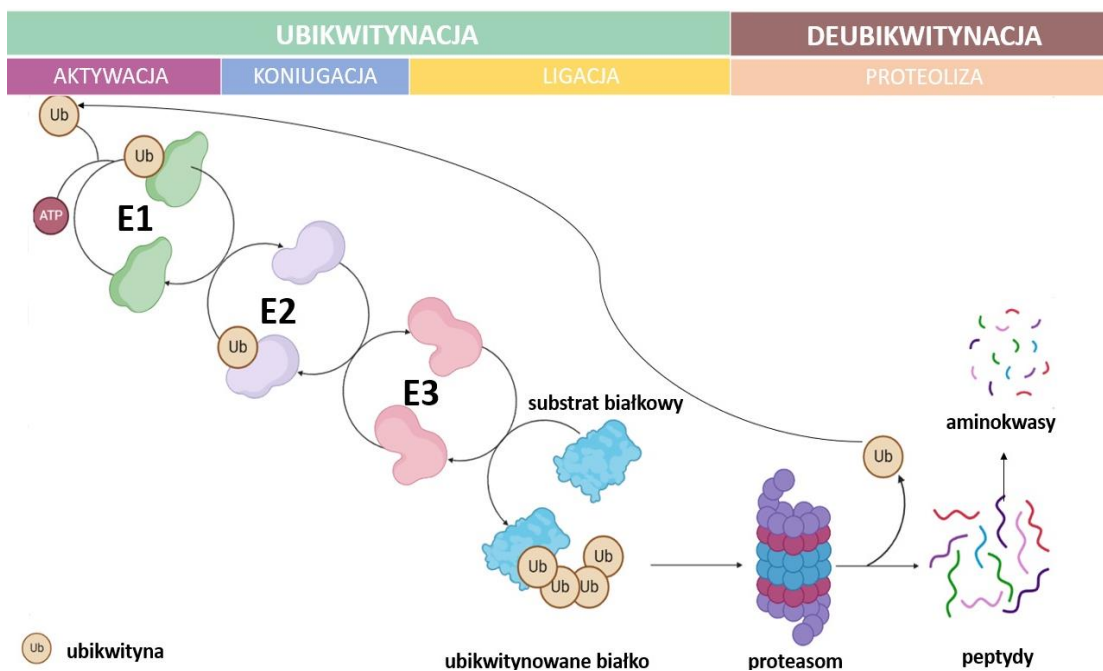
### 3.1. Szlak ubikwityna – proteasom

Układ ubikwityna-proteasom (UPS) składa się ze specyficznych enzymów, które modyfikują substraty białkowe za pomocą ubikwityny (Ub) oraz z proteasomu 26S odpowiedzialnego za proteolizę substratów oznakowanych ubikwityną [41]. Koniugacja substratu z ubikwityną, niewielkim, składającym się z 76 reszt aminokwasowych białkiem, przeprowadzana jest przez wieloetapową, kaskadową reakcję w obecności enzymów E1, E2 i E3 (Rysunek 5). Enzymy aktywujące ubikwitynę (E1) wykorzystują energię z hydrolizy ATP do tworzenia wiązania tioestrowego między C-końcem ubikwityny a resztą cysteiny znajdującą się w miejscu aktywnym enzymu E1. Ta aktywowana ubikwityna jest następnie przenoszona do enzymów koniugujących ubikwitynę (E2), które tworzą wiązanie tioestrowe między resztą cysteiny w miejscu katalitycznym enzymu E2 a ubikwityną. W następnym etapie kompleks E2-Ub wiąże się z ligazą ubikwityny (E3) w celu przeniesienia aktywowanej ubikwityny na substrat białkowy przeznaczony do degradacji. Powstaje wiązanie izopeptydowe pomiędzy grupą ε-aminową lizyny substratu białkowego a C-końcową grupą karboksylową Ub [42].

Ludzki genom zawiera dwa geny E1: UBA1 i UBA6, około pięćdziesiąt genów E2 oraz geny kodujące około 700 enzymów E3. Enzymy E3 podzielone są w oparciu o mechanizm, którego używają do przenoszenia ubikwityny z enzymu E2 na substrat [43]. Pierwsza grupa to RING E3 (*ang. Really Interesting New Gene*). Jest to największa klasa enzymów E3, która pomaga przenosić ubikwitynę przyłączoną do E2 bezpośrednio do substratu białkowego, bez tworzenia wiązań tioestrowych z ubikwityną [44], [45]. Kolejna grupa – HECT E3 (*ang. homologous to E6-APcarboxyl terminus*) – poprzez resztę cysteiny w miejscu aktywnym E3 wiąże ubikwitynę przyłączoną do E2, a następnie przenosi ją na docelowy substrat białkowy [46]. Ostatnia grupa to RBR E3 (*ang. RING-in-Between-RING*), która łączy ze sobą dwie domeny RING [47]. Jedna z domen RING bierze udział w tworzeniu kompleksu z E2-Ub, druga zawiera resztę cysteiny, która tworzy wiązanie tioestrowe z ubikwityną przyłączoną do E2 [48].

Ubikwityna zawiera siedem reszt lizyny (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63) i wszystkie one mogą się kowalencyjnie przyłączać do innych cząsteczek ubikwityny; w ten sposób powstają różne rozgałęzione lub liniowe łańcuchy poliubikwitynowe [49]. Koniugaty poliubikwityny powstałe z udziałem Lys48 i Lys11 są uznane jako najsilniejsze sygnały do degradacji przez proteasom, natomiast łańcuchy poliubikwitynowe z Lys63 są związane z degradacją nieproteosomalną, mogą indukować degradację substratu białkowego poprzez szklak autofagii. Inne typy wiązań nie są tak dobrze scharakteryzowane [50].





Rysunek 5. System proteolityczny ubikwityna – proteasom 26S (UPS).

Rozpoznanie ubikwitynowanego substratu białkowego dokonują specyficzne receptory Ub regulatora 19S [51]. Możliwe jest również wiązanie substratów przez zewnętrzne receptory z rodziny białek UbL-UBA, które zawierają domeny oddziałujące z proteasomem (ang. *ubiquitin-like*, UbL) oraz wiążące łańcuch poliubikwitynowy (ang. *ubiquitin-associated*, UBA) [52]. Ubikwitynowane białka są wychwytywane przez te receptory, a następnie ulegają deubikwitynacji przez proteasom. Podstawa 19S składa się z sześciu różnych podjednostek Rpt o charakterze ATPazy, które dostarczają energii potrzebnej do otwarcia kanału katalitycznego proteasomu [53]. Pierścień podjednostek Rpt rozwija łańcuchy białkowe, ułatwiając migrację substratu do wnętrza komory katalitycznej proteasomu, gdzie następnie ulega on hydrolizie. W tym samym czasie ubikwityna jest uwalniana przez enzymy deubikwitynujące (DUB), po czym kierowana jest do cytozolu w celu powtórnego wykorzystania do znakowania kolejnych białek [54].

### 3.2. Degradacja przez proteasom

Szacuje się, że zawartość proteasomów 20S w komórce wynosi 45-75% i jest wyższa niż proteasomów 26S, których zawartość wynosi 15-25% [19]. Proteasom 20S nie jest zdolny do degradacji ubikwitynowanych białek, ale jest w stanie skuteczniej niż proteasom 26S usuwać białka uszkodzone przez działanie wolnych rodników lub powstałe w warunkach utleniających [55], [56]. Ponadto proteasom 20S jest w stanie wykonać proteolizę

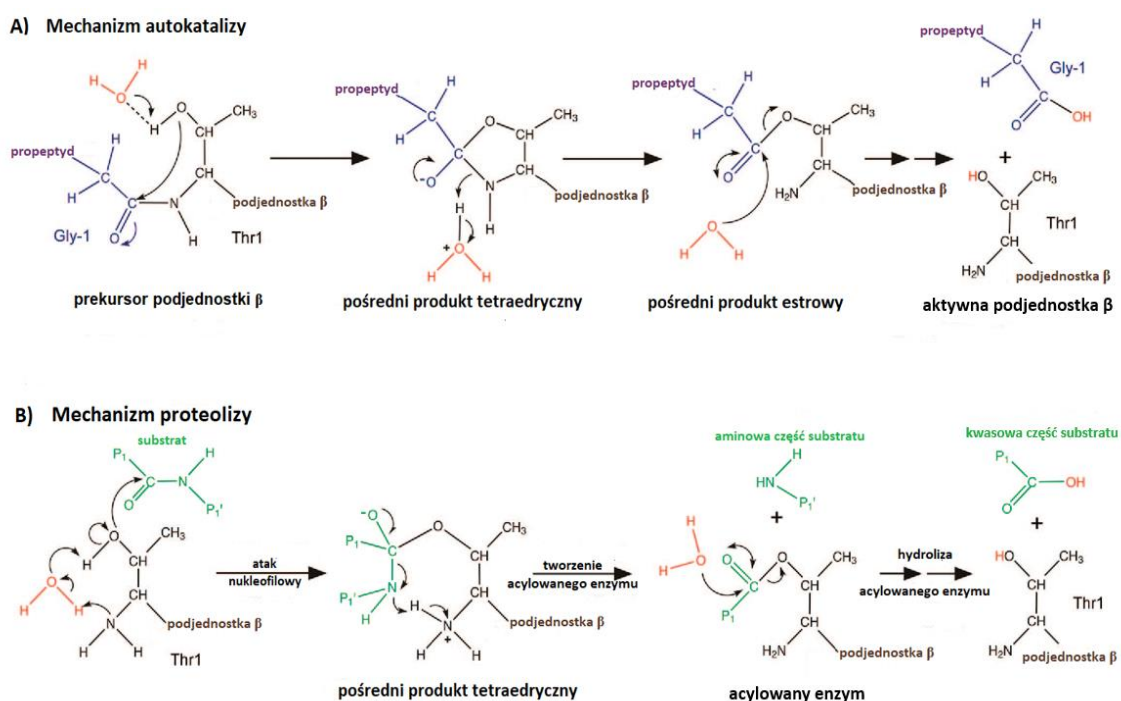
wewnętrznie nieuporządkowanych białek – IDP (z ang. *intrinsically disordered protein*), które pozbawione są struktury trzeciorzędowej oraz białek, które w swojej strukturze zawierają motyw IDR (z ang. *intrinsically disordered region*). Do tej grupy należą podstawowe białka sygnałowe, regulatorowe oraz białka, których agregaty są powiązane z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych, takie jak białko tau czy  $\alpha$ -synukleina. Jak dotąd, nie poznano do końca mechanizmu tłumaczącego sposób kierowania substratów na szlak degradacji przez proteasom 20S. Przeprowadzono badania z wykorzystaniem metody Bifc (ang. *Bimolecular fluorescence complementation*), na podstawie których wykazano, że podjednostka  $\alpha_7$  może odgrywać kluczową rolę podczas rozpoznawania substratu przez proteasom. Wydaje się, że znajdujący się na zewnątrz struktury C-koniec podjednostki  $\alpha_7$  odpowiada za oddziaływanie z białkami IDP, poprzez stabilizowanie ich w miejscu znajdującym się blisko bramy prowadzącej do komory katalitycznej [57].

### 3.3. Mechanizm proteolizy

Typowymi produktami degradacji proteasomalnej są oligopeptydy o długości od 2 do 35 reszt aminokwasowych; średnia długość powstałych peptydów wynosi 8-12 reszt [58]. Za degradację odpowiadają miejsca aktywne zlokalizowane w podjednostkach  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_5$ . We wszystkich trzech aktywnych podjednostkach centrum aktywne tworzone jest przez N-końcową resztę treoniny (Thr1) [59]. Podjednostki proteasomu posiadające właściwości proteolityczne powstają w formie nieaktywnej, dopiero po autokatalizie odłączony zostaje N-końcowy propeptyd, co prowadzi do ekspozycji katalitycznej Thr1 [60].

Początkowym etapem mechanizmu reakcji proteolizy jest aktywacja reszty Thr1 (Rysunek 6). Aktywację tę można osiągnąć poprzez przeniesienie protonu z grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym treoniny do najbliższego w otoczeniu akceptora protonu. Mechanizmowi tego konkretnego etapu poświęcono wiele uwagi w ciągu ostatnich dwóch dekad [61], [62]. Niektórzy badacze sugerowali, że nukleofil Thr1O<sup>y</sup> jest aktywowany przez bezpośrednie przeniesienie protonu do własnej grupy aminowej Thr1-NH<sub>2</sub>. Zhan i wsp. udowodnili jednak, że transfer protonu zachodzi za pośrednictwem cząsteczki wody [63]. Atak nukleofilowy Thr1O<sup>y</sup> na karbonyłowy atom węgla w wiązaniu peptydowym powoduje uwolnienie pierwszego produktu, zawierającego wolną grupę aminową, a także utworzenie przejściowego kompleksu acyl-enzym.

W kolejnym etapie kompleks pod wpływem cząsteczki wody ulega hydrolizie, tworząc produkt z wolną C-końcową grupą karboksylową, jednocześnie uwalniając enzym [64]. Najnowsze badania dotyczące mechanizmu proteolizy wskazują również na możliwość, iż pobliska reszta lizyny (Lys33) działa jako akceptor protonu, tworząc z resztą Thr1 oraz Asp/Glu17 triadę katalityczną. Asp17O<sup>δ</sup> jest wówczas stabilizowany w odpowiedniej pozycji przez Lys33NH<sub>2</sub>, a grupa Thr1NH<sub>3</sub><sup>+</sup> bierze udział w tworzeniu wiązania wodorowego z atomem azotu wiązania peptydowego. Ostatecznie w zaproponowanym mechanizmie cząsteczka wody jest deprotonowana przez N-końiec Thr1, dzięki czemu możliwy jest atak nukleofilowy na karbonylowy atom węgla w kompleksie acyl-enzym [60].



Rysunek 6. Mechanizm autokatalityczny oraz proteolityczny proteasomu 20S. A) Przedstawienie głównych kroków prowadzących do uzyskania aktywnej formy podjednostki  $\beta$ . B) Mechanizm prowadzący do hydrolizy wiązania peptydowego substratu przez N-końcową resztę Thr1 [5].

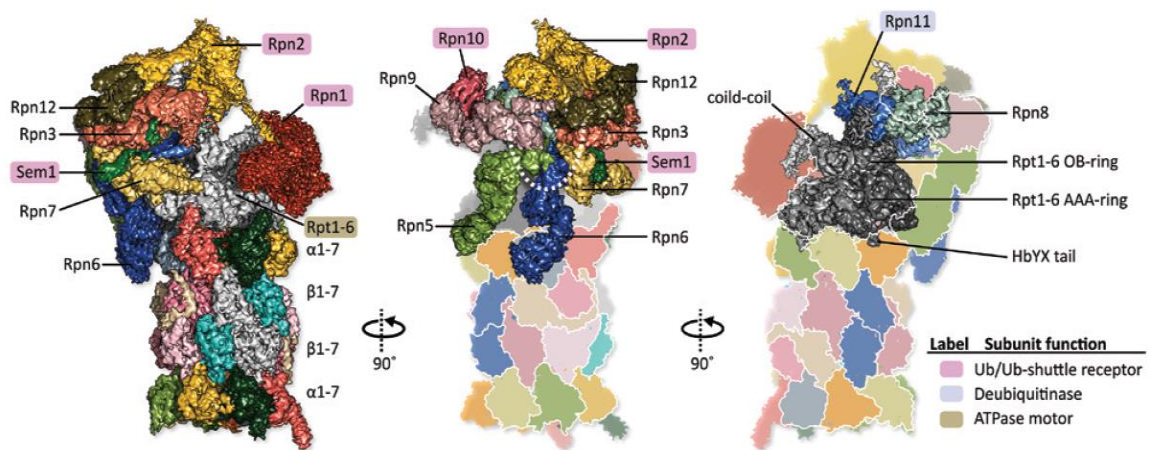
## 4. Regulatory aktywności proteasomu

### 4.1. Regulator 19S

Aby zapobiec niekontrolowanej degradacji proteolitycznej aktywność proteasomu musi być dokładnie regulowana poprzez: zmianę na poziomie ekspresji podjednostek, modyfikacje potranslacyjne oraz zmiany w składzie proteasomu, a także przyłączenie naturalnych aktywatorów. Dotychczas zidentyfikowano kilka białkowych aktywatorów proteasomu; niektóre z nich są zależne od ATP i ubikwityny, a inne działają niezależnie od tych cząsteczek. Aktywatory wpływają na konformację tworzących bramę podjednostek  $\alpha$ , co prowadzi do otrzymania otwartej formy proteasomu [1].

Wśród dotychczas znanych aktywatorów proteasomu, 19S/PA700 jest najbardziej złożonym makrocząsteczkowym tworem. Jego funkcją jest rozpoznanie ubikwitynowanych białek, usunięcie łańcuchów ubikwityny, rozwinięcie substratu oraz utworzenie pierścienia  $\alpha$  proteasomu. Jedna lub dwie cząsteczki regulatora 19S mogą przyłączyć się do proteasomu, tworząc proteasom 26S. Regulator 19S składa się z co najmniej 19 podjednostek kanonicznych, które można podzielić na dwa subkompleksy: podstawę oraz wieko. W podstawie znajduje się 10 podjednostek; sześć podjednostek posiadających aktywność ATPaz (Rpt 1-6) oraz cztery nie-ATPazowe podjednostki Rpn: Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13. Pozostałe dziewięć podjednostek: Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn9, Rpn11, Sem1 tworzy pokrywę (Rysunek 7) [65], [66]. Oba subkompleksy zawierają białka o masie cząsteczkowej od 10 do 110 kDa. Główną funkcją pokrywy 19S jest deubikwitynacja przechwyconych substratów. Aby doszło do rozpoczęcia deubikwitynacji konieczne jest rozpoznanie substratu przez podjednostki Rpn1, Rpn10, Rpn11 lub Rpn13 regulatora 19S, zawierające na swojej powierzchni miejsca wiążące ubikwitynę oraz białka jej pokrewne (UBL). Następnie metaloizopeptydaza Rpn 11 rozszczepia łańcuch poliubikwityny poprzez hydrolizę wiązania izopeptydowego pomiędzy lizyną substratu a C-końcem pierwszej ubikwityny [67]. Ponadto w komórkach ssaków występują dwa związane z proteasomem enzymy DUB: Usp14 jest związany z Rpn1 i wiąże drugi z enzymów, Uch37, z Rpn2 poprzez Rpn13 [68], [69]. Podstawę 19S tworzy heksameryczny zbiór podjednostek Rpt 1-6, który oddziałuje bezpośrednio z pierścieniem  $\alpha$  proteasomu. Odpowiedzialny jest przede wszystkim za rozwijanie substratu oraz jego translokację do proteasomu 20S. Dodatkowo reguluje otwieranie bramy proteasomu poprzez zakotwiczenie C-końcowych fragmentów podjednostek Rpt

w kieszeniach proteasomu znajdujących się między podjednostkami  $\alpha$ . Pozostałe podjednostki, do których należą receptory ubikwityny, deubikwitylazy oraz białka rusztowania, częściowo otaczają heksamer Rpt1-6. Interakcja pomiędzy podjednostkami posiadającymi aktywność ATPaz oraz podjednostkami nie posiadającymi takich właściwości pomaga sprawnie połączyć procesy rozpoznawania ubikwitynowanego substratu, jego przetwarzania, rozfałdowywania oraz transportu do wnętrza proteasomu [70], [71], [72].



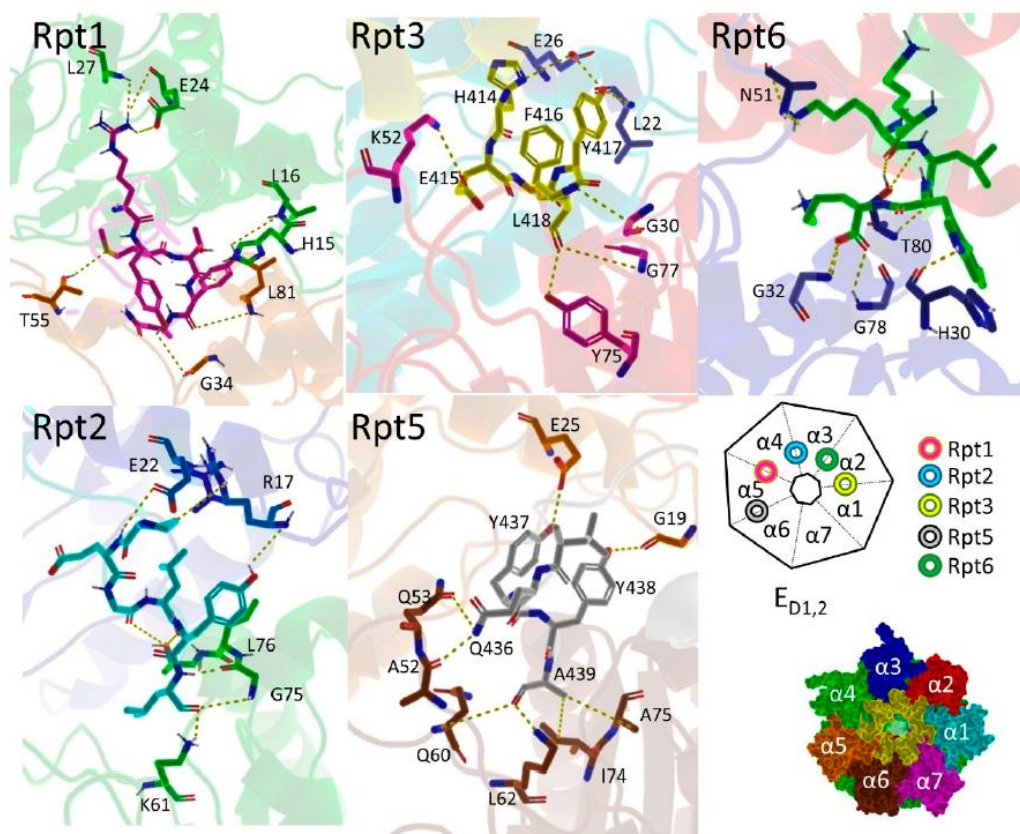
Rysunek 7. Wyznaczona metodą mikroskopii krioelektronowej (krio-EM) struktura ludzkiego proteasomu 26S z przylączoną pojedynczą cząsteczką regulatora 19S. Struktura jest pokazana w trzech orientacjach obróconych względem siebie o kąt 90° [68].

#### 4.1.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez 19S

C-końcowy motyw HbYX, składający się z hydrofobowej reszty aminokwasowej, tyrozyny oraz dowolnej reszty aminokwasowej, jest kluczowy dla mechanizmu aktywacji proteasomu. Wśród podjednostek Rpt regulatora 19S taki motyw posiadają: Rpt2, Rpt3, Rpt5. Występuje on też w innych białkach aktywujących proteasom, np. Blm10, PA200 [73]. Pierwsze przeprowadzone badania strukturalne i biochemiczne przy użyciu kompleksu proteasomu z PAN, który jest występującym u archeonów homologiem 19S, wykazały, że zadokowanie motywu HbYX powoduje otwarcie bramy proteasomu. Udowodniły też istotność reszty hydrofobowej oraz przedostatniej tyrozyny dla mechanizmu aktywacji. W eksperymencie tym końcowy aminokwas miał pewien stopień zmienności i jego łańcuch boczny nie odgrywał żadnej roli w mechanizmie [74].

Kolejne wyniki badań dynamiki 26S pozwalają na stopniowo coraz lepsze rozumienie procesu rozpoznawania substratu, jego rozwijania i translokacji do komory katalitycznej.

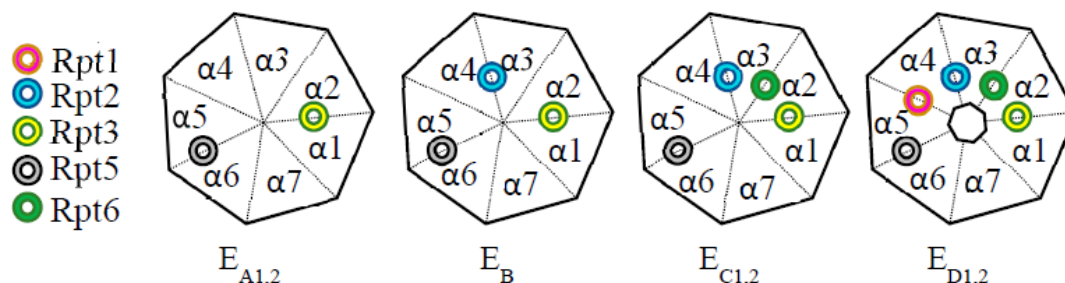
Wyjaśnienie przebiegu procesu otwierania bramy proteasomu po przyłączeniu do niego regulatora 19S stało się możliwe dzięki zaobserwowaniu za pomocą techniki krio-EM siedmiu różnych stanów, przedstawiających zmiany konformacyjne zachodzące na styku powierzchni regulatora 19S z proteasomem 20S (Rysunek 8) [75], [76], [77]. Te nowe dane sugerują, że Rpt3 działa jak kotwica dla podstawy regulatora 19S, ponieważ posiada silne wiązania wodorowe w wielu punktach wzdłuż powierzchni styku podjednostki  $\alpha_2$  z  $\alpha_1$ . Taką samą dynamikę wykazuje podjednostka Rpt5.



Rysunek 8. Sugerowane interakcje między fragmentami C-końców podstawy regulatora 19S z jednostkami  $\alpha$  proteasomu 20S, w stanie otwartej bramy proteasomu. Schemat przedstawia miejsca zakotwiczenia fragmentu danej podjednostki Rpt. Kolory schematu są skoordynowane kolorystycznie z przedstawionym obrazem struktury krystalicznej [73].

Jednak podjednostki pozbawione motywu HbYX również mogą wiązać się do proteasomu. Rpt1 najprawdopodobniej w sposób podobny jak Rpt2, 3 oraz 5, wiąże się z resztami aminokwasowymi w centralnej części podjednostki  $\alpha_4$ , tworząc mostek solny z resztą Glu26 oraz wiązanie wodorowe z resztą Leu27 [78]. Podjednostka Rpt6 posiada niewielkie oddziaływania hydrofobowe z podjednostką  $\alpha_2$  oraz większe z podjednostką  $\alpha_3$ . Zauważono też, że zakotwiczenie pięciu C-końców podjednostek Rpt w kieszeniach znajdujących się pomiędzy podjednostkami  $\alpha$  umożliwia uzyskanie stabilnej, otwartej

konformacji proteasomu Impulsem do wszystkich zmian konformacyjnych, prowadzących do otwarcia bramy i wnikięcia substratu do wnętrza proteasomu 20S, jest energia pochodząca z hydrolizy ATP przez podjednostki Rpt (Rysunek 9) [79].



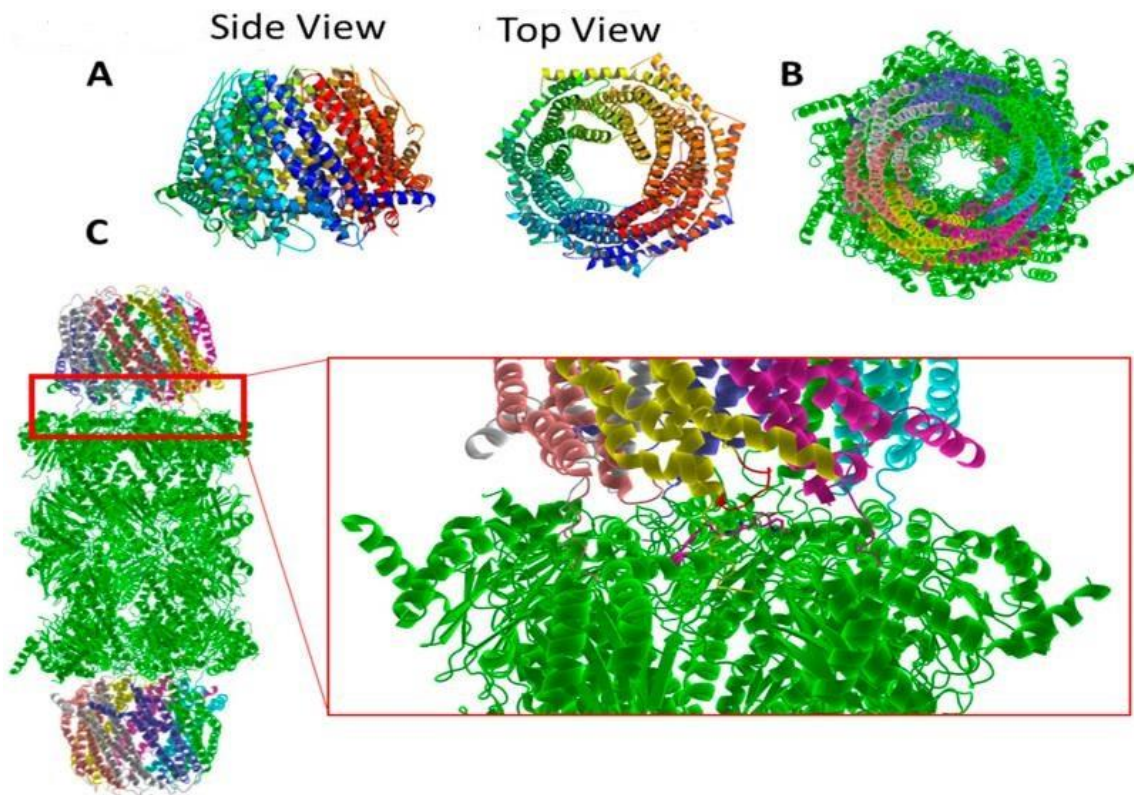
Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie wiązania C-końców fragmentów podjednostek Rpt do kieszeni proteasomu 20S w siedmiu konformacjach, które proteasom przyjmuje po związaniu substratu białkowego.  $E_{A1}$  (przed rozpoznaniem ubikwityny),  $E_{A2}$  (po rozpoznaniu ubikwityny),  $E_B$  (deubikwitynacja),  $E_{C1}$  oraz  $E_{C2}$  (inicjacja translokacji substratu),  $E_{D1}$  oraz  $E_{D2}$  (translokacja) [74], [75].

W zamkniętej konformacji proteasomu bramę zamykającą dostęp do wnętrza kanału katalitycznego tworzą ułożone poziomo  $N$ -końce podjednostek  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  oraz  $\alpha_4$ , a  $N$ -końce podjednostek  $\alpha_1$  i  $\alpha_6$  zwrócone są w kierunku pierścienia ATPaz. W momencie gdy trzy podjednostki Rpt przyłączają się do proteasomu, także te blokujące bramę  $N$ -końce zwracają się w kierunku podstawy regulatora [80], [81].

## 4.2. Regulator 11S

Regulator 11S (znany również jako REG lub PA28 (PA26 w *T. brucei*)) bierze udział w procesach związanych z odpornością immunologiczną [82], [83]. W eukariontach występują trzy izoformy podjednostek regulatora 11S, określane jako  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  tworzą heteroheptamer, który występuje głównie w cytoplazmie, podczas gdy izoforma PA28 $\gamma$  jest homoheptamerem i występuje w jądrze komórkowym [83]. Homomeryczna izoforma PA28 $\alpha$  jest niestabilna, ale może powstawać *in vitro*, podczas gdy PA28 $\beta$  nie ma takiej możliwości [84], [85]. Średnica podstawy regulatora 11S wynosi około 90 Å, a jego wysokość wynosi około 60Å. Regulatory 11S są zdolne do wiązania z zewnętrznymi pierścieniami  $\alpha$  proteasomu 20S i mogą wpływać na jego właściwości degradacyjne (Rysunek 10). Kompleks 11S-20S działa niezależnie od ATP i jest zdolny do degradacji jedynie rozfałdowanych i wewnętrznie nieuporządkowanych białek [86]. Związanie regulatora 11S przyspiesza około 2-krotnie hydrolizę zachodzącą

w podjednostce  $\beta_2$  oraz 50-krotnie hydrolizę zachodzącą w podjednostkach  $\beta_1$  i  $\beta_5$  [87], [88]. Izoforma PA28 $\gamma$  aktywuje tylko podjednostkę  $\beta_2$  [84]. Wiązanie PA28 zmienia konformację proteasomu, czyniąc go bardziej skutecznym w aktywności katalitycznej.



Rysunek 10. Aktywator 11S. A) Aktywator 11S z monomerami oznaczonymi różnymi kolorami. B) Widok z góry drożdżowego kompleksu 11S-20S-11S. C) Widok z boku drożdżowego kompleksu 11S-20S-11S. W czerwonym obramowaniu powiększenie ilustrujące oddziaływanie 11S-20S. Fioletowe reszty ilustrują konserwatywną sekwencję w podjednostce  $\alpha$  proteasomu: Tyr8, Asp9, Pro17, Tyr26, oddziałującą z podjednostką 11S (złoty kolor). Pętla aktywacyjna 11S została przedstawiona w czerwonym kolorze [73].



#### 4.2.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez regulator 11S

Mechanizm aktywacji proteasomu 20S przez regulator 11S został wyjaśniony na podstawie kompleksu PA26 (wersja ludzkiego REG28 w *T. brucei*) z proteasomem *S. cerevisiae* [89], [90] oraz *Thermoplasma acidophilum* [91]. Reszty C-końcowe poszczególnych monomerów PA26 tworzą liczne wiązania wodorowe z podjednostkami  $\alpha$  oraz mostki solne między C-końcową resztą tyrozyny a Lys66 w podjednostkach  $\alpha$ . Aktywator 11S nie posiada motywu HbYX na C-końcu sekwencji. Wykorzystuje swój C-koniec jedynie do dokowania w kieszeniach między podjednostkami  $\alpha$  proteasomu, jednakże jest to niewystarczające aby wywołać otwarcie bramy prowadzącej do miejsc aktywnych. Kluczowe dla otwierania bramy oddziaływania zapewniane są przez pętlę aktywną o sekwencji: SGEKSGSGGAPTPI [92]. Na skutek oddziaływania pętli aktywnej aktywatora następuje przesunięcie reszty Pro17 w każdej podjednostce  $\alpha$  o 0,5-3,5 Å. Te niewielkie ruchy każdej podjednostki indukują otwieranie bramy proteasomu. Zidentyfikowano cztery konserwatywne reszty jako kluczowe dla wiązania i stabilizacji formy otwartej: Tyr8, Asp9, Pro17 oraz Tyr26. Zaobserwowano zmniejszenie stopnia degradacji w zmutowanych proteasomach archeonów z modyfikacjami którejkolwiek z wymienionych reszt [89], [93]. U drożdży te cztery konserwatywne reszty są obecne w każdej podjednostce  $\alpha$ . Jednakże analiza ostatnich struktur krystalicznych ludzkiego proteasomu 20S pokazuje, że dwie podjednostki,  $\alpha 1$  oraz  $\alpha 2$ , nie posiadają tej kluczowej sekwencji reszt aminokwasowych. Cztery podjednostki ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ) posiadają prawidłowo zachowany motyw, tj. Tyr8, Asp9, następnie osiem aminokwasów do reszty Pro17, potem kolejne 9 aminokwasów do reszty Tyr26. Natomiast podjednostka  $\alpha 7$  posiada cztery kluczowe reszty aminokwasowe, ale w innym układzie przestrzennym [79].

#### 4.3. Aktywator PA200

Mechanizm aktywacji proteasomu 20S przez regulator 11S został wyjaśniony na podstawie kompleksu PA26 (wersja ludzkiego REG28 w *T. brucei*) z proteasomem *S. cerevisiae* [89], [90] oraz *Thermoplasma acidophilum* [91]. Reszty C-końcowe poszczególnych monomerów PA26 tworzą liczne wiązania wodorowe z podjednostkami  $\alpha$  oraz mostki solne między C-końcową resztą tyrozyny a Lys66 w podjednostkach  $\alpha$ . Aktywator 11S nie posiada motywu HbYX na C-końcu sekwencji. Wykorzystuje swój C-koniec jedynie do dokowania w kieszeniach między podjednostkami  $\alpha$  proteasomu,

jednakże jest to niewystarczające, aby wywołać otwarcie bramy prowadzącej do miejsc aktywnych. Kluczowe dla otwierania bramy oddziaływania zapewniane są przez pętlę aktywną o sekwencji: SGEKSGSGGAPTPI [92]. Na skutek oddziaływania pętli aktywnej aktywatora następuje przesunięcie reszty Pro17 w każdej podjednostce  $\alpha$  o 0,5-3,5 Å. Te niewielkie ruchy każdej podjednostki indukują otwieranie bramy proteasomu. Zidentyfikowano cztery konserwatywne reszty jako kluczowe dla wiązania i stabilizacji formy otwartej: Tyr8, Asp9, Pro17 oraz Tyr26. Zaobserwowano zmniejszenie stopnia degradacji w zmutowanych proteasomach archeonów z modyfikacjami którejkolwiek z wymienionych reszt [89], [93]. U drożdży te cztery konserwatywne reszty są obecne w każdej podjednostce  $\alpha$ . Jednakże analiza ostatnich struktur krystalicznych ludzkiego proteasomu 20S pokazuje, że dwie podjednostki,  $\alpha 1$  oraz  $\alpha 2$ , nie posiadają tej kluczowej sekwencji reszt aminokwasowych. Cztery podjednostki ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ) posiadają prawidłowo zachowany motyw, tj. Tyr8, Asp9, następnie osiem aminokwasów do reszty Pro17, potem kolejne 9 aminokwasów do reszty Tyr26. Natomiast podjednostka  $\alpha 7$  posiada cztery kluczowe reszty aminokwasowe, ale w innym układzie przestrzennym [79].

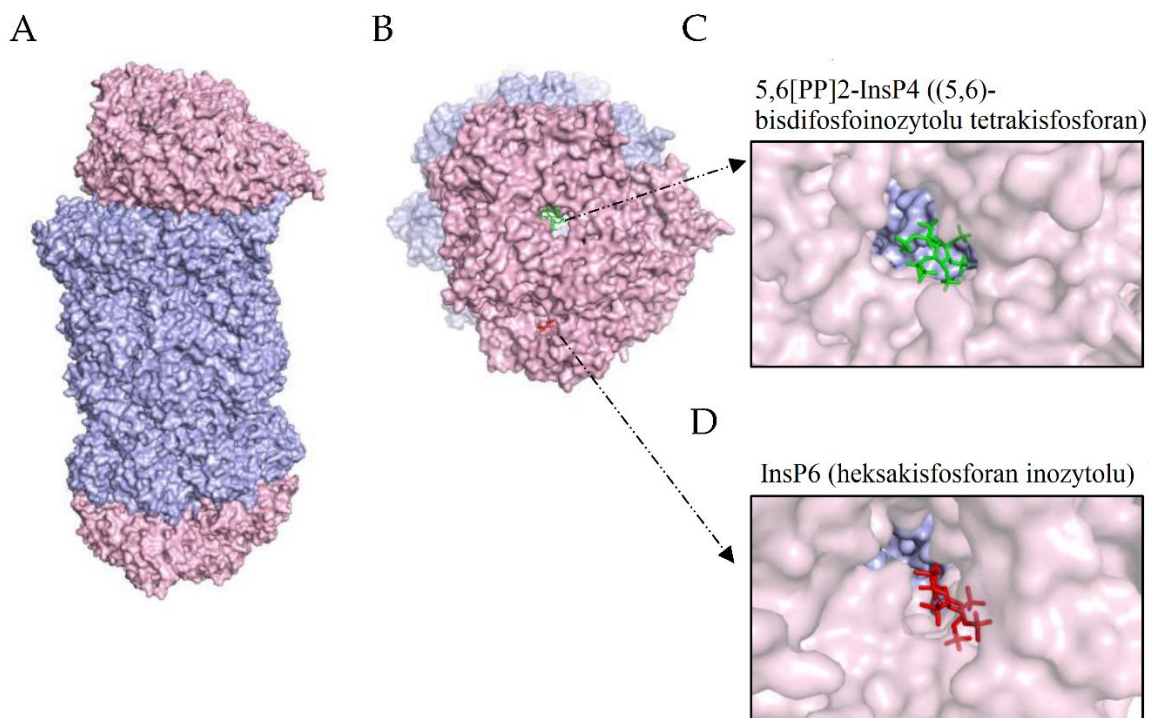
Regulator proteasomu PA200 jest białkiem o masie cząsteczkowej 200 kDa, występującym wyłącznie w jądrze komórkowym. Swoim kształtem przypomina asymetryczną kopułę (średnica 100 Å, wysokość około 60 Å), która może się wiązać do jednego lub dwóch pierścieni  $\alpha$ . W odróżnieniu od innych regulatorów proteasomu, PA200 ma strukturę monomeryczną [94] i występuje szczególnie obficie w jądrach. Myszy z niedoborem PA200 są zdolne do życia oraz nie wykazują żadnych nieprawidłowości oprócz zmniejszenia męskiej płodności, co sugeruje ważną rolę PA200 podczas spermatogenezy [95]. Niedawno przeprowadzone badania wykazały, że poziom PA200 wzrasta w tkankach nowotworowych, a jego ekspresja w niedrobnokomórkowym raku płuc odgrywa rolę przeciwzapalną [96]. Po ekspozycji na promieniowanie jonizujące oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hybrydowy proteasom, z dołączonym regulatorem 19S oraz PA200, gromadzi się na chromatynie, co sugeruje że może odgrywać rolę w naprawie pęknięć podwójnej helisy [97].

#### *4.3.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez PA200*

Jedna ze struktur krystalicznych wskazuje, że wiązanie PA200 z proteasomem 20S odbywa się za pośrednictwem struktury, która zawiera kilka powtórzeń HEAT (ang.

*Huntingtin-elongation factor 3 - PR65/A subunit of PP2A - lipid kinase TOR*). Są to domeny  $\alpha$ -helikalne składające się z około 50 reszt aminokwasowych, które łączą się tworząc wydłużoną superhelisę o wysokim stopniu elastyczności. Takie dwie połączone helisy tworzą podstawową jednostkę powtórzeń HEAT. Ze względu na ich wklęsłą formę, powtórzenia te tworzą dwuwarstwową kopułę umieszczoną nad powierzchnią proteasomu, stykającą się prawie z każdą podjednostką  $\alpha$ , z wyjątkiem  $\alpha_7$  [98]. Brak interakcji podjednostki  $\alpha_7$  z aktywatorem powoduje, iż w miejscu tym pozostaje wolna przestrzeń, umożliwiając dostęp do kanału katalitycznego znajdującego się pod spodem [94]. PA200 wykorzystuje C-końcowy motyw YYA (tyrozyna-tyrozyna-alanina) do indukowania re-aranżacji podjednostek  $\alpha$  proteasomu 20S. Te zmiany powodują częściowe otwarcie bramy proteasomu, ułatwiając wejście substratów i/lub wyjście produktów trawienia. Co więcej, ostatnie dane strukturalne wykazały, że PA200 posiada dwa otwory otoczone skupiskami dodatnio naładowanych aminokwasów, które prawdopodobnie mogą brać udział w kontroli dostępu do kanału katalitycznego w kompleksie PA200-20S [99].

Kolejna struktura ludzkiego PA200 została opublikowana pod koniec 2019 roku. Analiza krio-EM o wysokiej rozdzielczości kompleksu PA200-20S wykazała podobną strukturę kopuły jak poprzednio, składającą się głównie z helikalnych powtórzeń owijających się spiralnie nad pierścieniem  $\alpha$  proteasomu. PA200 jest zakotwiczony w dwóch punktach proteasomu: w pobliżu kieszeni pomiędzy podjednostkami  $\alpha_5$  i  $\alpha_6$  oraz pomiędzy podjednostkami  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ . Po związaniu PA200 podjednostki  $\alpha_5$ - $\alpha_7$  przemieściły się w kierunku wewnętrznej powierzchni PA200, podczas gdy  $\alpha_3$  uległa przesunięciu w sposób powodujący szersze otwarcie pierścienia  $\alpha$ . Te zmiany w podjednostkach  $\alpha$  wpłynęły allosterycznie na podjednostki  $\beta$  posiadające aktywność katalityczną, powodując poszerzenie kieszeni substratowej  $\beta_2$ , natomiast zmniejszenie kieszeni substratowej  $\beta_1$  oraz  $\beta_5$ . Związany jest z tym wzrost aktywności trypsynopodobnej oraz spadek aktywności chymotrypsynopodobnej i kaspazopodobnej [100]. Kolejna struktura krio-EM kompleksu PA200-20S została opublikowana w 2020 roku (Rysunek 11). Tutaj również PA200 znajduje się bezpośrednio na pierścieniach  $\alpha$  proteasomu 20S [99].



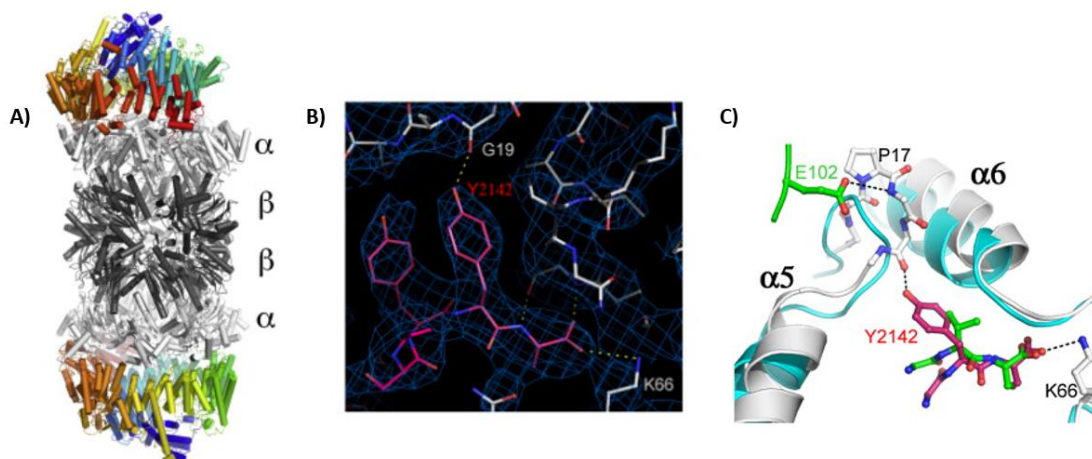
Rysunek 11. Struktura PA200. A) Ogólny widok złożonej struktury PA200-20S-PA200, B) Widok z góry PA200 z przyłączonymi dwiema ujemnie naładowanymi cząsteczkami, C) 5,6[PP]2-InsP4 (tetrakisfosforanem (5,6)-bisdifosfoinozytolu i D) InsP6 (heksakisfosforanem inozytolu) [93].

Wysoka rozdzielczość kompleksów ujawniła dwa dodatnio naładowane miejsca na zewnątrz PA200, które tworzyły potencjalne bramy umożliwiające dostęp substratów do proteasomu. Jednak kanały te były wypełnione przez dwie ujemnie naładowane gęstości: 5,6[PP]2-InsP4 ((5,6)-tetrakisfosforan bisdifosfoinozytolu) i InsP6 (heksakisfosforan inozytolu). W poprzednich strukturach InsP6 był zaangażowany w fałdowanie oraz stabilizację struktury [101], [102]. Niewiele jednak wiadomo na temat roli InsP4 [100]. Niestety, obecnie nie ma struktury PA200 bez obecności tych cząstek. Powyższe dane strukturalne wskazują, iż wiązanie PA200 może: zwiększyć selektywność w kierunku ujemnie naładowanych substratów oraz blokować przedostawanie się do kanału katalicznego dużych i dodatnio naładowanych substratów [103].

#### 4.4. Blm10

Blm10 jest unikalnym regulatorem, który bierze udział w procesie powstawania oraz dojrzewania proteasomu. Może być związany samodzielnie z proteasomem lub w kompleksach hybrydowych z pozostałymi regulatorami aktywności. Blm10 jest drożdżowym odpowiednikiem PA200 i wykazuje z nim 20% zgodności sekwencyjnej. To pojedynczy polipeptyd o masie około 240 kDa. Kompleks Blm10-20S bierze udział

w degradacji krótkich peptydów oraz nieustrukturyzowanych, nie wymagających ubikwitynacji białek, takich jak białko Tau [104]. Blm10 stymuluje degradację histonów oraz białek mitochondrialnych, jego obecność jest konieczna w procesie spermatogenezy i naprawy DNA [105], [106], [107]. Wykazano, że Blm10 może wiązać acetylowane histony w celu umożliwienia ich degradacji przez kompleks Blm10-20S [108], [109].



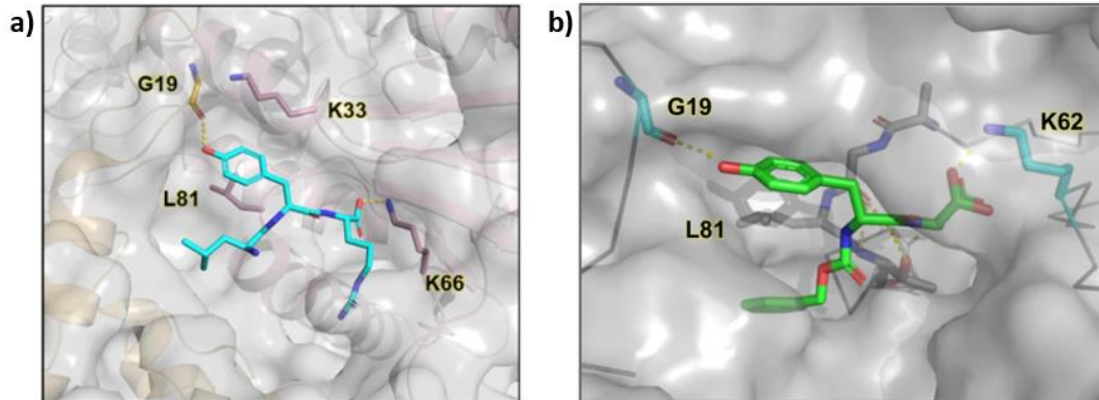
Rysunek 12. Blm10. A) Komplex proteasomu 20S z Blm10, rzut z boku. B) Mapa gęstości elektronowej dla przedostatniej tyrozyny Blm10 (Tyr2142) i otaczających ją reszt z podjednostek  $\alpha$ . C) Nałożone na siebie ostatnie trzy reszty PA26 (zielone) i Blm10 (czerwone) z kompleksów tych białek z proteasomem. Reszta Tyr2142 aktywatora Blm10 stabilizuje otwartą bramę proteasomu przez wiązanie wodorowe z atomem tlenu Gly19  $\alpha_5$ , natomiast PA26 - poprzez wiązania wodorowe pętli aktywacyjnej z resztą Glu102 [102].

#### 4.4.1. Mechanizm aktywacji proteasomu przez Blm10

Blm10 zawiera motyw HbYX na swoim C-końcu, który pozwala mu związać się z pierścieniem  $\alpha$  proteasomu. Ponieważ Blm10, podobnie jak PA200, jest białkiem monomerycznym, wiązanie to zachodzi tylko w jednej kieszeni pomiędzy podjednostkami enzymu, w kieszeni  $\alpha_5$ - $\alpha_6$  [110]. Reszta Lys66 podjednostki  $\alpha_6$  tworzy mostek solny z C-końcową grupą karboksylową Blm10. Z kolei atom tlenu Gly19 z podjednostki  $\alpha_5$  tworzy wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową przedostatniej tyrozyny aktywatora (Rysunek 12). W ten sposób stabilizowane jest ułożenie reszty Pro17 w takiej samej konformacji jak w kompleksie 20S-PA26. Jednakże PA26 stabilizuje pozycję Pro17 we wszystkich podjednostkach, podczas gdy Blm10 tylko w jednej z nich, co prowadzi do częściowo otwartej bramy [111].

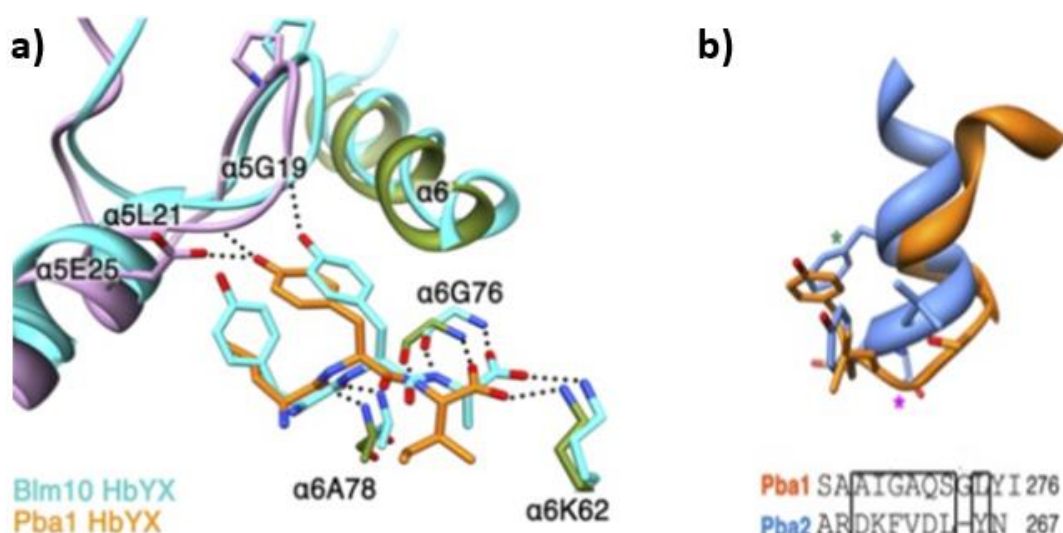
#### 4.5. Aktywacja proteasomu przez motyw HbYX

Wiele białek wiążących proteasom posiada motyw C-końcowy HbYX, odpowiedzialny za wiązanie aktywatorów z cząstką rdzeniową 20S. Syntezowane są również związki, które posiadając taki motyw są w stanie wiązać się z proteasomem. Zaobserwowano, iż motyw HbYX wiąże się bardzo podobnie w kieszeniach proteasomu różnych organizmów (ludzkiego, drożdżowego oraz archeonów): 1) C-końcowy grupa karboksylowa skierowana jest w kierunku lizyny (Lys66 w archeonach), tworząc wiązanie jonowe, 2) grupa hydroksylowa przedostatniej tyrozyny łączy się z grupą karbonylową Gly19 i jest zorientowana w stronę proliny (zlokalizowanej w podstawie bramy), 3) grupa hydrofobowa (Hb) styka się z kieszenią hydrofobową w sąsiedniej podjednostce  $\alpha$  (Rysunek 13a). W ostatnim czasie zsyntezowano mimetyk peptydowy ZYA (Z – karboksybenzyl), który aktywuje proteasom około 10-krotnie w stężeniu 2,5 mM. Grupa Z na N-końcu naśladuje grupę Hb, eliminując N-końcowy ładunek. ZYA zadokowano w kieszeni  $\alpha_5$ - $\alpha_6$  ludzkiego proteasomu, w której wiąże się HbYX Rpt5 (Rysunek 13b). Strukturę modulatora zmodyfikowano wprowadzając reszty kwasowe w miejsce alaniny. ZYE oraz ZYD nie aktywowały jednak proteasomu. Również analogi zawierające prolinę (ZYP) oraz grupę polarną (ZYQ) utraciły zdolność do stymulacji proteasomu. Aby potwierdzić istotność grupy karboksylowej w wiązaniu, zsyntezowano analog z zablokowaną grupą karboksylową na C-końcu, co też zniósło aktywność. Rozważono też znaczenie mostkowania kieszeni proteasomu przez ZYA, tj. wiązania Gly19 w jednej podjednostce i Lys66 sąsiadującej podjednostki. W tym celu dodano grupę nitrową lub fosfonową do grupy hydroksylowej tyrozyny; żaden z analogów nie aktywował 20S, co potwierdza, iż długość mostka spinającego podjednostki  $\alpha$  musi odpowiadać odległości pomiędzy grupą hydroksylową tyrozyny a C-końcem ZYA [112]. Istotność tego C-końcowego motywu w aktywacji proteasomu potwierdza też fakt, iż wprowadzenie motywu HbYX do sekwencji peptydu PR11, który w natywnej formie jest allosterycznym inhibitorem proteasomu, spowodowało przekształcenie związku w aktywator [113].



Rysunek 13. a) Reszty konserwatywne w kieszeni między podjednostkami  $\alpha$  proteasomu 20S z *T. acidophilum*, oddziałujące z motywem HbYX. b) ZYA zadokowany w kieszeni  $\alpha_5$ - $\alpha_6$  h20S.

Motyw HbYX występuje także w białkach Pba1/Pba2. Są one heterodimerycznymi białkami opiekuńczymi w procesie składania proteasomu. Uważa się, że jedną z ich funkcji jest zapobieganie zarówno przedwczesnej aktywacji proteasomu przez 19S, jak i nieproduktywnej dimeryzacji pierścieni  $\alpha$  [114]. Motywy HbYX chaperonów Pba1/Pba2 wiążą się z proteasomem w taki sam sposób jak Blm10, wbudowując się do kieszeni między podjednostkami  $\alpha$  [115] (Rysunek 14a). Reszta Glu222 i Asp172 w Pba1 są ściśle powiązane z parą Pro17/Tyr8 podjednostki  $\alpha_5$ . Ponadto Tyr275 z motywu HbYX Pba1 tworzy wiązania wodorowe z Gly19 podjednostki  $\alpha_5$ , co prawdopodobnie stabilizuje pozycję reszty Pro17 [114]. Pba2 wiąże się z kieszenią  $\alpha_6$ - $\alpha_7$  i tworzy mostek solny z Lys65  $\alpha_7$ . Jednak ułożenie pozostałych C-końcowych reszt aminokwasowych jest inne niż w Blm10 oraz Pba1. Odrębne konformacje HbYX można wyjaśnić różnicami w sekwencjach aminokwasowych. Jedną z nich widać pomiędzy strukturalnie równoważnymi resztami Pba1 Gly268 i Pba2 Phe262, ponieważ duży łańcuch boczny Phe262 zapobiega przyjęciu przez tyrozinę z motywu HbYX kanonicznej konformacji [116] (Rysunek 14b). Mimo iż Pba1/Pba2 oddziałują z wewnętrzną częścią bramy, zakłócając interakcje istotne dla utrzymania zamkniętej konformacji proteasomu, wyprodukowany w bakterjach rekombinowany heterodimer nie był w stanie aktywować dojrzałego drożdżowego proteasomu w badaniach *in vitro*. Dzieje się tak najprawdopodobniej dlatego, iż, jak wskazuje struktura otrzymana dzięki zastosowaniu krio-EM, N-koniec Pba1 zamyka kanał katalityczny proteasomu [116].



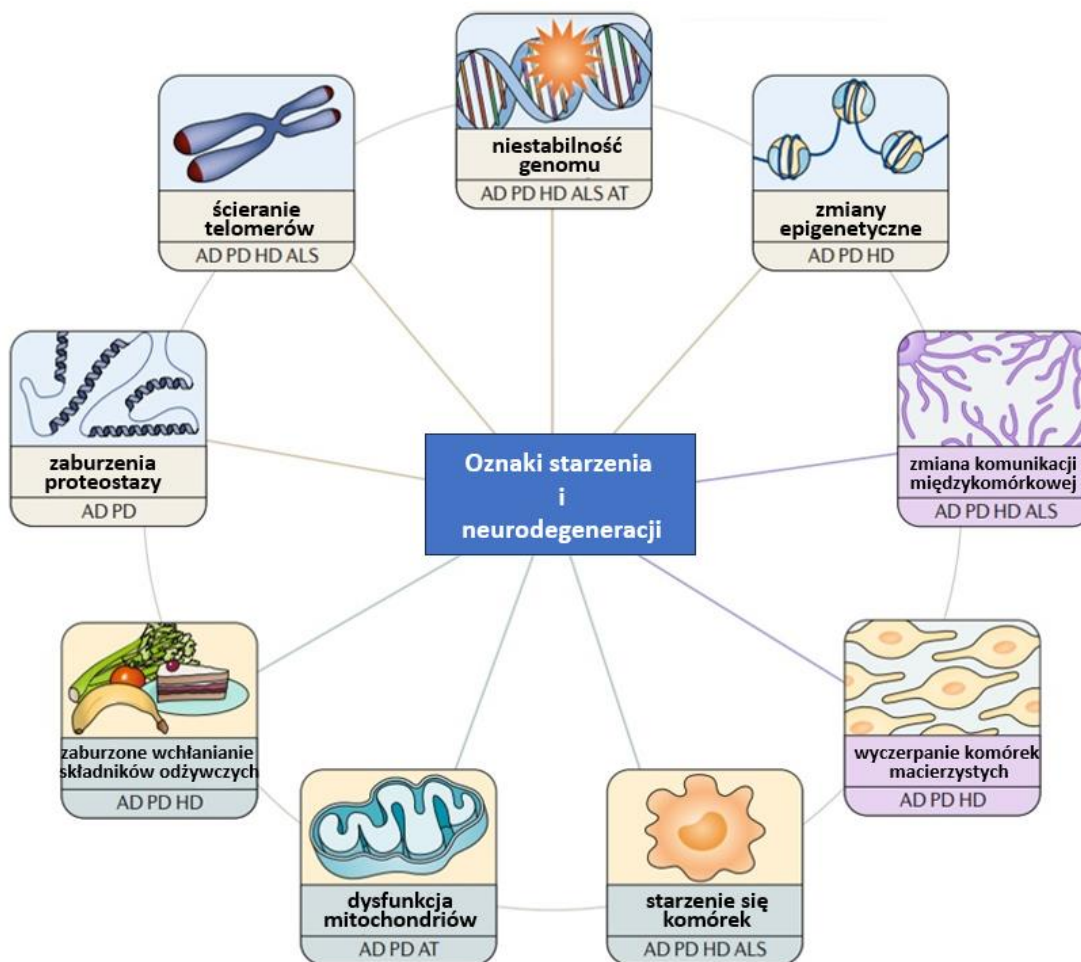
Rysunek 14. a) Motyw HbYX Pba1 oraz Blm10 oraz otaczające je reszty aminokwasowe proteasomu, pokazane po wyrównaniu struktur względem podjednostek  $\beta$ . Elementy struktury i reszty aminokwasowe Blm10 mają kolor jasnoniebieski, b) Reszty C-końcowe Pba1 i Pba2 nałożone na siebie. Pba1 Gly-269 i Pba2 Phe-262 oznaczono odpowiednio różowymi i zielonymi gwiazdkami. Przy porównaniu sekwencji reszty równoważne strukturalnie ujęto w ramki. [116].

## 5. Dysfunkcje proteasomalnego systemu degradacji białek

### 5.1. Wpływ procesów starzenia na aktywność proteasomu

Aby organizm eukariotyczny mógł prawidłowo funkcjonować, musi skutecznie reagować na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Podczas starzenia zauważalny jest postępujący spadek funkcjonalności organizmu na wielu różnych poziomach, zwłaszcza na poziomie komórkowym i molekularnym, zwiększając podatność na choroby i ostatecznie powodując śmierć [117]. Spadek ten jest związany z tym, że równowaga dynamiczna pomiędzy produkcją białek, utrzymaniem proteomu oraz usuwaniem białek z wiekiem zawodzi. Z upływem czasu gromadzi się coraz więcej zniekształconych oraz uszkodzonych białek, powodując pogorszenie stanu komórek. Istnieje dziewięć charakterystycznych cech starzenia, które są podzielone na następujące kategorie: niestabilność genomowa, zmiany epigenetyczne, ścieranie telomerów, dysfunkcja mitochondriów, zmiana w wykrywaniu składników odżywczych, starzenie się komórek, zmiana w komunikacji międzykomórkowej, wyczerpanie komórek macierzystych oraz utrata proteostazy (Rysunek 15). Upośledzona proteostaza związana jest z nieefektywną degradacją białek, co sprzyja proteotoksyczności [118].





Rysunek 15. Dziewięć cech charakterystycznych dla starzenia oraz neurodegeneracji. AD, choroba Alzheimera; ALS, stwardnienie zanikowe boczne; AT, ataksja-teleangiektazja; HD, choroba Huntingtona; PD choroba Parkinsona.

Liczne dane literaturowe potwierdzają fakt, że podczas procesów starzenia aktywność proteasomu może być znacznie zmniejszona, co zaobserwowano w różnych starzejących się komórkach lub tkankach, np. fibroblastach, limfocytach lub komórkach rdzenia kręgowego. Istnieje kilka modyfikacji, które prawdopodobnie przyczyniają się do spadku aktywności proteasomu. W jednym z badań stwierdzono, iż nieprawidłowa praca proteasomu wynikała z zaburzeń regulacji podjednostek katalitycznych kompleksu proteasomu 20S oraz podjednostek regulatora 19S [119]. Kolejna grupa badawcza sugerowała, że z nieefektywną pracą proteasomu mogą być związane nierówne ilości podjednostek  $\alpha$  oraz  $\beta$ , ograniczając szybkość tworzenia proteasomu oraz jego izoform [120]. Oprócz tej obserwacji zauważono również nieprawidłową ekspresję podjednostek regulatorowych. Starzenie organizmu może mieć również wpływ na proces ubikwitynacji substratów białkowych. Udokumentowano spadek ilości wolnej ubikwityny oraz

obniżenie transkrypcji ligazy E3 [121]. Niedawno zaobserwowano również zmniejszoną aktywność proteasomu w starzejących się limfocytach CD4<sup>+</sup> T, co skutkowało zwiększoną produkcją cytokin, wadliwą proliferacją oraz zwiększoną liczbą komórek PD-1<sup>+</sup>CD44 CD4<sup>+</sup>T. Odkrycie to wskazuje, że spadek aktywności proteasomu związany jest z procesem immunosenescencji [122], nieodwracalnego, postępującego procesu powodującego m.in. obniżenie liczby limfocytów B oraz limfocytów T – komórek układu immunologicznego, których funkcja w procesie starzenia ulega upośledzeniu [123]. W innym eksperymencie wykazano, że indukcja NFκB była poważnie zakłócona u osób starszych w porównaniu z młodymi. Było to spowodowane znacznym spadkiem aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 20S, co uniemożliwia skuteczną degradację inhibitora NFκB - IκBα, co z kolei również skutkuje upośledzeniem układu odpornościowego [124].

## 5.2. Choroby neurodegeneracyjne

Neurodegeneracja związana jest z utratą struktur i/lub funkcji komórek nerwowych. Neurony nie ulegają łatwo regeneracji, a ich degradacja prowadzi do licznych dysfunkcji i niepełnosprawności. Jest to powolny proces, który może trwać przez lata zanim pojawią się charakterystyczne objawy. Wspólną cechą chorób neurodegeneracyjnych jest dysfunkcja w różnych regionach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Dysfunkcja ta jest spowodowana proteotoksycznością wynikającą z obecności form oligomerycznych oraz nieprawidłowo sfałdowanych białek [79].

Choroba Alzheimera (AD) jest najpowszechniejszym zaburzeniem neurodegeneracyjnym, cechującym się agregacją oraz nieprawidłowym fałdowaniem białek. Głównymi objawami tej choroby są: postępująca demencja, utrata pamięci oraz zdolności rozumowania. Zauważono zmniejszoną aktywność proteasomu w mózgach pacjentów z AD w porównaniu z osobami zdrowymi. AD cechuje się odkładaniem dwóch różnych agregatów białkowych: wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych oraz zewnątrzkomórkowych blaszek starczych (amyloidów). Sploty neurofibrylarne zbudowane są głównie z hiperfosforylowanego białka tau związanego z mikrotubulami [125]. Ligaza ubikwitynowa CHIP promuje usuwanie białka tau gdy nie jest ono związane z mikrotubulami, ale wiąże się z białkiem opiekuńczym Hsp70. CHIP bezpośrednio oddziałuje z Hsp70 promując degradację ubikwitynowanego białka tau [126]. Badania *in vitro* wykazały, że białko tau może być też degradowane przez

proteasom 20S niezależnie od ATP i ubikwityny [118], jednakże agregaty białka tau hamują aktywność proteasomu. Płytki starcze są najczęściej zbudowane z agregatów amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ). APP to prekursor  $A\beta$ , który ulega trawieniu enzymatycznemu przez  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekreazy. Nieprawidłowe rozszczepienie APP powoduje powstawanie peptydów  $A\beta_{40}$  oraz  $A\beta_{42}$ , wykazujących silną tendencję do agregacji.  $A\beta$  z łatwością tworzą formy od oligomerów do fibryli ze względu na hydrofobowy oraz wysoko fibrylogenny łańcuch peptydowy. Akumulacja  $A\beta$  przyczynia się do obniżenia aktywności proteasomu [127]. Przeprowadzono badania, które pokazują, że  $A\beta$  przyjmuje trójwymiarową konformację, która jest w stanie upośledzać zależną od ubikwityny i niezależną od ubikwityny funkcję proteasomu. Powstałe oligomery posiadają unikalne sekwencje pierwszorzędowe, które upośledzają proteasom poprzez allosteryczną stabilizację konformacji z zamkniętą bramką cząstki rdzeniowej 20S, blokując w ten sposób degradację białek. Toksyczne oligomery specyficznie upośledzają otwarcie bramki zależne od motywu HbYX, ponieważ podjednostki  $\alpha$  związane z oligomerami nie są w stanie przejść zmian konformacyjnych wymaganych do otwarcia bramki [128]. Prócz hipotezy tau (akumulacja hiperfosforylowanego białka tau) oraz hipotezy amyloidowej (tworzenie złogów  $\beta$ -amyloidu) w etiologii choroby Alzheimera wymieniana jest również hipoteza cholinergiczna, związana ze zmniejszoną syntezą acetylocholin. Kolejnymi czynnikami, które mogą odgrywać istotną rolę w chorobie AD jest obecność genu apolipoproteiny E (ApoE4), stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność, cukrzyca typu 2 i wiele innych.

Choroba Parkinsona (PD) jest neurodegeneracyjnym zaburzeniem ruchowym. Typowe objawy to: bradykineza, sztywność mięśni i niekontrolowane drżenia. PD cechuje się nagromadzeniem ciał Lewy'ego w neuronach dopaminergicznych oraz utratą neuronów dopaminergicznych w części zbitiej istoty czarnej. Ciała Lewy'ego zbudowane są głównie z  $\alpha$ -synukleiny, parkiny (ligazy E3), ubikwityny oraz innych białek związanych z UPS. Aby odkryć rolę proteasomu opracowano model szczurzy tej choroby, traktując zwierzęta inhibitorami proteasomu [129]. Szczury te wykazywały objawy PD, czyli bradykinezę oraz drżenie. W neuronach dopaminergicznych zaobserwowano inkluzje zawierające  $\alpha$ -synukleinę oraz ubikwitynę [130]. Natywna  $\alpha$ -synukleina występuje w mózgu, w presynaptycznych zakończeniach neuronów. Białko to składa się z około 140 reszt aminokwasowych i w fizjologicznym pH ma głównie nieuporządkowaną strukturę.  $\alpha$ -Synukleina bierze udział w istotnych interakcjach z tubuliną, pełniąc funkcję łącznika,

blokuje transport białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego. W stanie fizjologicznym  $\alpha$ -synukleina jest dobrze rozpuszczalna i może ulegać degradacji przez proteasom w sposób zależny oraz niezależny od ubikwityny, zapewniając w ten sposób przeżywalność neuronów. W chorobie Parkinsona  $\alpha$ -synukleina może przekształcić się w różne konformacje, w tym oligomery (konformacje rozpuszczalne) i fibryle (konformacje nierozpuszczalne). Formy te mogą hamować funkcję proteasomu, co przyczynia się do wzmożonej akumulacji białek, w tym także amyloidogennej  $\alpha$ -synukleiny [131]. U osób cierpiących na PD zauważalna jest, głównie w istocie czarnej, utrata podjednostek  $\alpha$  proteasomu w neuronach dopaminergicznych oraz zmniejszenie aktywności wszystkich trzech peptydaz [132]. Wykonano również eksperymenty dowodzące, iż nadekspresja  $\alpha$ -synukleiny prowadzi do upośledzenia katalitycznych funkcji proteasomu 26S. Jest to spowodowane akumulacją  $\alpha$ -synukleiny fosforylowanej w Ser129, co poprzedza degenerację neuronów dopaminergicznych oraz wystąpienie deficytów motorycznych [133]. W patogenezie PD prócz mutacji i agregacji  $\alpha$ -synukleiny wymienia się dysfunkcję mitochondriów, stres oksydacyjny i zaburzenia w funkcjonowaniu układu proteasomalnego i lizosomalnego [79].

Choroba Huntingtona (HD) jest zaburzeniem z grupy chorób poliglutaminowych. Jest to choroba autosomalna, która upośledza koordynację mięśniową i prowadzi do pogorszenia funkcji poznawczych i psychozy. Selektywna neurodegeneracja występuje w prążkowie mózgu. Choroba spowodowana jest ekspansją regionu powtórzeń trypletowych CAG w genie huntingtyny, co przekłada się na odcinek poliglutaminowy w *N*-końcu białka, powodując tworzenie oraz agregację fibryli [134]. Inkluzye huntingtyny zawierają białka opiekuńcze, składniki proteasomu oraz ubikwitynowane białka. W modelach komórkowych HD zwiększona ekspresja PA28 $\gamma$  poprawia przeżywalność komórek. Ektopowa ekspresja PSMD11/Rpn6 w modelu *C. elegans* łagodzi objawy choroby [135]. Dokładne mechanizmy toksyczności prowadzącej do śmierci neuronów pozostają jednak niewyjaśnione, aczkolwiek uznaje się, że ogólne upośledzenie funkcji proteasomu powoduje zaburzenie proteostazy i śmierć komórkową. Badanie *in vitro* sugerowało, że proteasom nie jest w stanie rozszczepiać wiązania peptydowego w obrębie długich odcinków poliglutaminowych, a te niedegradowalne sekwencje mogą zakłócać jego pracę [136].

## 6. Powstrzymanie neurodegeneracji poprzez aktywację proteasomu

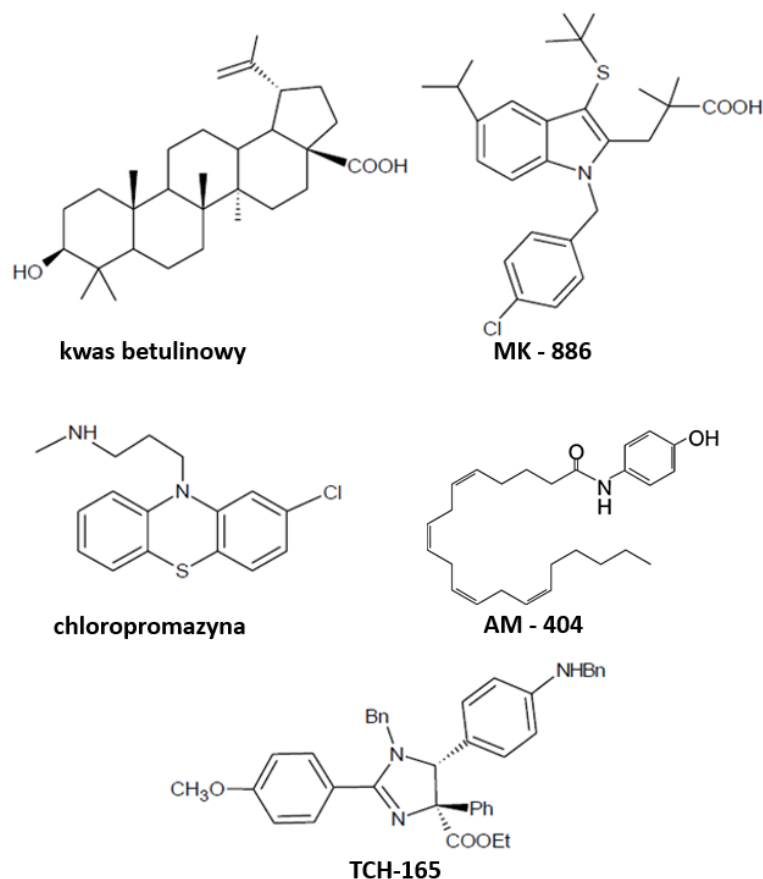
### 6.1. Bezpośrednia aktywacja proteasomu

Szacuje się, że 6 milionów Amerykanów powyżej 65 roku życia cierpi na chorobę Alzheimera, a 1 milion cierpi na chorobę Parkinsona. Wraz ze starzeniem się społeczeństwa prognozowany jest wzrost zachorowalności. Pomimo narastającego problemu, na rynku farmaceutycznym brakuje leków, które mogłyby spowolnić postęp chorób neurodegeneracyjnych. Obecnie istnieje jeden lek zatwierdzony przez FDA do stosowania w leczeniu choroby Alzheimera – donanemab. W przypadku PD żaden lek nie został oficjalnie zatwierdzony przez FDA. Jednym z potencjalnych oraz obiecujących podejść terapeutycznych jest zastosowanie egzogennych aktywatorów proteasomu, takich jak małe cząsteczki lub peptydy, które są zdolne do bezpośredniej aktywacji proteasomu poprzez indukowanie konformacji z otwartą bramą proteasomu, umożliwiającą dostęp substratów białkowych do kanału katalitycznego [137].

Wśród małocząsteczkowych aktywatorów jedną podgrupę stanowią związki, które zachowują się jak detergenty. Dodecylosiarczan sodu (SDS) był pierwszym opisanym aktywatorem proteasomu 20S. Stymulował on 20-krotnie powyżej linii bazowej hydrolizę fluorogennego substratu Suc-LLVY-AMC, specyficznego dla peptydazy chymotrypsynopodobnej. Taki efekt można było jednak zaobserwować tylko powyżej krytycznego micelnego stężenia SDS, co sugeruje iż prawdopodobnym mechanizmem oddziaływania na proteasom jest działanie podobne do detergentu. Układy indukujące aktywność w ten sposób częściowo denaturują podjednostki  $\alpha$ , dopuszczając do przejścia substratu w głąb kanału katalitycznego [138]. Wiele związków wykazuje takie oddziaływanie, m.in. polikationy, lipidy polianionowe, kwasy tłuszczowe oraz naturalny produkt oleuropeina. Związki z tej klasy nie mają jednakże potencjału terapeutycznego ze względu na brak specyficzności [137].

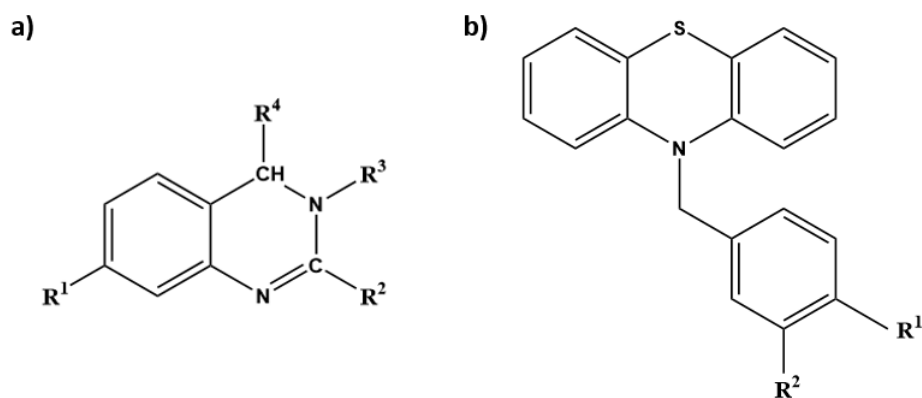
Kolejnym małocząsteczkowym związkiem aktywującym proteasom jest kwas betulinowy (Rysunek 16). To naturalny produkt triterpenowy, który selektywnie wzmacnia aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu. Syntetycznie otrzymane analogi tego związku wpływały hamująco na proteasom, co sugeruje złożoną zależność struktura-aktywność (SAR) [139]. Grupa badawcza z laboratorium Kodadek wysnuła hipotezę, iż niektóre związki mogą indukować otwieranie bramy proteasomu jedynie

w stopniu wystarczającym, by umożliwić degradację małych fluorogennych peptydów, ale nie na tyle szeroko, aby umożliwić degradację nieprawidłowo sfałdowanych białek. W wyniku analiz HTS (ang. *High-Throughput Screening*) związków z NIH Clinical Collection zidentyfikowano dwa aktywatory proteasomu: MK-866 oraz AM-404 [140]. Niedawno opublikowano badania dotyczące AM-404, które opisują znaczenie długości łańcucha oraz konieczność obecności cis-alkenu przy atomie węgla C8 [141]. Silnym aktywatorem proteasomu jest również neuroleptyk chlorpromazyna (Rysunek 16), który przyspiesza degradację białek o nieuporządkowanej strukturze ( $\alpha$ -synukleina oraz białko tau), a jego  $EC_{50}$  wynosi  $14,8 \mu M$  [142]. Obrazowanie AFM wykazało, że stosunek liczby proteasomów z otwartą bramą do liczby proteasomów z zamkniętą jest zależny od stężenia aktywatora oraz koreluje ze zwiększoną aktywnością wszystkich trzech miejsc aktywnych. TCH-165 zapobiega wiązaniu peptydu Rpt3 oraz regulatora 19S do proteasomu, co wskazuje na bezpośrednie wiązanie z pierścieniem  $\alpha$  [79]. Aktywator ten najprawdopodobniej oddziałuje z kieszenią pomiędzy podjednostkami  $\alpha$ , w podobny sposób jak motyw HbYX, co wskazuje na allosteryczny mechanizm jego działania.



Rysunek 16. Przykłady znanych małowcząsteczkowych aktywatorów proteasomu.

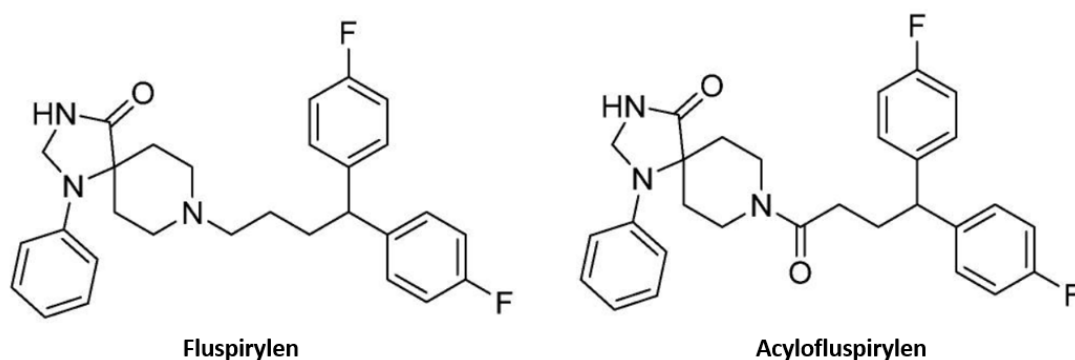
Podczas ciągłej eksploracji aktywatorów proteasomu, przeszukano szereg motywów strukturalnych, które można zastosować przy projektowaniu nowych klas związków aktywujących [79]. Zaobserwowano, że związki na bazie dihydrochinazolinoliny (Rysunek 17a) mogą skutecznie oddziaływać z proteasomem. Powstają one w wieloskładnikowej reakcji amidów, amin oraz aldehydów. Najlepsze analogi z tej grupy w stężeniu 30  $\mu\text{M}$  9-krotnie stymulują aktywność chymotrypsynopodobną [143]. Również klasa aktywatorów bazujących na rusztowaniu fenotiazynowym (Rysunek 17b) okazała się zdolna do zwiększania w warunkach *in vitro* degradacji patologicznych białek, m.in.  $\alpha$ -synukleiny, a co najważniejsze, także do zapobiegania nagromadzeniu jej szybko agregującego mutantu A53T w liniach komórkowych ssaków [137]. Interesującą grupą są też analogi oparte na szkielecie pirazolonu, występującego w wielu lekach przeciwgorączkowych oraz przeciwbólowych. Dwa związki tego typu: aminopiryna oraz nifenazon okazały się szczególnie efektywne i obiecujące dla leczenia choroby Alzheimera, ponieważ wykazywały właściwości neurotroficzne i chroniły zróżnicowane ludzkie komórki neuroblastoma SH-SY5Y przed toksycznym działaniem beta-amyloidu. Mechanizm ich działania związany jest z otwarciem bramy prowadzącej do kanału katalicznego proteasomu, poprzez wiązanie między podjednostkami  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  oraz  $\alpha_5$  i  $\alpha_6$  [144].



Rysunek 17. Szkielet aktywatora bazujący na a) dihydrochinazolinie oraz b) fenotiazynie.

Również syntetyczne analogi fluspirylenu (Rysunek 18) są zdolne do zwiększania aktywności proteolitycznej proteasomu 20S. Fluspirylen oraz jego amidowa pochodna acylofluspirylen aktywują trzy miejsca kataliczne oraz zapobiegają agregacji i oligomeryzacji IDP. Co ciekawe, acylofluspirylen wykazuje nieznacznie większą siłę działania ( $EC_{200}$  1,9  $\mu\text{M}$ ) w porównaniu z fluspirylenem ( $EC_{200}$  2,2  $\mu\text{M}$ ). Dokowanie

molekularne pokazuje, że fluspirylen i acylofluspirylen wiążą się z kieszenią pomiędzy podjednostką  $\alpha_2$  oraz  $\alpha_3$ , co różni je od aktywatorów TCH-165, chloropromazyny oraz aktywatorów na bazie dihydrochinoliny, które wiążą się w kieszeni między podjednostką  $\alpha_1$  oraz  $\alpha_2$ . Ponadto pochodne fluspirylenowe nie wpływają na aktywność proteolityczną proteasomu 26S, dlatego mogą być stosowane do selektywnego zapobiegania gromadzeniu się uszkodzonych białek bez wpływu na degradację białek zależną od ubikwityny [145]



Rysunek 18. Struktura fluspiryleny i acylofluspiryleny.

Odrębną grupę aktywatorów proteasomu stanowią związki peptydowe. Jednym z nich jest syntetyczny peptyd PAP1 (Rysunek 19), który zwiększa aktywność chymotrypsynopodobną poprzez mechanizm otwierania bramy proteasomu [146]. Peptyd ten chronił fibroblasty przed stresem oksydacyjnym wywołanym nadtlenkiem wodoru. Zapobiegał także agregacji dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1) w komórkowym modelu zanikowego stwardnienia bocznego (ALS) [147]. Aktywatorem posiadającym motyw HbYX jest Blm-pep, który został zaprojektowany w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, na podstawie C-końcowego fragmentu aktywatora Blm10. To 14-aminokwasowy peptyd (Rysunek 19), który stymuluje wszystkie aktywności ludzkiego proteasomu 20S [148]. *N*-końcowe reszty tyrozyny oraz fenyloalaniny włączono do jego sekwencji po to, aby zapewnić oddziaływanie ich grup aromatycznych z *N*-końcami podjednostek  $\alpha$ . Tę modyfikację wprowadzono na podstawie struktury krystalicznej kompleksu Blm10-y20S, w której można zauważyć, że *N*-końce podjednostki  $\alpha_6$  odginają się w kierunku przyłączonego aktywatora Blm10, tworząc z nim oddziaływania aromatyczne, co stabilizuje częściowe otwarcie kanału katalicznego (Rysunek 20). Łącznik TGS wprowadzono do sekwencji



Blm-pep chcąc poprawić rozpuszczalność oraz wydłużyć peptyd, aby zapewnić zarówno zakotwiczenie w kieszeni proteasomu, jak i oddziaływania z jego powierzchnią. Ponieważ Blm-pep, mimo wiązania się z drożdżowym proteasomem, nie był w stanie spowodować jego aktywacji, był natomiast skutecznym aktywatorem ludzkiego enzymu, zadokowano go w tej samej kieszeni  $\alpha_5$ - $\alpha_6$  ludzkiego proteasomu i porównano ich oddziaływania. Jedyne różnice w miejscu wiązania obejmują  $\alpha_5$ Leu28, która jest podstawiona Ile w h20S oraz  $\alpha_6$ Ala78, w miejscu której w ludzkim proteasomie jest Thr. W obu kompleksach Arg10 w sekwencji aktywatora tworzy mostek solny z  $\alpha_5$ Glu25. Oddziaływania Tyr12 z  $\alpha_5$ Leu28/  $\alpha_5$ Ile28 i  $\alpha_5$ Glu159/ $\alpha_5$ Asp157 w drożdżowym/ludzkim proteasomie są porównywalne pod względem charakteru. Interakcje Tyr13 z  $\alpha_5$ Arg20,  $\alpha_6$ Arg51 i  $\alpha_5$ Gly129 są konserwatywne w obu rodzajach proteasomu. Mostek solny pomiędzy C-końcową grupą karboksylową Blm-pep z  $\alpha_6$ Lys62 jest również konserwatywny w obu strukturach, podobnie jak dwa wiązania wodorowe pomiędzy C-końcową grupą karboksylową a  $\alpha_6$ Ser33 i  $\alpha_6$ Gly76. Jednakże oddziaływanie tejże grupy karboksylowej z łańcuchem bocznym  $\alpha_6$ Ser33 jest możliwe tylko dla ludzkiego proteasomu. Jest to jedyna różnica w wiązaniu Blm-pep w kieszeni  $\alpha_5$ - $\alpha_6$  proteasomu ludzkiego i drożdżowego. W badaniach biochemicznych Blm-pep w stężeniu 10  $\mu$ M spowodował trzykrotny wzrost aktywności ChT-L oraz C-L ludzkiego proteasomu 20S, natomiast w przypadku aktywności T-L wzrost był siedmiokrotny. Stwierdzony jednocześnie brak wpływu Blm-pep na którąkolwiek peptydazę drożdżowego enzymu można próbować wyjaśnić różnicami w budowie innych niż kanoniczna dla wiązania Blm10 i Blm-pep kieszeń  $\alpha_5$ - $\alpha_6$ , gdzie potencjalnie modulator także mógłby się dokować. Niektóre kieszenie drożdżowego proteasomu są bowiem mniej przestronne niż ich ludzkie odpowiedniki, dlatego mogą selektywnie wykluczać niektóre ligandy [148], [149] Innym wyjaśnieniem może być znaczenie N-końcowego rejonu Blm-pep, który choć niewidoczny w strukturze krystalicznej, może przyczyniać się swoimi przejściowymi oddziaływaniami do otwierania kanału katalitycznego i wzmacniania aktywności ludzkiego proteasomu, ale już nie jego drożdżowego odpowiednika.

Ile-Pro-Arg-Cys-Arg-Lys-Met-Pro-Gly-Val-Lys-Met-Cys-NH<sub>2</sub> (PAP1)

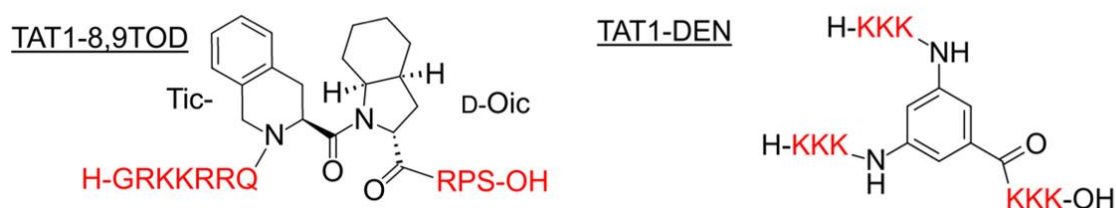
Lys-Tyr-Phe-Thr-Gly-Ser-Lys-Leu-Trp-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Ala-OH (Blm-pep)

Rysunek 19. Sekwencja PAP1 oraz Blm-pep



Rysunek 20. a) Aromatyczne reszty aminokwasowe (czerwone) otaczające wejście do kanału katalitycznego proteasomu. b) Skierowana na zewnątrz *N*-końcowa reszta Phe2 (czerwona) podjednostki  $\alpha_6$  proteasomu. c) Kompleks proteasomu z Blm10. Ta sama reszta  $\alpha_6$ Phe2 skierowana jest w górę po związaniu z Blm10, i wchodzi w kontakt aromatyczny z Phe2120 aktywatora. Reszty *C*-końcowe sekwencji aktywatora i *N*-koniec podjednostki  $\alpha_6$  są przedstawione z wykorzystaniem pogrubionych wiązań, fragment pochodzący od aktywatora zaznaczono na czerwono [149]

Kolejną interesującą grupą związków zwiększających aktywność proteolityczną proteasomu, zaprojektowanych w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, są peptydomimetyki oparte na aktywatorze transkrypcji HIV-1 TAT (Tat), zawierające motyw RTP wiążący proteasom, wspólny z aktywatorem 11S. Na podstawie sekwencji białka wyodrębniono fragment TAT1 o sekwencji GRKKRRQRRRPS, który ma zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg. Przeprowadzone badania doprowadziły do otrzymania modulatorów składających się z dodatnio naładowanej sekwencji peptydowej połączonej ugrupowaniem wymuszającym powstanie zgięcia typu  $\beta$  z krótką sekwencją specyficzną (Rysunek 21). Związek TAT1-8,9TOD posiada doskonałą zdolność do aktywacji proteasomu. Ciekawym związkiem okazał się również TAT1-DEN, który posiada rozgałęzioną strukturę zbudowaną z sekwencji zasadowych. Oba modulatory silnie stymulowały aktywność ChT-L h20S. TAT1-8,9TOD oraz TAT1-DEN aktywowały proteasom odpowiednio 8- i 10-krotnie. EC<sub>50</sub> dla tych związków mieściły się w zakresie 200-400 nM. Zaletą tych związków jest długi okres półtrwania w ludzkim osoczu oraz zdolność do przenikania bariery krew-mózg. Co więcej, aktywatory te złagodziły w organizmach modelowych patologie podobne do występujących w chorobie Alzheimera, uzyskując efekty porównywalne z tymi osiąganymi poprzez genetyczną augmentację proteasomu [150].



Rysunek 21. Sekwencja aktywatorów TAT1-8,9TOD oraz TAT1-DEN.

## 6.2. Pośrednia aktywacja proteasomu

### 6.2.1. Aktywacja poprzez nadekspresję jednostek proteasomu

Aktywność proteasomu może być również regulowana przez nadekspresję podjednostek. W pierwszej dostępnej w literaturze pracy na ten temat została opisana nadekspresja podjednostki  $\beta_5$  w limfoblastach oraz komórkach HeLa, która spowodowała zwiększoną aktywność ChT-L oraz T-L. Natomiast nadekspresja  $\beta_{1i}$  wpłynęła na zwiększenie aktywności T-L. Dzięki zwiększeniu aktywności immunoproteasomu uzyskano wzmocnioną odpowiedź immunologiczną [151]. Nadekspresja podjednostki  $\beta_5$  w linii WI38/T oraz HL60 i pierwotnej IMR90 linii komórkowej ludzkich fibroblastów indukuje nadekspresję innych podjednostek  $\beta$ , co prowadzi do zwiększonej aktywności proteasomu oraz wzrostu szybkości jego formowania [152]. Linie komórkowe, w których przeprowadzono nadekspresję  $\beta_5$  charakteryzowały się zwiększoną odpornością na stres oksydacyjny i podwyższonym stopniem degradacji utlenionych białek oraz wolniej zachodziły w nich procesy starzenia [153]. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) jest kolejnym sposobem, za pomocą którego można przeprowadzić nadekspresję proteasomu, a w konsekwencji podnieść jego aktywność. Nrf2 kontroluje ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, w tym S-transferazy glutationowej, oksydoreduktazy chinonowej NADPH oraz podjednostek proteasomu [154]. W związku z tym nadekspresję proteasomu można przeprowadzić również przy pomocy małowcząsteczkowych aktywatorów Nrf2. Wykazano, że przeciwutleniacz 3H-1,2-ditiolo-3-tion (D3T) indukował nadekspresję podjednostek proteasomu 20S oraz regulatora 19S, zwiększając aktywność proteasomu w fibroblastach posiadających funkcjonalny Nrf2 [155]. Wykazano również, że aktywacja Nrf2 poprzez D3T znacząco zredukowała deficyty poznawcze w mysim modelu choroby Alzheimera oraz radykalnie zmniejszyła poziom stresu oksydacyjnego, jak również ilość nierozpuszczalnego amyloidu  $\beta$  [156]. Triterpenoid, kwas 18- $\alpha$ -glicyretynowy (18 $\alpha$ -GA), również opóźniał

replikacyjne starzenie ludzkich fibroblastów poprzez stymulowanie ekspresji podjednostek oraz wzrost aktywności proteasomu [157]. W *Caenorhabditis elegans* (model AD nicieni) związek 18 $\alpha$ -GA powodował zmniejszone odkładanie się A $\beta$  oraz opóźniał postęp AD, promując zależne od proteasomu wydłużenie życia [158]. Zwiększoną aktywność proteasomu uzyskano również przez aktywację Nrf2 dodatkiem do żywności, *tert*-butylohydrochinonem (t-BHQ), oraz suplementem diety - sulforafanem. Wzrostowi aktywności proteasomu z t-BHQ oraz sulforafanem towarzyszyło opóźnione zróżnicowanie, zwiększona regeneracja oraz pluripotencja w ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych (hESC) oraz w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (iPS – IMR90) [159].

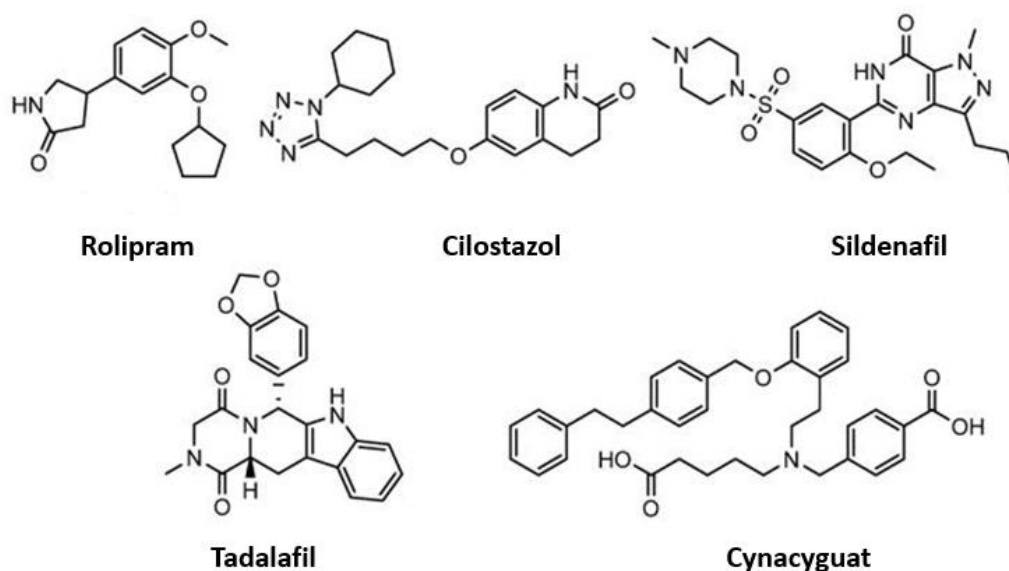
Na aktywność proteasomu można też wpływać poprzez nadekspresję podjednostek regulatorowych. Nadekspresja podjednostki Rpn6 regulatora 19S doprowadziła do zwiększonej aktywności proteasomu w embrionalnych komórkach macierzystych [160]. Stwierdzono również, że zwiększenie aktywności proteasomu przez nadekspresję PA28 $\alpha$  chroni myszy przed proteinopatią oraz uszkodzeniem niedokrwiennie-reperfuzyjnym. Inne badania pokazały unikalne podejście do genetycznej regulacji proteasomu. Wykazano w nich, iż usunięcie dziewięciu *N*-końcowych reszt aminokwasowych podjednostki  $\alpha_3$  powoduje destabilizację struktury pozostałych *N*-końcowych fragmentów podjednostek  $\alpha$ , prowadząc do stabilnej otwartej konformacji mutantu  $\alpha_3$ - $\Delta$ N. Proteasom  $\alpha_3$ - $\Delta$ N, działając sam lub w postaci kompleksu 26S, posiada większą zdolność do degradacji około dwustu substratów białkowych, w tym  $\alpha$ -synukleiny oraz białka Tau. Zaobserwowano również znaczącą odporność na stres oksydacyjny w przypadku komórek posiadających proteasom  $\alpha_3$ - $\Delta$ N [161].

#### *6.2.1. Aktywacja proteasomu przez stymulację aktywności kinaz*

Możliwa jest również aktywacja proteasomu przez modulację kinaz, z czym związana jest potranslacyjna modyfikacja podjednostek. Ludzki proteasom 26S podlega odwracalnej fosforylacji w wyniku ciągłych zmian stanów patofizjologicznych komórek [162]. Ludzki proteasom 26S posiada ponad 455 miejsc fosforylacji, które odgrywają istotne role w wielu procesach, zaczynając od procesu formowania proteasomu 26S, poprzez jego stabilność, na aktywności kończąc. Jednym z przykładów jest fakt, iż stres osmotyczny hamuje aktywność proteasomu poprzez zależną od p37-MAPK fosforylację podjednostki Rpn2. Zauważono, że fosforylacja Ser-14 podjednostki Rpn6 regulatora

19S przez zależną od cAMP kinazę białkową A (PKA), powoduje przyspieszenie procesu składania proteasomu 26S oraz wzrost aktywności proteasomu *in vitro* oraz *in vivo* [163]. Dodatkowo, hamowanie fosforylacji Thr25 podjednostki Rpt3 przez kinazę tyrozynową 2 o podwójnej specyficzności (DYRK2) oraz Ser120 Rpt6 przez kinazę białkową II zależną od wapnia/kalmoduliny (CamKII), upośledzają zdolność proteasomu do proteolizy [164]. Stwierdzono również, że rolipram (Rysunek 21), który jest małocząsteczkowym inhibitorem fosfodiesterazy typu 4 (PDE4), podnosi poziom cAMP w mózgu myszy [165], aktywuje PKA oraz prawdopodobnie zwiększa aktywność proteasomu poprzez fosforylację podjednostki Rpt6. Rolipram także usprawniał degradację nieprawidłowego białka Tau oraz poprawiał funkcje poznawcze w mysim modelu choroby Alzheimera [166]. Potwierdzono, że wywołana przez PKA fosforylacja podjednostki Rpn6 regulatora 19S zwiększa hydrolizę białek ubikwitynowanych oraz podatnych na agregację, takich jak białko tau, w różnych liniach komórkowych. Badania te potwierdziły udział proteasomu 26S w degradacji niesfałdowanych białek (lub wewnątrznie nieuporządkowanych białek), dodatkowo utwierdziły w słuszności strategię celowania w proteasom 20S i/lub 26S w dążeniu do zwiększenia degradacji IDP [147]. Cilostazol (Rysunek 22) jest kolejnym inhibitorem fosfodiesterazy typu 3 (PDE3) [167]. Podawanie cilostazolu myszom rTg4510 powodowało poprawę funkcji poznawczych oraz zwiększoną aktywność proteasomu poprzez szlak cAMP/PKA. Ta mała cząsteczka została zatwierdzona przez FDA do leczenia chromania przestankowego oraz może być stosowana w prewencji wtórnej udaru mózgu [168]. Pod koniec 2020 roku FDA zakończyła badanie kliniczne mające na celu określenie terapeutycznego zastosowania cilostazolu u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych. Wykazano, iż związki małocząsteczkowe, które podnoszą poziom cGMP, aktywują kinazę białkową zależną od cGMP (PKG – ang. *cGMP-dependent protein kinase*), przez co zwiększają aktywność proteolityczną proteasomu, unikając przy tym wpływu na degradację lizosomalną. Prowadzi to do zwiększenia szybkości hydrolizy zmutowanych białek, w tym białka Tau. Traktowanie ludzkich komórek neuroblastów (SH-SY5Y) cząsteczkami zwiększającymi poziom cGMP, takimi jak tadalafil lub sildenafil (Rysunek 22), które są inhibitorami fosfodiesterazy typu 5 (PDE5), lub cynacyguat (Rysunek 22), który jest stymulatorem rozpuszczalnych cyklaz guanylowych, spowodowało szybki wzrost aktywności proteasomów w lizatach komórkowych. Jednak w przeciwieństwie do fosforylacji Rpn6 przez PKA, Rpt3 przez DYRK2 bądź Rpt6 przez CamMKII, fosforylacja żadnej z tych podjednostek nie była obserwowana w szlaku PKG. Natomiast

nadekspresja PKG w komórkach HEK293 oraz SH-SY5Y przyczyniła się do wzrostu zawartości fosforylowanych białek w porównaniu z komórkami transfekowanymi pustymi wektorami [164]. Podjednostka proteasomu 26S lub związane z nią białka, które jest fosforylowane w aktywacji proteasomu przy udziale cGMP, są nieznane, a mechanizm nadal pozostaje niejasny.



Rysunek 22. Częsteczki modulujące aktywność kinaz.

Innym podejściem do aktywacji proteasomu jest zahamowanie ekspresji bądź inhibicja aktywności kinazy p38 MAPK. MAPK to enzymy, które odpowiadają za fosforylację grupy hydroksylowej treoniny oraz seryny w białkach. Kinazy te biorą udział w apoptozie komórek. W 2017 roku odkryto imidazolowe inhibitory p38 MAPK, które wzmacniają aktywność proteolityczną proteasomu 26S. Inhibitor PD169316 oraz jego analog zwiększają aktywność proteasomu w sposób zależny od stężenia, bez toksycznego wpływu na żywotność komórek oraz poziom ubikwitynowanych białek [169].

## 7. Zastosowanie peptydów jako leki

Dzięki nowoczesnym metodom produkcji, modyfikacji oraz analiz w ostatniej dekadzie poczynione zostały ogromne postępy we wprowadzaniu do terapii leków peptydowych. Peptydy terapeutyczne stanowią wyjątkową klasę środków terapeutycznych. Składają się z aminokwasów, a ich masa cząsteczkowa wynosi zazwyczaj 500-5000 Da [170]. Badania nad terapeutycznym zastosowaniem peptydów rozpoczęto od badań naturalnych ludzkich

hormonów, takich jak insulina, oksytocyna, wazopresyna [171]. W 1921 roku otrzymano pierwszy syntetyczny lek peptydowy – insulinę. Od tego czasu zatwierdzono ponad 80 leków peptydowych, a rozwój takich leków stał się jednym z najgorętszych tematów w badaniach farmaceutycznych [172]. Rozwój leków peptydowych wkroczył w nową erę wraz z nadejściem XXI wieku. Było to związane z postępowaniem biologii molekularnej. Leki peptydowe nie są już po prostu mimetykami hormonów, złożonymi z naturalnych aminokwasów, np. enfuwirtyd jest 36-aminokwasowym biomimetycznym peptydem naśladującym białko ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (HIV), stosowanym w kombinowanej terapii przeciwko HIV [173].

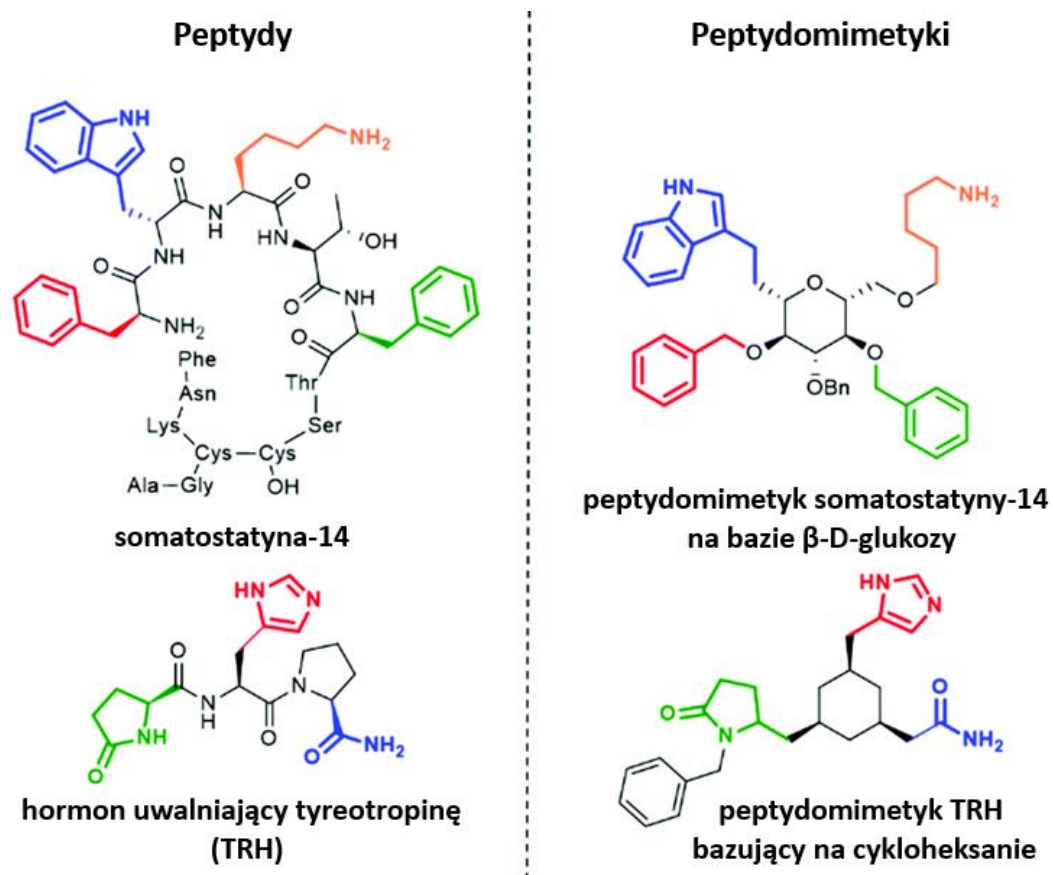
Terapeutyczne peptydy działają jako hormony, czynniki wzrostu, neuroprzekaźniki lub środki przeciwnieinfekcyjne. Wiążą się z receptorami na powierzchni komórek z wysoką specyficznością i powinowactwem, wywołując wewnątrzkomórkowe efekty podobne do działania leków biologicznych. Jednakże w porównaniu z lekami biologicznymi peptydy terapeutyczne wykazują mniejszą immunogenność i mają niższe koszty produkcji [174]. Małocząsteczkowe leki peptydowe mają wydłużony czas działania oraz głębiej penetrują tkankę [175]. Jednak takie leki posiadają dwie istotne wady. Przede wszystkim peptydy mają słabą przenikalność przez błony. Przenikalność leków peptydowych przez membrany zależy od wielu czynników, m.in. długości łańcucha peptydowego oraz rodzaju aminokwasów, z których jest zsyntezowany. Peptydy generalnie nie są w stanie przeniknąć przez błonę komórkową, co ogranicza ich wewnątrzkomórkowe działanie. W 2018 roku ogłoszono, że >90% leków peptydowych jest ukierunkowanych na cele zewnątrzkomórkowe [176]. Drugą wadą jest niska stabilność *in vivo*. Naturalne peptydy składają się z reszt aminokwasowych połączonych wiązaniem amidowym, ale ich struktury drugo- oraz trzeciorzędowe są niestabilne. Wiązania amidowe mogą być łatwo hydrolizowane przez enzymy proteolityczne obecne np. w przewodzie pokarmowym lub osoczu. To sprawia, że peptydy mają krótki okres półtrwania i są szybko eliminowane z organizmu.

Wyżej wymienione wady sprawiają, że w przypadku leków peptydowych konieczne jest pozajelitowe podanie leku, poprzez wlewy dożylnie lub iniekcję podskórną [177].

## 7.1. Opracowywanie nowych leków peptydowych

Poprzez wprowadzenie różnych modyfikacji do sekwencji peptydowej można otrzymać peptydomimetyki, które będą się cechowały większą stabilnością proteolityczną oraz lepszymi właściwościami fizykochemicznymi niż macierzyste związki.

Peptydomimetyki są zdefiniowane jako związki organiczne mające strukturę drugorzędową. Różniąc się budową od natywnego peptydu, posiadają jednak zachowany podstawowy element – farmakofor, odpowiedzialny za zdolność do interakcji z celem biologicznym, co umożliwia osiągnięcie takiego samego efektu biologicznego, jaki wywołuje naturalny peptyd (Rysunek 23) [178].



Rysunek 23. Przykłady peptydów terapeutycznych oraz ich peptydomimetycznych odpowiedników.

Wraz z postępowaniem poczynionym na przestrzeni lat, klasyfikacja peptydomimetyków ewoluowała od historycznego podziału kategoryzującego związki na podstawie podobieństwa do substratu wyjściowego do najnowszej klasyfikacji na podstawie stopnia peptydowego charakteru [179].



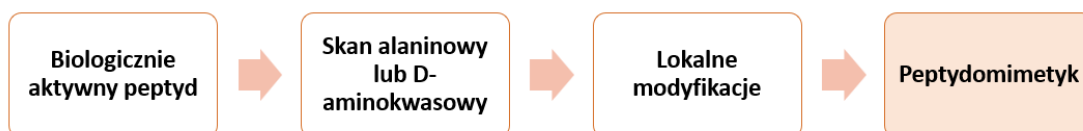
Mimetyki klasy A – to związki najbardziej podobne do peptydu natywnego. W swojej strukturze zawierają ograniczoną liczbę lokalnych modyfikacji wprowadzonych w celu ustabilizowania struktury i ograniczenia szybkości procesu proteolizy. Ta klasa obejmuje dawne mimetyki strukturalne typu I, ponieważ szkielet oraz łańcuchy boczne wykazują ściśle powiązanie z topografią macierzystego peptydu.

Mimetyki klasy B – nadal mają w dużym stopniu zachowany peptydowy charakter, ale zawierają liczniejsze modyfikacje, zarówno w łańcuchu głównym, jak i bocznych. Modyfikacje mogą obejmować różne nienaturalne aminokwasy lub małowcząsteczkowe mimetyki szkieletu.

Mimetyki klasy C – charakteryzują się wzrostem zawartości struktur małowcząsteczkowych. Związki te mają niepeptydowy, nienaturalny szkielet, który całkowicie zastępuje szkielet natywny. Mimo to farmakofory znajdują się w takiej samej topografii jak w bioaktywnej konformacji peptydu naturalnego.

Mimetyki klasy D – w najmniejszym stopniu przypominają peptyd macierzysty. Częsteczki takich związków naśladują sposób działania bioaktywnego peptydu bez bezpośredniego związku z grupami funkcyjnymi łańcucha bocznego [179].

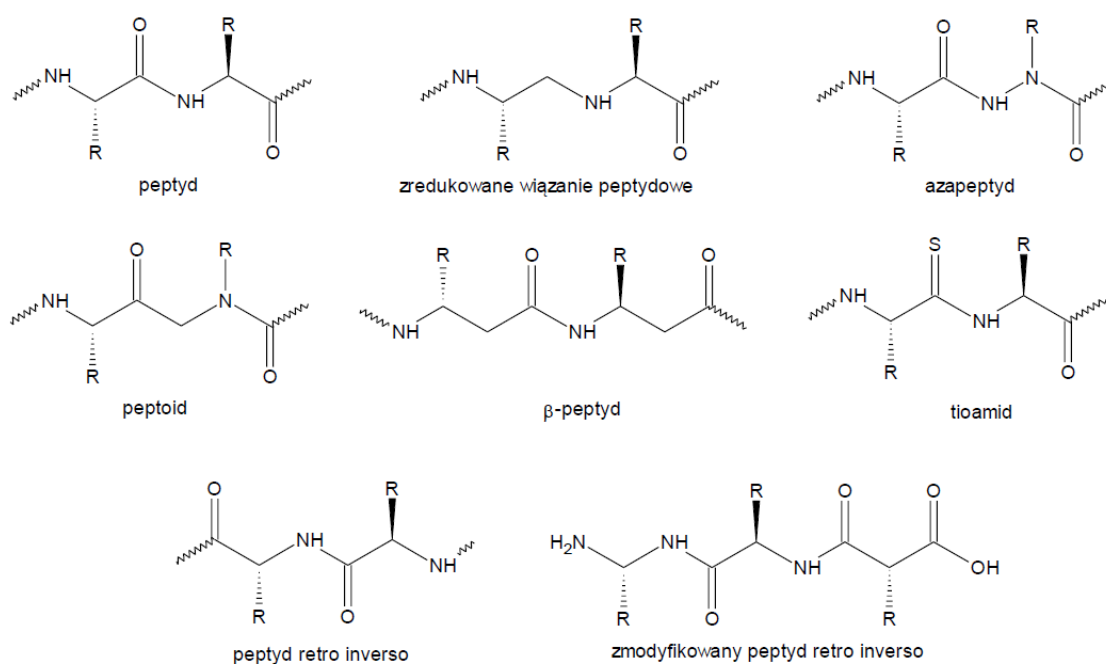
Istnieje kilka różnych podejść do tworzenia peptydomimetyków. Wybór strategii zależy od poziomu wiedzy o macierzystym peptydzie na temat jego struktury, funkcji, sekwencji oraz miejsca wiązania [180]. Podstawowym procesem przy projektowaniu peptydomimetyków jest przeprowadzenie skanu peptydu natywnego, polegającego na syntezie oraz testowaniu peptydów różniących się zazwyczaj jedną resztą aminokwasową. Pozwala to wskazać minimalną sekwencję kluczową dla interakcji biologicznej. Skanowanie alaniną lub D-aminokwasami polega na syntezie oraz biologicznej weryfikacji aktywności peptydów, w których aminokwasy peptydu macierzystego zostają kolejno zastąpione przez D-aminokwas lub alaninę. W ten sposób można zidentyfikować farmakoforowe aminokwasy odpowiedzialne za bioaktywność. Konieczne jest również zidentyfikowanie miejsc w sekwencji macierzystej podatnych na proteolizę, utlenianie bądź racemizację (Rysunek 24) [181].



Rysunek 24. Schemat procesu projektowania peptydomimetyków.

## 7.2. Modyfikacje zwiększające stabilność proteolityczną peptydu

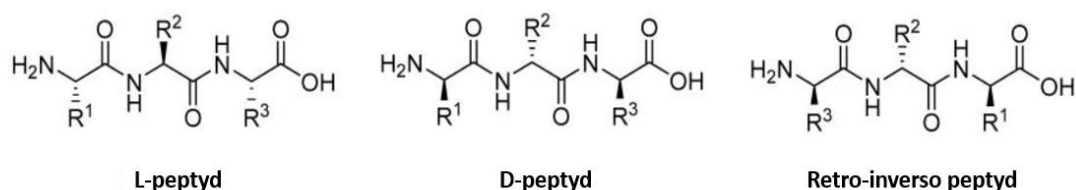
Modyfikowanie macierzystego peptydu jest najbardziej skutecznym podejściem w strategii projektowania peptydomimetyków. Polega to na wymianie konkretnych ugrupowań chemicznych na izostery, którymi mogą być atomy, jony lub fragmenty cząsteczek, wykazujące podobne właściwości fizykochemiczne. Lokalne modyfikacje są ograniczone do pojedynczych aminokwasów i obejmują izostery szkieletu lub łańcuchów bocznych. Przez lata powstała szeroka gama izosterów wiązania amidowego, m.in. wiązanie tioamidowe, azapeptydowe lub pierścień triazolowy [181].



Rysunek 25. Mimetyki peptydu.

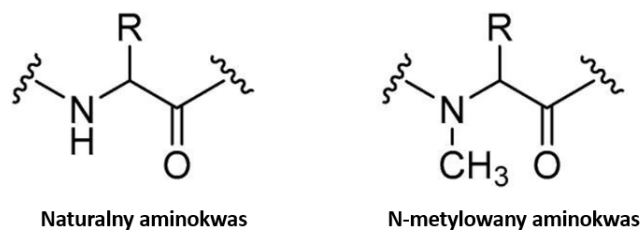
Oprócz glicyny wszystkie aminokwasy są chiralne i mogą występować w postaci enancjomeru L (-) oraz D (+). W naturze większość aminokwasów występuje w formie enancjomeru L [182]. Zasadnicze różnice w budowie przestrzennej powodują, że D-aminokwasy nie są rozpoznawane przez wiele białek, w tym proteazy. Rezultatem braku

tego rozpoznania jest to, że większość L-peptydów jest podatna na degradację *in vivo*, natomiast analogiczne D-peptydy są odporne na hydrolizę przez proteazy oraz mają niską immunogenność [183], [184]. Jednakże zamiana wszystkich L-aminokwasów w peptydzie na ich stereoizomery D zazwyczaj jest nieskuteczną strategią, ponieważ wynikające z tego zmiany w konformacji peptydu oraz orientacji łańcuchów bocznych mogą uniemożliwić prawidłową geometrię wiązania i zakłócić oddziaływanie z celem molekularnym [185]. Częstym rozwiązaniem takiego problemu jest retroinwersja, polegająca na odwróceniu sekwencji D-peptydu (Rysunek 26). To podejście spowodowało zwiększenie aktywności biologicznej niektórych nieustrukturyzowanych D-peptydów, poprzez przywrócenie prawidłowych, analogicznych jak w natywnych L-aminokwasach, kątów łańcuchów bocznych. Jednak helisy w D-peptydach pozostają lewoskrętne nawet po odwróceniu sekwencji w retroinwersji, podczas gdy helisy w L-peptydach są zawsze prawoskrętne. Wiąże się to z pogorszeniem wiązania peptydów z ich biologicznym celem [186].



Rysunek 26. Budowa L-peptydu i jego analogu D-peptydowego oraz peptydu retro-inverso.

Peptydy można również modyfikować przez *N*-metylację (zwaną również *N*-alkilacją) (Rysunek 27). Ten sposób polega na substytucji jednej lub kilku grup NH w szkielecie peptydowym ugrupowaniami *N*-metylowanymi. Proces ten może przynieść kilka korzyści, m.in. polepsza przepuszczalność przez błony i aktywność biologiczną oraz zwiększa odporność na proteolizę [187]. Podczas metylacji następuje wymiana donora wodoru NH na grupę NCH<sub>3</sub>, co eliminuje międzycząsteczkowe oraz wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe i ma wpływ na elastyczność konformacyjną szkieletu peptydowego oraz łańcuchów bocznych. Wraz ze zmianą konformacyjną może nastąpić zmniejszenie powinowactwa peptydu do miejsca aktywnego proteaz, czyli zwiększenie stabilności proteolitycznej. Jednakże rozerwanie wewnątrz- oraz międzycząsteczkowych wiązań wodorowych może wpłynąć negatywnie na rozpoznawanie docelowego receptora i stabilizację biologicznie aktywnej konformacji [181].

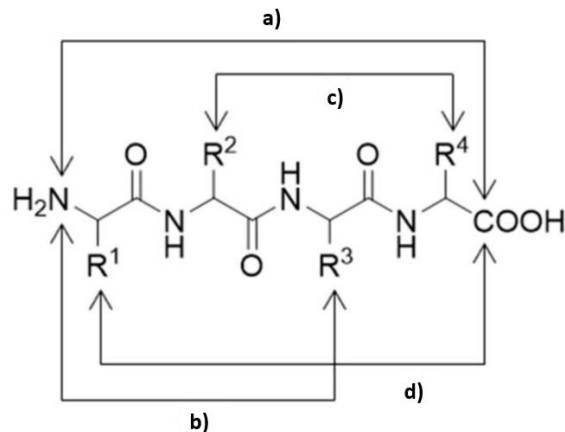


Rysunek 27. Struktura naturalnego aminokwasu w porównaniu z N-metylowanym.

Kolejną modyfikacją, która może być zastosowana w celu zwiększenia odporności proteolitycznej jest ugrupowanie peptoidowe bądź azapeptydowe (Rysunek 25).

Peptoidy można opisać jako mimetyki peptydów, w którym łańcuchy boczne są przyłączone do amidowego azotu zamiast do atomu węgla  $\alpha$ , co wpływa na polepszenie odporności na degradację enzymatyczną oraz zdolności do przenikania do wnętrza komórki. Ponieważ szkielety peptoidów pozbawione są centrów chiralnych oraz zakłócone jest w nich tworzenie wiązań wodorowych, związki tego typu mogą wykazywać mniejszą specyficzność. Węgiel  $\alpha$  można też zastąpić atomem azotu tworząc azapeptydy, które powstają przez acylowanie hydrazyny lub włączenie do sekwencji estru aza-aminokwasu. Zredukowane wiązanie ( $-\text{CH}_2\text{-NH}-$ ) (Rysunek 25) jest kolejną formą modyfikacji, zwiększającą elastyczność łańcucha peptydowego. Jednak również w tym przypadku ograniczenie możliwości tworzenia wiązań wodorowych, wynikające z braku grupy karbonylowej, może utrudniać oddziaływanie z celem molekularnym [188].

Stwierdzono, że cyklizacja sekwencji peptydowej zwiększa odporność na działanie proteaz. Cyklizację przeprowadza się zazwyczaj poprzez łączenie C-końca z N-końcem głównego łańcucha oraz poprzez łączenie C-końca lub N-końca łańcucha głównego z łańcuchem bocznym (Rysunek 28). Możliwa jest także cyklizacja poprzez połączenie jednego łańcucha bocznego z innym łańcuchem bocznym.



Rysunek 28. Różne układy cyklizacji: (a) typu „głowa – ogon”; (b) typu „głowa - łańcuch boczny”; (c) łańcuch boczny - łańcuch boczny; (d) „ogon – łańcuch boczny” [171], [172].

### 7.3. Modyfikacje polepszające przenikalność przez błony komórkowe

Błona komórkowa jest ogromną barierą, która oddziela wnętrze komórki od otoczenia. Podwójna warstwa lipidowa zbudowana jest z białek błonowych oraz węglowodanów, które działają jak półprzepuszczalny, selektywny filtr, umożliwiający przenikanie wybranych cząsteczek. Hydrofobowe ogony lipidów są połączone, tworząc hydrofobową membranę o grubości 3-4 nm. Taką barierę może pokonać tylko mała, nienaładowana cząsteczka, taka jak woda albo hormony steroidowe, które mogą z łatwością dyfundować przez membranę [189]. Małe, hydrofilowe składniki odżywcze lub jony, aby przedostać się do cytozolu, wykorzystują białka transportowe lub kanały, natomiast hydrofilowe makrocząsteczki o masie cząsteczkowej powyżej 500-1000 Da mają nikłą przenikalność przez membrany [190]. Błona komórkowa jest jedną z najtrudniejszych przeszkód do pokonania w projektowaniu oraz syntezie leków peptydowych. W celu rozwiązania tego problemu opracowano szereg metod transportu wspomaganego, wykorzystującego m.in. wirusy, peptydy CPP, liposomy oraz nanocząstki [191].

Peptydy penetrujące komórki (CPP) to sekwencje aminokwasowe, które mogą indukować procesy wychwytu przez komórki. W 1988 roku odkryto, że transaktywator białka transkrypcyjnego (TAT) z ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV-1) wykazuje się niezwykłą zdolnością do przenikania przez błony komórkowe [192]. Od tego czasu odkryto liczne naturalne oraz sztuczne sekwencje CPP. Ich przewagą nad pozostałymi rozwiązaniami jest prostota chemicznej i biologicznej syntezy, łatwość wprowadzenia do sekwencji potencjalnego terapeutycznego oraz wysoka biokompatybilność.

CPP wykazują zdolność do penetracji tkanek ze względu na małą hydrodynamikę ( $< 5$  nm) [193].

CPP można sklasyfikować według ich ładunku oraz hydrofobowości, co z kolei wiąże się z mechanizmem penetracji komórek. Dodatkowo naładowane CPP w fizjologicznych warunkach mają ogólny dodatni ładunek, co ułatwia im wiązanie się z ujemnie naładowaną błoną komórkową. Silna interakcja nie tylko zwiększa lokalne stężenie peptydów na błonie komórkowej, ale także indukuje wychwyt komórkowy peptydów poprzez endocytozę lub bezpośrednią penetrację błony. Sztandarowym przykładem tej grupy związków jest peptyd TAT o sekwencji GRKKRRQRRRPQ, posiadający osiem reszt o ładunku dodatnim – lizyn oraz arginin [194]. Łańcuch boczny lizyny oraz argininy mają wysoką wartość pKa, odpowiednio 10,3 oraz 12,5. Te dwa dodatnio naładowane aminokwasy mają wyraźny wpływ na penetrację komórki. Arginina posiada ugrupowanie guanidynowe w łańcuchu bocznym, natomiast lizyna posiada wolną grupę aminową. Ugrupowanie guanidynowe pozwala na silniejsze, bo dwukleszczowe wiązanie z grupą fosforanową fosfolipidów błony komórkowej [195].

Drugim odkrytym peptydem CPP jest penetratyna, która należy do grupy amfipatycznych CPP. Penetratyna ma inną budowę niż TAT. Posiada siedem naładowanych dodatnio reszt, ale w jej sekwencji, składającej się z szesnastu aminokwasów, występuje aż sześć reszt hydrofobowych, takich jak: tryptofan, izoleucyna, fenyloalanina, metionina. Te reszty są kluczowe dla zdolności penetrującej. Region kationowy w amfipatycznym CPP wchodzi w interakcję z ujemnie naładowaną błoną plazmatyczną, dodatkowo hydrofobowy region może oddziaływać z hydrofobowymi łańcuchami lipidowymi, wywołując strukturalną reorganizację błony [196]. Kolejną grupą są ujemnie naładowane CPP, jednak związki z neutralnym lub ujemnym ładunkiem wykazują bardzo ograniczoną penetrację i to głównie przy stosunkowo wysokich stężeniach. Jednakże dodatnio naładowane CPP są szybko usuwane z krwioobiegu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, a ujemne CPP prawdopodobnie są pozbawione tej wady, dlatego mają potencjał do zastosowania ich w strategii dostarczania systemowego [197].

Tabela 1. Klasyfikacja CPP.

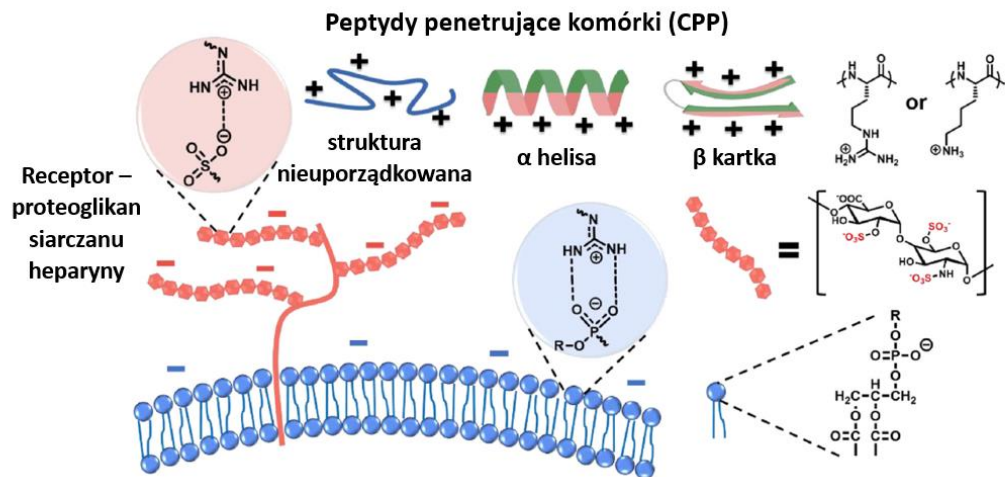
Peptyd	Sekwencja	Ładunek
<b>CPP o ładunku dodatnim</b>		
<b>TAT<sub>48-60</sub></b>	GRKKRRQRRRPPQ	+8/13
<b>Oligoarginina</b>	R <sub>n</sub> (6 < n < 9)	+6-9/6-9
<b>8-lizyna</b>	KKKKKKKK	+8/8
<b>Ampifatyczne CPP</b>		
<b>pVEG</b>	LLIILRRRIRKQAHASK	+8/18
<b>Penetratyna</b>	RQIKIWFQNRRMKWKK	+7/16
<b>MAP</b>	KLALKLALKALKALKLA	+5/18
<b>Pep1</b>	KETWWETWWTEWSQPKKRKY	+5/21
<b>Transportan</b>	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	+4/27
<b>CPP o ujemnym ładunku</b>		
<b>SAP(E)</b>	(VELPPP) <sub>3</sub>	-3/18
<b>P28</b>	LSTAADMQGVVTDGMASGLDKDYLPDD	-4/28

### 7.3.1. Mechanizm działania CPP

Jak dotąd, sugerowano dla CPP różne mechanizmy penetracji i wciąż jest trudno wskazać dominujący mechanizm. Ten sam CPP może wykorzystywać kilka opcji przenikania przez błonę komórkową w zależności od warunków. Mechanizmy ogólnie podzielone są na penetrację zależną oraz niezależną od energii ATP [197].

Większość CPP wnika do komórki poprzez endocytozę - mechanizm, za pomocą którego komórki wychwytyją pozakomórkowe składniki odżywcze, hormony, ligandy lub obce cząsteczki. Proces endocytarny wykorzystuje energię ATP do utworzenia struktury przypominającej pęcherzyk, zwanej endosomem. Pęcherzyki te są transportowane do wnętrza komórki. Istnieje kilka typów endocytozy, m.in. fagocytoza, makropinocytoza oraz endocytoza zależna i niezależna od receptora [198]. We wszystkich szlakach endocytarnych wymagana jest znaczna ilość ATP do zmiany krzywizny błony, jednak wiele CPP pokonuje ten wymóg przez destabilizację błony plazmatycznej [199]. Bezpośrednia interakcja pomiędzy CPP a dwuwarstwą fosfolipidową jest konieczna, aby wpłynąć na integralność błony plazmatycznej. Dodatnie ładunki, zwłaszcza ugrupowania guanidynowe reszt argininy, oddziałują z lipidowymi grupami fosforanowymi (Rysunek 29). W zależności od rodzaju interakcji zaproponowano trzy niezależne od energii

mechanizmy, które powstały w oparciu o badania CPP z modelami membranowymi: modelem odwróconej miceli, modelem tworzenia porów oraz modelem dywanu. Peptydy bogate w reszty argininy, takie jak TAT, wykazują preferencję do tworzenia odwróconych miceli. W mechanizmie tym CPP są otaczane przez fosfolipidy w wyniku interakcji ugrupowanie guanidynowe-fosforan, indukują również przegrupowanie lipidów, tworząc strukturę przypominającą tor, co umożliwia przenikanie przez błonę komórkową [200]. Większość CPP przenika do komórek na drodze więcej niż jednego mechanizmu. Stężenie CPP, temperatura, wielkość ładunku oraz komórki docelowe wpływają na preferowany mechanizm. Przy wysokim stężeniu ( $\sim 10 - 100 \mu\text{M}$ ) wiele CPP wykazuje zdolność penetracji niezależnie od energii ATP.



Rysunek 29. Oddziaływanie dodatnich ładunków CPP z ujemnymi ładunkami lipidów i węglowodanów błony komórkowej.



## II. Cel pracy

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było zaprojektowanie oraz zsyntezowanie stymulatorów proteasomu, zdolnych do przenikania przez błony komórkowe i stabilnych w warunkach proteolitycznych. Odkryto nową grupę bardzo skutecznych aktywatorów proteasomu, których sekwencje wywodzą się z C-końcowego fragmentu naturalnego regulatora proteasomu, białka Blm10 (drożdżowego ortologu białka PA200). Zdolność tych peptydów do stymulowania ludzkiego proteasomu 20S została udowodniona zarówno w testach aktywności ze standardowymi substratami fluorogennymi, jak i z modelowymi białkami ( $\alpha$ -synukleina, Tau441). Okazało się jednak, że w obecnej postaci analogi Blm nie są w stanie wnikać do komórek, a także charakteryzują się niską stabilnością proteolityczną. Poprawa tych dwóch parametrów była niezbędna do zaproponowania nowej struktury wiodącej, mogącej pomóc zaprojektować skuteczne stymulatory proteasomu, które ograniczałyby gromadzenie się nieprawidłowych białek w komórkach. Na tej podstawie wyodrębniłam następujące cele szczegółowe:

1. Projektowanie oraz otrzymanie aktywatorów Blm zdolnych do przenikania przez błony komórkowe oraz stabilnych w warunkach proteolitycznych.

Na podstawie wyników badań przeprowadzanych w ramach wcześniej realizowanych projektów zoptymalizowałam sekwencje aktywatorów typu Blm, aby otrzymać związki, które mogą łatwo przenikać przez błony komórkowe i są bardziej odporne na degradację proteolityczną niż naturalne peptydy. Wybrałam sekwencje z puli Blm, w oparciu o ich skuteczność w stymulacji ludzkiego proteasomu 20S. Wprowadziłam modyfikacje w postaci *N*-metylowanych aminokwasów lub mimetyku wiązania peptydowego, co zapewniło większą stabilność proteolityczną powstałych peptydomimetyków. Zoptymalizowałam zarówno rodzaj modyfikacji, jak i ich położenie w sekwencjach aktywatorów. Aby spełnić kluczowy warunek przenikalności do komórek, wydłużyłam sekwencję poprzez dołączenie kilku reszt niosących ładunek dodatni. Wykorzystałam sekwencje znanych CPP – fragmentu 49-57 białka HIV-1 Tat oraz sześćoaminokwasowego peptydu zbudowanego wyłącznie z reszt argininy. Otrzymałam 26 zmodyfikowanych aktywatorów Blm.

2. Oznaczenie zdolności aktywujących związków – badania z wyizolowanym ludzkim proteasomem 20S.

Wpływ otrzymanych związków na aktywność katalityczną peptydaz chymotrypsyno, trypsyno- i kaspazopodobnych proteasomu określiłam przy użyciu standardowych substratów fluorogennych i proteasomu 20S izolowanego z ludzkich erytrocytów. Dodatkowo aktywność proteasomu badałam przy użyciu zsyntezowanego substratu typu FRET, Dabcyl-EDANS.

### 3. Oznaczenie stabilności związków w ludzkim osoczu.

Stabilność proteolityczną związków o udowodnionej zdolności stymulującej wobec ludzkiego proteasomu 20S określiłam *in vitro*. Związki inkubowałam w osoczu w temperaturze 37°C. Stabilność każdego związku oszacowałam za pomocą analizy UHPLC. Miejsca rozszczepienia określiłam metodą spektrometrii mas.

### 4. Badanie przenikalności przez błony komórkowe.

Aby ocenić, czy otrzymane aktywatory proteasomu są w stanie przeniknąć przez błonę komórkową, zsyntezowałam analogi znakowane barwnikiem fluorescencyjnym 4-chloro-7-nitrobenzofurazanem (NBD). Następnie wykorzystałam mikroskopię fluorescencyjną do wykrycia ich przedostawania się do komórek. Do testów wykorzystałam ludzkie embrionalne komórki nerki 293 (HEK293T).

Przed wykonaniem badań biologicznych, peptydomimetyki poddałam ocenie cytotoksyczności wobec linii komórkowej w hodowli *in vitro*.

### 5. Badanie aktywności proteasomu w hodowli komórkowej.

Chcąc ocenić zdolność aktywacyjną proteasomu w hodowli komórkowej, komórki HEK293T poddałam lizie, a następnie zbadałam wpływ związków na aktywność stosując standardowy substrat fluorogeny Suc-LLVY-AMC. Dodatkowo przeprowadziłam eksperyment z zsyntezowaną sondą fluorescencyjną TAS3, która jest specyficzna dla proteasomu oraz przenika przez błony komórkowe.

### 6. Ocena oddziaływań pomiędzy peptydomimetykiem a proteasomem 20S.

Zweryfikowałam za pomocą techniki MST możliwość tworzenia kompleksu peptydomimetyk : proteasom 20S.

7. Określenie zdolności związków do stymulacji proteasomu do wydajnej degradacji substratów białkowych przez proteasom 20S.

Aby określić, czy otrzymane związki mogą stymulować proteasom do efektywniejszej degradacji białek skłonnych do agregacji, wykorzystałam modele, które są potwierdzonymi substratami 20S. Jednym z nich była  $\alpha$ -synukleina, której agregaty biorą udział w rozwoju choroby Parkinsona. Drugim było białko Tau, którego agregacja towarzyszy chorobie Alzheimera. Białka modelowe zostały poddane inkubacji z proteasomem 20S w obecności/nieobecności aktywatora. Wyniki doświadczenia poddałam analizie metodą elektroforezy SDS-PAGE.

8. Określenie zdolności związków do stymulacji proteasomów w modelu komórkowym.

Zweryfikowałam zdolność otrzymanych aktywatorów do redukcji indukowanych agregatów  $\alpha$ -synukleiny w mysich pierwotnych komórkach hipokampalnych. Komórki wyizolowałam z zarodków myszy. Agregaty  $\alpha$ -synukleiny powstały poprzez wprowadzenie PFFs, prionopodobnej, łatwo wnikażącej do komórek, nieprawidłowo sfałdowanej  $\alpha$ -synukleiny, która może indukować tworzenie się inkluzji podobnych do ciał Lewy'ego i dysfunkcji komórkowych w modelach *in vivo* i *in vitro*. Utrwalone komórki zwizualizowałam poprzez użycie przeciwciał pierwszorzędowych: króliczego monoklonalnego anty-fosfoseryna129-alfa-synukleinowego i mysiego anty-neuronalnego. Kolejno wybarwiłam komórki przeciwciałami drugorzędowymi: D@R 488 oraz D@M 647. Następnie rozpoczęłam skanowanie płytek pod mikroskopem fluorescencyjnym, a uzyskane obrazy analizowałam za pomocą programu CellProfiler.

### III. Metodologia przeprowadzonych badań

#### 1. Uwagi ogólne

Do wyznaczenia mas cząsteczkowych otrzymanych związków wykorzystałam spektrometr mas LCMS-ESI-IT-TOF (Shimadzu) oraz spektrometr MALDI TOF Biflex III (Bruker). W przypadku techniki MALDI stosowałam matrycę DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy) oraz CCA (kwas  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowy).

#### 2. Synteza pochodnych aminokwasowych

Przebieg syntez był kontrolowany za pomocą chromatografii TLC (płytki pokryte żelazem krzemionkowym F254, 60  $\mu$ m, układ rozwijający: chloroform: metanol: kwas octowy (85:10:5) oraz HPLC (Varian ProStar, kolumna Kinetex 100 x 2,1 mm, 2,6  $\mu$ m, gradient 5-100% B, 30 minut, gdzie A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 80% ACN + 0,08% TFA).

##### 2.1. Synteza pochodnej kwasu glutaminowego z propargiloaminą dołączoną do grupy karboksylowej w łańcuchu bocznym.

Przygotowałam roztwór składający się z 1 eq. Fmoc-Glu-OtBu rozpuszczonego w 2 ml DCM, 1,3 eq. aktywatora HATU rozpuszczonego w DMF oraz 3 eq. DIPEA. W kolbie umieściłam 1 eq. propargiloaminy oraz dodałam roztwór zawierający preaktywowany aminokwas. Mieszankę pozostawiłam na mieszadle magnetycznym, w temperaturze pokojowej, przez noc. Następnie odparowałam rozpuszczalniki korzystając z wyparki próżniowej. Do ok. 1 ml zatężonego roztworu dodałam octan etylu, całość przenieśliam do rozdzielacza. Warstwę organiczną przemyłam kolejno: 1 M HCl, solanką, 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, solanką do uzyskania obojętnego pH. Warstwę organiczną wysuszyłam za pomocą bezwodnego Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odsączeniu środka suszącego odparowałam octan etylu, co spowodowało wytrącenie się osadu. W kolejnym etapie usunęłam osłonę OtBu. W tym celu otrzymany osad rozpuściłam w około 10 ml 6 M HCl w dioksanie, a następnie mieszałam na mieszadle magnetycznym, kontrolując postęp reakcji za pomocą HPLC. Łącznie reakcja przebiegała 1 godzinę. W ostatnim etapie syntezy odparowałam rozpuszczalnik, a produkt wytrąciłam zimnym eterem dietylowym. Zawiesinę pozostawiłam przez 24 godziny w lodówce, po czym osad odsączyłam na lejku Buchnera.

## 2.2. Synteza pochodnej Boc-Lys(Boc)-OH

10 mmoli H-Lys-OH rozpuściłam w 10 ml 1 M NaOH i 10 ml *tert*-butanolu. Następnie dodałam 24 mmole Boc<sub>2</sub>O w ciągu 30 minut, utrzymując pH na poziomie 8-9 za pomocą 1 M NaOH. Zawartość kolby była mieszana przez 24 godziny na mieszadle magnetycznym. Po upływie tego czasu odparowałam *tert*-butanol, dodałam wody i dwukrotnie ekstrahowałam heksanem w celu usunięcia nadmiaru Boc<sub>2</sub>O. Warstwę wodną zakwasiłam 1 M HCl, po czym poddałam ją czterokrotnej ekstrakcji octanem etylu. Następnie warstwę organiczną przemyłam wodą, solanką i wysuszyłam nad bezwodnym MgSO<sub>4</sub>. W ostatnim etapie odsączyłam środek suszący, odparowałam rozpuszczalnik do momentu pojawienia się oleju. Powstały oleisty produkt suszyłam w eksykatorze. Otrzymany związek bez dalszego oczyszczania wykorzystałam w kolejnym etapie syntezy.

## 3. Synteza peptydów i peptydomimetyków

### 3.1. Osadzanie pierwszego aminokwasu na nośniku stałym

Pierwszy aminokwas do żywicy Wang przyłączyłam przy użyciu metody estrów aktywnych (5 eq. Fmoc-AA-OH, 5 eq. MSNT, 3,85 eq. Mlm). Przygotowałam roztwór Fmoc-aminokwasu w bezwodnym DCM z dodatkiem kilku kropel THF w celu lepszego rozpuszczenia, dodałam MSNT oraz Mlm. Usunęłam powietrze z roztworu, przepuszczając przez niego strumień argonu. Szczelnie zamkniętą kolbę pozostawiłam na mieszadle magnetycznym do rozpuszczenia MSNT, po czym jej zawartość za pomocą strzykawki przeniosłam do żywicy znajdującej się w naczyniu reakcyjnym. Całość wytrząsałam przez godzinę, na wytrząsarce o ruchu drgającym. Odsączyłam mieszaninę reakcyjną, następnie peptydylożywicę przemyłam 5xDMF, 5xDCM oraz 2xMeOH. Przeprowadziłam dodatkowe osadzenie Fmoc-aminokwasu, przygotowując roztwór 4 eq. Fmoc-AA-OH, 3,8 eq. TBTU, 8 eq. DIPEA w DMF. Po zmianie zabarwienia mieszaniny na delikatnie żółty kolor, dodałam ją do żywicy. Po 2 godzinach wytrząsania mieszaninę reakcyjną odsączyłam pod zmniejszonym ciśnieniem, peptydylożywicę przemyłam DMF, DCM, MeOH oraz umieściłam ją w eksykatorze w celu wysuszenia.

Aby dołączyć pierwszy aminokwas do żywicy Cl-TCP(Cl) ProTide przygotowałam roztwór 0,6 eq. Fmoc-aminokwasu oraz 4 eq. DIPEA w DMF, który dodałam do napęczniałej żywicy. Całość wytrząsałam przez 1,5 godziny. Po tym czasie

odsączyłam mieszaninę od peptydyżywicy, którą przemyłam 5xDMF, 5xDCM oraz 2xMeOH. Następnie żywicę z osadzonym aminokwasem wytrząsałam z mieszaniną DCM-MeOH-DIPEA (17:2:1), dwukrotnie przez 2 minuty. Ostatecznie peptydyżywicę przemyłam DCM.

### 3.2. Sprawdzenie stopnia osadzenia pierwszego aminokwasu na żywicy.

Do umieszczonej w szklanej ampule osuszonej peptydyżywicy (3-6 mg) dodałam 1 ml roztworu piperydiny w DMF (3:7). Po zakończeniu 30-minutowego wytrząsania dodałam 5 ml metanolu. Po 5 minutach znajdującą się w ampule mieszaninę przesączyłam oraz przeniosłam ilościowo do kolby miarowej, uzupełniając ją następnie metanolem do objętości 25 ml. Próbę referencyjną stanowił roztwór zawierający piperydynę, DMF, metanol w proporcji 0,3: 0,7: 2,4 w objętości 25 ml. Następnie dokonałam pomiaru absorbancji dla obu przygotowanych roztworów w kuwecie o pojemności 1 ml, przy długości fali 301 nm, na spektrofluorymetrze Infinite M200Pro (Tecan).

Stopień osadzenia obliczałam ze wzoru:

$$L = \frac{A_{301} \times V \times 10^6}{\epsilon \times l \times m}$$

$A_{301}$  - absorbancja zmierzona przy długości fali 301 nm

V – pojemność kolby miarowej [dm<sup>3</sup>]

l – długość drogi optycznej [cm]

m – masa żywicy [mg]

$\epsilon$  – współczynnik ekstynkcji (7800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

### 3.3. Synteza manualna peptydomimetyków

Syntezy manualne sekwencji peptydowych prowadziłam w temperaturze pokojowej w strzykawce ze spiekaniem. Reszty aminokwasowe dołączałam korzystając z mieszaniny zawierającej 4 eq. Fmoc-aminokwasu, 4 eq. DIC, 4 eq. HOBt, 8 eq. DIPEA, rozpuszczone w niewielkiej ilości DMF. Deprotekcję grupy aminowej przeprowadziłam przy użyciu

20% roztworu piperydyny w DMF. Każdorazowo po zakończeniu acylowania lub deprotekcji sprawdzałam postęp syntezy za pomocą testu chloranilowego.

Tabela 2. Przykładowy cykl syntezy.

Lp	Reagenty i rozpuszczalniki	Etap syntezy	Czas [min]
1.	DMF	Przemywanie	5 x 1
2.	20% piperydyna w DMF	Deprotekcja	2 x 15
3.	DMF	Przemywanie	5 x 1
4.	DCM	Przemywanie	5 x 1
5.	Fmoc-AA-OH/odczynnik sprzęgający/DIPEA w DMF	Acylowanie	90
6.	DMF	Przemywanie	5 x 1
7.	DCM	Przemywanie	5 x 1

### 3.4. Synteza z wykorzystaniem automatycznego syntezyzatora mikrofalowego

Syntezy prowadziłam w skali 0,05 lub 0,1 mmol, w atmosferze azotu, korzystając z automatycznego mikrofalowego syntezyzatora Liberty Blue (CEM Corporation). Standardowe acylowanie prowadziłam używając 4 eq Fmoc-aminokwasu, 4 eq DIC oraz 4 eq Oxyma pure w stosunku do stopnia osadzenia nośnika stałego. Podczas dołączania Fmoc-Arg(Pbf)-OH zastosowałam podwójne acylowanie. Do deprotekcji stosowałam 20% roztwór piperydyny w DMF. W przypadku syntez na żywicy Cl-TCP(Cl) Protide, do 1 M roztworu Oxyma dodawałam 0,1 M DIPEA, chcąc zapobiec odszczepieniu peptydu od nośnika. Podczas wykonywania syntez korzystałam z DMF suszonego nad sitami molekularnymi A3 oraz A4.

Opis procesu syntezy:

W pierwszym etapie syntezy nastąpiło odblokowanie osłoniętej ugrupowaniem Fmoc grupy aminowej na nośniku stałym. Etap ten został wykonany przez potraktowanie żywicy 20% roztworem piperydyny w DMF, przy jednoczesnym poddawaniu jej przez 15 sekund działaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 125 W (temperatura 70°C), a następnie promieniowania o mocy 30 W w czasie 110 sekund (temperatura 85-90°C). Nośnik stały był odsączany i przemywany 4-krotnie DMF. Wszystkie *N*-chronione

aminokwasy były dołączane w analogiczny sposób, z wykorzystaniem 0,5 M roztworu DIC w DMF jako odczynnika sprzęgającego oraz 1 M roztworu Oxyma pure jako odczynnika zapobiegającego racemizacji. W reakcji używano 4-krotnego nadmiaru aminokwasu w stosunku do stopnia osadzenia stałego nośnika. Reakcja sprzęgania była prowadzona z wykorzystaniem indukcji mikrofalowej o mocy 170 W przez 15 sekund (temperatura 75°C), a następnie mocy 30 W przez 110 sekund, podczas których temperatura utrzymywała się w zakresie 89-90°C. Każdorazowo po dołączeniu *N*-chronionego aminokwasu peptydylożywica była odsączana i dodawany był do niej 20% roztwór piperydyny w DMF, w celu odblokowania grupy aminowej. Etap deprotekcji prowadzony był z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego o mocy 125 W przez 15 sekund (temperatura równa 75°C), a następnie mocy 30 W w czasie 110 sekund (temperatura w zakresie 89-90°C). Po zakończeniu syntezy peptydylożywicę przenosiłam z naczynia reakcyjnego do strzykawki ze spiekem i przemywałam 4-krotnie DMF, następnie 3-krotnie MeOH oraz 1-krotnie Et<sub>2</sub>O i pozostawiałam ją w próżniowym eksykatorze.

Tabela 3. Przykładowy cykl syntezy z zastosowaniem syntezy mikrofalowego.

Lp	Reagenty i rozpuszczalniki	Etap syntezy	Temperatura i czas
1.	20% piperydyna w DMF	Deprotekcja	75°C, 15 s 90°C, 50 s
2.	DMF	Przemywanie	17 s
3.	DMF	Przemywanie	17 s
4.	DMF	Przemywanie	17 s
5.	DMF	Przemywanie	17 s
6.	0,2 M Fmoc-AA-OH/ 0,5 M DIC/ 1 M OXYMA	Acylowanie	75°C, 15 s 90°C, 110 s

W przypadku analogów aktywatora E ze względu na żywicę Cl-TCP(Cl) wprowadziłam następujące zmiany do cykli:

Acylowanie: moc 30 W; czas 480 sekund; temperatura 50°C

W przypadku A1-tat, A1-6r, D1-tat oraz D1-tat(R1) jako odczynnik sprzęgający zastosowałam 0,5 M roztwór HCTU w DMF w połączeniu z 2 M roztworem DIPEA w NMP. Dodatkowo wprowadziłam następujące zmiany do cykli:



Acylowanie: moc 29 W; czas 600 sekund; temperatura 75°C, podwójne sprzęganie.

Deprotekcja: moc 28 W; czas 180 sekund; temperatura 75°C

### 3.5. Wprowadzenie do sekwencji wiązania peptoidowego lub *N*-metylowanych aminokwasów

#### 3.5.1. Wprowadzenie wiązania peptoidowego do sekwencji

Wiązanie peptoidowe wprowadziłam w następujący sposób: przygotowałam mieszaninę 2 M roztworu kwasu bromooctowego w DMF oraz 2 M roztworu aktywatora DIC (50:50, v/v). Mieszaninę wytrząsałam do momentu pojawienia się osadu, następnie całość dodałam do peptydylożywicy znajdującej się w strzykawce ze spiekim i wytrząsałam przez 30 min. Po tym czasie odsączyłam mieszaninę, peptydylożywicę przemyłam 4-krotnie DMF oraz dodałam do niej 1,5 M roztwór odpowiedniej aminy w DMF, po czym ponownie wytrząsałam całość przez 1,5 godziny. W zależności od sekwencji peptydomimetyku do jego syntezy użyłam odpowiedniej aminy.

Tabela 4. Przykłady amin wykorzystanych w syntezie poszczególnych związków.

Amina	Nazwa związku
<i>N</i> -Boc-1,4-diaminobutan	A1, A3, B1, C1, C2, C3, A1-tat, A1-6r, D1-tat
4-metoksybenzyloamina	C4, C5, C6
Etanoloamina	A2, A3, E2, E3
Benzyloamina	E1, E3
1,3-diaminopropan	D1-tat(R1)

Początkowo, przy syntezie związków C2 oraz C3, korzystałam z aminy nieposiadającej ugrupowań ochronnych i po dołączeniu aminy do peptydylożywicy wprowadzałam roztwór zawierający ugrupowanie ochronne ivDde-OH. 10 eq. tego związku rozpuszczałam w 2,5 ml DMF. Całość była wytrząsana przez 1h. Po syntezie dalszej sekwencji, przed odszczepieniem produktu od nośnika stałego, usuwałam osłonę ivDde stosując 4-krotne wytrząsanie, każdorazowo przez 4 minuty, ze świeżą porcją 5% roztworu hydrazyny w DMF. Jednakże ze względu na brak dobrej wydajności podczas zakładania osłony, dużą liczbę produktów ubocznych oraz problemy podczas

oczyszczania, zaczęłam przy wprowadzaniu tej modyfikacji korzystać z *N*-Boc-1,4-diaminobutanu, co zdecydowanie usprawniło oraz przyspieszyło proces syntezy.

Podczas syntezy D1-tat(R1), po dołączeniu 1,3-diaminopropanu do peptydylożywicy dodałam roztwór z odczynnikami guanidylującym: 6 eq. pirazolo-1-karboksyamidu oraz 6 eq. DIPEA. Mieszaninę wytrząsałam przez 1 godzinę.

Po manualnym wprowadzeniu modyfikacji w kolejnym etapie mieszaninę reakcyjną odsączałam od peptydylożywicy, którą 4-krotnie przemyłam DMF. Kolejny *N*-chroniony aminokwas z sekwencji także dołączałam w sposób manualny. Peptydylożwicę poddałam 2-godzinnemu wytrząsaniu z rozpuszczonymi w DMF *N*-osłoniętym aminokwasem, odczynnikami aktywującym DIC oraz HOBt. W reakcji używałam 4-krotnego nadmiaru każdego ze składników w stosunku do stopnia osadzenia żywicy. Reakcje acylowania przeprowadziłam 2-krotnie. Syntezę dalszej części sekwencji kontynuowałam z wykorzystaniem syntezy mikrofalowego Liberty Blue, zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 3.4.

### 3.5.2. Wprowadzenie *N*-metylowanych aminokwasów do sekwencji

*N*-metylowane aminokwasy wprowadzałam do następujących peptydomimetyków:

Tabela 5. Przykłady *N*-metylowanych aminokwasów zastosowanych w syntezie.

<b><i>N</i>-metylowany aminokwas</b>	<b>Nazwa związku</b>
Fmoc- <i>N</i> -MeLys(Boc)-OH	A5, B3
Fmoc- <i>N</i> -MeSer(tBu)-OH	A4
Fmoc- <i>N</i> -MeTyr(tBu)-OH	A5, B3
Fmoc- <i>N</i> -MeArg(Pbf)-OH	A4, B2

Pochodne aminokwasowe dołączałam poprzez 3-godzinne wytrząsanie peptydylożywicy z mieszaniną składającą się z: 3 eq. *N*-chronionego *N*-metylowanego aminokwasu, 3 eq. aktywatora COMU oraz 5,4 eq. DIPEA, rozpuszczonych w DMF. Przed dodaniem do żywicy mieszaninę wytrząsałam przez 3 minuty w celu preaktywacji aminokwasu. Po zakończeniu sprzęgania wykonywałam test chloranilowy. Po uzyskaniu wyniku testu wskazującego na brak wolnej grupy aminowej przeprowadzałam usunięcie osłony Fmoc, stosując 20% roztwór piperidyny w DMF. Roztwór do deprotekcji wytrząsałam z peptydylożwicą przez 15 minut, następnie mieszaninę odsączałam, po czym proces

deprotekcji wykonywałam ponownie. Kolejny *N*-chroniony-*N*-metylowany aminokwas bądź standardowy *N*-osłonięty aminokwas przyłączałam według analogicznej procedury. W przypadku A4 oraz B2, po zakończeniu tego etapu dalszą syntezę prowadziłam przy użyciu syntezy mikrofalowego Liberty Blue, zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.4.

### 3.6. Synteza Bis1

Sekwencję KTRNTGE(propargiloamina)DWRSYYS zsyntezowałam z wykorzystaniem syntezy mikrofalowego Liberty Blue. Jako odczynnik sprzęgający zastosowałam 0,5 M roztwór HCTU w DMF w połączeniu z 2 M roztworem DIPEA w NMP. Natomiast w celu deprotekcji wykorzystywałam 5% roztwór piperazyny w DMF zawierający 0,1 M HOBt. Dodatkowo wprowadziłam następujące modyfikacje do cykli:

Sprzęganie: moc 29 W; czas 600 sekund; temperatura 75°C, podwójne sprzęganie.

Deprotekcja: moc 28 W; czas 180 sekund; temperatura 75°C.

Pochodną kwasu glutaminowego z modyfikowanym propargiloaminą łańcuchem bocznym dołączyłam do peptydydożywicy manualnie, dodając mieszaninę zawierającą 3 eq. pochodnej aminokwasowej, 3 eq. DIC oraz 3 eq. HOBt. Dalszy, *N*-końcowy fragment sekwencji, zsyntezowałam ponownie z wykorzystaniem syntezy mikrofalowego Liberty Blue.

Sekwencję TRNEGK(Mtt)DWRSYYS zsyntezowałam przy użyciu syntezy mikrofalowego. Ostatnią, *N*-końcową resztę – pochodną Boc-Lys(Boc)-OH, dołączyłam manualnie, stosując 4 eq. pochodnej, 4 eq. DIC oraz 4 eq. HOBt w stosunku do stopnia osadzenia żywicy. Wszystkie reagenty rozpuściłam w DMF. Mieszanina była wytrząsana z peptydydożywicą przez 1,5 godziny. W kolejnym etapie usunęłam osłonę Mtt z lizyny poprzez 10-krotne wytrząsanie peptydydożywicy z 1,8% roztworem TFA/DCM, każdorazowo po 3 minuty. Następnie przemyłam peptydydożywicę za pomocą DMF, dodałam do niej mieszaninę składającą się z 4 eq. Fmoc-PEG2-OH, 4 eq. DIC oraz 4 eq. HOBt, rozpuszczonych w DMF. Całość wytrząsałam 1,5 godziny, po czym ponownie żywicę przemyłam DMF, dodałam do niej mieszaninę 4 eq. Fmoc-PEG2-OH, 3,5 eq. HATU oraz 3 eq. DIPEA w DMF i ponownie wytrząsałam przez 1,5 godziny. Następnie usunęłam osłonę Fmoc poprzez 3-krotne wytrząsanie żywicy z 20% roztworem piperidyny w DMF, każdorazowo po 20 min, w temperaturze pokojowej.

Po przeprowadzeniu deprotekcji do peptydylożywicy dodałam roztwór zawierający 1,25 eq. DIPEA oraz 2 eq. HOBt rozpuszczone w DMF. Po czym porcjami, przez 0,5 h, dodałam 10 eq. bezwodnika bursztynowego rozpuszczonego w 5 ml DMF, za pomocą DIPEA utrzymując pH na poziomie 7. Następnie całość mieszałam przez 1 godzinę. W ostatnim etapie do zsyntezowanej sekwencji dołączałam N<sub>3</sub>-PEG3-NH<sub>2</sub>, trzykrotnie wykonując 1,5-godzinny cykl sprzęgania. W kolejnych cyklach stosowałam 4 eq. N<sub>3</sub>-PEG3-NH<sub>2</sub> oraz odmienne czynniki sprzęgające. Za pierwszym razem wprowadziłam mieszaninę 4 eq. DIC i 4 eq. OXYMA w DMF, za drugim dodałam 3,5 eq. HATU oraz 3 eq. DIPEA w DMF, za trzecim natomiast 4 eq. HCTU i 3 eq. DIPEA.

Peptyd z dołączonym ugrupowaniem azydkowym oraz ten z przyłączoną propargiloaminą odszczepiłam od nośnika stałego i poddałam oczyszczeniu. Do połączenia obu peptydów wykorzystałam reakcję CLICK. W kolbie umieściłam rozpuszczony w 1 ml H<sub>2</sub>O peptyd z wiązaniem potrójnym, następnie dodałam peptyd zawierający ugrupowanie azydkowe, 0,5 M roztwór askorbinianu sodu oraz 0,1 M roztwór siarczynu (VI) miedzi (II). Reagenty dodałam w stosunku molowym: 1:3:4:3. Mieszaninę poddałam ogrzewaniu mikrofalowemu przez 5 min w 60°C, następnie reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej, na mieszadle magnetycznym, przez 24 godziny. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodałam H<sub>2</sub>O, następnie zamroziłam ją w ciekłym azocie i poddałam procesowi liofilizacji.

### 3.7. Synteza Bis1-tat

Bis1-tat zsyntezowałam w analogiczny sposób jak Bis1. Jediną różnicę stanowił fakt, iż peptyd posiadający propargiloaminę dołączoną do grupy karboksylowej w łańcuchu bocznym kwasu glutaminowego wydłużyłam o sekwencję peptydową polepszającą przenikalność przez błony komórkowe - RKKRRQRRR (tat).

### 3.8. Synteza Bis2

Zsyntezowałam oraz odszczepiłam od nośnika stałego sekwencję peptydową (zgodnie z procedurą zawartą w punkcie 3.4. oraz 3.14.), którą następnie rozpuściłam w 5 ml H<sub>2</sub>O. Do roztworu dodałam 2,5 eq. *p*-dibromoksylenu. Doprowadziłam pH do około 7,5 za pomocą 0,2 M roztworu NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Całość mieszałam na mieszadle magnetycznym, co pół godziny przeprowadzając analizę HPLC badającą postęp reakcji. Po 3 godzinach

roztwór zakwaśiłam 2% TFA w DMF do pH 2-3. Mieszaninę przesączałam przez sącdek karbowany.

### 3.9. Synteza Bis3

Zsyntezowałam sekwencję peptydową zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.4, następnie peptyd odszczepiłam od nośnika stosując procedurę opisaną w punkcie 3.14. Następnie otrzymany peptyd rozpuściłam w 2 ml DMSO i utleniłam, dodając go w stosunku molowym 1:2 do DPDS rozpuszczonego w minimalnej ilości DMSO. Reakcja trwała 24 godziny. Po tym czasie do kolby dodałam 5 ml układu A: 100% H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA i przystąpiłam do oczyszczania.

### 3.10. Synteza Bis4

Korzystając z syntezy mikrofalowej zsyntezowałam na nośniku stałym sekwencję peptydową zawierającą Fmoc-*N*-amido-PEG2-OH. Po zakończeniu syntezy peptydydyżownicę podzieliłam na dwie równe części. Do jednej części dołączałam Fmoc-Gly-OH. W tym celu żywicę poddałam 2-godzinnemu wytrząsaniu z mieszaniną zawierającą 4 eq. rozpuszczonego w DMF *N*-osłoniętego aminokwasu, 4 eq. DIC oraz 4 eq. HOBt. Tę reakcję przeprowadziłam 2-krotnie.

Do drugiej części peptydydyżownicy przyłączyłam bezwodnik bursztynowy. Do nośnika stałego dodałam mieszaninę DIPEA z dodatkiem HOBt, rozpuszczone w 4 ml DMF. Następnie porcjami dodałam roztwór bezwodnika bursztynowego w 3 ml DMF. Całość mieszałam przez godzinę, kontrolując pH. Podczas reakcji użyłam 1,25 eq. DIPEA, 2 eq. HOBt oraz 2 eq. bezwodnika bursztynowego w stosunku do stopnia osadzenia nośnika. W celu utworzenia estru aktywnego TFPh na grupie karboksylowej powstałej po dołączeniu bezwodnika bursztynowego, peptydydyżownicę umieściłam w kolbie okrągłodennej zawierającej niewielką ilość DMF. 11 eq. TFPh rozpuściłam w 3 ml DMF i dodałam do żywicy. Całość mieszałam na mieszadle magnetycznym w 0°C, przez dwie godziny, porcjami dodając 11 eq. DIC. Mieszaninę reakcyjną przenieśliam do łaźni lodowej i pozostawiłam ją na 24 godziny na mieszadle magnetycznym, w lodówce. W kolejnym etapie odsączałam mieszaninę reakcyjną, a do peptydydyżownicy dodałam roztwór o pH ustalonym za pomocą TEA na poziomie ok. 8,5, zawierający 40 µmol odszczepionego od nośnika i rozpuszczonego w DMF peptydu H-Gly-PEG2-LERSYYS-OH. Mieszaninę poddałam wytrząsaniu z peptydydyżownicą przez 3 dni, po czym

odsączyłam mieszaninę reakcyjną, a peptydydłożywicę przemyłam 4-krotnie DMF, następnie 3-krotnie MeOH oraz 1-krotnie Et<sub>2</sub>O i pozostawiłam ją w próżniowym eksykatorze.

### 3.11. Dołączanie fluoroforu NBD do sekwencji

Do peptydydłożywicy dodałam 3 eq. NBD oraz 3 eq. DIPEA rozpuszczone w minimalnej objętości DMF. Całość wytrząsałam przez 24 godziny. Następnie odsączyłam nadmiar reagentów, a peptydydłożywicę przemyłam 5-krotnie DMF, 5-krotnie DCM oraz 2-krotnie MeOH.

### 3.12. Synteza substratu fluorescencyjnego Dabcyl-EDANS

Sekwencję H-K(Dabcyl)MSGFAATAE(EDANS)G-OH zsyntezowałam w sposób manualny na żywicy Wang z ręcznie osadzoną glicyną. Reakcje acylowania prowadziłam w 55°C przez 1 godzinę. Przed dodaniem do żywicy mieszaniny zawierającej 4 eq. Fmoc-aminokwasu, 4 eq. COMU, 8 eq. DIPEA w DMF, wytrząsałam ją przez 3 minuty w temperaturze pokojowej w celu preaktywacji. Po przyłączeniu kolejnych reszt aminokwasowych peptydydłożywicę przemywałam za pomocą DMF, DCM. Podczas deprotekcji korzystałam z 20% roztworu piperydyny w DMF, reakcję przeprowadziłam w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Deprotekcję przeprowadzałam dwukrotnie.

### 3.13. Synteza sondy fluorescencyjnej TAS3

Sondę TAS3 zsyntezowałam w sposób manualny na nośniku stałym TentaGel R RAM (m= 0,6 g; stopień osadzenia = 0,20 mmol/g). W pierwszym etapie, po usunięciu grupy Fmoc znajdującej się na żywicy, do uwolnionej grupy aminowej dołączyłam kwas bromooctowy (BAA). W tym celu przygotowałam 4 ml mieszaniny składającej się z 2 M roztworu BAA oraz 1 M aktywatora DIC (1:1 v/v), po wytrąceniu się białego osadu całą mieszaninę dodałam do żywicy i wytrząsałam 20 minut w temperaturze 37°C. Następnie odsączyłam mieszaninę reakcyjną, przemyłam żywicę trzykrotnie DMF. Po uzyskaniu negatywnego wyniku testu chloranilowego do żywicy dodałam 1 M roztwór *N,N*-dimetylo-1,3-propanodiaminy w DMF i wytrząsałam przez 1 godzinę w 37°C. Po uzyskaniu pozytywnego wyniku testu chloranilowego przystąpiłam do wydłużania łańcucha peptoidowego w analogiczny sposób, sprzęgając kolejno BAA oraz 3-metoksypropyloaminę i *N,N*-dimetylo-1,3-propanodiaminę. Po ukończeniu syntezy fragmentu peptoidowego dołączyłam do sekwencji resztę glicyny. W tym celu 4 eq.

Fmoc-Gly-OH i 3,75 eq. HATU rozpuściłam w DMF i dodałam 8 eq. DIPEA. Po zmianie zabarwienia na kolor żółty mieszaninę dodałam do żywicy i poddałam ją wytrząsaniu przez 3 h w 37°C. Po przeprowadzeniu deprotekcji 20% roztworem piperydyny, potwierdzonej pozytywnym wynikiem testu chloranilowego, do żywicy dodałam roztwór 10 eq. bezwodnika bursztynowego w DMF z dodatkiem 12 eq. pirydyny. Całość wytrząsałam przez 24 godziny. W kolejnym etapie przygotowałam 6 ml mieszaniny zawierającej 40 eq. gąbki protonowej w DMF oraz 40 eq. DIPEA. Połowę tego roztworu dodałam do żywicy na pięciominutowe wytrząsanie, do pozostałej mieszaniny dodałam 1 eq. COMU. Po odsączeniu mieszaniny gąbki protonowej i DIPEA dodałam do żywicy mieszaninę zawierającą odczynnik aktywujący. Po pięciominutowym wytrząsaniu w 60°C do zawiesiny dodałam 3 ml roztworu zawierającego 10 eq. chlorku rodaminu 110. Całość została poddana wytrząsaniu w 60°C przez 3 godziny. W następnym etapie dołączyłam Fmoc-Phe(4-NO<sub>2</sub>)-OH. W tym celu ponownie przygotowałam roztwór 40 eq. gąbki protonowej w 6 ml DMF, połowę roztworu dodałam na 5 minut do żywicy w celu aktywacji, a do pozostałej porcji dodałam 10 eq. pochodnej aminokwasowej oraz 10 eq. aktywatora COMU. Po odsączeniu pierwszego roztworu dodałam do żywicy roztwór z aktywatorem i pozostawiłam całość na trzygodzinne wytrząsanie w 60°C. W dalszej kolejności usunęłam osłonę Fmoc korzystając z 20% roztworu piperydyny i przystąpiłam do wydłużenia sekwencji o fragment peptydowy: walina-leucyna-leucyna. Do nośnika stałego dodałam roztwór 6 eq. Fmoc-Val-OH, 6 eq. COMU i 12 eq. DIPEA w DMF. Po 1 godzinie wytrząsania w 37°C odsączyłam reagenty i przeprowadziłam usunięcie osłony Fmoc. Kolejne dwa aminokwasy przyłączyłam w analogiczny sposób.

### 3.14. Odszczepianie peptydów/peptydomimetyków z nośnika

Peptydy/peptydomimetyki po zakończonej syntezie odszczepiałam z nośnika stałego, z jednoczesnym usunięciem osłon łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, za pomocą mieszaniny TFA z dodatkiem zmiataczy karbokationów: TFA/Fenol/TIPSI/H<sub>2</sub>O (90:5:2,5:2,5, v/w/v/v). Stosowałam 5 ml mieszaniny odszczepiającej na 0,5 g peptydylożywicy. Czas trwania reakcji średnio wynosił 2 godziny na wytrząsarce o ruchu drgającym. W przypadku A1-tat, A1-6r, D1-tat oraz D1-tat(R1) czas trwania reakcji wydłużyłam do 3,5 godziny ze względu na dużą ilość reszt argininy w sekwencji. Następnie, stały nośnik odsączałam pod zmniejszonym ciśnieniem na lejku Schotte'a. Nadmiar TFA odparowywałam przy pomocy rotacyjnej wyparki próżniowej. Pozostałość zadawałam eterem dietylowym (Et<sub>2</sub>O), który uprzednio schładzałam do temperatury 4°C.

Wytrącony osad wraz z eterem przenosiłam do falkonu o pojemności 50 ml i poddawałam wirowaniu przez 15 min (4000xg) w 4°C. Supernatant dekantowałam, a osad traktowałam kolejną porcją schłodzonego Et<sub>2</sub>O. Procedurę tę wykonywałam 3-krotnie. Tak uzyskany surowy produkt rozpuszczałam w wodzie i poddawałam liofilizacji.

Tabela 6. Szczegóły dotyczące syntez poszczególnych związków .

Nazwa	Rodzaj żywicy	Stopień osadzenia żywicy [mmol/g]	Ilość żywicy [g]	Ilość surowego związku [mg]
A1	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	235
A2	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	212
A3	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	199
A4	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	220
A5	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	230
A1-tat	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	302
A1-6r	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	290
A1-NBD	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	202
A1-tat-NBD	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	306
A1-6r-NBD	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	299
B1	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	239
B2	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	120
B3	Fmoc Ser(t-Bu) TentaGel R PHB	0,20	0,5	234
C1	Wang	0,25	0,46	153
C2	Wang	0,25	0,46	160
C3	Wang	0,25	0,46	170
C4	Wang	0,36	0,35	199
C5	Wang	0,36	0,35	180
C6	Wang	0,36	0,35	192
D1-tat	Cl-TCP(Cl) ProTide	0,40	0,25	172
D1-tat(R1)	Cl-TCP(Cl) ProTide	0,40	0,25	132



D1-tat-NBD	Cl-TCP(Cl) ProTide	0,39	0,25	150
D1-tat(R1)-NBD	Cl-TCP(Cl) ProTide	0.39	0,25	162
E1	Cl-TCP(Cl) ProTide	0,40	0,25	113
E2	Cl-TCP(Cl) ProTide	0,40	0,25	101
E3	Cl-TCP(Cl) ProTide	0,40	0,25	82
Substrat Dabcylo- EDANS	Wang	0,36	0,5	181
Sonda TAS3	TentaGel R RAM	0,20	0,6	217

#### 4. Oczyszczanie i charakterystyka peptydów i peptydomimetyków

Surowe peptydomimetyki oczyszczałam z wykorzystaniem semipreparatywnego HPLC z detektorem UV: K2001 (Knauer) z wykorzystaniem następujących kolumn:

- A Jupiter Proteo C12, 250 x 21,2 mm, 4  $\mu\text{m}$ , 90 Å (Phenomenex)
- B Jupiter Proteo C12, 250 x 10 mm, 10  $\mu\text{m}$ , 90 Å (Phenomenex)
- C Kinetex C18, 250 x 21,2 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å (Phenomenex)
- D Kromasil C8, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å

Oczyszczanie prowadziłam stosując gradient liniowy rozpuszczalników A i B, z detekcją przy długości fali  $\lambda = 223$  nm. Gradient dobierałam indywidualnie, w zależności od hydrofobowości i stopnia zanieczyszczenia związku. Do oczyszczania zastosowałam następujące układy eluentów:

- I A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 45% ACN + 0,1% TFA
- II A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 35% ACN + 0,1% TFA
- III A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 50% ACN + 0,1% TFA
- IV A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 40% ACN + 0,1% TFA
- V A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 80% ACN + 0,1% TFA
- VI A: 10% ACN + 0,1% TFA, B: 40% ACN + 0,1% TFA
- VII A: 10% ACN + 0,1% TFA, B: 50% ACN + 0,1% TFA

VIII A: 10% ACN + 0,1% TFA, B: 70% ACN + 0,1% TFA

Do sprawdzenia czystości surowych peptydów i frakcji otrzymanych po oczyszczaniu wykorzystalam chromatograf HPLC Varian ProStar 240 (Varian), z następującymi kolumnami analitycznymi:

a) Jupiter Proteo C12, 250 mm x 4,6 mm, 4  $\mu$ m, 90 Å (Phenomenex),

b) Luna C18, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å (Phenomenex),

Uzyskane oczyszczone związki poddawałam analizie chromatograficznej z wykorzystaniem chromatografii cieczowej U-HPLC z detektorem PDA (Shimadzu). Kolumna chromatograficzna: Kinetex 100 x 2,1 mm, 2,6  $\mu$ m, 100 Å. Układ faz A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 80% ACN + 0,1% TFA, przepływ 0,5 ml/min, detekcja UV przy  $\lambda$ =223 nm, gradient 5% B  $\rightarrow$  100% B w 15 minut.

Natomiast w celu weryfikacji poprawnej masy cząsteczkowej korzystałam ze spektrometru mas MALDI TOF (Bruker) lub LCMS-ESI-IT-TOF (Shimadzu) z kolumną analityczną Jupiter Proteo, 150 x 2 mm, 4  $\mu$ m, 90 Å (Phenomenex). Analiza LC-MS została przeprowadzona w gradiencie liniowym 5-100% B w 60 min (eluenty A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 80% ACN + 0,1% TFA), w trybie pozytywnej jonizacji metodą elektrorozpylania.

Tabela 7. Warunki oczyszczania związków oraz ich masy cząsteczkowe.

Warunki oczyszczania						
Nazwa	Ilość oczyszczanego związku [mg]	Kolumna	Układ eluentów	Ilość czystego produktu [mg]	M <sub>cz</sub> obliczona [Da]	M <sub>cz</sub> wyznaczona [Da]
A1	162	A	I	36,40	1788,2	1788,4
A2	158	A	I	37,30	1800,5	1800,8
A3	94	A	I	1,56	1800,5	1800,8
A4	122	A	III	32,59	1815,9	1815,8
A5	112	A	III	26,55	1815,9	1816,0
A1-tat	150	C	II	20,50	3108,5	3108,7
A1-6r	102	C	IV	15,10	2724,1	2724,4
A1-NBD	52	C	VI	0,50	1956,6	1958,8
A1-tat-NBD	88	C	VI	8,33	3270,1	3270,3
A1-6r-NBD	90	C	VI	5,90	2886,0	2886,1
B1	118	A	I	30,30	1857,9	1857,8
B2	104	A	III	27,90	1871,2	1871,0
B3	117	A	III	22,36	1883,6	1883,8
C1	72	A	I	14,79	1832,6	1832,8
C2	68	A	I	12,40	1832,6	1832,8

C3	76	A	I	9,80	1834,3	1834,5
C4	90	A	I	9,70	1846,6	1846,8
C5	94	A	I	15,80	1846,8	1846,8
C6	89	A	I	14,35	1860,7	1860,9
D1-tat	103	A	I	10,30	3009,0	3009,1
D1-tat(R1)	99	A	I	12,87	3009,0	3009,2
D1-tat-NBD	62	B	VII	3,23	3170,1	3170,3
D1-tat(R1)-NBD	50	B	VII	1,37	3170,1	3170,3
E1	45	D	I	1,30	1675,9	1675,7
E2	43	D	III	0,83	1689,5	1689,7
E3	39	D	III	0,80	1689,5	1689,7
Bis1	10,6	D	I	2,20	4049,3	4049,4
Bis1-tat	10	D	I	0,20	5369,1	5369,2
Bis1-tat-NBD	8	D	VII	0,72	5532,5	5532,7
Bis2	7	B	II	2,50	3563,7	3563,8
Bis3	8	B	V	3,30	3458,3	3458,6
Bis4	25	B	II	6,40	2290,1	2290,0
Substrat Dabcył-EDANS	102	A	VIII	20,50	1567,5	1567,6
Sonda TAS3	81	A	V	2,50	1416,5	1416,7

## 5. Badania strukturalne (dichroizm kołowy)

Pomiary zostały przeprowadzone w Zespole Pracowni Fizykochemicznych na Wydziale Chemii UG, przy użyciu spektropolarymetru Jasco J-815 (Jasco), w kuwecie kwarcowej o długości ścieżki optycznej 10 mm. Pomiary CD zostały zarejestrowane dla wodnych roztworów peptydomimetyków o stężeniu 0,2 mg/ml w zakresie 185-260 nm w temperaturze 25°C.

## 6. Oczyszczanie ludzkiego proteasomu

### 6.1. Izolacja erytrocytów z krwi

W sterylnej probówce wirówkowej typu Falcon umieściłam 20 ml koncentratu czerwonych krwinek, do którego dodałam 20 ml buforu PBS. Następnie całość poddałam wirowaniu przez 10 minut z prędkością 600 x g, w temperaturze 20°C. Po zakończeniu wirowania korzystając ze strzykawki z długą igłą przeniosłam warstwę erytrocytów do nowej sterylnej probówki wirówkowej typu Falcon. W kolejnym etapie przeprowadziłam lizę erytrocytów poprzez zmieszanie w stosunku 2:3 (v/v) erytrocytów z buforem lizującym o składzie: 30 mM Tris pH 7,6, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1,6 mM DTT. Lizę prowadziłam przez godzinę w 4°C, na wytrząsarce kołyskowej. Chcąc usunąć niezlizowane erytrocyty oraz błony komórkowe, mieszaninę po zakończonej lizie poddałam wirowaniu przez 30 minut, w 4°C, z prędkością 17500 rpm. Supernatant przeniosłam do nowej probówki wirówkowej i ponownie poddałam wirowaniu w analogicznych warunkach.

### 6.2. Wysalanie siarczanem(VI) amonu

Lizat przeniosłam do zlewki, znajdującej się na mieszadle magnetycznym w lodówce (4°C). Do lizatu czerwonych krwinek dodawałam małymi porcjami (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tak aby końcowo uzyskać stężenie 35% soli. Po skończeniu dodawania, roztwór poddałam 30-minutowemu mieszaniu. Wysolony lizat przeniosłam do gilz oraz poddałam wirowaniu przez 1 godzinę, z prędkością 17500 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant przeniosłam do worka dializacyjnego z membraną o punkcie odcięcia 6-8 kDa, który następnie umieściłam w schłodzonym buforze dializacyjnym o składzie: 10 mM Tris pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 2 mM DTT. Dializę prowadziłam w 4°C. Po około

3 godzinach worek dializacyjny przeniosłam do świeżego schłodzonego buforu dializacyjnego, kontynuując proces przez noc.

### 6.3. Oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej (kolumna HiTrap CaptoQ)

Kolumnę HiTrap CaptoQ podłączyłam do systemu chromatograficznego AKTA. Zawartość worka dializacyjnego przeniosłam do zlewki oraz przefiltrowałam przez filtr membranowy. Następnie roztwór naniosałam na kolumnę HiTrap. Podczas rozdziału stosowałam bufor A: 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol oraz bufor B: 700 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol. Rozdział w gradiencie 10-100% B trwał około godzinę. Zebrane frakcje dializowałam w worku dializacyjnym o odcięciu 6-8 kD w buforze o składzie 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol, w 4°C przez noc.

### 6.4. Oczyszczanie za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych (kolumna HiPrep Phenyl FF)

Po dializie do roztworu proteasomu dodawałam porcjami  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do ostatecznego 50% stężenia soli. Następnie roztwór mieszałam przez 30 minut na mieszadle magnetycznym w 4°C. Po zakończeniu wysalania roztwór poddałam wirowaniu przez 1 godzinę z prędkością 17500 rpm w 4°C. Supernatant naniosałam na kolumnę HIC, po uprzednim jej równowagowaniu w buforze startowym. Podczas oczyszczania stosowałam bufor A o składzie: 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol oraz bufor B o składzie: 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glicerol. Białko eluowałam stosując gradient liniowy 60-100% B przez 10 objętości kolumny. Zebrane frakcje umieściłam w worku dializacyjnym o odcięciu 6-8 kD i dializowałam w 4°C przez noc w buforze 20 mM Tris/HCl pH 7,6, zawierającym 25 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT i 5% glicerolu.

### 6.5. Oczyszczanie za pomocą chromatografii jonowymiennej (kolumna Mono-Q)

Po dializie roztwór z worka dializacyjnego przefiltrowałam przez membranę do sterylnej butli. Całą objętość naniosałam na kolumnę MonoQ. Do oczyszczania stosowałam gradient liniowy: 0 – 1 M NaCl w buforze 20 mM Tris/HCl pH 7,6, zawierającym 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 przez noc w 4°C w worku dializacyjnym o punkcie odcięcia 15 kD, wobec buforu 20 mM Tris/HCl pH 7,2, zawierającego 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 2 mM DTT i 10% glicerolu.

## 6.6. Zateżnienie oczyszczonego proteasomu

Frakcję po dializie zateżzałam za pomocą koncentratora 10K o pojemności 15 ml (Vivaspin 6), wirując go każdorazowo z prędkością 8000xg przez 10-15 minut w temperaturze 4°C. Po zateżnieniu stężenie białka wyznaczałam metodą Bradforda. Roztwór proteasomu o stężeniu 1 mg/ml przechowywany był przez kilka miesięcy w temperaturze -20 °C w buforze o składzie: 50% glicerol, 20 mM Tris/HCl pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM DTT.

## 7. Badania biologiczne otrzymanych związków

### 7.1. Badanie wpływu otrzymanych związków na aktywność ludzkiego proteasomu z wykorzystaniem substratów z fluoroforem AMC oraz substratu Dabcyl-EDANS

Wpływ zsyntezowanych związków na chymotrypsynopodobną (ChT-L), trypsynopodobną (T-L) oraz kaspazopodobną (C-L) aktywność proteasomu badałam przy wykorzystaniu latentnego proteasomu 20S wyizolowanego z ludzkich erytrocytów. Do analizy użyłam substratów fluorogenicznych odpowiednich do oznaczania aktywności poszczególnych peptydaz, Suc-LLVY-AMC (ChT-L), Boc-LRR-AMC (T-L) i Z-LLE-AMC (C-L). Związki zbadałam również używając substratu typu FRET, zawierającego parę EDANS-Dabcyl jako odpowiednio donor oraz wygaszacz fluorescencji. Substrat ten, o sekwencji H-K(Dabcyl)MSGFAATAE(EDANS)G-OH (dalej nazywany w skrócie Dabcyl-EDANS), jest w niewielkim stopniu degradowany przez latentny proteasom i dlatego lepiej nadaje się do oceny efektywności działania aktywatorów.

Pomiary prowadziłam w 96-dołkowej płytce, w 50 mM buforze Tris/HCl o pH 8. Końcowa objętość próbek wynosiła 100 µl. Peptydomimetyki i substraty fluorogeniczne rozpuszczałam w DMSO do stężenia 10 mM, natomiast substrat Dabcyl-EDANS do stężenia 1,5 mM. Ostateczne stężenie proteasomu 20S w próbkach pomiarowych wynosiło 0,002 mg/ml (≈ 2,8 nM), stężenie substratu zaś odpowiednio 100 µM (substraty

z fluoroforem AMC) lub 15  $\mu\text{M}$  (Dabcyl-EDANS). Otrzymane związki badałam w zakresie stężeń: 1  $\mu\text{M}$  – 50  $\mu\text{M}$ , oprócz analogów z sekwencją TAT oraz 6R, które testowałam w zakresie 0,5  $\mu\text{M}$  do 10  $\mu\text{M}$ . Pomiary przeprowadziłam na spektrofluorymetrze Infinite M200Pro (Tecan), w temperaturze 37°C, rejestrując intensywność fluorescencji w zakresie 380-460 nm (substraty fluorogeniczne) bądź 335-493 nm (Dabcyl-EDANS). Pomiary z wykorzystaniem substratu Dabcyl-EDANS poprzedziłam 10-minutową inkubacją w 37°C. Odczyt fluorescencji był wykonywany co 2 minuty, przez 60 minut. Każdy eksperyment wykonywałam co najmniej trzykrotnie. Względną aktywność obliczałam w stosunku do aktywności katalitycznej latentnego proteasomu, zmierzonej bez dodatku modulatora, która traktowana była jako 100%.

## 7.2. Ocena stabilności otrzymanych związku w ludzkim osoczu

Otrzymane modulatory inkubowałam z ludzkim osoczem w 37°C przez 30 min. Związki rozpuszczałam w wodzie, a ich ostateczne stężenie wynosiło 200  $\mu\text{M}$ . Co 5 min z inkubowanego roztworu pobierałam próbki, zatrzymywałam postęp reakcji za pomocą 6% TCA, który dodawałam do próbki w proporcji 1:1 (v:v). Całkowity czas trwania inkubacji wynosił 30 minut. Wszystkie próbki poddawałam wirowaniu przez 10 minut w 4°C przy obrotach 14000 rpm. Pobrany z nad osadu supernatant poddawałam analizom HPLC i MS.

Postęp proteolitycznej degradacji aktywatorów monitorowałam przy użyciu chromatografu UHPLC z detektorem PDA (Shimadzu), z kolumną analityczną Kinetex 100 x 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 Å. Do analizy stosowałam 15-minutowy gradient 5→100% B (eluenty A: H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA, B: 80% ACN + 0,08% TFA) z detekcją UV przy długości fali 223 nm. Stopień degradacji oszacowałam na podstawie powierzchni zawartej pod pikami odpowiadającymi związkom wyjściowym. W celu zidentyfikowania fragmentów peptydów powstałych w wyniku degradacji przeprowadzałam analizę przy użyciu spektrometru mas MALDI TOF. Dla każdego związku eksperymenty przeprowadziłam 3-krotnie.

## 7.3. Badania komórkowe

### 7.3.1. Hodowla komórek

Ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK293T) hodowałam w kolbie T-75, w 37°C i w atmosferze wysyczonej parą wodną i wzbogaconej 5% CO<sub>2</sub>, do ~80% konfluencji.



Hodowlę komórek prowadziłam w pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zawierającej mieszaninę penicyliny (100 jednostek/ml) i streptomycyny (100 µg/ml) z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej.

### *7.3.2. Badanie przenikalności znakowanych związków przez błony komórkowe*

Komórki HEK293T wysiewałam w ilości 30 tysięcy na dołek na szkiełkach pokrytych poli-L-lizyną, umieszczonych w dołkach płytki 24-dołkowej. Po 2 dniach inkubacji w standardowych warunkach całą objętość pożywki wymieniałam na pożywkę zawierającą wybrane aktywatory wyznakowane fluoroforem NBD, w ostatecznym stężeniu 10 µM. Pół godziny przed zakończeniem inkubacji dodawałam do każdego dołka 20 µL barwnika Hoechst 33342, który służy do wizualizacji jąder komórkowych, następnie umieszczałam płytkę ponownie w inkubatorze. Po 3-godzinnej inkubacji usuwałam całkowicie pożywkę. Po uprzednim 2-krotnym przemyciu komórek za pomocą 200 µL PBS, dodawałam pożywkę FluoroBrite™ DMEM. Następnie szkiełka zawierające preparat analizowałam pod mikroskopem Zeiss AXIO Observer D1, korzystając z filtru Alexa Fluor 488. Każdy związek testowałam w 3 dołkach, kontrolę negatywną stanowiły dołki z komórkami nietraktowanymi aktywatorami, natomiast pozytywną kontrolę stanowiły komórki z dodatkiem diocyanu fluoresceiny. Eksperyment wykonałam 3-krotnie.

### *7.3.3. Wpływ otrzymanych związków na przeżywalność hodowli komórkowej*

Żywotność hodowli komórkowej mierzyłam ilościowo przy użyciu testu MTT, za pomocą którego można dokonać oceny aktywności metabolicznej komórek. Żywe komórki, z aktywnym metabolizmem, przekształcają rozpuszczalny tetrazol o żółtym zabarwieniu w purpurowy, nierozpuszczalny formazan. Jego detekcji dokonuje się przez pomiar absorbancji przy długości fali 570 nm.

Komórki wysiewałam na płytkę 96-dołkową, w ilości 7 tysięcy na dołek. Po 2 dniach inkubacji standardową pożywkę wymieniałam na pożywkę zawierającą wybrane aktywatory w stężeniach: 1, 10, 25, 50, 100 µM. Po 24 godzinnej inkubacji w standardowych warunkach do komórek dodawałam roztwór MTT w DMEM w końcowym stężeniu 0,5 mg/ml. Inkubacja MTT z komórkami trwała 4 godziny. Po tym czasie usuwałam całkowicie roztwór, otrzymane fioletowe kryształy formazanu rozpuszczałam w DMSO. Przygotowaną w ten sposób płytkę 96-dołkową zakrywałam folią aluminiową. Po około 12 godzinach przeprowadzałam pomiar na

spektrofluorymetrze Infinite M200Pro (Tecan) przy długości fali 570 nm. Jako kontrolę przyjęłam nietraktowane związkami aktywującymi komórki, do których dodawałam roztwór MTT. Każde stężenie aktywatora testowałam w 4 dołkach, a cały eksperyment wykonałam 3-krotnie.

Z odczytów testu MTT dla prób kontrolnych (bez dodatku aktywatora) uzyskałam wartość średnią, uznaną za 100%, którą stosowałam później jako wartość referencyjną (odniesienia) dla pomiarów dołków, w których komórki potraktowałam związkiem o określonym stężeniu.

#### *7.3.4. Badanie wpływu otrzymanych związków na proteasom w lizacie komórkowym*

Komórki HEK293T wysiewałam w kolbie T-75 w ilości 600 tys. Hodowlę prowadziłam w standardowej pożywce i w standardowych warunkach (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Po dwóch dniach inkubacji komórki poddawałam lizie przy użyciu buforu Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA), zgodnie z protokołem producenta. Zawartość białka mierzyłam za pomocą testu BCA. Roztwory podstawowe substratu fluorogenicznego (Suc-LLVY-AMC) i badanych związków przygotowałam w sulfotlenku dimetylu (DMSO). Aktywatory badałam w stężeniach: 1, 2,5, 5, 10 i 25 µM (w przypadku aktywatorów z sekwencją TAT lub 6R stężenia wynosiły: 0,5, 1, 2,5, 5, 10 µM). Końcowe stężenie DMSO utrzymywałam na stałym poziomie 2%. Testy aktywności przeprowadziłam na płytkach 96-dołkowych w 50 mM buforze Tris/HCl o pH 8,0, stosując 100 µl objętość reakcyjną. Końcowe stężenie substratu Suc-LLVY-AMC i białek lizatu komórkowego wynosiło odpowiednio: 100 µM i 20 µg/ml. Jako kontrolę negatywną zastosowałam lizat zawierający 1 µM roztwór inhibitora proteasomu, bortezomibu. Uwalnianie aminometylokumaryny (AMC) mierzyłam w sposób ciągły w odstępach 2-minutowych przez 60 minut w temperaturze 37°C, stosując spektrofluorymetr Infinite M200Pro (Tecan). Długość fali wzbudzenia i emisji ustawiłam odpowiednio na 380 nm i 460 nm.

#### *7.3.5. Badanie wpływu otrzymanych związków na aktywność proteasomu z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej TAS3.*

Komórki wysiewałam na płytkę 96-dołkową w ilości 7 tysięcy komórek na dołek. Po dwóch dniach inkubowania komórek usuwałam pożywkę, wymieniając ją na pożywkę zawierającą aktywatory w stężeniach: 1, 10, 25, 50, 100 µM. Objętość reakcyjna wynosiła

100  $\mu$ l. Komórki z dodatkiem aktywatorów poddawałam 30-minutowej inkubacji. W tym czasie przygotowywałam rozcieńczenia aktywatorów w przygotowanym 10  $\mu$ M roztworze TAS3 w buforze KRBH o następującym składzie: 30 mM HEPES pH 7,4, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 120 mM NaCl, 4 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Końcowe stężenia aktywatorów wynosiły 1, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M. Po zakończeniu inkubacji usuwałam z dołków pożywkę zawierającą aktywatory i dodałam roztwory aktywatorów w buforze TAS3/KRBH. Objętość reakcyjna również wynosiła 100  $\mu$ l. Następnie przeprowadzałam pomiar intensywności fluorescencji na spektrofлуorymetrze Infinite M200Pro (Tecan), w sposób ciągły w odstępach 2-minutowych przez 90 minut w temperaturze 37°C. Długość fali wzbudzenia i emisji ustawiłam odpowiednio na 485 nm i 535 nm. Jako kontrolę przyjąłm nietraktowane związkami aktywującymi komórki, do których dodawałam roztwór 10  $\mu$ M TAS3 w buforze KRBH. Kontrolę negatywną stanowił 10  $\mu$ M roztwór bortezomibu, który inkubowałam z komórkami w analogiczny sposób do aktywatorów. Każde stężenie aktywatora testowałam w 4 dołkach, a cały eksperyment wykonałam 3-krotnie.

#### 7.4. Badanie zdolności wybranych aktywatorów do pokonywania bariery krew-mózg.

Weryfikację zdolności aktywatorów do pokonywania bariery krew-mózg przeprowadziłam przy wykorzystaniu testu PAMPA (ang. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), który pozwala na symulowanie w warunkach *in vitro* procesów związanych z transportem substancji przez błony biologiczne. Podczas przeprowadzenia tego testu wykorzystywałam dwie włożone w siebie płytki, z których jedna, tzw. płytka donorowa, posiada studzienki o dnach zbudowanych z membrany PVDF. Na tę membranę nanosiłam warstwę lipidową w organicznym rozcieńczalniku, imitującą barierę krew-mózg. Następnie badany związek, rozcieńczony w buforze, umieszczałam w studziencie płytki donorowej. Związki zdolne do przenikania bariery krew-mózg przechodzą ze studzienek donorowych do studzienek akceptorowych na drodze biernej dyfuzji. Aby określić szybkość przenikania związku obliczałam tzw. efektywną przepuszczalność (Pe).

Przygotowałam 5,26% roztwór DMSO w 0,1 M PBS o pH 7,4. Roztworem tym rozcieńczałam 10 mM roztwory aktywatorów w DMSO do stężenia 500  $\mu$ M. Końcowe stężenie DMSO wynosiło 5%. Płytke MultiScreen-IP (donorową) przygotowywałam

zgodnie z protokołem producenta. W celu przygotowania ekstraktu mózgowego (PBL; Avanti Polar Lipids Inc.), jego chloroformowy roztwór przeniosłam do kolby o pojemności 5 ml, następnie odparowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały na ścianach kolby film lipidowy rozpuściłam w bezwodnym dodekanie, tak by uzyskać 2% roztwór (20 mg/ml). Rozpuszczanie filmu lipidowego wspomagałam działaniem ultradźwięków (5 minut). W następnym etapie na płytkę donorową nanosiłam po 5  $\mu$ l 2% roztworu ekstraktu mózgowego, po czym płytkę umieszczałam w wytrząsarce na około 1 minutę, w temperaturze pokojowej. W dołkach płytki akceptorowej umieszczałam po 300  $\mu$ l 0,1 M buforu PBS o pH 7,4, zawierającego 5% DMSO. Na membranę pokrytą 2% ekstraktem mózgowym nanosiłam po 200  $\mu$ l badanego związku. Każdy związek testowałam w co najmniej 5 powtórzeniach. Jako kontrolę pozytywną zastosowałam peptyd TAT oraz propranolol, jako kontrola negatywna posłużyła mi natomiast dopamina. Po naniesieniu wszystkich próbek, delikatnie usuwałam gumę zabezpieczającą płytkę donorową, po czym łączyłam ją z płytką akceptorową. Połączone płytki przykrywałam pokrywą, do dna płytki akceptorowej przykładałam zmoczony wodą arkusz ręcznika papierowego. Całość umieszczałam w worku zip-lock, szczelnie go zamykając. Płytkę wstawiałam do inkubatora, nastawionego na 37°C, z drganiami o częstotliwości 250 rpm. Inkubację prowadziłam przez 22 godziny.

Po zakończeniu inkubacji dla roztworów z płytki akceptorowej przeprowadzałam pomiar fluorescencji. Jedyne dla propranololu wykonałam pomiar absorbancji przy długości fali 290 nm. Pomiar fluorescencji przeprowadzałam po uprzednim potraktowaniu próbek fluorescaminą. W tym celu na czarną płytkę 96-dołkową nanosiłam 5% roztwór DMSO w PBS, następnie roztwór pobierany z odpowiednich dołków płytki akceptorowej oraz 0,02% roztwór fluorescaminę w bezwodnym acetonie. Płytkę zabezpieczałam przed odparowaniem i wytrząsałam ją przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dokonywałam pomiaru fluorescencji, rejestrując jej intensywność w zakresie 388-462 nm na spektrofluorymetrze Infinite M200Pro (Tecan). Jednocześnie wykonywałam też pomiar dla roztworów odpowiadających równowadze między dołkami z płytki donorowej i akceptorowej (equilibrium).

Na podstawie uzyskanych danych szybkość dyfuzji biernej obliczałam jako liniową prędkość przenikania ( $P_e$ ), korzystając z równania:

$$Pe = C x - \ln\left(1 - \frac{OD_A}{OD_E}\right)$$

OD<sub>A</sub> = absorbancja/fluorescencja roztworu akceptora

OD<sub>E</sub> = absorbancja/fluorescencja roztworu wzorca równowagi

### 7.5. Badanie wpływu otrzymanych aktywatorów na zdolność proteasomu h20S do trawienia substratów białkowych

Próbkę natywnej ludzkiej  $\alpha$ -synukleiny (800 ng) oraz ludzkiego białka tau-441 (800 ng), inkubowałam w 37°C z proteasomem h20S (400 ng), latentnym bądź aktywowanym za pomocą 0,01% SDS lub z buforem 50 mM Tris/HCl pH 7,0, zawierającym 1 mM DTT, 1 mM azydek sodu, 20% glicerol (próba kontrolna). Eksperymenty prowadziłam w 20 mM HEPES pH 7,4. Czas inkubacji dla  $\alpha$ -synukleiny wynosił 1h natomiast dla białka tau 2h. Objętość reakcyjna wynosiła 10  $\mu$ l. Reakcję proteolizy zatrzymywałam poprzez dodanie do mieszaniny 4xbufor Laemmli. W kolejnym etapie denaturowałam próbki w temperaturze 95°C, przez 5 minut, po czym nanosiłam je na 10% (białko Tau) lub 12% ( $\alpha$ -synukleina) żel SDS-PAGE. Rozdziały elektroforetyczne prowadziłam w buforze elektrodowym o następującym składzie: 25 mM Tris/HCl, 192 mM glicyna, 0,1% SDS. Czas trwania rozdzielania wynosił 1 godzinę 45 minut. Początkowo podczas rozdzielania stosowałam napięcie 90 V przez 15 minut, a następnie 120 V. W celu wizualizacji produktów trawienia wykorzystałam błękit brylantowy Coomassie R-250. Podczas analiz ilościowych żeli korzystałam z programu Quantity One 1-D (BioRad). Każdy eksperyment wykonałam 3-krotnie. Ilość niestrawionego białka obliczyłam jako % próby kontrolnej po odjęciu tła obrazu.

### 7.6. Badanie oddziaływania wybranych aktywatorów z proteasomem za pomocą techniki MST (Microscale thermophoresis).

Proteasom 20S wyznakowałam stosując Monolith Protein Labelling Kit RED-NHS 2nd Generation Amine Reactive, NT-647 (NanoTemper Technologies GmbH, Monachium, Niemcy), zgodnie z instrukcjami producenta. Bezpośrednie interakcje między znakowanym fluorescencyjnie proteasomem 20S a aktywatorami badałam za pomocą termoforezy mikroskalowej (NanoTemper Monolith NT.115). Stężenie znakowanego proteasomu utrzymywałam na stałym poziomie 10 nM. Znakowany proteasom mieszałam z 16 różnymi stężeniami aktywatora, przygotowanymi jako seryjne

rozcieńczenia, w zakresie od 1,5 nM do 50  $\mu$ M. Roztwór z każdej próbki pobierałam do szklanej kapilary (Monolith NT Premium Capillaries, NanoTemper Technologies GmbH, Monachium, Niemcy). Jako bufor testowy zastosowałam 50 mM bufor Tris/HCl, pH 7,2, zawierający 5% glicerolu. Eksperymenty termoforezy przeprowadzałam stosując laser IR o natężeniu promieniowania dobieranym automatycznie przez system. Krzywe MST dopasowałam metodą Hilla, korzystając z programu OriginPro 2021. Wartości EC50 obliczyłam na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych eksperymentach.

## 7.7. Badania degradacji $\alpha$ -synukleiny w mysim modelu komórkowym choroby Parkinsona

Badania degradacji  $\alpha$ -synukleiny zostały wykonane we współpracy z Zakładem Farmakologii i Farmakoterapii Uniwersytetu w Helsinkach.

### 7.7.1 *Izolacja oraz hodowla komórek hipokampalnych*

Komórki były izolowane z embrionów ciężarnej myszy w dniu E16.0. Dołki 96-dółkowych płytek pokryłam poli-L-lizyną i wysiałam do nich wyodrębnione komórki hipokampalne w ilości 25 000 komórek/dolek. Końcowa objętość reakcyjna wynosiła 150  $\mu$ l. Komórki hodowałam w temperaturze 37 °C w atmosferze wysyczonej parą wodną i wzbogaconej 5% CO<sub>2</sub>. Jako medium zastosowałam pożywkę NB (Neurobasal Medium) uzupełnioną o suplement do hodowli komórek neuronalnych B27 (2%), L-glutaminę (0,25%) oraz Primocin (0,2%). Pożywkę wymieniłam trzeciego (-25 $\mu$ l/+75 $\mu$ l) oraz siódmego (-75 $\mu$ l/+75 $\mu$ l) dnia eksperymentu.

### 7.7.2 *Indukowanie agregatów $\alpha$ -synukleiny w komórkach oraz wprowadzenie aktywatorów do hodowli komórkowej.*

Rozcieńczyłam za pomocą PBS roztwór pre-formowanych fibryli (PFFs) do stężenia 100  $\mu$ g/ml. Eppendorfkę z roztworem poddałam działaniu ultradźwięków (10 cykli 30sON/30sOFF, 4°C). Ósmego dnia eksperymentu dodałam 3,75  $\mu$ l roztworu PFFs/dolek (ostateczne stężenie PFFs wynosiło 2,5  $\mu$ g/ml). Próbę kontrolną stanowiły dołki z dodatkiem takiej samej objętości PBS. Tak przygotowaną płytkę umieściłam w inkubatorze na 1 godzinę. Po tym czasie do komórek z PFFs dodałam 1,5  $\mu$ l roztworu testowanych aktywatorów w stężeniu 0,5 oraz 2,5  $\mu$ M. W przypadku prób kontrolnych dodałam taką samą objętość PBS.

### 7.7.3 *Immunobarwienie*

W 15 dniu eksperymentu odciągnęłam pożywkę oraz dodałam 4% PFA (paraformaldehyd) w ilości 50 µl/dołek. Płytkę inkubowałam przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po utrwaleniu komórek usunęłam PFA i przemyłam trzykrotnie wszystkie dołki roztworem PBS. W kolejnym etapie rozpoczęłam permabilizację: usunęłam PBS oraz inkubowałam komórki z 0,2% roztworem Triton X-100 w PBS (PBST) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Odciągnęłam z dołków roztwór PBST, a następnie komórki poddałam godzinnej inkubacji z 5% roztworem NHS (normalna surowica końska) w PBST, w temperaturze pokojowej. Przygotowałam roztwór pierwszorzędowych przeciwciał przeciwko pS129- $\alpha$ syn (Rb@ $\alpha$ syn, 1:2000) oraz neuronom (M@NeuN 1:500) w 5% roztworze NHS/PBST. Po zakończeniu inkubacji komórek z 5% NHS/PBST odciągnęłam zawartość dołków oraz dodałam 40 µl roztworu pierwszorzędowych przeciwciał/dołek, całość inkubowała się przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie usunęłam przeciwciała oraz przemyłam wszystkie dołki trzykrotnie roztworem PBS. W kolejnym etapie do komórek dodałam znakowane fluorescencyjnie drugorzędowe przeciwciała rozcieńczone w PBST: D@M647 (1:500) oraz D@R488 (1:500); 40 µl/dołek. Po inkubacji, która trwała 1 godzinę w temperaturze pokojowej, ponownie odciągnęłam zawartość dołków, a komórki trzykrotnie przemyłam PBS. Ostatnim etapem było barwienie DAPI. W tym celu przygotowałam roztwór barwnika poprzez rozcieńczenie w stosunku 1:5000 wyjściowego roztworu o stężeniu 1 mg/ml za pomocą PBS. Dodałam 40 µl roztworu DAPI na dołek, całość inkubowałam przez 10 minut. Ostatecznie komórki ponownie przemyłam trzykrotnie PBS.

Płytkę skanowałam za pomocą zautomatyzowanego mikroskopu Image Xpress Nano Automated Imaging System, z trzema filtrami fluorescencyjnymi. Uzyskane obrazy zostały przeanalizowane za pomocą pakietów oprogramowania CellProfiler i CellProfiler Analyst.

## IV. Badania własne. Prezentacja i omówienie wyników

### 1. Aktywność zsyntezowanych peptydomimetyków Blm względem ludzkiego proteasomu 20S.

Na podstawie struktury krystalicznej kompleksu białka Blm10 z drożdżowym proteasomem, zaprojektowano peptydowy aktywator Blm-pep (KYFTGSKLWRSYYA). Bazując na sekwencji tego aktywatora zsyntezowano pulę jego analogów o większej zdolności do aktywacji proteasomu. Charakteryzowały się one jednak niską stabilnością proteolityczną oraz słabą przenikalnością przez błony komórkowe. Te dwie właściwości są krytyczne do tego, aby aktywator mógł mieć potencjalne zastosowanie jako terapeutyk. Chcąc otrzymać aktywatory proteasomu, które będą odporne na działanie proteaz, wprowadziłam do ich sekwencji modyfikacje. Jako sekwencje bazowe z puli aktywatorów Blm wybrałam te związki, które cechują się najwyższą zdolnością do aktywacji: A, C, E. Dodatkowo zsyntezowałam analog B, posiadający *N*-koniec od aktywatora A oraz *C*-koniec od aktywatora C, chcąc zweryfikować aktywność takiej hybrydowej sekwencji. Zaprojektowane modulatory zawierają 13-14 reszt aminokwasowych (Tabela 8). Wpływ otrzymanych modulatorów na aktywność ludzkiego proteasomu 20S zweryfikowałam stosując substraty fluorogeniczne dla każdej z peptydaz proteasomu: Suc-LLVY-AMC, Boc-LRR-AMC i Z-LLE-AMC.

Tabela 8. Nazwy oraz sekwencje otrzymanych peptydomimetyków Blm.

Nazwa:	Sekwencja:
<b>A</b>	KYFTGSKDWRSYYS
<b>B</b>	KYFTGSKDWRRYYS
<b>C</b>	KYFTGSKDYRRYYS
<b>E</b>	EFTDEPLWRSYYA
<b>A1</b>	<i>Nab</i> -YFTGSKDWRSYYS
<b>A2</b>	KYFTGSKDWR- <i>Nhe</i> -YYS
<b>A3</b>	<i>Nab</i> -YFTGSKDWR- <i>Nhe</i> -YYS
<b>A4</b>	KYFTGSKDW- <i>MeR</i> - <i>MeS</i> -YYS
<b>A5</b>	NH- <i>MeK</i> - <i>MeY</i> -FTGSKDWRSYYS
<b>B1</b>	<i>Nab</i> -YFTGSKDWRRYYS
<b>B2</b>	KYFTGSKDWR- <i>MeR</i> -YYS



<b>B3</b>	<i>MeK-MeY</i> -FTGSKDWRRYYYS
<b>C1</b>	<i>Nab</i> -YFTGSKDYRRYYYS
<b>C2</b>	KYFTGS- <i>Nab</i> -DYRRYYYS
<b>C3</b>	<i>Nab</i> -YFTGS- <i>Nab</i> -DYRRYYYS
<b>C4</b>	K- <i>Nompe</i> -FTGSKDYRRYYYS
<b>C5</b>	KYFTGSKD- <i>Nompe</i> -RRYYYS
<b>C6</b>	K- <i>Nompe</i> -FTGSKD- <i>Nompe</i> -RRYYYS
<b>E1</b>	E- <i>Npm</i> -TDEPLWRSYYA
<b>E2</b>	EFTDEPLWR- <i>Nhe</i> -YYA
<b>E3</b>	E- <i>Npm</i> -TDEPLWR- <i>Nhe</i> -YYA

Skróty: *Nompe* – *N*-(4-metoksybenzylo)glicyna; *Nab* – *N*-(4-aminobutylo)glicyna, *Nhe* – *N*-(2-hydroksyetylo)glicyna, *Npm* – *N*-benzyloglicyna, *Nag* – *N*-(3-guanidylopropylo)glicyna, *MeK* – *N*-metylolizyna, *MeR* – *N*-metyloarginina, *MeS* – *N*-metyloseryna, *MeY* – *N*-metylotyrozyna.

Miejsca wprowadzenia modyfikacji wytypowałam na podstawie testów stabilności aktywatorów Blm, które polegały na inkubacji związków z proteasomem 20S ( $c=0,025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) w  $37^\circ\text{C}$ . Po określonym czasie (0, 1 oraz 3 godziny) proteoliza była zatrzymywana przez dodanie roztworu kwasu TFA ( $c=1\%$ ), a próbki były analizowane za pomocą HPLC z detektorem PDA. Miejsce degradacji zostały wyznaczone przy użyciu spektrometru masowego LCMS-ESI-IT-TOF. Dla wybranych aktywatorów wykonałam również badanie stabilności w osoczu, poprzez jego inkubację z modulatorami przez 30 minut w  $37^\circ\text{C}$ . Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że aktywatory Blm są trawione zarówno przez proteasom 20S, jak i enzymy obecne w ludzkim osoczu. Ponadto, wprowadzenie do aktywatorów Blm reszt aminokwasowych o zmodyfikowanym łańcuchu bocznym, np. nitroargininy bądź 4-fluorofenyloalaniny, nie przyniosło poprawy stabilności oraz wpłynęło negatywnie na zdolność do stymulacji h20S. W związku z tym zdecydowałam się na wprowadzenie modyfikacji obejmujących szkielet peptydowy: wiązanie peptoidowe oraz *N*-metylowane aminokwasy. Aktywatory A1, B1, B2, C1, C4, E1 zaprojektowałam w celu zweryfikowania jak na zdolność do aktywacji proteasomu wpłyną modyfikacje w rejonie *N*-końca, natomiast aby sprawdzić jak na aktywność proteasomu 20S wpłyną modyfikacje w fragmencie *C*-końcowym zaprojektowałam

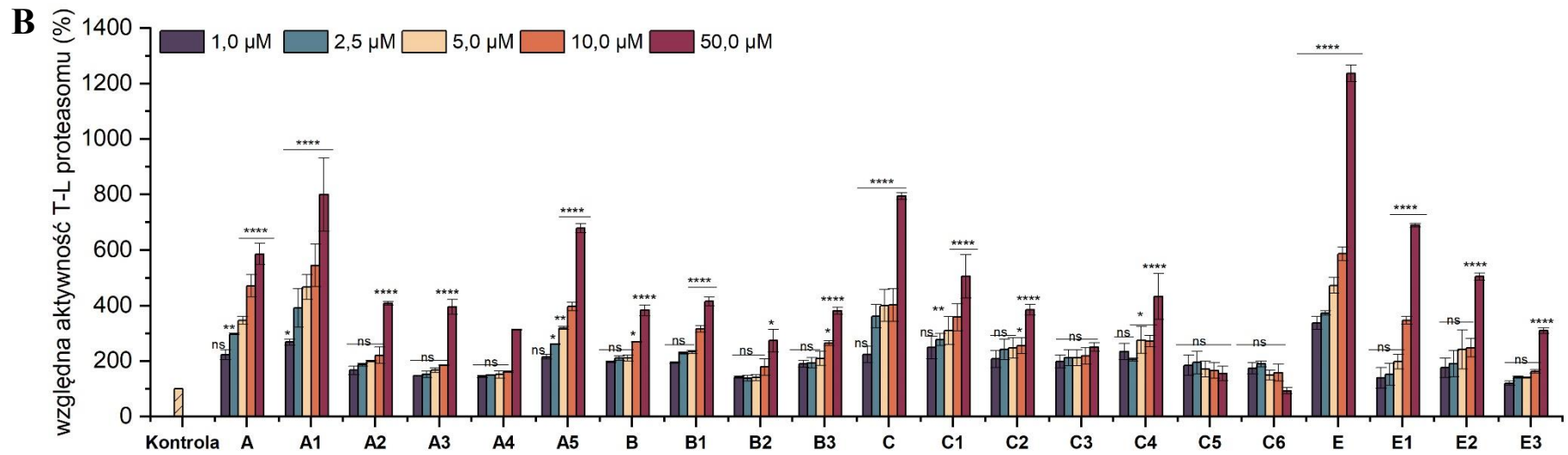
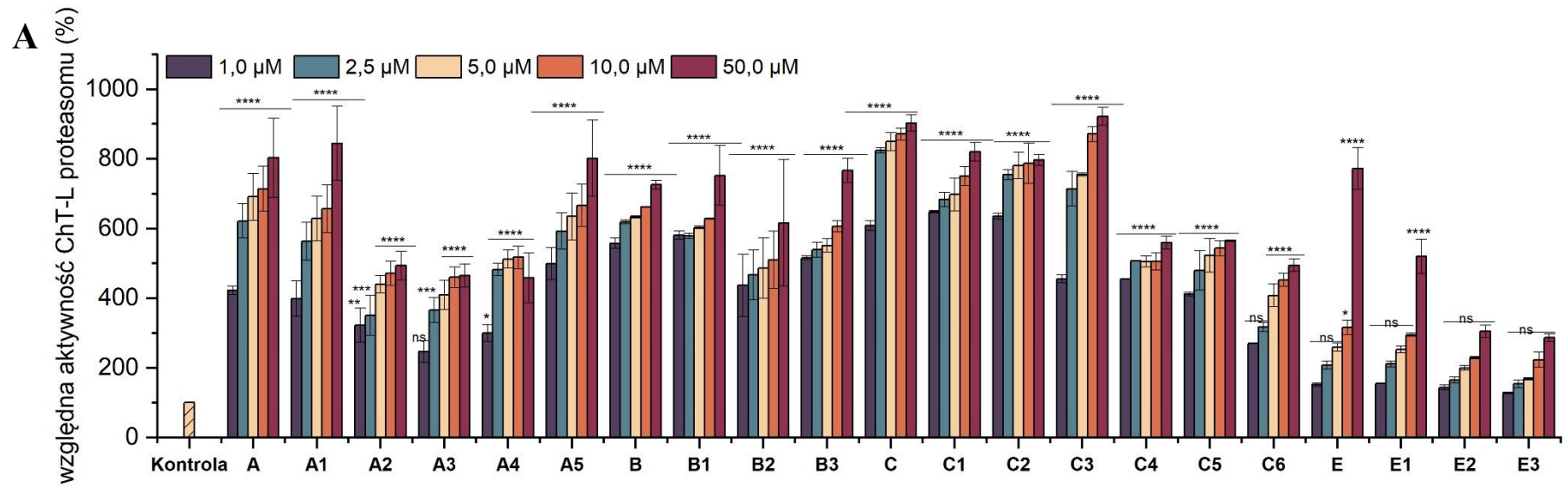
modulatory A2, B2, C2, C5 oraz E2. Zaprojektowałam również dla każdej grupy związków analog posiadający w sekwencji obie modyfikacje jednocześnie. Wszystkie aktywatory posiadają na C-końcu zachowany motyw HbYX.

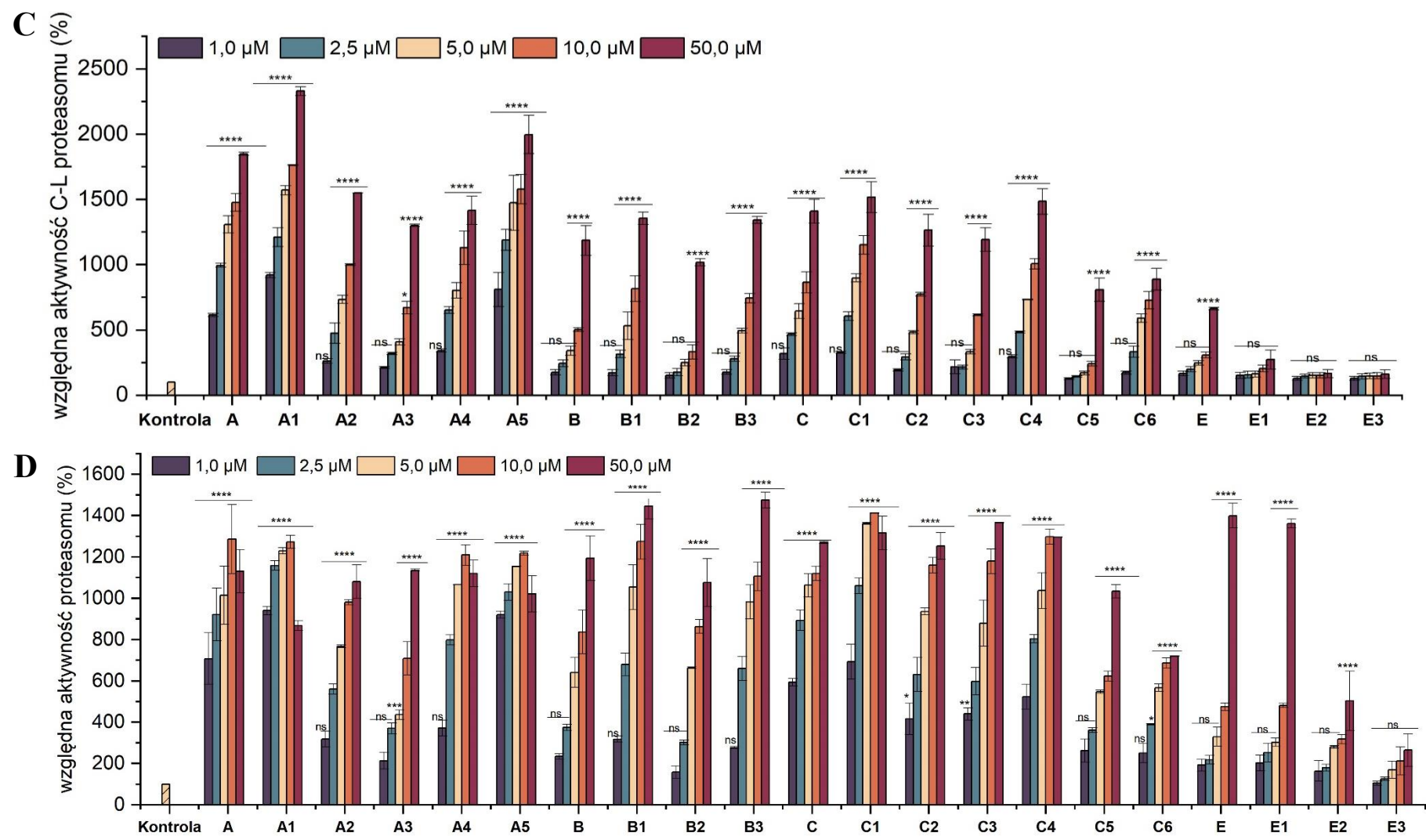
Hybrydowa sekwencja B posiada podobną do aktywatora A oraz nieco niższą niż aktywator B aktywność względem peptydazy ChTL (Rysunek 30A). Modulatory A1, A5, B1, B3, C1 posiadają takie same lub nieco wyższe zdolności do aktywacji jak ich macierzyste związki, co oznacza, iż modyfikacje w rejonie N-końca nie obniżają zdolności do stymulacji proteasomu 20S. Wymienione związki aktywują proteasom 20S 8-krotnie. Najsłabszym aktywatorem z modyfikacją na N-końcu okazał się być związek C4. Modyfikacje w rejonie C-końca sekwencji spowodowały zmniejszenie zdolności do stymulacji aktywności ChTL proteasomu. Najlepszym związkiem z modyfikacją tego typu jest aktywator B2, który posiada N-metylowaną argininę w 11 pozycji. Wprowadzenie zmian w pozycji 7 (C2, C3) nie przyczyniło się do drastycznego spadku lub wzrostu aktywności. Motyw GSK został wprowadzony do macierzystych sekwencji by pełnić funkcję łącznika oraz przyczynić się do polepszenia rozpuszczalności związku, być może dlatego lizyna w pozycji 7 nie jest resztą kluczową w oddziaływaniach z proteasomem. W przypadku analogów E, każda modyfikacja wpłynęła na obniżenie aktywności. Spośród modulatorów posiadających obie modyfikacje, związek C3 charakteryzował się najlepszą aktywnością względem peptydazy ChTL. Może to wynikać z faktu, iż fragment ściśle C-końcowy został zachowany, a wprowadzona zmiana nie narusza motywu HbYX. Wynik badania pokazuje, iż C-końcowy fragment jest istotny w aktywacji proteasomu, co można wywnioskować na podstawie obniżenia zdolności do aktywacji proteasomu 20S związków: A2, B2, C5 oraz E2, które posiadają modyfikacje w tym rejonie. W przypadku aktywności TL dla analogów A i B został utrzymany podobny trend – modulatory z modyfikacją w fragmencie N-końcowym zachowują swoją efektywność w stymulacji h20S, natomiast zmiany w fragmencie C-końcowym powodują jej obniżenie w porównaniu do natywnych aktywatorów (Rysunek 309B). Wszystkie modyfikacje wprowadzone w analogu C spowodowały obniżenie aktywności w porównaniu z natywnym związkiem. Aktywator E w stężeniu 50  $\mu$ M stymuluje aktywność trypsynopodobną aż 12-krotnie. Tak dobry rezultat w porównaniu z innymi modulatorami może wynikać z obecności dwóch reszt o charakterze kwasowym, znajdujących się w fragmencie łącznikowym. Jednakże wprowadzenie jakichkolwiek modyfikacji do

sekwencji tego modulatora powodowało obniżenie aktywności. Widoczna jest pewna korelacja między stymulowaniem aktywności CL oraz ChTL - wprowadzone modyfikacje wpłynęły podobnie na aktywacyjne zależności w przypadku każdej z nich (Rysunek 309C). Jednakże peptydaza CL silniej zwiększa swoją aktywność pod wpływem modulatorów A1 oraz A5, które powodują aż ponad 20-krotną jej aktywację. Różnice w selektywności otrzymanych związków względem różnych peptydaz wskazują, że fragment C-końcowy otwierający bramę prowadzącą do komory katalitycznej h20S jest istotny i może też bezpośrednio wpływać na miejsca aktywne. Na podstawie wyników aktywności dla związków C4 oraz E1 można również potwierdzić istotność reszt posiadających ugrupowanie aromatyczne w rejonie N-końca. Na podstawie struktury kompleksu Blm10-y20S wykazano, iż grupy aromatyczne reszt tyrozyny oraz fenyloalaniny mogą stabilizować częściowe otwarcie kanału katalitycznego poprzez ich oddziaływanie z N-końcami podjednostek  $\alpha$ . Dla obu związków przesunięcie łańcucha bocznego zawierającego pierścień aromatyczny z węgla  $\alpha$  na sąsiadujący z nim atom azotu wiązało się z obniżeniem zdolności do stymulacji h20S. W przypadku związku C4 w wyniku modyfikacji nastąpiło również podstawienie wodoru z grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym grupą metylową, co mogło przyczynić się do zaburzenia oddziaływań wodorowych i utrudnienia stymulacji proteasomu 20S. Warto też zwrócić uwagę, iż wprowadzenie N-metylowanych reszt w rejonie N-końca nie wpłynęło negatywnie na potencjał aktywacyjny związków względem poszczególnych peptydaz, pomimo tego, że podstawienie wodoru przy atomie azotu  $\alpha$  grupą metylową prawdopodobnie miało wpływ na oddziaływania wodorowe w tych miejscach.

Aktywność zsyntezowanych aktywatorów oznaczyłam również stosując efektywny peptydowy substrat typu FRET. Zbudowany z 11 reszt aminokwasowych substrat Dabcyl-EDANS (H-K(Dabcyl)MSGFAATAE(EDANS)G-OH; dalej określany skrótowo jako Dabcyl-EDANS), jest słabo degradowany przez nieaktywowany proteasom, ze względu na utrudniający dostęp do kanału katalitycznego znaczny rozmiar. Klasyczne substraty fluorogeniczne, zwykle zbudowane z 3-4 reszt aminokwasowych, mogą łatwo wnikać do komory nawet latentnego proteasomu, co utrudnia charakteryzowanie aktywatorów. Na podstawie analizy MS zidentyfikowałam miejsca degradacji substratu Dabcyl-EDANS przez proteasom, wykazując, że związek ten jest hydrolizowany po kilku różnych resztach aminokwasowych – Lys(Dabcyl), Glu(EDANS) oraz Phe, dlatego substrat ten lepiej obrazuje procesywny sposób degradacji białkowych substratów przez

proteasom, a przez to dostarcza bardziej wiarygodnych informacji. Dla większości związków największa zgodność występuje między wynikami uzyskanymi przy użyciu Dabcyl-EDANS oraz Z-LLE-AMC (C-L) (Rysunek 30C, 309D). Odmienna dla obu substratów jest jedynie aktywacja h20S wywoływana przez modulator E oraz jego analogi. W przypadku aktywności ChT-L oraz C-L aktywator E1 znacznie słabiej stymulował proteasom niż jego macierzysty związek, podczas gdy w badaniach z wykorzystaniem substratu Dabcyl-EDANS modulatory E oraz E1 działały w bardzo podobny sposób. Kolejną różnicą jest to, iż związki A4 oraz C4 wykazują lepsze zdolności aktywacyjne podczas badań z wykorzystaniem tego substratu niż z Suc-LLVY-AMC (ChT-L). Podczas badań z substratem Dabcyl-EDANS modulatory B1 oraz B3 stymulowały proteasom 3-krotnie lepiej niż macierzysty związek B, w przypadku standardowych substratów ChT-L oraz C-L ich zdolności aktywacyjne były na porównywalnym poziomie. Można też zauważyć podobną tendencję analogów E do pobudzania degradacji substratów Dabcyl-EDANS oraz Boc-LRR-AMC (T-L); w obu przypadkach można zaobserwować charakterystyczny intensywny przyrost aktywności dla aktywatora w najwyższym testowanym stężeniu 50  $\mu$ M.

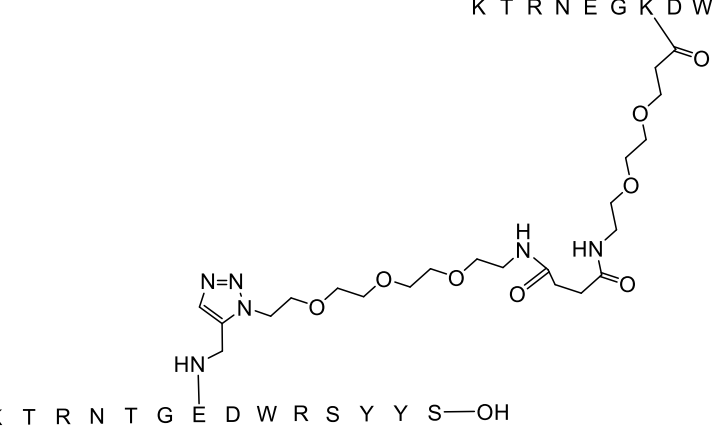
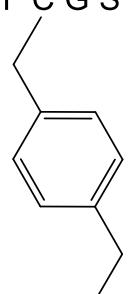
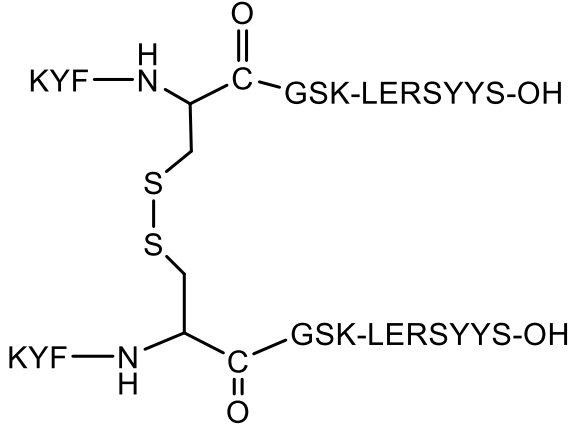
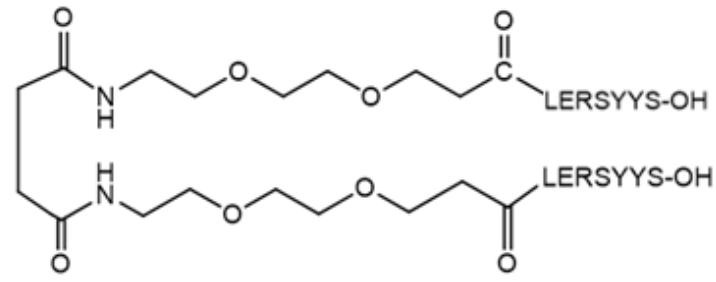




Rysunek 30. Wpływ otrzymanych analogów na aktywność A: chymotrypsynopodobną, B: trypsynopodobną, C: kaspazopodobną, D: ogólną aktywność proteasomu h2S. Względną aktywność obliczono przez porównanie przyrostów fluorescencji w obecności modulatorów z wartościami uzyskanymi dla latentnego proteasomu (kontrola), które przyjęto jako 100%. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej ± SEM, liczba powtórzeń n=4. Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, ns – brak istotności statystycznej.

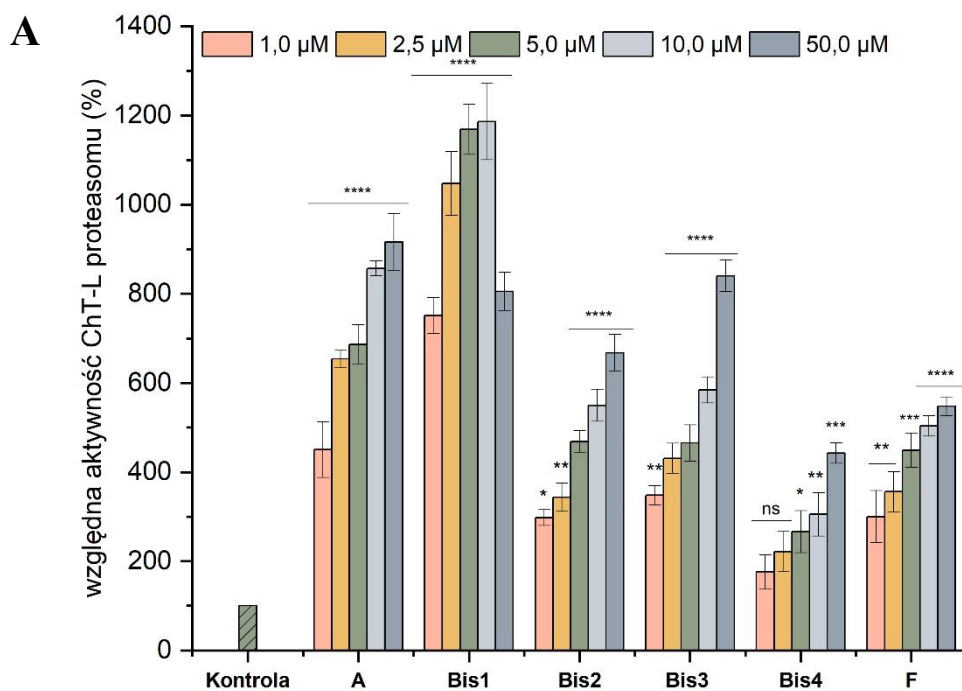
Przeprowadzone wcześniej badania z wykorzystaniem rentgenografii strukturalnej wykazały, iż jeden z aktywatorów z puli B1m, o sekwencji: KFTQKPLERSYYS (związek F), związał się w dwóch kieszeniach  $\alpha$  proteasomu:  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  i  $\alpha 3$ - $\alpha 4$ . Kieszenie te zlokalizowane są na powierzchni proteasomu, a związanie w nich modulatora najprawdopodobniej indukuje przesłanie sygnału w postaci zmian konformacyjnych do miejsc aktywnych, wpływając na efektywność ich działania. Otrzymanie modulatora zdolnego jednocześnie wiązać się w obu kieszeniach mogłoby pozwolić na wzmocnienie tego sygnału. Być może efektem byłoby także zwiększenie stabilności formy otwartej proteasomu. Bazując na aktywatorze F zaprojektowałam związki posiadające zduplikowany C-końcowy fragment połączony łącznikiem opartym na bezwodniku bursztynowym oraz PEG2 (Bis4) bądź łącznikiem w postaci wiązania disulfidowego (Bis3) lub jego zmodyfikowanej formy (Bis2) (Tabela 9). Aktywator Bis3 otrzymałam poprzez utlenienie cysteiny z sekwencji aktywatora za pomocą DPDS w niewielkiej objętości DMSO, co pozwoliło na otrzymanie międzycząsteczkowego wiązania disulfidowego. Związek Bis2, który posiada taką samą sekwencję peptydową oraz zmodyfikowane wiązanie disulfidowe, uzyskałam stosując *p*-dibromobenzen i przeprowadzając reakcję CLIPS. Dodatkowo, wykorzystując modelowanie molekularne dr hab. Artur Giełdoń (Katedra Chemii Teoretycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) zaprojektował aktywator Bis1 opierający swoją sekwencję aktywną na modulatorze A. Związek ten otrzymałam poprzez syntezę na nośniku stałym dwóch jego fragmentów. Każdy z peptydów w łańcuchu bocznym piątej reszty aminokwasowej posiadał dołączony fragment łącznika. Jedna część aktywatora zawierała propargiloaminę w łańcuchu bocznym kwasu glutaminowego, w drugiej części do łańcucha bocznego piątej reszty aminokwasowej (Lys) dołączyłam PEG2, bezwodnik bursztynowy oraz PEG3 z ugrupowaniem azydkowym. Oba fragmenty po odszczepieniu od nośnika połączyłam stosując reakcję CLICK. Zdolność zsyntezowanych aktywatorów do stymulacji proteasomu 20S zweryfikowałam stosując standardowe substraty fluorogeniczne oraz substrat Dabcy1-EDANS.

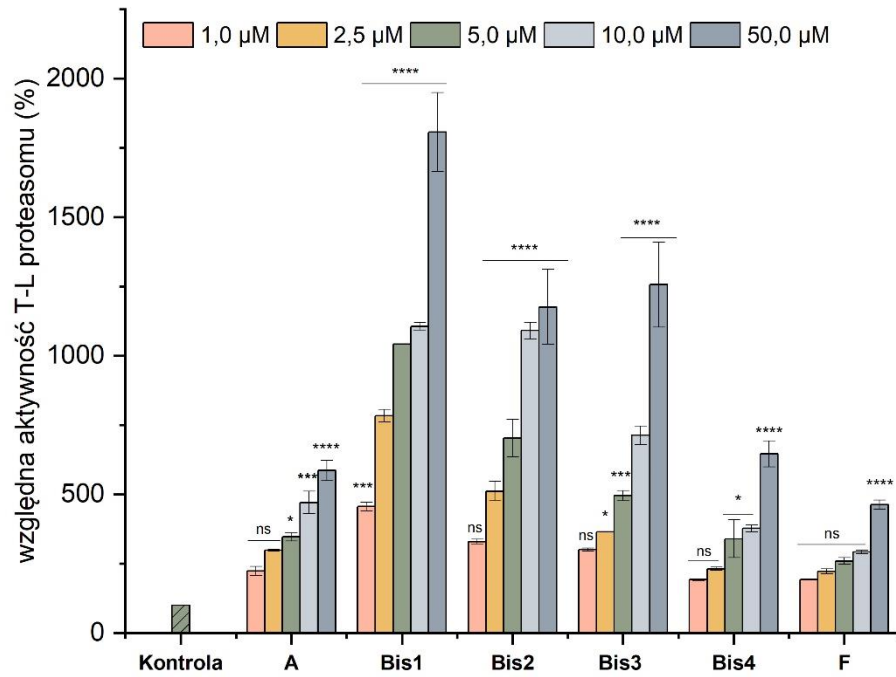
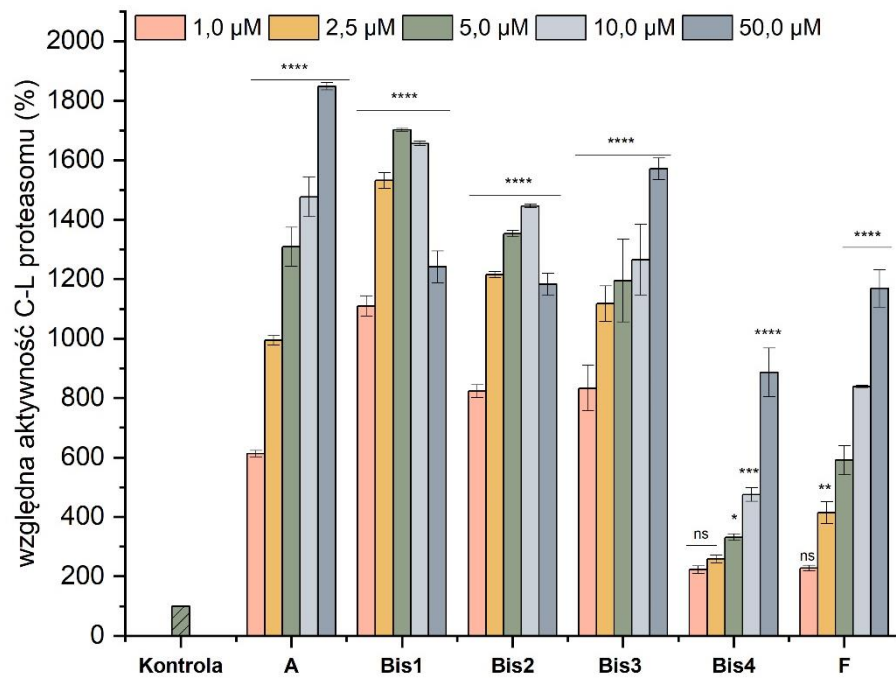
Tabela 9. Nazwy i struktury związków z grupy aktywatorów Bis.

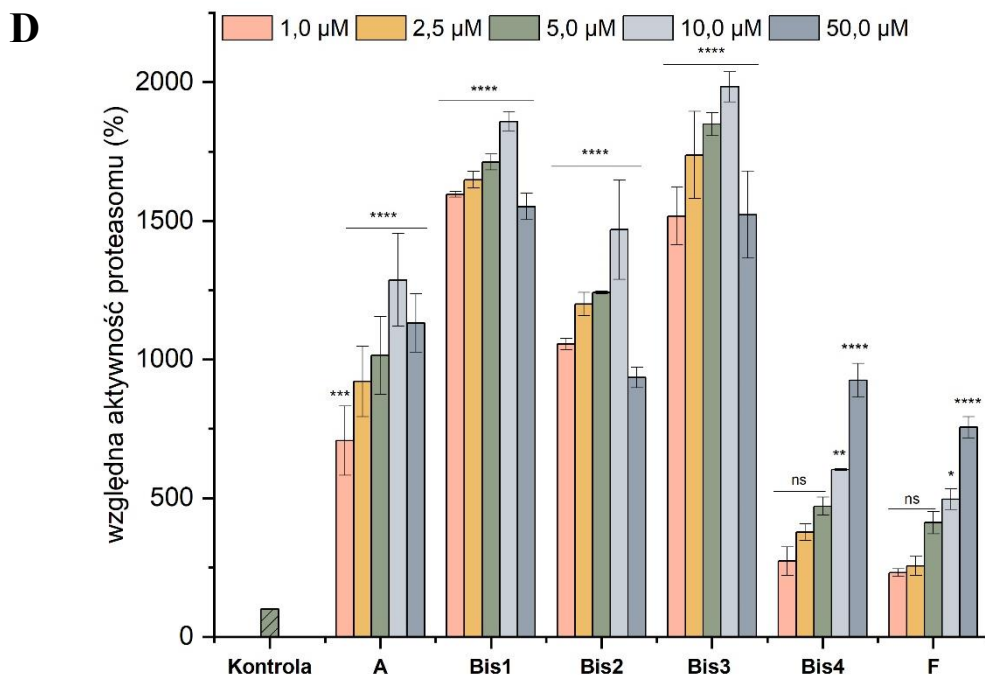
Nazwa:	Struktura:
<b>Bis1:</b>	<p style="text-align: right;">K T R N E G K D W R S Y Y S-OH</p>  <p style="text-align: left;">K T R N T G E D W R S Y Y S-OH</p>
<b>Bis2:</b>	<p>K Y F C G S K L E R S Y Y S-OH</p>  <p>K Y F C G S K L E R S Y Y S-OH</p>
<b>Bis3:</b>	
<b>Bis4:</b>	



Bis1, który jest analogiem związku A, okazał się najlepszym modulatorem; stymulował aktywność ChTL 12-krotnie, 33% bardziej niż związek A (Rysunek 31A). Bis2, Bis3 oraz Bis4 bazują na aktywatorze F, który ma słabsze właściwości stymulujące proteasom niż związek A, stąd może wynikać ich niższa zdolność do aktywacji enzymu. Najślabszym aktywatorem jest Bis4. Prawdopodobną przyczyną takiego rezultatu może być brak rejonu N-końcowego modulatora F, a oddziaływania tego rejonu mogą odgrywać istotną rolę w procesie aktywacji enzymu. Bis2 oraz Bis3 posiadają podobne właściwości aktywacyjne względem peptydazy ChTL, co wskazuje, iż niezmodyfikowane wiązanie disulfidowe jest stabilne podczas przeprowadzanych eksperymentów i nie ulega degradacji. W przypadku aktywności TL oraz CL (Rysunek 31B, 31C) uzyskane wyniki pokazują podobieństwo tendencji stymulacyjnych wykazywanych przez poszczególne związki, jednak siła ich oddziaływania nie jest taka sama. Związek Bis1 przy stężeniu 50  $\mu\text{M}$  jest najlepszym aktywatorem tej peptydazy i stymuluje ją aż 17-krotnie w porównaniu do kontroli. W badaniach aktywności z wykorzystaniem substratu Dabcyl-EDANS główną zaobserwowaną różnicą było znaczne polepszenie właściwości aktywujących Bis3 względem innych aktywatorów (Rysunek 31D).

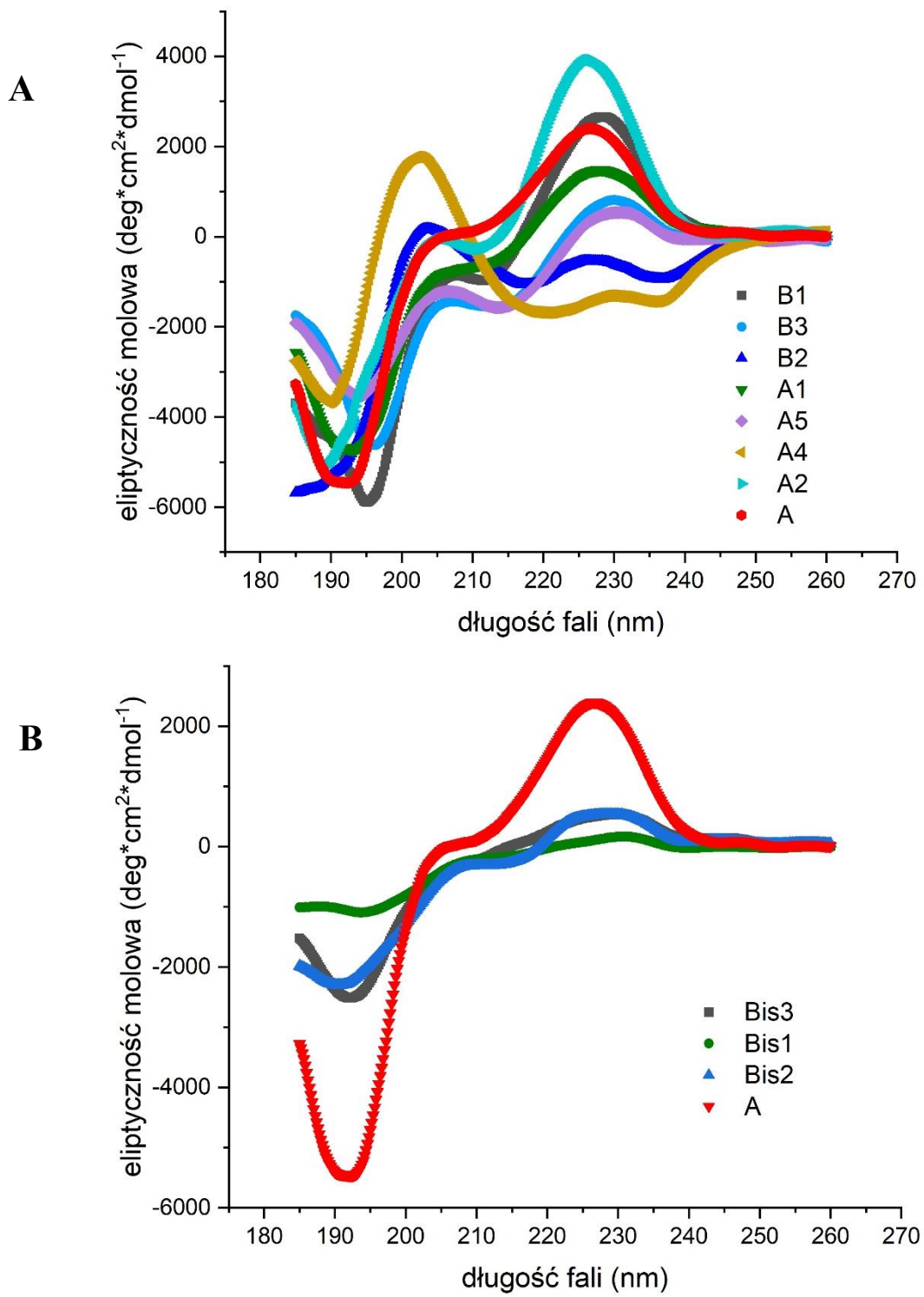


**B****C**



Rysunek 31. Wpływ aktywatorów Bis na aktywność proteasomu h20S. Pomiar został wykonany przy użyciu substratu A: Suc-LLVY-AMC, B: Suc-LRR-AMC, C: Suc-LLE-AMC, D: Dabcył-EDANS. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=4$ . Statystykę wykonano porównując za pomocą testu One-way ANOVA dane uzyskane dla modulatorów z kontrolą: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

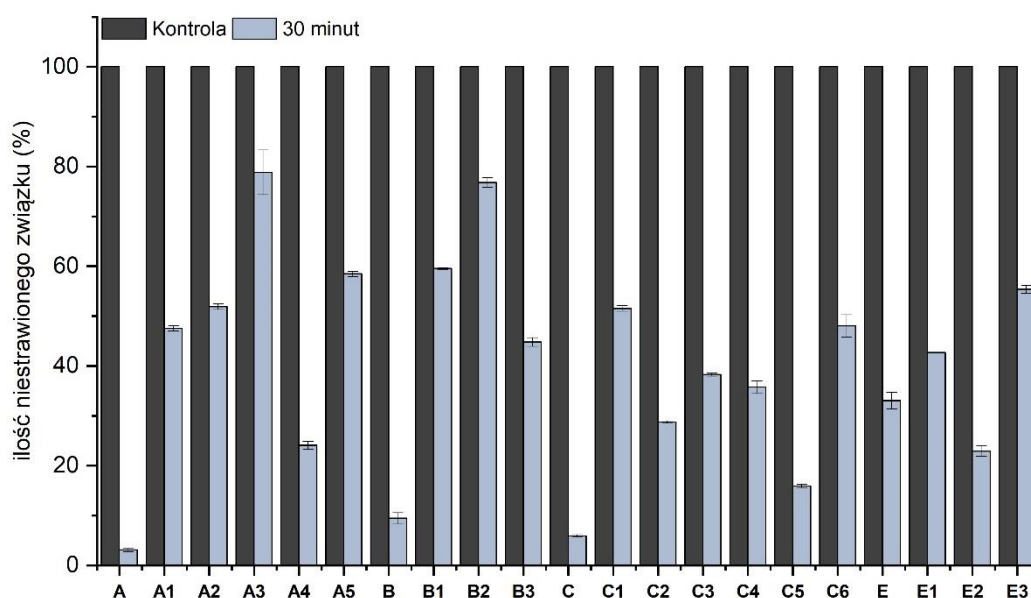
Zmiana właściwości aktywacyjnych zaprojektowanych modulatorów nie jest bezpośrednio powiązana ze zmianą struktury drugorzędowej. Widma CD peptydomimetycznych aktywatorów, macierzystych aktywatorów oraz związków z grupy bisBlm mają podobny przebieg, z wyraźnym minimum w zakresie 190-200 nm oraz maksimum w okolicy 225-235 nm (Rysunek 32). Większość peptydomimetyków charakteryzuje się strukturą nieuporządkowaną, oprócz związków, w których C-końcowej sekwencji występują *N*-metylowane aminokwasy (A4, B2). Widma tych związków posiadają maksimum w zakresie 200-210 nm oraz minimum w zakresie 220-230 nm. Widma te kształtem odpowiadają  $\alpha$ -helisie, ale przesunięcie batochromowe może wskazywać na obecność  $\beta$ -zgięć.



Rysunek 32. Widma CD rozpuszczonych w wodzie aktywatorów o stężeniu 0,2 mg/ml.

## 2. Stabilność proteolityczna otrzymanych aktywatorów w ludzkim osoczu.

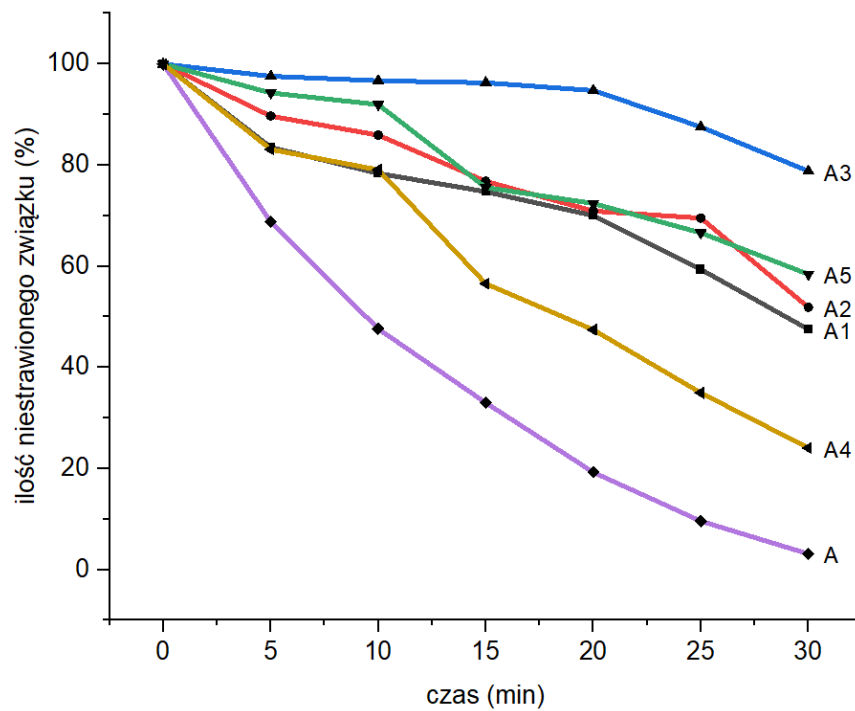
Otrzymane aktywatory przebadalam pod kątem stabilności proteolitycznej poprzez inkubację z ludzkim osoczem w 37°C przez 30 minut, stosując protokół z użyciem kwasu trichlorooctowego. Proces monitorowałam wykonując analizy na instrumencie UHPLC. Za pomocą spektrometrii mas dokonana została identyfikacja fragmentów powstających po inkubacji związków z osoczem, a na ich podstawie wyznaczyłam miejsca degradacji proteolitycznej. Zawartość większości aktywatorów z wprowadzonymi modyfikacjami utrzymuje się po 30 minutach na poziomie około 50-60% (Rysunek 33, 34), podczas gdy zawartość wyjściowych związków jest na poziomie <10%. Dokonane modyfikacje spowodowały, iż otrzymane modulatory są znacznie mniej podatne na działanie enzymów proteolitycznych obecnych w osoczu. Z serii A oraz E najlepszą stabilność posiadały związki, które w swej strukturze miały dwie modyfikacje: na *N*- oraz *C*-końcu (A3 oraz E3). W serii B najstabilniejszym aktywatorem okazał się związek B2, posiadający *N*-metylowaną argininę. Prawdopodobnie umieszczenie w *C*-końcowym fragmencie takiej pochodnej w sąsiedztwie reszty argininy skutecznie zapobiega degradacji wiązania peptydowego w tym miejscu. W serii C również aktywatory posiadające jednocześnie dwie modyfikacje charakteryzowały się wysoką stabilnością (C3, C6). Stabilnym związkiem jest również C1 z modyfikacją na *N*-końcu.

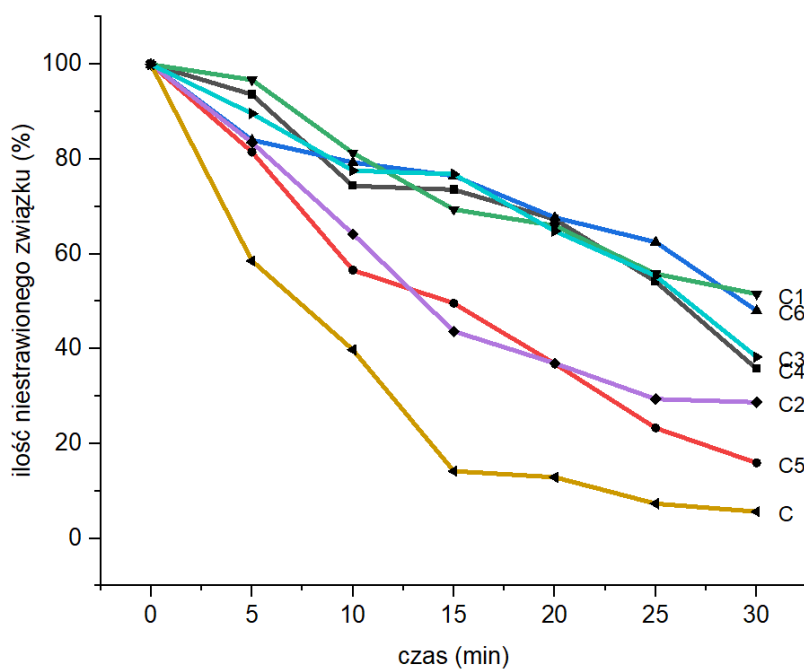
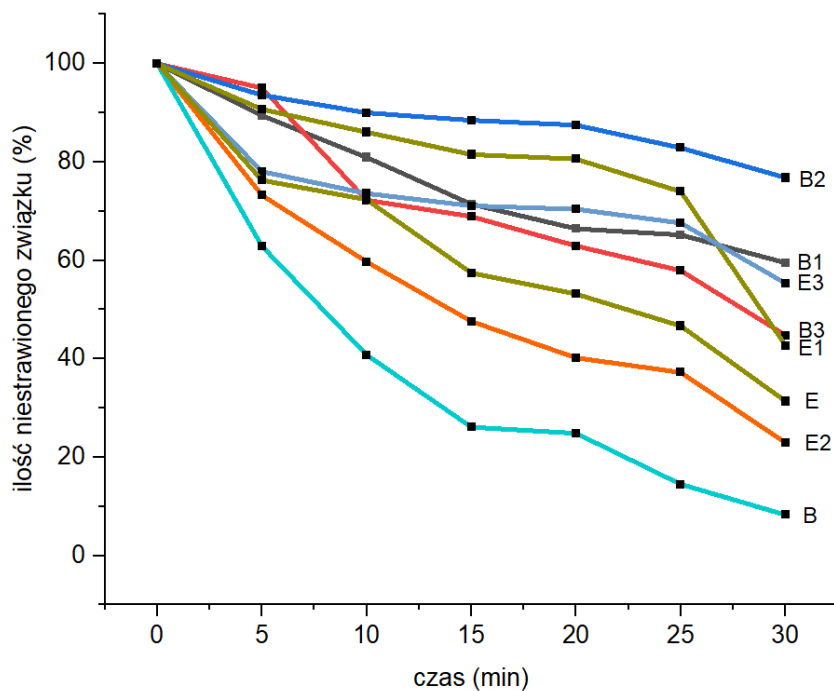


Rysunek 33. Porównanie stabilności proteolitycznej aktywatorów w ludzkim osoczu. Ilość niestrawionego związku obliczyłam poprzez porównanie pól powierzchni pików na chromatogramach zarejestrowanych dla aktywatorów inkubowanych z ludzkim osoczem przez

0 (kontrola) oraz 30 min. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM., liczba powtórzeń n=3.

Najniższą stabilność proteolityczną <30% wykazuje związek A4 z dwoma N-metylowanymi aminokwasami na N-końcu, związek C5 z modyfikacją w postaci wiązania peptoidowego w 10. reszcie oraz E2 z wprowadzoną modyfikacją w 2. reszcie. Najlepszą stabilność posiadały natomiast związki A3 oraz B2; po 30 minutach inkubacji w osoczu obu pozostało około 80%.





Rysunek 34. Postęp degradacji aktywatorów z grupy peptydomimetyków B1m podczas inkubacji z ludzkim osoczem.

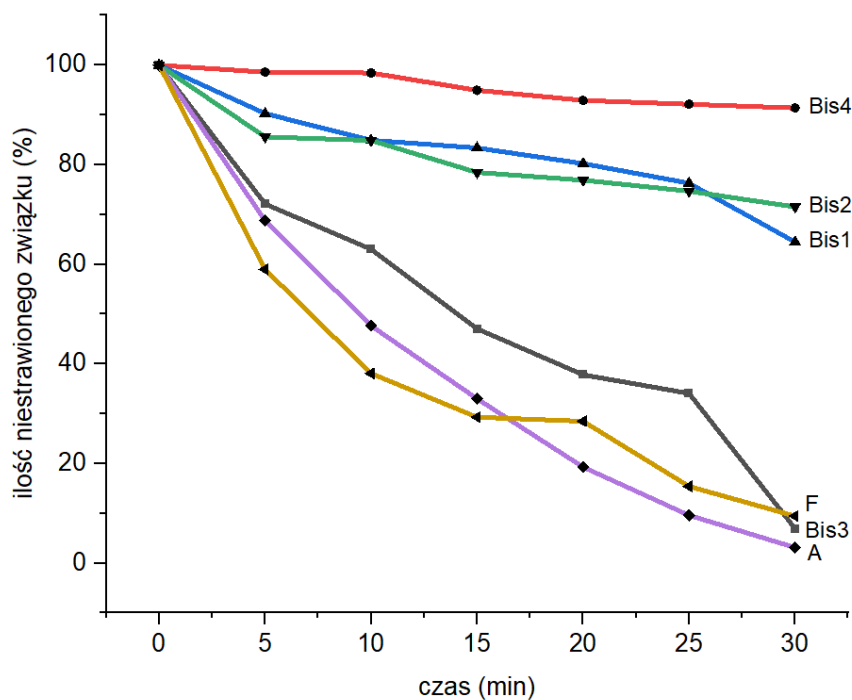
Analizując widma MS po przeprowadzonej inkubacji z osoczem można zauważyć, że wprowadzone modyfikacje mają wpływ na miejsca degradacji, przy czym nie dotyczy to tylko bezpośredniego sąsiedztwa modyfikacji (Tabela 10). Zmiany w N- lub C-końcowym fragmencie sekwencji powodują zablokowanie degradacji wiązania

peptydowego w dalszej części sekwencji. W związkach A4 oraz B2, które zawierają *N*-metylowane aminokwasy, zablokowana zostaje hydroliza wiązania poprzedzającego miejsce modyfikacji.

Tabela 10. Zidentyfikowane za pomocą LC-MS miejsca degradacji w aktywatorach. Kolorem czerwonym został oznaczony fragment sekwencji modulatora, pozostały po zakończeniu inkubacji.

Nazwa:	Fragment sekwencji, który nie uległ degradacji (czerwony):
A	KYFT <b>GSKD</b> WRSYYS
A1	<i>Nab</i> -YFT <b>GSKD</b> WRSYYS
A2	KYFT <b>GSKD</b> WR- <i>Nhe</i> -YYS
A3	<i>Nab</i> -YFT <b>GSKD</b> WR- <i>Nhe</i> -YYS
A4	KYFT <b>GSKD</b> W- <i>MeR</i> - <i>MeS</i> -YYS
A5	<b>NH</b> - <i>MeK</i> - <i>MeY</i> -FT <b>GSKD</b> WRSYYS
B	KYFT <b>GSKD</b> WRRYYS
B1	<i>Nab</i> -YFT <b>GSKD</b> WRRYYS
B2	KYFT <b>GSKD</b> WR- <i>NR</i> -YYS
B3	<i>MeK</i> - <i>MeY</i> -FT <b>GSKD</b> WRRYYS
C	KYFT <b>GSKD</b> YRRYYS
C1	<i>Nab</i> -YFT <b>GSKD</b> YRRYYS
C2	KYFT <b>G</b> S- <i>Nab</i> - <b>DY</b> RRYYS
C3	<i>Nab</i> -YFT <b>G</b> S- <i>Nab</i> - <b>DY</b> RRYYS
C4	<b>K</b> - <i>Nompe</i> -FT <b>GSKD</b> YRRYYS
C5	KYFT <b>GSKD</b> - <i>Nompe</i> -RRYYS
C6	<b>K</b> - <i>Nompe</i> -FT <b>GSKD</b> - <i>Nompe</i> -RRYYS
E	EFT <b>D</b> EPLWRSYIA
E1	<b>E</b> - <i>Npm</i> -T <b>D</b> EPLWRSYIA
E2	EFT <b>D</b> EPLWR- <i>Nhe</i> -YIA
E3	<b>E</b> - <i>Npm</i> -T <b>D</b> EPLWR- <i>Nhe</i> -YIA





Rysunek 35. Postęp degradacji aktywatorów z grupy Bis podczas inkubacji z ludzkim osoczem.

Zbadałam również stabilność związków z grupy Bis (Rysunek 35). Największą odpornością na obecność enzymów proteolitycznych w osoczu posiadał Bis4. Jego podwyższona stabilność może być związana z obniżeniem zdolności stymulujących proteasom, wynikającym z braku fragmentów *N*-końcowych. Zawartość związków Bis1 oraz Bis2 była na poziomie około 70% po 30 minutowej inkubacji, co jest bardzo dobrym rezultatem w świetle zdolności aktywacyjnych tych związków. Podwyższona stabilność wynika z nienaturalnych modyfikacji oraz rozbudowania cząsteczki. Najniższą stabilność spośród tej grupy ma związek Bis3, prawdopodobnie przyczyną tego jest jego sekwencja, która składa się z samych naturalnych reszt aminokwasowych.

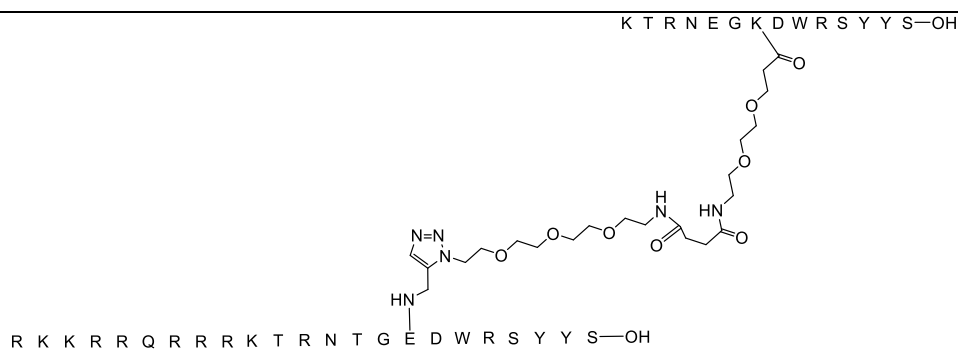
### 3. Wpływ wprowadzenia CPP do sekwencji aktywatorów na zdolność do aktywacji proteasomu 20S oraz stabilność.

Wyniki z badań aktywności oraz stabilności proteolitycznej zsyntezowanych peptydomimetycznych analogów aktywatorów B1m oraz grupy Bis pozwoliły mi wybrać sekwencje, które cechują się jednocześnie zadowalającą zdolnością do aktywacji proteasomu 20S oraz odpornością na degradację wiązania peptydowego w osoczu. Analizując te dwa parametry oraz mając na uwadze trudności podczas przeprowadzanych

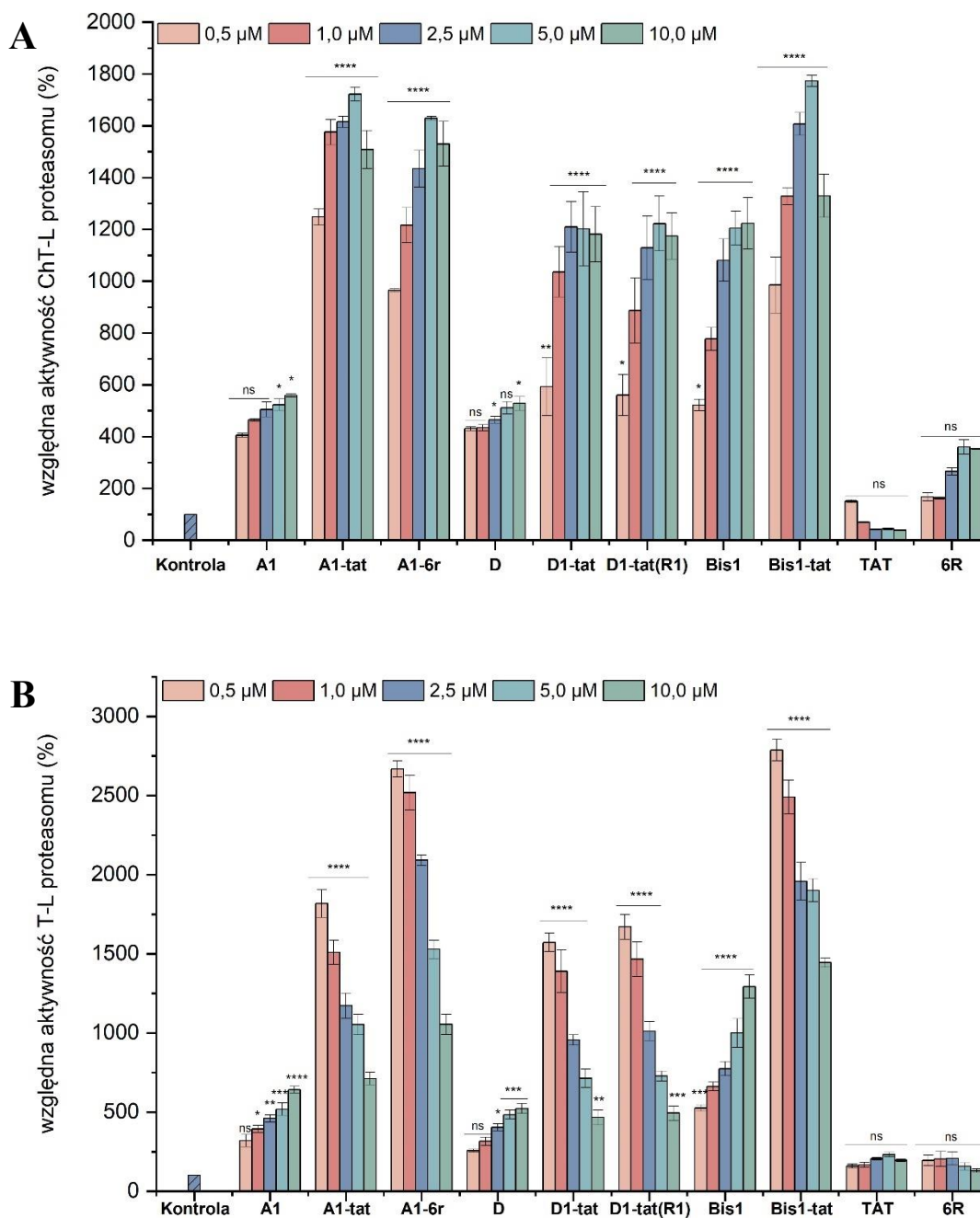
syntez wytypowałam związki, które poddałam kolejnej modyfikacji – wprowadzeniu fragmentu polepszającego przenikalność przez błony komórkowe, sekwencji CPP. Zdolność do wnikania aktywatora do wnętrza komórki jest konieczna, aby związek mógł być zastosowany jako terapeutyk. W literaturze dostępna jest baza sekwencji CPP o różnym charakterze. Opisano m.in., iż peptyd składający się z więcej niż pięciu reszt zawierających ugrupowanie guanidynowe skutecznie penetruje błonę komórkową. Zdecydowałam się na dołączenie do modulatorów peptydu tat o sekwencji RKKRRQRRR oraz peptydu składającego się wyłącznie z sześciu reszt argininy (6r). Z puli otrzymanych przeze mnie aktywatorów wybrałam peptydomimetyk A1. Zsyntezowałam jego dwa analogi A1-tat oraz A1-6r, chcąc porównać wpływ dwóch różnych sekwencji CPP na zdolność modulatora do aktywacji proteasomu, stabilność w osoczu oraz przenikalność przez błonę. Z grupy aktywatorów Bis wybrałam związek Bis1, do jednego z N-końców którego dołączyłam sekwencję tat (Bis1-tat). Dodatkowo zaprojektowałam analogi aktywatora D, który również był interesującym modulatorem z puli aktywatorów Blm. Związek D1-tat posiada modyfikację w postaci wiązania peptoidowego pomiędzy lizyną a fenyloalaniną z sekwencji aktywnej, natomiast związek D1-tat(R1) posiada dodatkowe wiązanie peptoidowe na N-końcu. Oba analogi zostały zsyntezowane w ramach realizacji pracy magisterskiej. Struktury pierwszorzędowe otrzymanych związków przedstawiłam w Tabeli 11.

Tabela 11. Nazwy oraz sekwencje aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP.

Nazwa:	Sekwencja:
A1-tat	RKKRRQRRR- <i>Nab</i> -YFTGSKDWRSYYS
A1-6r	RRRRRR- <i>Nab</i> -YFTGSKDWRSYYS
D1-tat	RKKRRQRRR- <i>Nab</i> -FTQKPLWRSYYA
D1-tat(R1)	<i>Nag</i> -KKRRQRRRKFTQKPLWRSYYA
Bis1-tat	



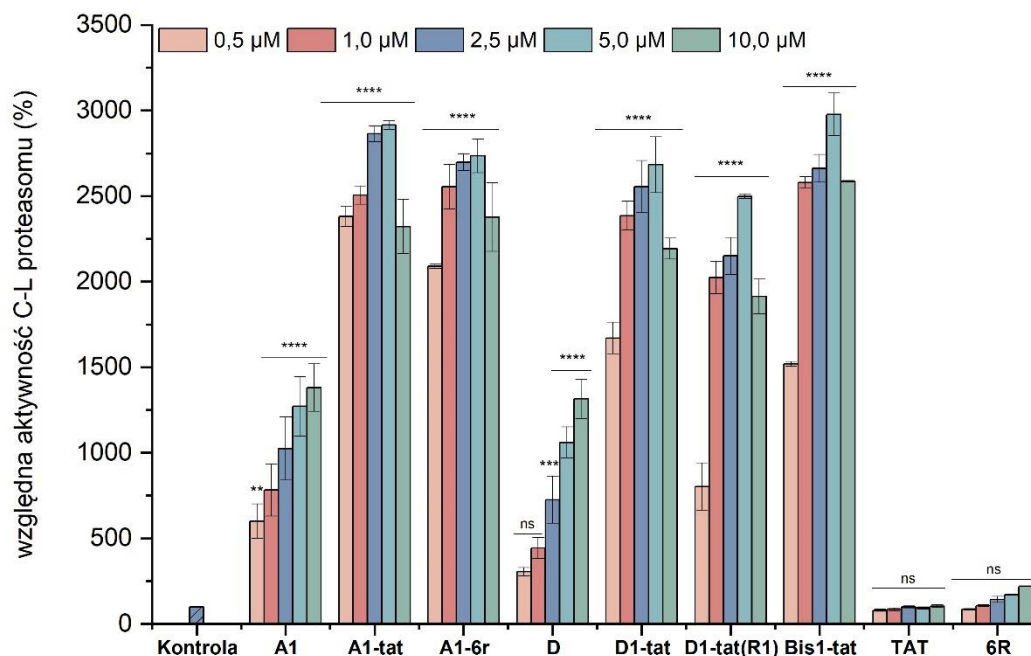
Aktywatory zostały otrzymane w kilku etapach: 1) synteza sekwencji aktywnej na nośniku stałym z wykorzystaniem syntezy mikrofalowej, 2) wprowadzenie wiązania peptoidowego poprzez syntezę manualną, 3) dołączenie wybranej sekwencji CPP z wykorzystaniem syntezy mikrofalowej z zastosowaniem podwójnych, wydłużonych cykli sprzęgania. Konieczność podwójnych, wydłużonych cykli oraz użycia silniejszego odczynnika sprzęgającego wynikała z trudności w syntezie sekwencji zawierających wiele reszt argininy. Stosowanie tradycyjnych cykli podczas syntezy mikrofalowej prowadziło do otrzymania wielu produktów ubocznych, posiadających delecje tej reszty aminokwasowej. Aktywator Bis1-tat uzyskałam w analogiczny sposób do syntezy modulatora Bis1, jedyną różnicą było dołączenie sekwencji tat do fragmentu z propargiloaminą w łańcuchu bocznym. Wykonałam to korzystając z syntezy mikrofalowej. Zbadałam zdolność otrzymanych związków do aktywacji proteasomu 20S stosując standardowe substraty fluorogeniczne oraz substrat Dabcy1-EDANS. Dołączenie CPP do sekwencji spowodowało, iż aktywność ChTL proteasomu wzrosła 2,7 razy względem wyjściowych peptydomimetyków (Rysunek 36A). Najlepszymi modulatorami są A1-tat, A1-6r oraz Bis1-tat, które w stężeniu 5  $\mu$ M stymulują aktywność ChTL proteasomu około 17-krotnie. Chcąc wykluczyć możliwość, iż tak wysoka aktywacja zależy w dużej mierze od sekwencji 6r oraz tat zsyntezowałam te peptydy i równolegle zbadałam ich właściwości aktywacyjne. Okazało się, że związki te mają bardzo słabe właściwości stymulujące, peptyd tat wraz ze wzrostem stężenia wykazuje wręcz właściwości inhibicyjne.



Rysunek 36. Wpływ aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP na aktywność ChTL i TL proteasomu h20S. Pomiar został wykonany przy użyciu substratu A: Suc-LLVY-AMC, B: Suc-LRR-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=6$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

W przypadku aktywności TL można zaobserwować spadek zdolności do aktywacji wraz ze wzrostem stężenia (Rysunek 36B). Wynika to prawdopodobnie z tego, że związki z dołączoną sekwencją CPP, z racji nagromadzenia na *N*-końcu reszt zasadowych, skutecznie rywalizują z substratem i po wnikięciu do wnętrza proteasomu, co jest

możliwe po jego zaktywowaniu, mogą ulegać degradacji. Hipotezę tę potwierdziłam poddając analizie MS próbki z aktywatorem A1-tat oraz A1-6r: na widmie MS pojawiły się sygnały odpowiadające masie cząsteczkowej związku z odciętą resztą argininy.



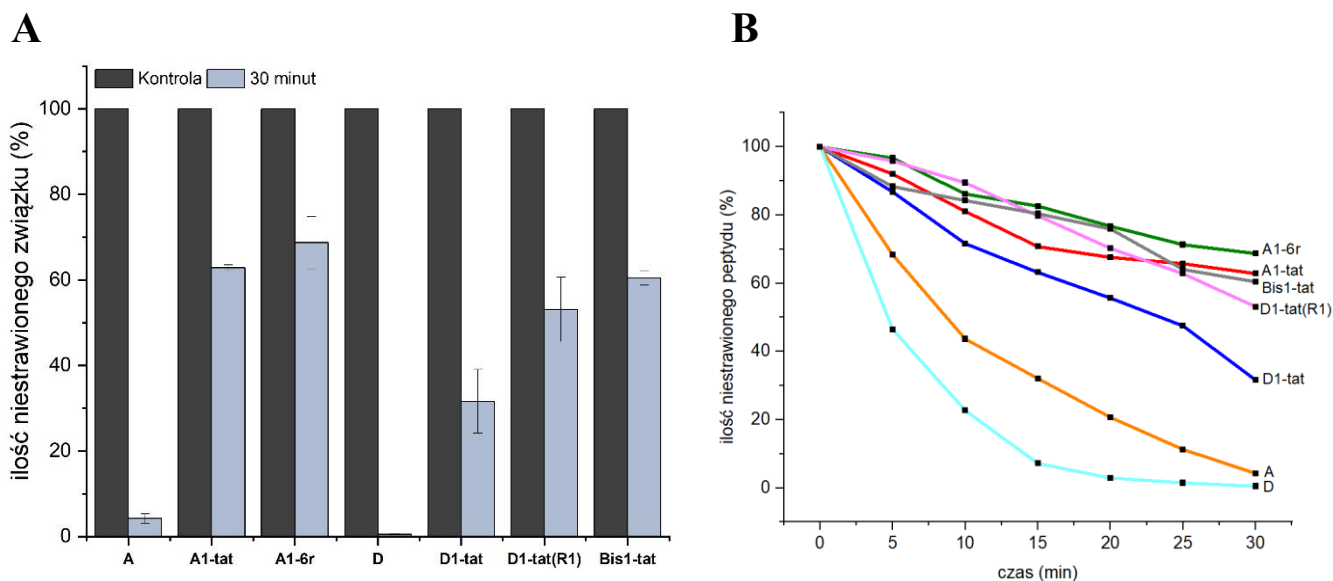
Rysunek 37. Wpływ aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP na aktywność kaspazopodobną proteasomu h20S. Pomiar został wykonany przy użyciu substratu Z-LLE-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=6$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

Aktywatory bardzo skutecznie stymulują również peptydazę CL (Rysunek 37). Został zachowany taki sam trend jak przy aktywności ChTL, jednak wartości liczbowe są znacznie większe (nawet 30-krotna aktywacja względem kontroli).

W dalszym etapie zbadalam stabilność otrzymanych związków stosując protokół z kwasem trichlorooctowym, następnie analizując próbki na instrumencie UHPLC. Zawartość większości aktywatorów po 30 minutach inkubacji z osoczem wynosi około 60% (Rysunek 38). Najniższą stabilność na poziomie około 30% posiadał związek D1-tat.

Na podstawie analizy MS zidentyfikowałam miejsca degradacji podczas inkubacji w ludzkim osoczu. Wiązanie peptydowe jest hydrolizowane po czwartej reszcie od C-końca lub po pierwszym aminokwasie od N-końca. Dołączenie sekwencji zawierającej

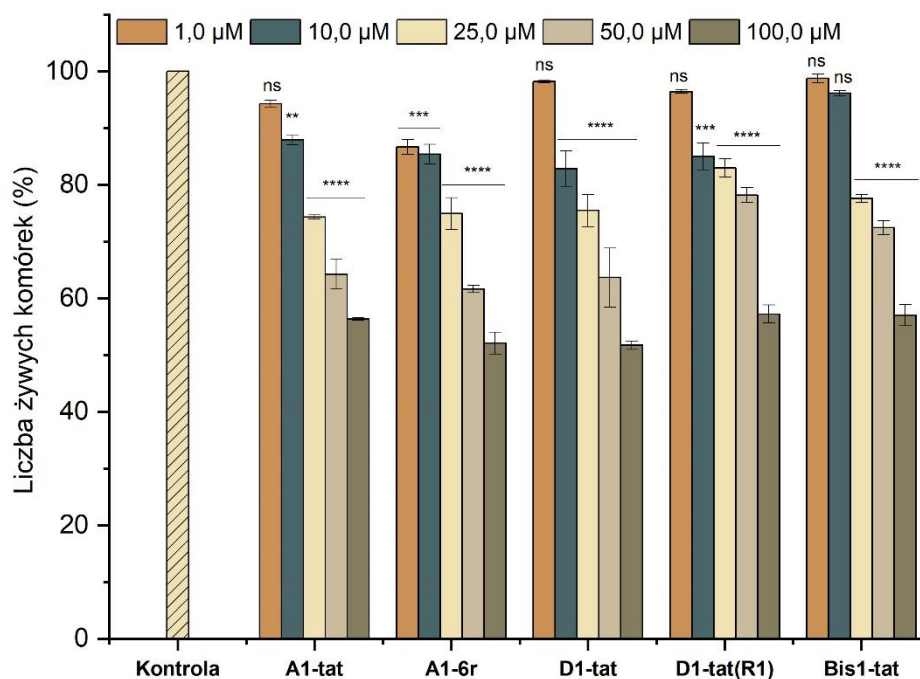
wiele reszt argininy do aktywatorów skutecznie hamuje działanie enzymów zawartych z ludzkim osoczem.



Rysunek 38. A: Porównanie stabilności proteolitycznej aktywatorów w ludzkim osoczem. Ilość niestrawionego związku obliczyłam poprzez porównanie pól powierzchni pików na chromatogramach zarejestrowanych dla aktywatorów inkubowanych z ludzkim osoczem przez 0 (kontrola) i 30 minut. Liczba powtórzeń n=3, B: Postęp degradacji aktywatorów z sekwencją CPP w czasie.

#### 4. Zdolność peptydomimetyków B1m do przenikania przez błonę komórkową oraz ich cytotoksyczność.

Przeprowadziłam również badanie wpływu aktywatorów z CPP na żywotność hodowli komórkowej. W tym celu wykonałam test MTT dla komórek HEK293T inkubowanych przez 24 godziny z modulatorami o stężeniach w zakresie 1-100  $\mu\text{M}$ . Za pomocą tego testu mierzyłam aktywność metaboliczną komórek poprzez pomiar absorbancji metabolitu MTT przy długości fali 570 nm.



Rysunek 39. Cytotoksyczność aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP wobec linii komórkowej H293T podczas 24-godzinnej inkubacji. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=3$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

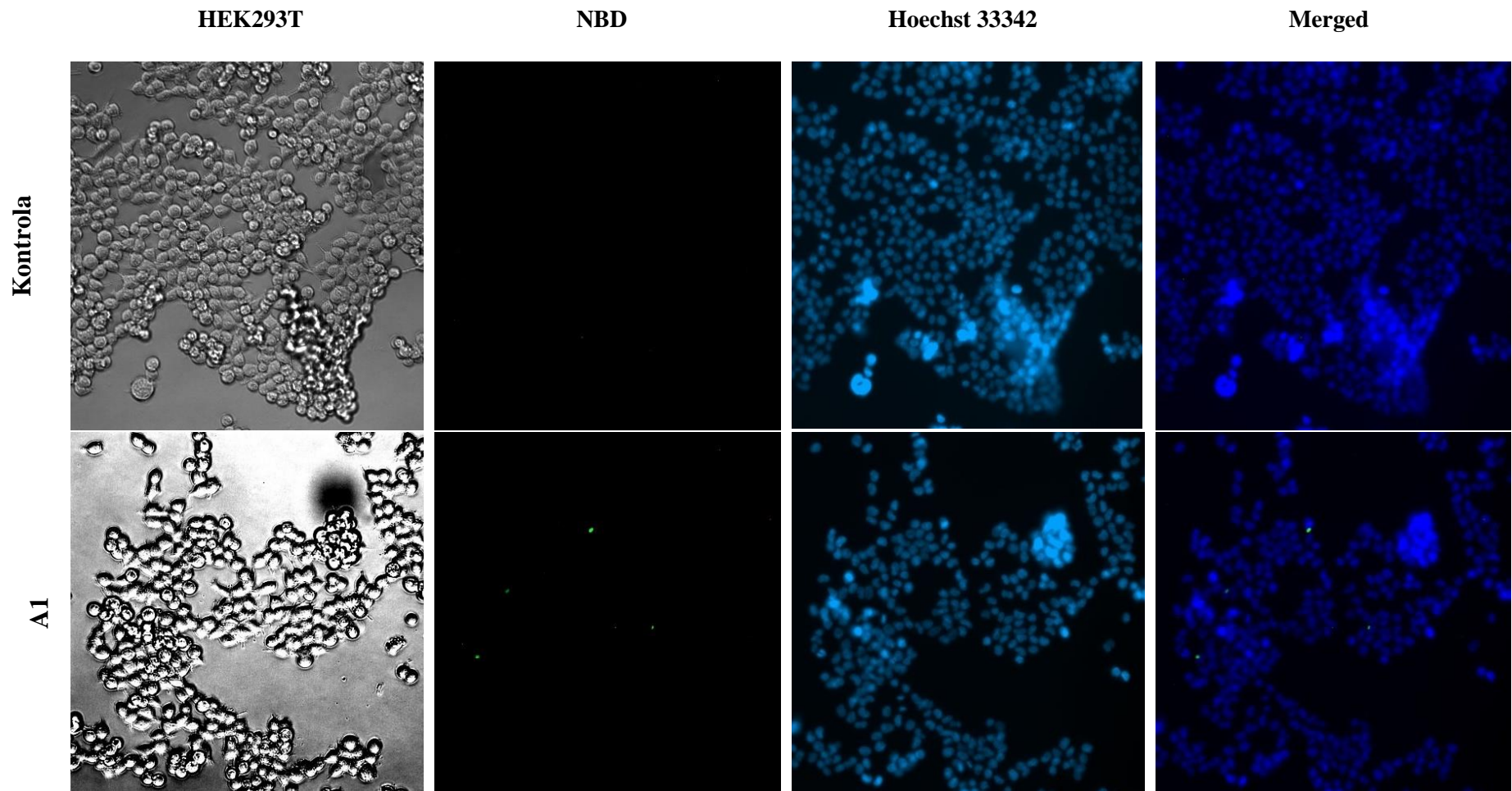
Aktywatory w stężeniu 25  $\mu\text{M}$  oraz 50  $\mu\text{M}$  są słabo cytotoksyczne, liczba żywych komórek jest na poziomie powyżej 60% (Rysunek 39). W najwyższym testowanym stężeniu żywotność komórek utrzymuje się na poziomie około 50%, co oznacza, że aktywatory w tym stężeniu wykazują umiarkowaną cytotoksyczność. W najniższym stężeniu 1  $\mu\text{M}$  oraz 10  $\mu\text{M}$  modulatory nie są cytotoksyczne, dlatego jest to zakres stężeń, które wybrano w późniejszych badaniach komórkowych. Związek A1-6r wykazał największy wpływ na obniżenie przeżywalności komórek spośród badanych modulatorów.

W celu zweryfikowania przenikalności otrzymanych aktywatorów przez błony komórkowe zsyntezowałam analogi z dołączonym fluoroforem NBD. Znacznik ten wykazuje wysoką reaktywność w stosunku do amin, dlatego został dołączony do grupy aminowej na *N*-końcu. Przyłączeniu tego znacznika do sekwencji towarzyszą zmiany kolorymetryczne i fluorescencyjne. Długość fali wzbudzenia dla tego fluoroforu wynosi 467 nm, natomiast emisji 539 nm. Dużą jego zaletą jest mały rozmiar cząsteczki. Do eksperymentów wykorzystałam ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK293T), po

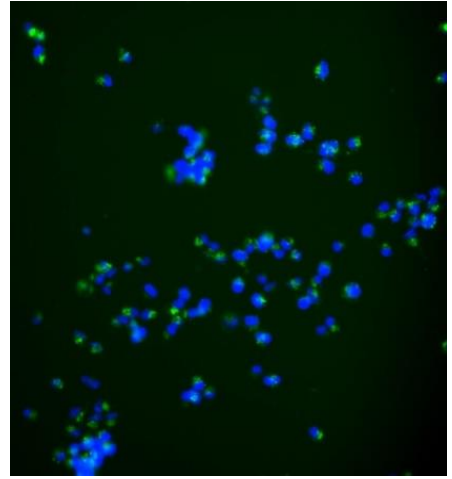
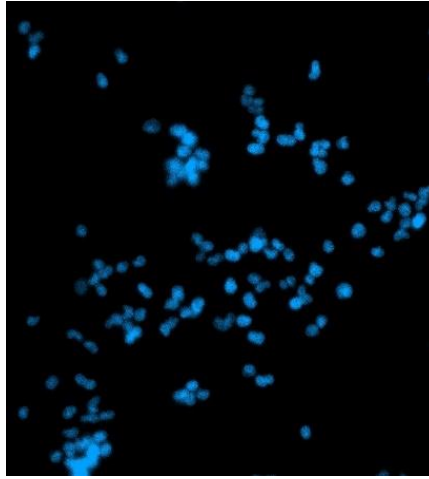
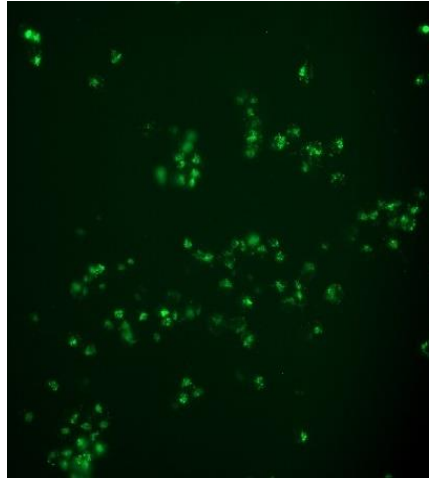
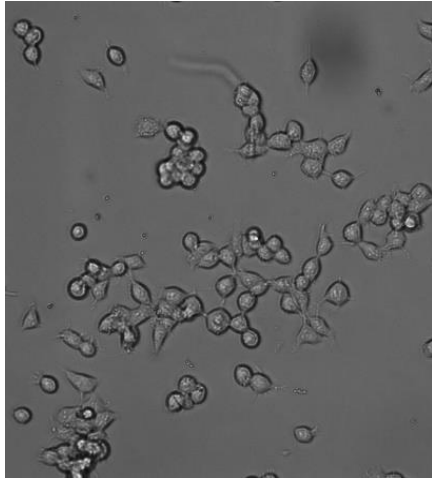
dwóch dniach ich inkubacji dodałam związki: A1, A1-tat\_NBD, A1-6r\_NBD, D1-tat\_NBD, D1-tat(R1)\_NBD oraz Bis1-tat\_NBD w stężeniu 10  $\mu$ M oraz barwnik Hoechst 33342. Po trzech godzinach inkubacji preparaty analizowałam za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego AXIO Observer D1, stosując filtr Alexa Fluor 488 oraz DAPI 465.

Na Rysunku 40 zostały przedstawione zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego dla kontroli oraz wyznakowanych aktywatorów. W przypadku kontroli oraz związku A1 na zdjęciach wykonanych z zastosowaniem filtra Alexa Fluor 488 (kolumna oznaczona jako NBD) nie jest zauważalna fluorescencja. Natomiast w przypadku modulatorów z sekwencją CPP wewnątrz komórek HEK293T widoczna jest fluorescencja pochodząca od dołączonego do aktywatorów znacznika NBD, co jest dowodem na to, iż wprowadzenie sekwencji CPP poprawiło przenikalność przez błonę komórkową. Porównując zdjęcia dla związków A1-tat\_NBD oraz A1-6r\_NBD nie zauważyłam różnicy w intensywności fluorescencji, co wskazuje na ich podobną zdolność do przenikania błony komórkowej. Na obrazach uzyskanych przez nałożenie sygnałów pochodzących od odczynnika Hoechst 33342, barwiącego jądra komórkowe, oraz NBD aktywatorów obserwuje się pewną fluorescencję cytozolową, co wskazuje na kolokalizację modulatorów i proteasomu, który obecny jest głównie w cytozolu. Aby to potwierdzić konieczne są jednak dalsze eksperymenty. Barwienie Hoechst 33342 wykorzystywane jest do oznaczania żywych komórek, eksperyment ten zatem potwierdza również wynik uzyskany w badaniach cytotoksyczności.

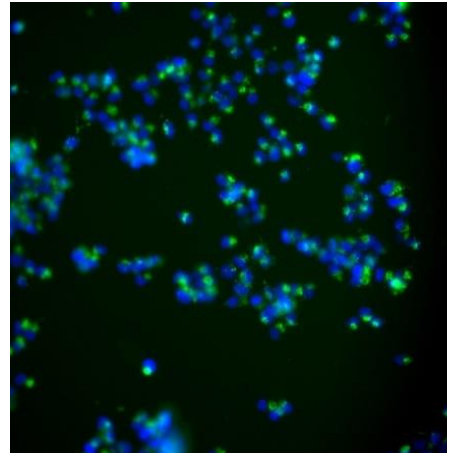
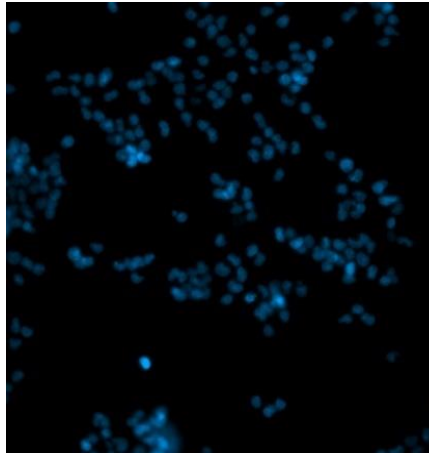
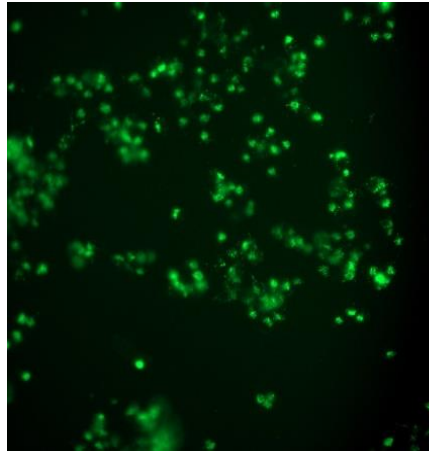
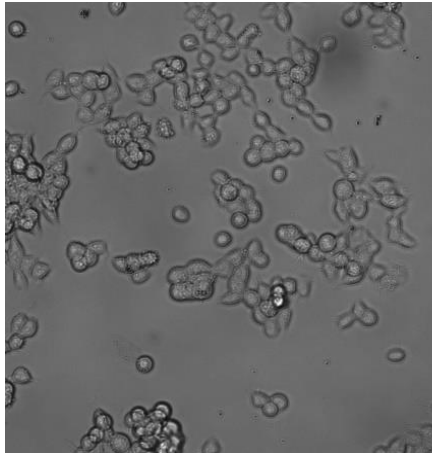




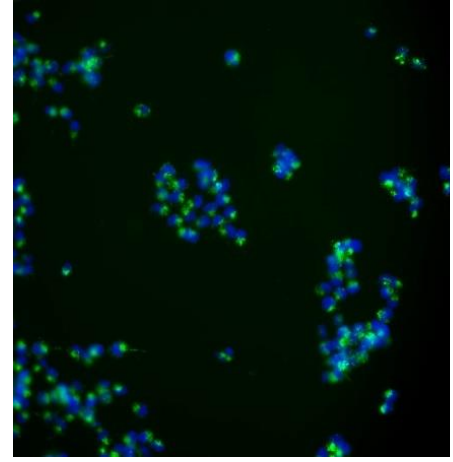
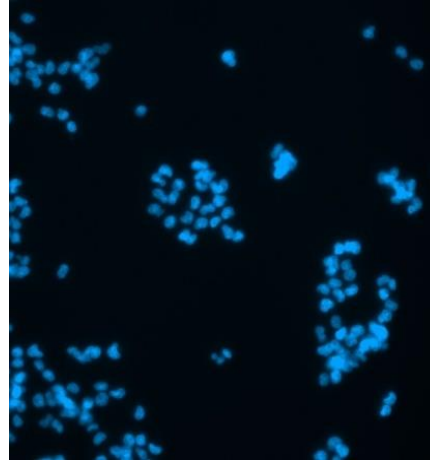
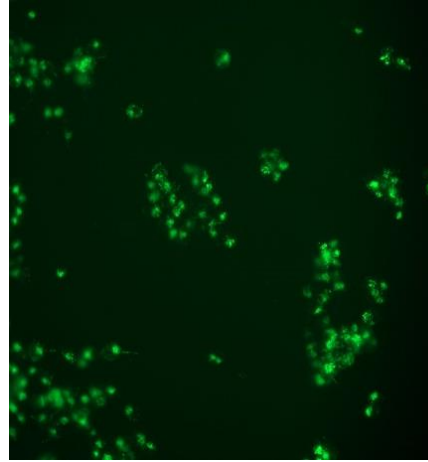
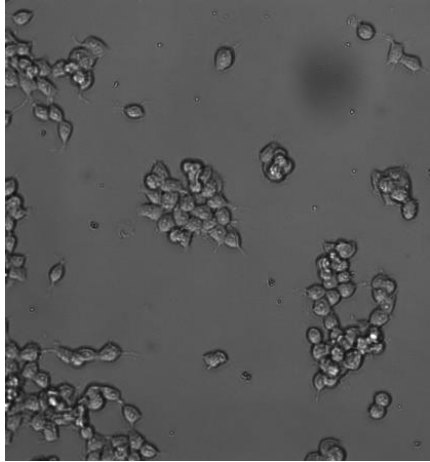
A1-tat



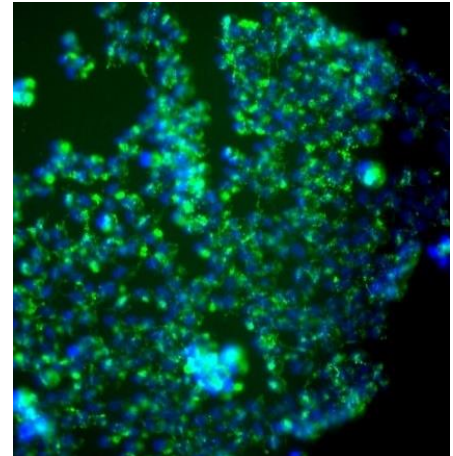
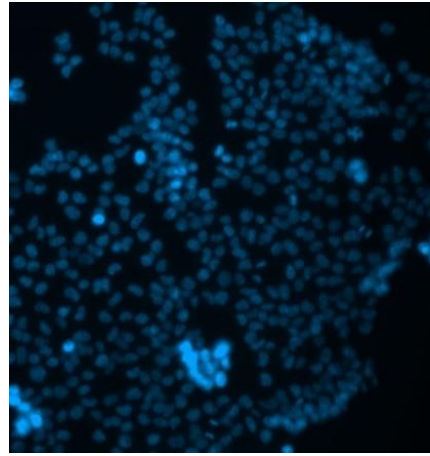
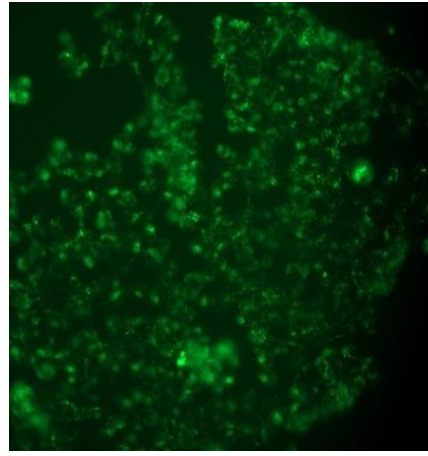
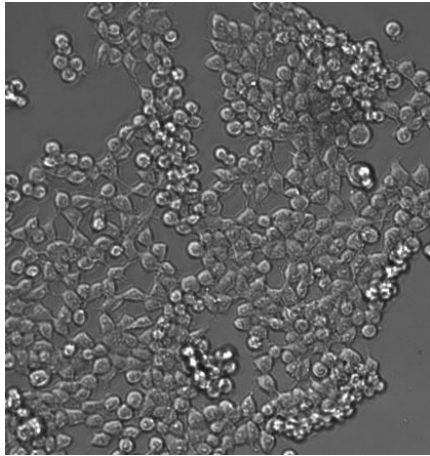
A1-6r



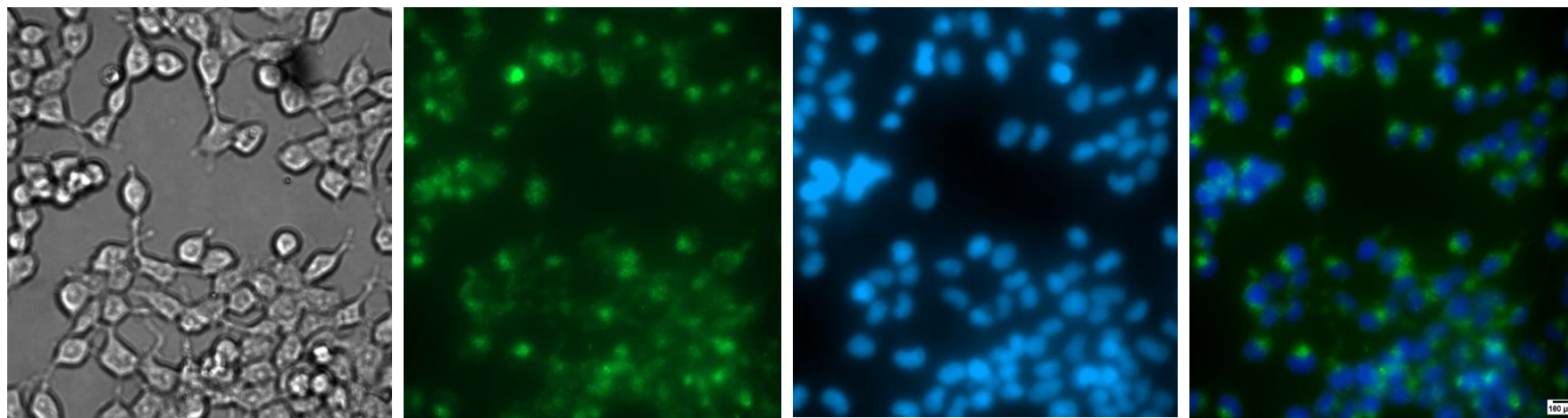
**D1-tat**



**D1-tat(R1)**



**Bis1-tat**

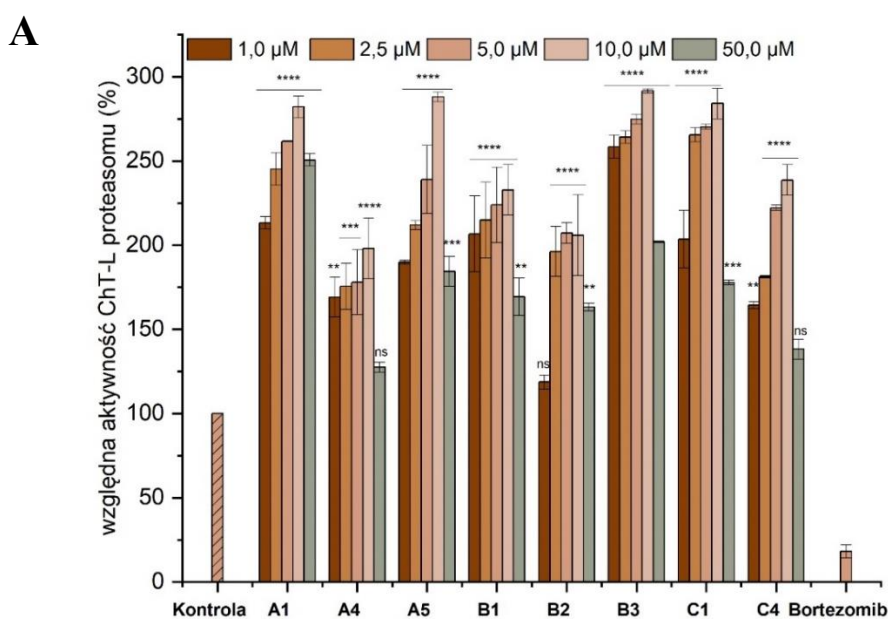


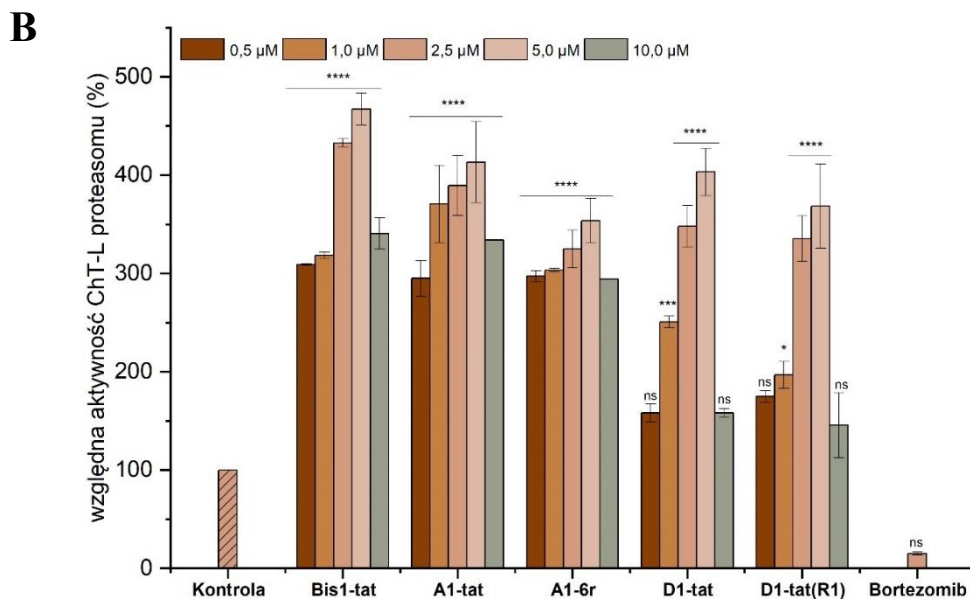
Rysunek 40. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HEK293T inkubowane w ciągu 3 godzin z wyznakowanymi aktywatorami. Na rysunku przedstawiono reprezentatywne zdjęcia, wybrane z trzech niezależnych powtórzeń. Skala wynosi 100  $\mu\text{m}$ .

## 5. Pobudzanie przez peptydomimetyki B1m aktywności proteasomu w lizatach komórkowych oraz wewnątrz komórek HEK293T.

Po dwóch dniach inkubacji komórki HEK293T zostały poddane lizie komórkowej przy użyciu buforu Reporter Lysis Buffer. Następnie przeprowadziłam badanie aktywności z zastosowaniem substratu Suc-LLVY-AMC. Wybrane modulatory B1m były badane w zakresie stężeń 1-25  $\mu\text{M}$ , a w przypadku aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP 0,5-10  $\mu\text{M}$ . Stężenie białek lizatu wynosiło 20  $\mu\text{g/ml}$ , inhibitor bortezomib stosowałam w eksperymencie jako kontrolę negatywną. Z grupy peptydomimetyków B1m zdecydowałam się przebadać związki, które najlepiej stymulowały proteasom 20S oraz związki A4 i B2 ze względu na ich odmienne widmo CD w porównaniu z pozostałymi związkami. W przypadku związków grupy Bis również wybrałam najlepsze aktywatory.

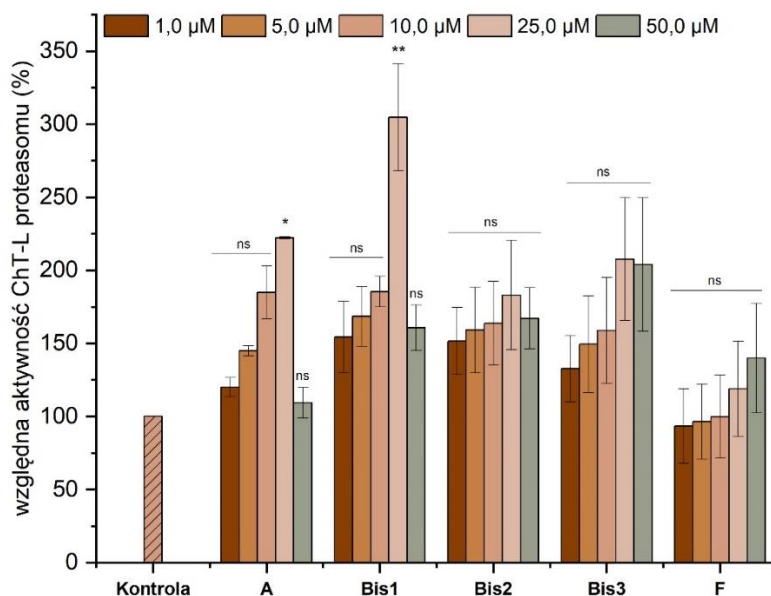
Badanie aktywności proteasomu w lizacie komórkowym w pewnym stopniu powieliło wyniki badań aktywności z izolowanym proteasomem. Najskuteczniejsze aktywatory z grupy peptydomimetyków aktywowały proteasom prawie 3-krotnie (Rysunek 41A). Tak jak w przypadku standardowych badań aktywności związki A4 oraz B2, z modyfikacją w postaci *N*-metylowanych aminokwasów, miały słabszy wpływ na aktywność proteasomu. Modulatory z dołączoną sekwencją CPP w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  aktywowały proteasom około 4-krotnie (Rysunek 41B). Najlepszym aktywatorem z tej grupy okazał się związek Bis1-tat.





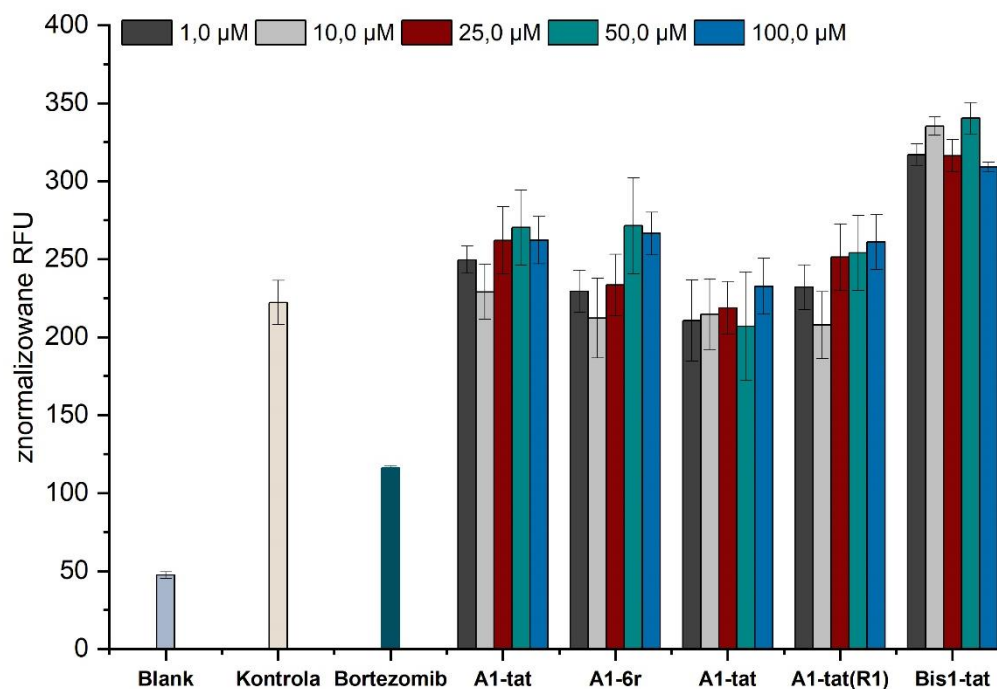
Rysunek 41. Wpływ na aktywność proteasomu w lizacie komórkowym A: peptydomimetycznych aktywatorów Blm, B: aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP. Podczas badań wykorzystalam substrat Suc-LLVY-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=4$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

W grupie aktywatorów typu Bis, aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu najefektywniej stymulował związek Bis1 (Rysunek 42), co również pokrywa się z badaniami na izolowanym proteasomie. Wszystkie modulatory posiadające zduplikowany fragment pochodzący z natywnego związku, są zdolne do lepszej aktywacji niż wyjściowe modulatory.



Rysunek 42. Wpływ na aktywność proteasomu w lizacie komórkowym aktywatorów z grupy Bis. Podczas badań wykorzystałam substrat Suc-LLVY-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=4$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

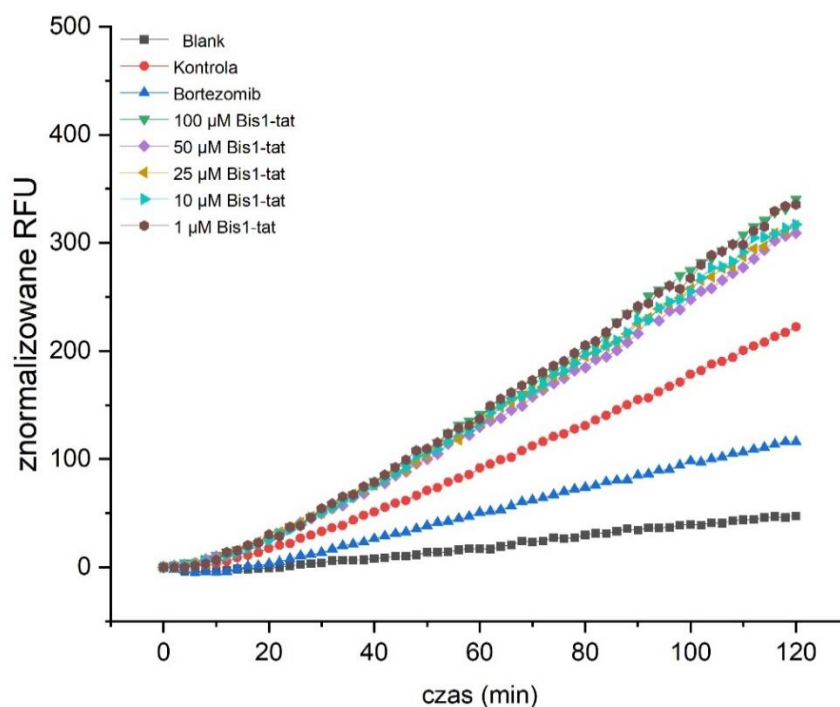
Zbadałam także zdolność aktywatorów do stymulowania proteasomu w komórkach HEK293T. W tym celu zsyntezowałam sondę fluorescencyjną TAS3, zdolną do wnikania do komórek oraz odporną na degradację enzymatyczną. Sekwencję sondy TAS3 można podzielić na trzy części: fragment zdolny do przenikania przez błony komórkowe, fluorofor, którym jest rodamina 110 oraz część substratową z wprowadzonym nienaturalnym aminokwasem, po którym następuje specyficzne cięcie wiązania peptydowego przez proteasom 20S. Komórki HEK293T inkubowałam z aktywatorami z dołączoną sekwencją CPP, w zakresie stężeń 1-100  $\mu\text{M}$  przez 30 minut. Po tym czasie usunęłam pożywkę zawierającą aktywatory i dodałam roztwory aktywatorów w buforze z sondą TAS3. Następnie przeprowadziłam pomiar fluorescencji przy długości fali 485 nm oraz 535 nm. Ostateczne stężenie sondy TAS3 wynosiło 10  $\mu\text{M}$ .



Rysunek 43. Wpływ aktywatorów na aktywność proteasomu w hodowli komórkowej HEK293T. Badania zostały wykonane przy użyciu sondy fluorescencyjnej TAS3. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM. Liczba powtórzeń  $n=6$ .

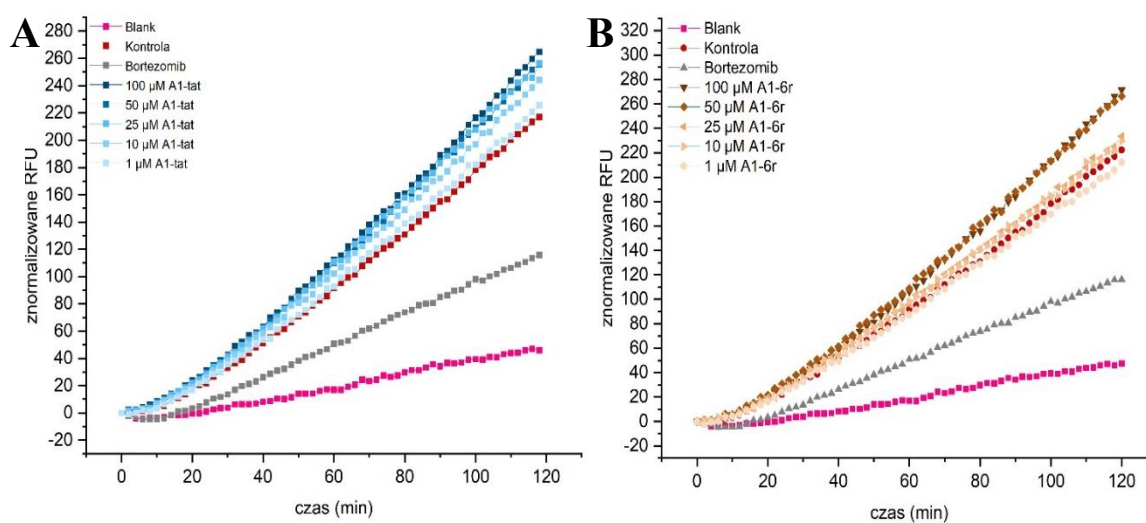
Kontrolę stanowiła próbka komórek z sondą TAS3, natomiast ślepą próbę (Blank) stanowiła tylko sonda fluorescencyjna. Po dodaniu Bortezomibu, który jest zdolnym do przenikania do komórek inhibitorem proteasomu, można było zaobserwować osłabienie sygnału fluorescencyjnego w porównaniu do kontroli (Rysunek 43), co było zgodne z oczekiwaniami i potwierdzało, że sonda TAS3 pozwala na ocenę aktywności proteasomu w komórkach. Po wykreśleniu średniej wartości fluorescencji w czasie i przeprowadzaniu regresji liniowej z wyników uzyskanych dla komórek inkubowanych z Bis1-tat, zaobserwowałam przyrost liniowy oraz zwiększenie wartości w punkcie końcowym krzywej o 100% w porównaniu do krzywej kontroli (Rysunek 44).





Rysunek 44. Przyrost fluorescencji pochodzącej od degradacji substratu TAS3 w komórkach w obecności aktywatora Bis1-tat.

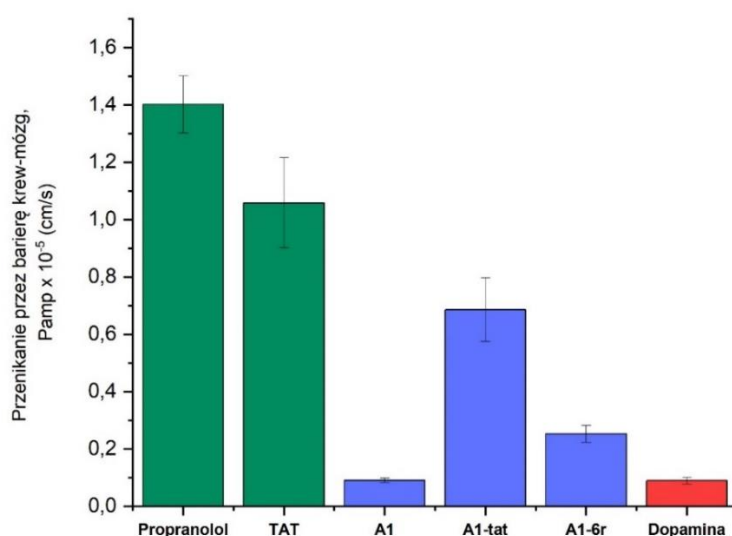
Aktywator A1-tat oraz A1-6r także spowodowały wzrost szybkości rozszczepienia sondy przez proteasom w porównaniu z próbami kontrolnymi (Rysunek 45). Jednak obserwowany przyrost intensywności fluorescencji nie był tak duży, jak w przypadku Bis1-tat. Na podstawie tego eksperymentu zostały wytypowane związki, które zostały wykorzystane w późniejszych badaniach w hodowlach komórek hipokampalnych.



Rysunek 45. Przyrost fluorescencji pochodzącej od degradacji substratu TAS3 w komórkach w obecności aktywatora A: A1-tat, B: A1-6r.

## 6. Zdolność aktywatorów do pokonywania bariery krew-mózg.

Test PAMPA (ang. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), pozwala na symulowanie w warunkach *in vitro* procesów związanych z transportem substancji przez błony biologiczne, w tym z przekraczaniem bariery krew-mózg. Analiza jest oparta na dyfuzji badanego związku przez membranę PVDF pokrytą roztworem odpowiedniej substancji lipidowej. Podczas przeprowadzania takiego eksperymentu korzysta się z dwóch płytek (donorowej i akceptorowej), które oddzielone są sztuczną membraną. Z substancji opisanych w literaturze jako zdolne do przenikania przez błony komórkowe wybrałam propranolol oraz peptyd tat<sup>47-57</sup> jako kontrolę pozytywną, dopaminę wykorzystywałam w eksperymencie jako kontrolę negatywną. Pomiar absorbancji możliwy był tylko dla związku, którego maksimum absorpcji leży poza zakresem absorpcji DMSO (dla propranololu – 290 nm), dla reszty związków, po dodaniu 0,02% roztworu fluorescaminy przeprowadziłam pomiar intensywności fluorescencji w zakresie 388-462 nm. Dla propranololu wykonałam pomiar przy długości fali 290 nm. Na podstawie otrzymanych wartości obliczyłam efektywną przepuszczalność związków, która określa szybkość przenikania. W przeprowadzonym eksperymencie analizowałam związki A1 oraz jego analogi z dołączoną sekwencją tat i 6r. Aktywator A1-tat oraz A1-6r wykazują większą zdolność do przenikania przez sztuczną membranę niż macierzysty analog bez sekwencji CPP oraz dopamina (Rysunek 46), co wskazuje na zdolność tych związków do pokonywania bariery krew-mózg.

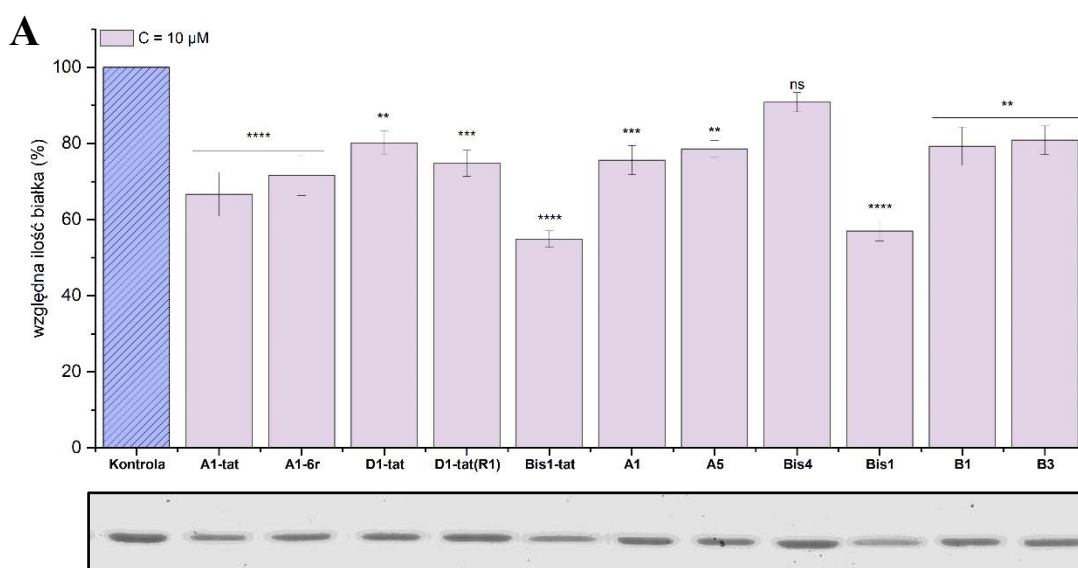


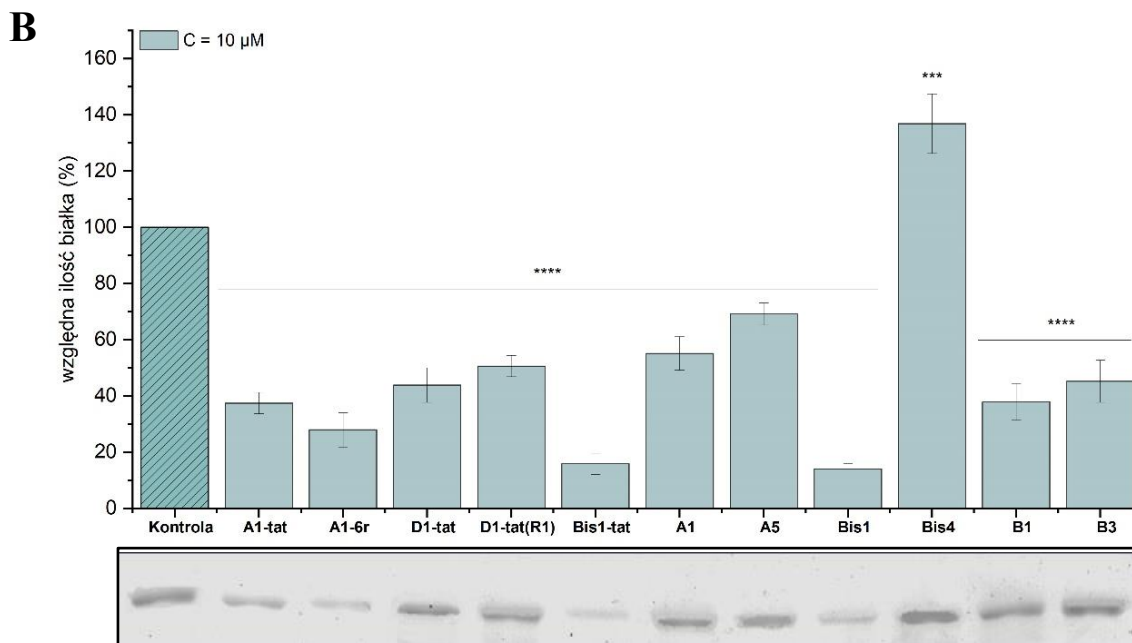
Rysunek 46. Przenikalność przez barierę krew-mózg określona za pomocą testu PAMPA. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM. Liczba powtórzeń n=3.

## 7. Stymulacja proteasomu 20S przez otrzymane peptydomimetyki Blm do wydajniejszego trawienia substratów białkowych.

Zweryfikowałam czy otrzymane aktywatory są w stanie stymulować degradację natywnych białek. W tym celu wykorzystałam dwa modelowe białka:  $\alpha$ -synukleinę związaną z chorobą Parkinsona oraz białko tau związane z chorobą Alzheimerera. Są to białka o nieuporządkowanej strukturze. Białka inkubowałam z proteasomem 20S bez dodatku związków (próba kontrolna) oraz w ich obecności, w stężeniu 10  $\mu$ M. Za pomocą elektroforezy SDS-PAGE oszacowałam ilość strawionego białka. Do eksperymentu wybrałam modulatory z dołączoną sekwencją CPP, z puli Bis najlepszy aktywator Bis1 oraz najslabszy Bis4, z grupy peptydomimetyków Blm do testów wybrałam związki o najlepszych właściwościach aktywacyjnych.

W zastosowanych warunkach eksperymentalnych dla większości modulatorów około 30%  $\alpha$ -synukleiny oraz 70% białka tau uległo degradacji przez proteasom (Rysunek 47). Dla obu białek do najbardziej efektywnych stymulatorów degradacji należały związki Bis1 i jego analog Bis1-tat oraz A1-tat i A1-6r. Natomiast Bis4 nie przyspieszał degradacji żadnego z badanych białek, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w testach aktywności z użyciem standardowych substratów fluorogenicznych. W przypadku białka tau skutecznymi aktywatorami okazał się również związek B1 oraz B3. Można również zaobserwować iż modulatory efektywniej wpływały na degradację białka tau niż  $\alpha$ -synukleiny.





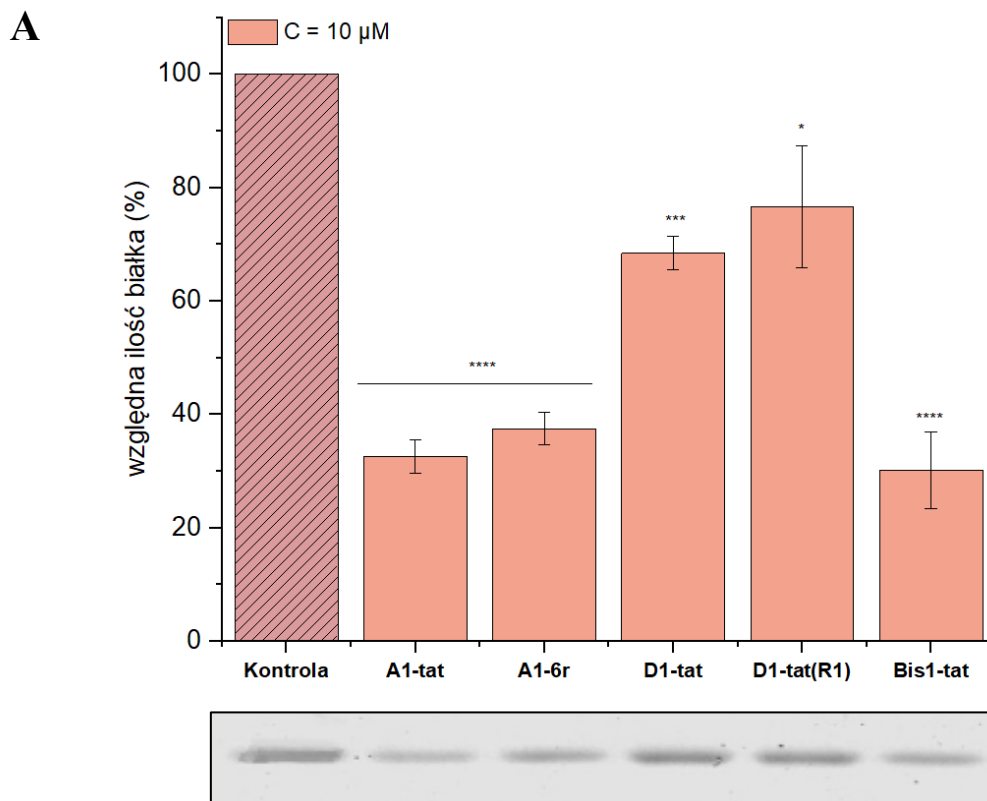
Rysunek 47. Wpływ aktywatorów na degradację A:  $\alpha$ -synukleiny, B: złożonego z 441 reszt aminokwasowych fragmentu białka Tau. Wykresy przedstawiają względną ilość substratu białkowego pozostałego po zakończeniu inkubacji z proteasomem 20S, bez obecności aktywatorów (próba kontrolna) oraz w ich obecności w stężeniu 10  $\mu$ M. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=3$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej. Poniżej wykresów dołączono przykładowe elektroforegramy.

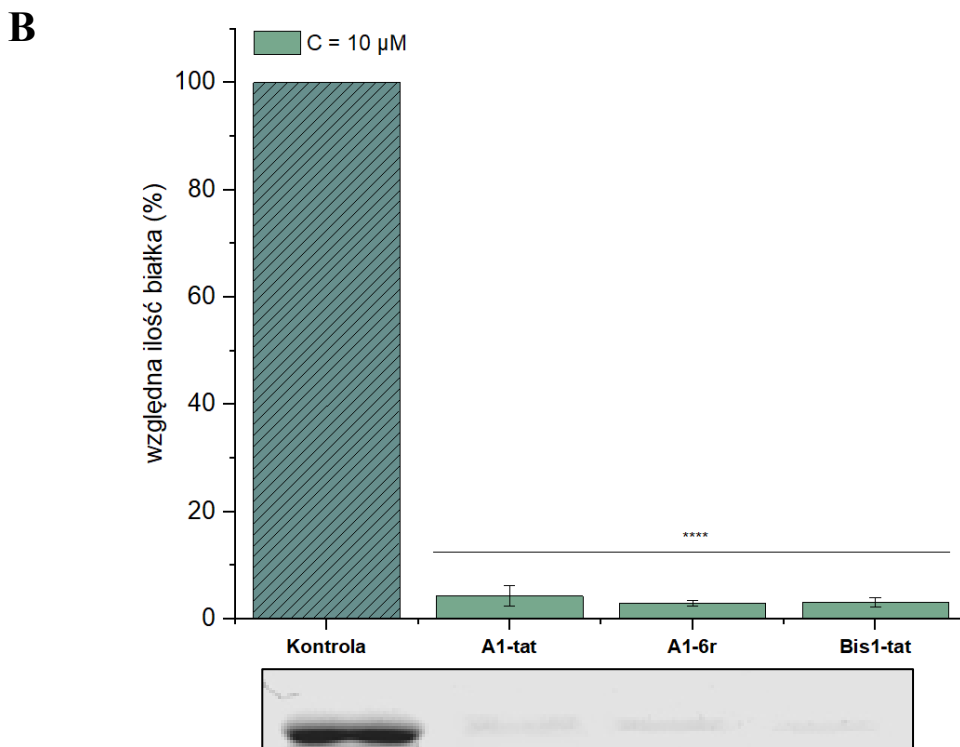
Różnice wpływu poszczególnych aktywatorów na trawienie białek przez proteasom wynikają z ich różnych struktur. Pomimo iż wszystkie posiadają ten sam C-końcowy fragment HbYX, mogą się wiązać między różnymi podjednostkami bądź w dwóch sąsiadujących kieszeniach jednocześnie (w przypadku aktywatorów typu Bis).

Aktywatory mogą wiązać się też do tej samej kieszeni, jednak ich zróżnicowane fragmenty N-końcowe mogą oddziaływać w inny sposób z enzymem. Jedyną różnicą w sekwencji A1 oraz B1 jest podstawienie seryny w pozycji 11 argininą. Ta jedyna różnica sprawia, iż związek B1 jest w stanie nieco wydajniej stymulować degradację białka tau. Substraty białkowe mogą allosterycznie wywoływać otwieranie się kanału katalitycznego proteasomu przez oddziaływanie hydrofobowych fragmentów nieustrukturyzowanych białek z powierzchnią pierścieni  $\alpha$ , zatem procesy wiązania aktywatora oraz białka mogą być względem siebie konkurencyjne.

SDS, który był zawarty w buforze używanym w eksperymentach trawienia białek, ułatwia otwarcie bramy wejściowej proteasomu poprzez rozluźnienie jego konformacji, co może wprowadzać pewien dodatkowy efekt w obserwowanych wynikach. Z tego

względu postanowiłam przeprowadzić analogiczne eksperymenty bez dodatku SDS. Do testów wybrałam związki z dołączoną sekwencją CPP, które dały najbardziej obiecujące wyniki. Obecność SDS nie wykazała znaczącego wpływu na zdolność stymulacyjną związków D1-tat oraz D1-tat(R1) w przypadku degradacji  $\alpha$ -synukleiny przez proteasom (Rysunek 48A). Działanie modulatorów A1-tat, A1-6r oraz Bis1-tat było z kolei bardziej skuteczne pod nieobecność SDS. W ich przypadku proteasom trawił  $\alpha$ -synukleinę 40 punktów procentowych bardziej intensywnie w eksperymencie bez dodatku SDS niż podczas inkubacji w obecności detergentu. W przypadku białka tau ta różnica jest jeszcze bardziej zauważalna (Rysunek 48B). Związek A1-tat, który w eksperymencie z SDS spowodował degradację białka na poziomie około 70%, podczas badań bez dodatku SDS przyczynił się do wydajniejszej degradacji – po zakończeniu inkubacji pozostało około 4% białka (~96% uległo hydrolizie). Pozostałe związki również bardzo efektywnie stymulowały proteasom do wydajniejszej degradacji białka tau. Jednym z możliwych wyjaśnień jest to, że cząsteczka SDS prowadzi do zbyt rozluźnionej konformacji proteasomu, co powoduje zwiększoną degradację aktywatora przez h20S, konkurując z trawieniem białkowego substratu. Być może też bez obecności SDS aktywatory mogą wiązać się lepiej do mniej dynamicznej konformacji proteasomu, przez co widoczny jest ich większy wpływ na degradację substratów białkowych.





Rysunek 48. Wpływ aktywatorów bez dodatku SDS na degradację A:  $\alpha$ -synukleiny, B: białka Tau-441. Wykresy przedstawiają względną ilość substratu białkowego pozostałego po zakończeniu inkubacji z proteasomem 20S, bez obecności aktywatorów (próba kontrolna) oraz w ich obecności w stężeniu 10  $\mu$ M. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń n=3. Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, ns – brak istotności statystycznej. Poniżej wykresów dołączono przykładowe elektroforegramy.

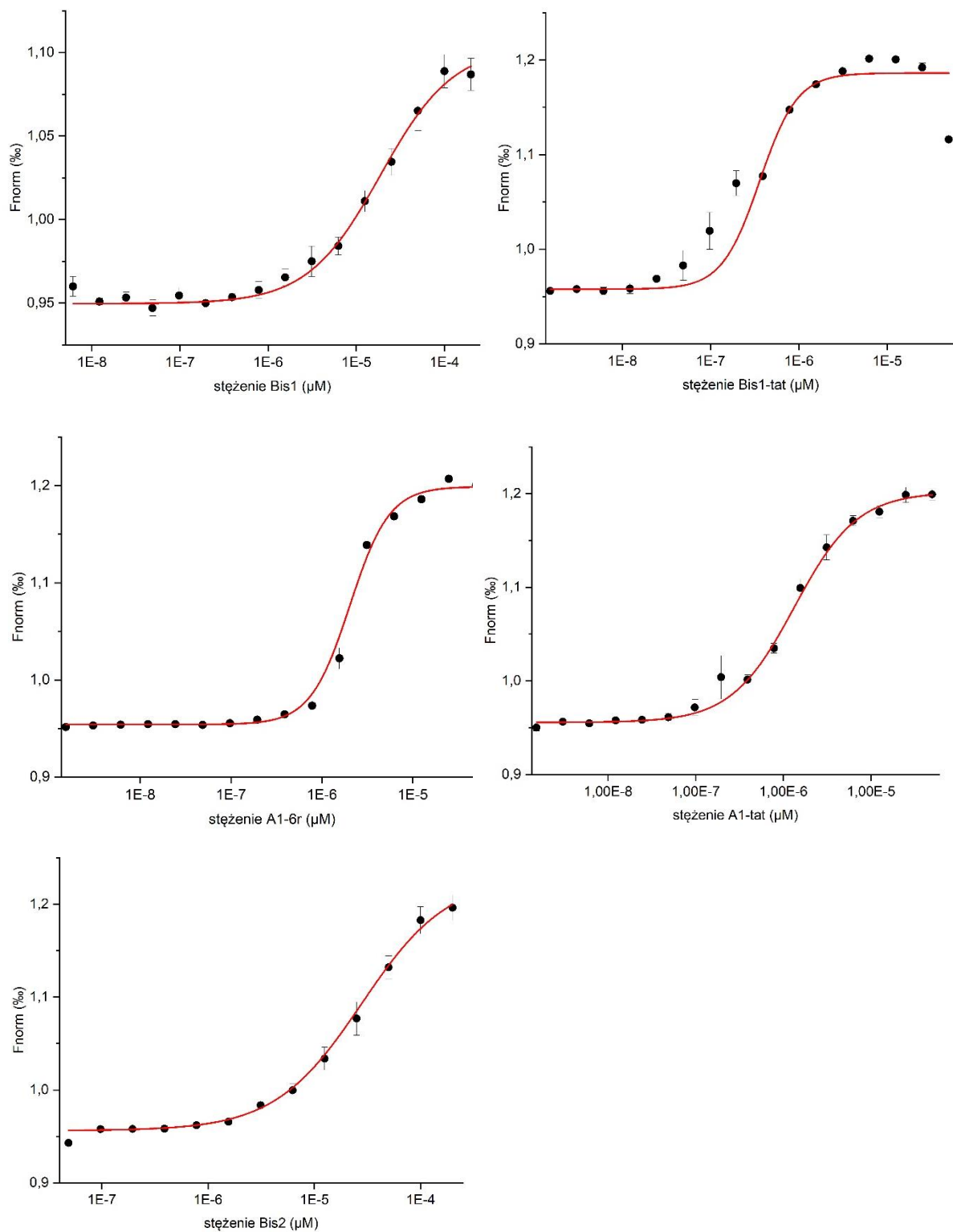
## 8. Termoforeza mikroskalowa (MST) – badanie oddziaływania aktywatorów z proteasomem 20S.

Kolejny eksperyment, który wykonałam miał na celu potwierdzenie zdolności aktywatorów do tworzenia kompleksu z proteasomem. Wykorzystałam w nim technikę termoforezy mikroskalowej. Głównym zadaniem MST jest badanie oddziaływań między dwiema molekułami oraz wyznaczenie stałej ich oddziaływania. Wyzaczyłam stałą EC50 wybranych aktywatorów z proteasomem. Pomiary wykonałam dla A1-tat, A1-6r, Bis1, Bis2 oraz Bis1-tat w obecności proteasomu wyznakowanego barwnikiem NT-647. Przebieg termoforetyczny oznaczonego fluorescencyjnie proteasomu rejestrowałam przy różnych stężeniach aktywatorów. Uzyskane dane (Rysunek 49) wykorzystałam do obliczenia powinowactwa. Przedstawione w tabeli wyniki (Tabela 12) potwierdzają, iż aktywatory oddziałują z proteasomem 20S. Najsilniej wiąże się związek Bis1-tat, który

posiada stałą EC50  $3,59 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 5,30 \times 10^{-8}$ . Związki posiadające dołączoną sekwencję CPP, zawierającą wiele reszt zasadowych, silniej oddziałują z proteasomem, co można zaobserwować na podstawie różnicy stałej EC50 dla związku Bis1 oraz Bis1-tat. Analizując wynik tego doświadczenia oraz wyniki aktywności dla aktywatorów przenikających przez błony można potwierdzić, że *N*-koniec sekwencji aktywatora również jest istotny w oddziaływaniu z proteasomem, przyczyniając się do polepszenia zdolności do aktywacji enzymu.

Tabela 12. Stała EC50 wyznaczona dla wybranych aktywatorów.

Nazwa:	EC50 [M]
A1-tat	$1,33 \times 10^{-6} \pm 9,31 \times 10^{-8}$
A1-6r	$2,03 \times 10^{-6} \pm 1,43 \times 10^{-7}$
Bis1	$1,80 \times 10^{-5} \pm 4,22 \times 10^{-6}$
Bis1-tat	$3,59 \times 10^{-7} \pm 5,30 \times 10^{-8}$
Bis2	$2,79 \times 10^{-5} \pm 8,58 \times 10^{-8}$

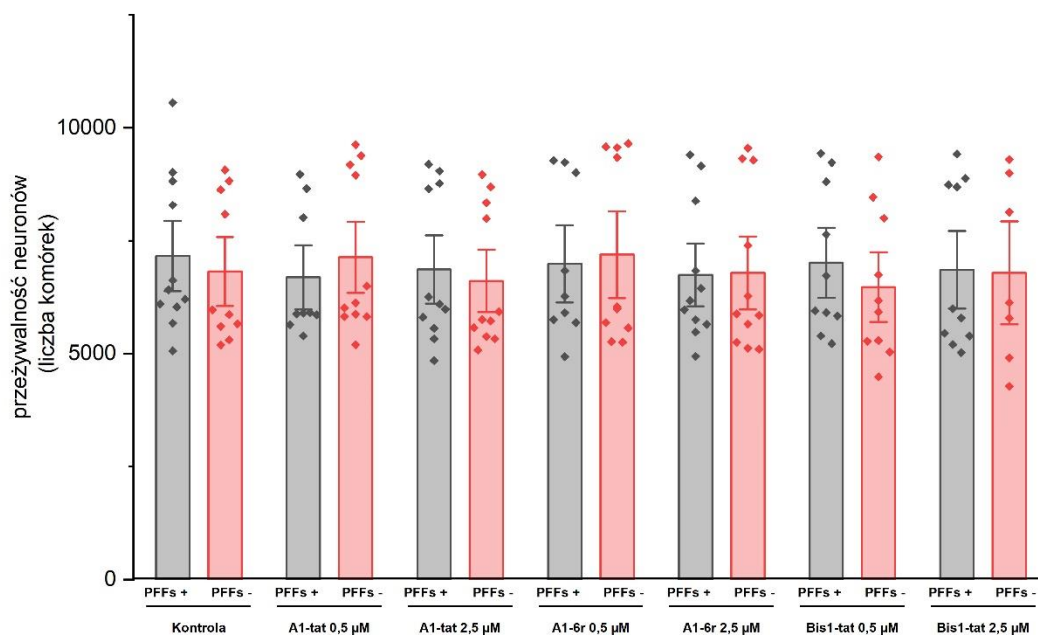


Rysunek 49. Wiązanie się aktywatorów ze znakowanym fluorescencyjnie proteasomem, określone za pomocą techniki MST. Liczba powtórzeń  $n=3$ .



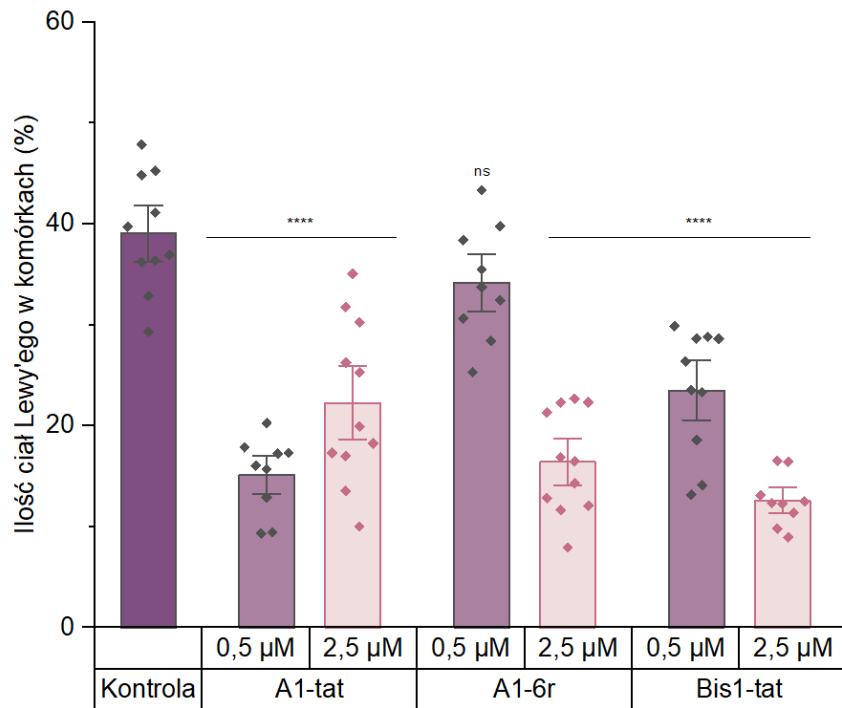
## **9. Degradacja $\alpha$ -synukleiny w mysim modelu komórkowym choroby Parkinsona.**

W kolejnym eksperymencie sprawdziłam zdolność wybranych aktywatorów do zwiększenia degradacji  $\alpha$ -synukleiny w modelu komórkowym wykorzystującym pierwotne mysie komórki neuronalne. Doświadczenia przeprowadziłam podczas realizacji stażu w Zakładzie Farmakologii i Farmakoterapii na Uniwersytecie w Helsinkach. Obecność neurytów oraz ciał Lewy'ego zawierających zagregowaną  $\alpha$ -synukleinę z fosforylowaną seryną 129 jest cechą charakterystyczną dla mózgow osób z chorobą Parkinsona. Aby uzyskać takie warunki wprowadzałam do komórek neuronalnych roztwór pre-formowanych fibryli (PFFs), co prowadziło do indukowania fosforylacji  $\alpha$ -synukleiny oraz jej agregacji w neuronach izolowanych z mysich embrionów. PFFs to oczyszczona, prionopodobna, sfałdowana  $\alpha$ -synukleina, która powstaje przez ekspresję rekombinowanego monomerycznego białka w bakteriach. 7 dni po wprowadzaniu PFFs do komórek widoczne są duże agregaty w somie komórkowej, często obok jądra komórkowego. W celu uzyskania wyników po 7 dniach inkubacji komórek hipokampalnych dodałam roztwór PFF, po godzinie inkubacji wprowadziłam roztwory aktywatorów: A1-tat, A1-6r, Bis1-tat. Po kolejnych 7 dniach dokonałam immunobarwienia komórek neuronalnych, korzystając z przeciwciała monoklonalnego przeciwko białku NeuN, które jest zlokalizowane w jądrach komórkowych oraz cytoplazmie okołojądrowej neuronów. Te przeciwciała są wykorzystywane w badaniach różnicowania neuronów w celu oceny ich stanu funkcjonalnego. Dodatkowo jądra wszystkich inkubowanych komórek wybarwiłam za pomocą DAPI. Jak widać na rysunku 49, testowane aktywatory nie wykazują cytotoksyczności dla komórek hipokampalnych. Warta zauważenia jest minimalnie wyższa liczba komórek w próbkach z niektórymi aktywatorami, co może wskazywać na właściwości neuroprotektoryjne. Taka zdolność może okazać się kluczową w kwestii niwelowania niemotorycznych objawów choroby Parkinsona.

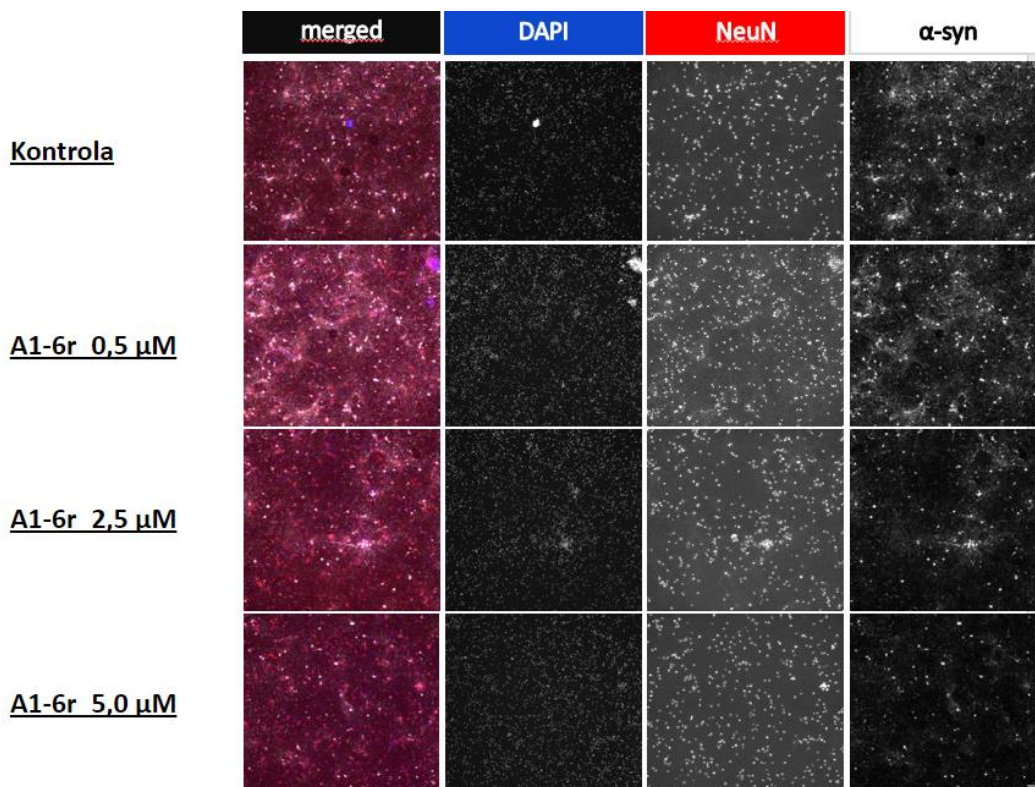


Rysunek 50. Wpływ aktywatorów na przeżywalność komórek hipokampalnych po 7 dniach inkubacji. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SD. Liczba powtórzeń biologicznych wynosiła 3, natomiast liczba powtórzeń technicznych 9-11.

Badane aktywatory skutecznie redukują ilość agregatów  $\alpha$ -synukleiny w komórkach hipokampalnych (Rysunek 50). Widoczna jest zależność zdolności do degradacji od stężenia testowanego związku. A1-tat oraz Bis1-tat już w bardzo niskim stężeniu zmniejszają o 50% ilość powstałych agregatów. Głównym narzędziem do monitorowania tego procesu było przeciwciało przeciwko  $\alpha$ -synukleinie fosforylowanej na reszcie Ser129. Na obrazach wykonanych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Rysunek 51) widoczna jest różnica między ilością zagregowanego białka w próbce kontrolnej oraz w próbkach zawierających aktywatory w różnych stężeniach.



Rysunek 51. Ilość ciał Lewy'ego po 7 dniach inkubacji z aktywatorem bądź bez dodatku modulatorów (kontrola). Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SD. Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej, liczba powtórzeń biologicznych wynosiła 3, natomiast powtórzeń technicznych wykonano 9-11.



Rysunek 52. Porównanie obrazów mikroskopowych komórek hipokampalnych inkubowanych bez aktywatora i w obecności A1-6r w trzech różnych stężeniach. Na rysunku przedstawiono reprezentatywne zdjęcia, wybrane z trzech niezależnych powtórzeń. Skala wynosi 100  $\mu\text{m}$ . Obrazy otrzymane na podstawie immunofluorescencji DAPI (kolor niebieski), NeuN (kolor czerwony), pS129- $\alpha\text{syn}$  (kolor biały).

## V. Podsumowanie.

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD) lub stwardnienie zanikowe boczne (ALS) są niezwykle poważnym i narastającym problemem społecznym. Występowanie tych schorzeń jest silnie powiązane z wiekiem i charakteryzuje się postępującą neurodegeneracją oraz demencją. Ich cechą charakterystyczną jest odkładanie się uszkodzonych białek, które w zdrowych komórkach są usuwane przez systemy proteolityczne; jednym z nich jest proteasom 20S. Ten ogromny kompleks enzymatyczny usuwa z komórek zmutowane, nieprawidłowo sfałdowane i utlenione białka. Niestety, wraz z wiekiem jego efektywność słabnie. Aktywacja proteasomu, czy to na poziomie ekspresji genów, czy przy użyciu naturalnych lub syntetycznych związków, może stanowić obiecującą strategię terapeutyczną, zapewniającą opóźnienie wystąpienia związanych z wiekiem chorób neurodegeneracyjnych. Jednak mechanizm aktywacji proteasomu 20S przez związki małocząsteczkowe nie jest dokładnie wyjaśniony, co utrudnia projektowanie potencjalnych terapeutyków. Struktur wiodących do ich projektowania można poszukiwać opierając się na kompleksach proteasomu z jego naturalnymi, białkowymi aktywatorami. Liczne badania wykazują, że krótkie peptydy wywodzące się z regulatorów 19S i PA200, zawierające ich C-końcowy motyw HbYX (reszta hydrofobowa - tyrozyna - dowolna reszta aminokwasowa) są w stanie stymulować proteasom 20S. Podczas badań prowadzonych przez grupę badawczą, w której realizowałam pracę doktorską, odkryto nową grupę bardzo skutecznych aktywatorów proteasomu, których sekwencje wywodzą się z C-końcowego fragmentu innego naturalnego regulatora proteasomu, białka Blm10 (drożdżowego ortologu białka PA200). Zdolność tych peptydów do stymulowania proteasomu 20S została udowodniona zarówno w testach aktywności ze standardowymi substratami fluorogennymi, jak i z modelowymi białkami ( $\alpha$ -synukleina, Tau441). Okazało się jednak, że w obecnej postaci analogi Blm nie są w stanie wnikać do komórek, a także charakteryzują się niską stabilnością proteolityczną. Poprawa tych dwóch parametrów jest niezbędna do zaproponowania nowej struktury wiodącej, mogącej pomóc zaprojektować skuteczne

stymulatory proteasomu, które ograniczałyby gromadzenie się nieprawidłowych białek w komórkach.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie stymulatorów proteasomu, zdolnych do przenikania przez błony komórkowe i stabilnych w warunkach proteolitycznych. Zsyntezowałam 26 nowych potencjalnych modulatorów aktywności proteasomu 20S, które zaprojektowałam na podstawie sekwencji aktywatorów z puli Blm. Związki te w swojej strukturze posiadały C-końcowy motyw HbYX. Syntezę peptydomimetyków oraz peptydów przeprowadziłam zgodnie z metodologią Fmoc, na nośniku stałym, korzystając z automatycznego syntezyzatora mikrofalowego. Wszystkie modyfikacje do sekwencji aktywatorów wprowadzałam w sposób manualny. Otrzymane modulatory przebadalam pod kątem zdolności do stymulowania aktywności proteasomu 20S wyizolowanego z erytrocytów, za pomocą standardowych substratów fluorogenicznych, specyficznych dla wybranych peptydaz (ChT-L, T-L, C-L) oraz zsyntezowanego substratu bazującego na zjawisku FRET, Dabcyl-EDANS, który ze względu na swoją budowę jest bardziej wiarygodnym narzędziem do oceniania skuteczności działania modulatorów.

Związki, które otrzymałam mogę podzielić na trzy grupy:

- grupa 1 – peptydomimetyczne analogi Blm-pep, do których wprowadziłam modyfikacje w postaci wiązania peptoidowego lub *N*-metylowanych aminokwasów; związki te zaprojektowałam w celu otrzymania stabilnych w warunkach proteolitycznych aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S.
- grupa 2 – związki bisBlm, które posiadają zduplikowany fragment C-końcowy połączony łącznikiem o odpowiedniej długości; związki te zaprojektowałam na podstawie struktury krystalicznej jednego z aktywatorów Blm, w celu uzyskania jednoczesnego wiązania się modulatora w dwóch sąsiadujących kieszeni pomiędzy podjednostkami  $\alpha$ .
- grupa 3 – analogi Blm z dołączoną sekwencją CPP; do wybranych aktywatorów z obu grup, charakteryzujących się najlepszymi właściwościami aktywującymi oraz stabilnością w ludzkim osoczu dołączyłam sekwencję CPP; związki te zaprojektowałam w celu otrzymania aktywatorów zdolnych do przenikania przez błony komórkowe.

Wprowadzone w grupie 1 modyfikacje przyniosły oczekiwany efekt. Wszystkie związki z tej grupy cechują się większą stabilnością w warunkach proteolitycznych niż związki macierzyste, których procentowa zawartość w próbce w eksperymentalnych warunkach wynosiła <10%. Miejsca degradacji proteolitycznej w sekwencji potwierdziłam za pomocą techniki MS. Zmiany w sekwencji blokują działanie enzymów proteolitycznych, natomiast nie powodują znaczącego obniżenia zdolności do stymulacji proteasomu. Na podstawie przeprowadzonych badań aktywności dla grupy 1 można zaobserwować, iż modyfikacje w rejonie *N*-końca nie mają negatywnego wpływu na aktywność proteasomu, w przeciwieństwie do modyfikacji w rejonie *C*-końca, co potwierdza istotność motywu HbYX w aktywacji proteasomu. Wyniki badań wskazują również na istotność oddziaływań z podjednostkami  $\alpha$  ugrupowań aromatycznych. Przy modyfikowaniu tych ugrupowań widoczne było zmniejszenie działania stymulującego modulatorów w porównaniu z wyjściowymi aktywatorami.

Związki z grupy 2 charakteryzują się lepszymi zdolnościami aktywacyjnymi niż ich macierzyste aktywatory. Najlepszym modulatorem z tej grupy okazał się związek Bis1, który w przeciwieństwie do pozostałych aktywatorów posiadał zachowany rejon *N*-końcowy. Uzyskane rezultaty wskazują na istotność oddziaływań tego fragmentu z w procesie aktywacji proteasomu.

Aktywatory z 3 grupy skutecznie przenikają przez błonę komórkową, co zweryfikowałam za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, przeprowadzając eksperyment z modulatorami wyznakowanymi fluoroforem NBD. Dołączenie fragmentu CPP – tat<sub>49-57</sub> oraz 6r nie spowodowało pogorszenia właściwości stymulacyjnych. Wręcz przeciwnie, otrzymane związki są w stanie aktywować proteasom aż 17-krotnie, znacznie efektywniej niż związek bez sekwencji CPP. Modulatory z sekwencją CPP są również stabilne podczas inkubacji z ludzkim osoczem oraz nie wykazują cytotoksyczności w stosunku do komórek HEK293T.

Wybrane aktywatory są w stanie skutecznie aktywować proteasom w hodowli komórkowej, co sprawdziłam za pomocą testu aktywności w lizacie komórkowym przy użyciu substratu Suc-LLVY-AMC oraz eksperymentu z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej TAS3, którą zsyntezowałam.

Efektywność aktywatorów zweryfikowałam również stosując modelowe substraty białkowe:  $\alpha$ -synukleinę oraz tau-441. Testowane analogi były w stanie stymulować

proteasom do bardzo wydajnej degradacji białek. Uzyskane wyniki są powiązane z zaobserwowaną zdolnością do aktywacji proteasomu 20S. Aktywatory efektywniej wpływają na rozkład białek w warunkach bez dodatku SDS niż w jego obecności. Efekt ten może być związany z wywoływaniem przez detergent preaktywacją h20S, w wyniku czego proteasom może być w stanie trawić modulator, przez co związek słabiej aktywuje enzym.

Na podstawie testu PAMPA oceniłam zdolność wybranych aktywatorów do pokonywania bariery krew-mózg. Jako kontrolę pozytywną zastosowałam peptyd tat oraz propranolol, zaś jako kontrolę negatywną dopaminę. Przenikalność modulatora bez dołączonej sekwencji CPP była na poziomie kontroli negatywnej, natomiast w przypadku aktywatorów z CPP była na znacznie wyższym poziomie. Za pomocą techniki MST udało mi się wyznaczyć stałą oddziaływań aktywatorów z proteasomem, poprzez miareczkowanie wyznakowanego enzymu roztworem aktywatora w rosnącym stężeniu.

Oprócz badań na izolowanym proteasomie, podczas realizacji stażu zagranicznego na Uniwersytecie w Helsinkach przeprowadziłam dla kilku związków badania z wykorzystaniem mysiego embrionalnego modelu komórkowego. Eksperymenty miały na celu oznaczenie zdolności aktywatorów do degradacji  $\alpha$ -synukleiny w neuronalnych komórkach myszy. Związek A1-tat, A1-6r oraz Bis1-tat skutecznie stymulowały proteasom do skutecznego degradowania agregatów  $\alpha$ -synukleiny powstałych przez wprowadzenie PFFs do komórek oraz nie wpływały negatywnie na przeżywalność wyizolowanych komórek neuronalnych. W tych testach korzystałam z przeciwciał pierwszorzędowych oraz fluorescencyjnych drugorzędowych przeciwko pSer129- $\alpha$ syn, która jest charakterystyczna dla osób z chorobą Parkinsona oraz przeciwko neuronom, co pomogło mi oznaczyć wpływ związków na przeżywalność komórek hipokampalnych.

## VI. Dorobek naukowy

### Publikacje naukowe

- Katarzyna Cekała, Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Przemysław Karpowicz, Artur Giełdoń, Julia Witkowska, Małgorzata Giżyńska, Elżbieta Jankowska, Ewa Wieczerek, Peptidomimetics Based on C-Terminus of Blm10 Stimulate Human 20S Proteasome Activity and Promote Degradation of Proteins, *Biomolecules*, vol. 12, nr 6, s.1-13 (2022).
- Katarzyna Cekała, Karolina Trepczyk, Julia Witkowska, Elżbieta Jankowska, Ewa Wieczerek, Rpt5-derived analogs stimulate human proteasome activity in cells and degrade proteins forming toxic aggregates in age-related diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, nr 9, s. 1-13 (2024).

### Poster na konferencjach krajowych i zagranicznych

- Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Can proteasome stimulation counteract the toxic effects of protein oligomers?, Cystatins 2022, 16-18.06.2022, Gdańsk
- Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Karolina Trepczyk, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Can proteasome stimulation counteract the toxic effects of protein oligomers?, Cystatins 2022, 16-18.06.2022, Gdańsk
- Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Wpływ modulatorów na proteasom inhibowany przez toksyczne oligomery białkowe, Chemia-Biznes-Środowisko „ChemBiŚ”, 24-25.06.2022, Gdańsk
- Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Karolina Trepczyk, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Zdolność proteasomu do degradacji małych oligomerów ludzkiej amyliny, Chemia-Biznes-Środowisko „ChemBiŚ”, 24-25.06.2022, Gdańsk
- Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Peptidomimetics based on a fragment of Blm10 protein as allosteric modulators of proteasome activity, IUBMB FEBS PABMB 2022, 9-14.07.2022, Lizbona



- Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Karolina Trepczyk, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Characterization of the oligomeric forms of human amylin, IUBMB FEBS PABMB 2022, 9-14.07.2022, Lizbona
- Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, The effect of modulator sequence modifications on the ability to activate proteasome 20S and stability in human plasma, European Peptide Synthesis Conference 2023, 28.02-02.03.2023, Leeds
- Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Karolina Trepczyk, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Stabilization of oligomeric forms of amylin, European Peptide Synthesis Conference 2023, 28.02-02.03.2023, Leeds
- Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Peptidomimetic activators of the 20S proteasome, capable of penetrating cell membranes and crossing the blood-brain barrier, BioClina 2023, International Conference on Biological and Clinical Studies, 15-16.09.2023, Rzym
- Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Karolina Trepczyk, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Stimulation of the proteolytic activity of the 20S proteasome in type II diabetes,, BioClina 2023, International Conference on Biological and Clinical Studies, 15-16.09.2023, Rzym

#### **Komunikaty ustne na konferencjach krajowych**

- Karolina Trepczyk, Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Aktywatory ludzkiego proteasomu 20S w walce z chorobami neurodegeneracyjnymi, V Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemicznym, 25-26.03.2023
- Daria Sowik, Małgorzata Giżyńska, Karolina Trepczyk, Ewa Wieczerek, Elżbieta Jankowska, Amylina - nieznana strona cukrzycy typu II, V Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemicznym, 25-26.03.2023

#### **Komunikaty ustne na konferencjach między narodowych**

- Karolina Trepczyk, Elżbieta Jankowska, Human 20S proteasome activators in the fight against neurodegenerative diseases, Natural Science Baltic Conference, 20-21.04.2024

## Finansowanie projektów naukowych

- Projekt badawczy NCN w ramach konkursu Preludium Bis1 pt. „Projektowanie i synteza stabilnych proteolitycznie i przenikających przez błony komórkowe aktywatorów ludzkiego proteasomu 20S oraz zbadanie ich wpływu na aktywność tego enzymu w modelach komórkowych chorób neurodegeneracyjnych” 2019/35/O/NZ7/00227, Uniwersytet Gdański

Kierownik projektu: dr hab. E. Jankowska, prof. UG

Termin realizacji: 10. 2020 - 09.2024

- Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2021 pt. „ Synteza TAS3 – sondy fluorescencyjnej do badań aktywności proteasomu 20S w komórkach” BMN 539-T070-B928-21

Kierownik projektu: Karolina Trepczyk

Termin realizacji: 03. 2021 - 02.2022

- Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2023 pt. „ Zastosowanie testu PAMPA w badaniach in vitro potencjalnych aktywatorów proteasomu 20S” BMN 539-T070-B075-23

Kierownik projektu: Karolina Trepczyk

Termin realizacji: 03. 2022 - 02.2023

- Projekt Badań dla Młodych Naukowców 2024, pt. „Synteza inhibitorów agregacji amyloidu  $\beta$  na podstawie struktury enzymu IDE” BMN 539-T070-B160-24

Kierownik projektu: Karolina Trepczyk

Termin realizacji: 03. 2024 - 02.2025

## VII. Literatura cytowana

- [1] T. Jung and T. Grune, 'Structure of the proteasome', in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 109, Elsevier B.V., 2012, pp. 1–39. doi: 10.1016/B978-0-12-397863-9.00001-8.
- [2] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, and R. Huber, 'Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution', *Science (1979)*, vol. 268, no. 5210, pp. 533–539, 1995, doi: 10.1126/SCIENCE.7725097.
- [3] D. Stock, L. Ditzel, W. Baumeister, R. Huber, and J. Lowe, 'Catalytic Mechanism of the 20S Proteasome of *Thermoplasma acidophilum* Revealed by X-ray Crystallography', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 60, pp. 525–532, Jan. 1995, doi: 10.1101/SQB.1995.060.01.056.
- [4] H. M. Kim, Y. Yu, and Y. Cheng, 'Structure characterization of the 26S proteasome', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1809, no. 2, pp. 67–79, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2010.08.008.
- [5] G. Hu *et al.*, 'Structure of the Mycobacterium tuberculosis proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate', *Mol Microbiol*, vol. 59, no. 5, pp. 1417–1428, Mar. 2006, doi: 10.1111/J.1365-2958.2005.05036.X.
- [6] A. Toste Rêgo and P. C. A. da Fonseca, 'Characterization of Fully Recombinant Human 20S and 20S-PA200 Proteasome Complexes', *Mol Cell*, vol. 76, no. 1, pp. 138-147.e5, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.014.
- [7] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, and R. Huber, 'Molecular Machines for Protein Degradation', *ChemBioChem*, vol. 6, no. 2, pp. 222–256, Feb. 2005, doi: 10.1002/CBIC.200400313.
- [8] G. Loidl, M. Groll, H.-J. Musiol, L. Ditzel, R. Huber, and L. Moroder, 'Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes', Accessed: Jun. 12, 2023. [Online]. Available: <http://biomednet.com/elecref/1074552100600197>
- [9] M. Groll and R. Huber, 'Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1695, no. 1–3, pp. 33–44, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2004.09.025.
- [10] W. Harshbarger, C. Miller, C. Diedrich, J. Sacchettini, 'Crystal Structure of the Human 20S Proteasome in Complex with Carfilzomib', doi: 10.1016/j.str.2014.11.017.
- [11] T. P. Dick *et al.*, 'Contribution of proteasomal  $\beta$ -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 40, pp. 25637–25646, Oct. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.40.25637.
- [12] M. Groll *et al.*, 'Colloquium Paper This paper was presented at the National Academy of Sciences colloquium ' 'Proteolytic Processing and Physiological Regulation', vol. 96, pp. 10976–10983, 1999, Accessed: Jun. 12, 2023. [Online]. Available: [www.pnas.org](http://www.pnas.org).

- [13] T. Tamura *et al.*, ‘The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*’, *Current Biology*, vol. 5, no. 7, pp. 766–774, Jul. 1995, doi: 10.1016/S0960-9822(95)00153-9.
- [14] B. Dahlamnn, L. Kuehn, A. Grziwa, P. Zwickl, and W. Baumeister, ‘Biochemical properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*’, *Eur J Biochem*, vol. 208, no. 3, pp. 789–797, Sep. 1992, doi: 10.1111/J.1432-1033.1992.TB17249.X.
- [15] I. Sahu and M. H. Glickman, ‘Structural Insights into Substrate Recognition and Processing by the 20S Proteasome’, *Biomolecules*, vol. 11, no. 2, pp. 1–15, Feb. 2021, doi: 10.3390/BIOM11020148.
- [16] P. Tsvetkov, N. Reuven, and Y. Shaul, ‘The nanny model for IDPs’, *Nature Chemical Biology* 2009 5:11, vol. 5, no. 11, pp. 778–781, 2009, doi: 10.1038/nchembio.233.
- [17] T. Wenzel and W. Baumeister, ‘Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome’, *Nature Structural Biology* 1995 2:3, vol. 2, no. 3, pp. 199–204, 1995, doi: 10.1038/nsb0395-199.
- [18] R. Touitou, J. Richardson, S. Bose, M. Nakanishi, J. Rivett, and M. J. Allday, ‘A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome’, *EMBO J*, vol. 20, no. 10, pp. 2367–2375, May 2001, doi: 10.1093/EMBOJ/20.10.2367.
- [19] I. Sahu and M. H. Glickman, ‘Structural Insights into Substrate Recognition and Processing by the 20S Proteasome’, *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 148, vol. 11, no. 2, p. 148, Jan. 2021, doi: 10.3390/BIOM11020148.
- [20] A. F. Kisselev, D. Kaganovich, and A. L. Goldberg, ‘Binding of Hydrophobic Peptides to Several Non-catalytic Sites Promotes Peptide Hydrolysis by All Active Sites of 20 S Proteasomes’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 25, pp. 22260–22270, Jun. 2002, doi: 10.1074/jbc.m112360200.
- [21] B. Luan, T. Huynh, J. Li, and R. Zhou, ‘Nanomechanics of Protein Unfolding Outside a Generic Nanopore’, *ACS Nano*, vol. 10, no. 1, pp. 317–323, Jan. 2016, doi: 10.1021/ACSNANO.5B04557.
- [22] M. Gaczynska, K. L. Rock, and A. L. Goldberg, ‘ $\gamma$ -Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes’, *Nature* 1993 365:6443, vol. 365, no. 6443, pp. 264–267, 1993, doi: 10.1038/365264a0.
- [23] J. Driscoll, M. G. Brown, D. Finley, and J. J. Monaco, ‘MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome’, *Nature* 1993 365:6443, vol. 365, no. 6443, pp. 262–264, 1993, doi: 10.1038/365262a0.
- [24] E. M. Huber *et al.*, ‘Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity’, *Cell*, vol. 148, no. 4, pp. 727–738, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.CELL.2011.12.030.

- [25] S. Murata *et al.*, ‘Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes’, *Science (1979)*, vol. 316, no. 5829, pp. 1349–1353, Jun. 2007, doi: 10.1126/SCIENCE.1141915/SUPPL\_FILE/MURATA-SOM.PDF.
- [26] S. Murata, Y. Takahama, and K. Tanaka, ‘Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides’, *Curr Opin Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 192–196, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.COI.2008.03.002.
- [27] T. Nitta *et al.*, ‘Thymoproteasome Shapes Immunocompetent Repertoire of CD8<sup>+</sup> T Cells’, *Immunity*, vol. 32, no. 1, pp. 29–40, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.009.
- [28] H. Uechi, J. Hamazaki, and S. Murata, ‘Characterization of the testis-specific proteasome subunit  $\alpha$ 4s in mammals’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 18, pp. 12365–12374, May 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.558866.
- [29] Z. H. Zhang *et al.*, ‘Proteasome subunit  $\alpha$ 4s is essential for formation of spermatoproteasomes and histone degradation during meiotic DNA repair in spermatocytes’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 296, p. 100130, Jan. 2021, doi: 10.1074/jbc.RA120.016485.
- [30] L. Gomez-H *et al.*, ‘The PSMA8 subunit of the spermatoproteasome is essential for proper meiotic exit and mouse fertility’, *PLoS Genet*, vol. 15, no. 8, p. e1008316, 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1008316.
- [31] Q. Zhang, S. Y. Ji, K. Busayavalasa, J. Shao, and C. Yu, ‘Meiosis I progression in spermatogenesis requires a type of testis-specific 20S core proteasome’, *Nature Communications 2019 10:1*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11346-y.
- [32] A. R. Kusmierczyk, M. J. Kunjappu, M. Funakoshi, and M. Hochstrasser, ‘A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes’, *Nature Structural & Molecular Biology 2008 15:3*, vol. 15, no. 3, pp. 237–244, Feb. 2008, doi: 10.1038/nsmb.1389.
- [33] I. Velichutina, P. L. Connerly, C. S. Arendt, X. Li, and M. Hochstrasser, ‘Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast’, *EMBO J*, vol. 23, no. 3, pp. 500–510, Feb. 2004, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600059.
- [34] A. Padmanabhan, S. A. T. Vuong, and M. Hochstrasser, ‘Assembly of an Evolutionarily Conserved Alternative Proteasome Isoform in Human Cells’, *Cell Rep*, vol. 14, no. 12, pp. 2962–2974, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.068.
- [35] V. Su and A. F. Lau, ‘Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation’, *Cellular and Molecular Life Sciences 2009 66:17*, vol. 66, no. 17, pp. 2819–2833, May 2009, doi: 10.1007/S00018-009-0048-9.
- [36] Y. Watanabe, K. Taguchi, and M. Tanaka, ‘Ubiquitin, Autophagy and Neurodegenerative Diseases’, *Cells*, vol. 9, no. 9. NLM (Medline), Sep. 02, 2020. doi: 10.3390/cells9092022.

- [37] N. Qureshi, S. N. Vogel, C. Van Way, C. J. Papasian, A. A. Qureshi, and D. C. Morison, 'The proteasome: A central regulator of inflammation and macrophage function', *Immunol Res*, vol. 31, no. 3, pp. 243–260, 2005, doi: 10.1385/IR:31:3:243/METRICS.
- [38] M. Tylicka, E. Matuszczak, M. Karpińska, and W. Dębek, 'Znaczenie podwyższenia i obniżenia aktywności proteasomów w patomechanizmie wybranych schorzeń', *Postepy Hig Med Dosw*, vol. 70, pp. 448–458, May 2016, doi: 10.5604/17322693.1201198.
- [39] J. Adams, 'The Proteasome in Cell-Cycle Regulation', *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy*, pp. 77–84, 2004, doi: 10.1007/978-1-59259-794-9\_6.
- [40] N. Rastogi and D. P. Mishra, 'Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors', *Cell Div*, vol. 7, p. 26, Dec. 2012, doi: 10.1186/1747-1028-7-26.
- [41] L. Mata-Cantero, S. Lobato-Gil, F. Aillet, V. Lang, and M. S. Rodriguez, 'The ubiquitin-proteasome system (UPS) as a cancer drug target: Emerging mechanisms and therapeutics', *Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*, pp. 225–264, Jan. 2015, doi: 10.1007/978-94-017-9421-3\_11/TABLES/4.
- [42] T. Yuan *et al.*, 'Inhibition of Ubiquitin-Specific Proteases as a Novel Anticancer Therapeutic Strategy', *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 407019, Sep. 2018, doi: 10.3389/FPHAR.2018.01080/BIBTEX.
- [43] I. Gupta, K. Singh, N. K. Varshney, and S. Khan, 'Delineating crosstalk mechanisms of the ubiquitin proteasome system that regulate apoptosis', *Front Cell Dev Biol*, vol. 6, no. FEB, p. 302939, Feb. 2018, doi: 10.3389/FCELL.2018.00011/BIBTEX.
- [44] K. L. Lorick, J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama, and A. M. Weissman, 'RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 20, pp. 11364–11369, Sep. 1999, doi: 10.1073/PNAS.96.20.11364/ASSET/7B6190EB-D4EA-4F4F-80F7-611577E35500/ASSETS/GRAPHIC/PQ1993156005.JPEG.
- [45] A. Mani and E. P. Gelmann, 'The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer', *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 21, pp. 4776–4789, Sep. 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.05.081.
- [46] M. Scheffner, U. Nuber, and J. M. Huibregtse, 'Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade', *Nature 1995 373:6509*, vol. 373, no. 6509, pp. 81–83, Jan. 1995, doi: 10.1038/373081a0.
- [47] D. M. Wenzel, A. Lissounov, P. S. Brzovic, and R. E. Klevit, 'UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids', *Nature*, vol. 474, no. 7349, pp. 105–108, Jun. 2011, doi: 10.1038/NATURE09966.
- [48] I. Gupta, K. Singh, N. K. Varshney, and S. Khan, 'Delineating Crosstalk Mechanisms of the Ubiquitin Proteasome System That Regulate Apoptosis', *Front Cell Dev Biol*, vol. 6, no. FEB, Feb. 2018, doi: 10.3389/FCELL.2018.00011.

- [49] C. Pohl and I. Dikic, ‘Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy’, *Science*, vol. 366, no. 6467, pp. 818–822, Nov. 2019, doi: 10.1126/SCIENCE.AAX3769.
- [50] J. E. McKeon, D. Sha, L. Li, and L. S. Chin, ‘Parkin-mediated K63-polyubiquitination targets ubiquitin C-terminal hydrolase L1 for degradation by the autophagy-lysosome system’, *Cell Mol Life Sci*, vol. 72, no. 9, pp. 1811–1824, May 2015, doi: 10.1007/S00018-014-1781-2.
- [51] G. A. Collins and A. L. Goldberg, ‘The Logic of the 26S Proteasome’, *Cell*, vol. 169, no. 5, pp. 792–806, May 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.04.023.
- [52] Y. Saeki, ‘Ubiquitin recognition by the proteasome’, *J Biochem*, vol. 161, no. 2, pp. 113–124, Feb. 2017, doi: 10.1093/JB/MVW091.
- [53] A. Ciechanover, ‘Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome’, *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no. 1, pp. 79–86, Jan. 2005, doi: 10.1038/NRM1552.
- [54] I. Bubko, B. M. Gruber, and E. L. Anuszewska, ‘Rola proteasomu w terapii chorób nieuleczalnych’, *Postepy Hig Med Dosw*, vol. 64, Jul. 2010, Accessed: Jun. 13, 2023. [Online]. Available: <https://phmd.pl/ucid/915316>
- [55] N. Qureshi, S. N. Vogel, C. Van Way, C. J. Papasian, A. A. Qureshi, and D. C. Morison, ‘The proteasome: A central regulator of inflammation and macrophage function’, *Immunol Res*, vol. 31, no. 3, pp. 243–260, 2005, doi: 10.1385/IR:31:3:243/METRICS.
- [56] A. Kostur, A. Kulczyńska, and J. Kłoczko, ‘Proteasomy - Nowy cel leczenia przeciwnowotworowego’, *Acta Haematol Pol*, vol. 41, no. 2, pp. 261–269, 2010.
- [57] A. Biran, N. Myers, J. Adler, K. Broennimann, N. Reuven, and Y. Shaul, ‘A 20S proteasome receptor for degradation of intrinsically disordered proteins’, *bioRxiv*, p. 210898, Oct. 2017, doi: 10.1101/210898.
- [58] A. Köhler, P. Cascio, D. S. Leggett, K. M. Woo, A. L. Goldberg, and D. Finley, ‘The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release’, *Mol Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 1143–1152, 2001, doi: 10.1016/S1097-2765(01)00274-X.
- [59] F. A. Ofose, J. Freedman, L. Dewar, Y. Song, and J. W. Fenton, ‘A trypsin-like platelet protease propagates protease-activated receptor-1 cleavage and platelet activation.’, *Biochemical Journal*, vol. 336, no. Pt 2, p. 283, Dec. 1998, doi: 10.1042/BJ3360283.
- [60] E. M. Huber, W. Heinemeyer, X. Li, C. S. Arendt, M. Hochstrasser, and M. Groll, ‘A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome’, *Nature Communications 2016 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2016, doi: 10.1038/ncomms10900.
- [61] D. J. Kuhn *et al.*, ‘Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma’,

- Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3281–3290, Nov. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2007-01-065888.
- [62] D. J. Kuhn, S. A. Hunsucker, Q. Chen, P. M. Voorhees, M. Orlowski, and R. Z. Orlowski, ‘Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors’, *Blood*, vol. 113, no. 19, pp. 4667–4676, 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2008-07-171637.
- [63] D. Wei, L. Fang, M. Tang, and C. G. Zhan, ‘Fundamental reaction pathway for peptide metabolism by proteasome: insights from first-principles quantum mechanical/molecular mechanical free energy calculations’, *J Phys Chem B*, vol. 117, no. 43, pp. 13418–13434, Oct. 2013, doi: 10.1021/JP405337V.
- [64] A. J. Marques, R. Palanimurugan, A. C. Mafias, P. C. Ramos, and R. J. Dohmen, ‘Catalytic mechanism and assembly of the proteasome’, *Chem Rev*, vol. 109, no. 4, pp. 1509–1536, Apr. 2009, doi: 10.1021/CR8004857.
- [65] G. C. Lander, E. Estrin, M. E. Matyskiela, C. Bashore, E. Nogales, and A. Martin, ‘Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle’, *Nature*, vol. 482, no. 7384, pp. 186–191, Feb. 2012, doi: 10.1038/NATURE10774.
- [66] F. Beck *et al.*, ‘Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome’, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 37, pp. 14870–14875, Sep. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1213333109/SUPPL\_FILE/SM02.MOV.
- [67] T. Yao and R. E. Cohen, ‘A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome’, *Nature*, vol. 419, no. 6905, pp. 403–407, Sep. 2002, doi: 10.1038/NATURE01071.
- [68] J. Hamazaki, S. I. Iemura, T. Natsume, H. Yashiroda, K. Tanaka, and S. Murata, ‘A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes’, *EMBO J*, vol. 25, no. 19, p. 4524, Oct. 2006, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7601338.
- [69] M. Hu *et al.*, ‘Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14’, *EMBO J*, vol. 24, no. 21, p. 3747, Nov. 2005, doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600832.
- [70] Q. Wang, P. Young, and K. J. Walters, ‘Structure of S5a bound to monoubiquitin provides a model for polyubiquitin recognition’, *J Mol Biol*, vol. 348, no. 3, pp. 727–739, May 2005, doi: 10.1016/J.JMB.2005.03.007.
- [71] R. Verma, R. Oania, J. Graumann, and R. J. Deshaies, ‘Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system’, *Cell*, vol. 118, no. 1, pp. 99–110, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.06.014.
- [72] Q. Deveraux, S. Van Nocker, D. Mahaffey, R. Vierstra, and M. Rechsteiner, ‘Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the Arabidopsis 26 S protease subunit S5a’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 50, pp. 29660–29663, Dec. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.50.29660.



- [73] A. R. Kusmierczyk, M. J. Kunjappu, R. Y. Kim, and M. Hochstrasser, 'A conserved 20S proteasome assembly factor requires a C-terminal HbYX motif for proteasomal precursor binding', *Nat Struct Mol Biol*, vol. 18, no. 5, pp. 622–629, 2011, doi: 10.1038/NSMB.2027.
- [74] D. M. Smith, S. C. Chang, S. Park, D. Finley, Y. Cheng, and A. L. Goldberg, 'Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry', *Mol Cell*, vol. 27, no. 5, pp. 731–744, Sep. 2007, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2007.06.033.
- [75] N. Chondrogianni, M. Sakellari, M. Lefaki, N. Papaevgeniou, and E. S. Gonos, 'Proteasome activation delays aging in vitro and in vivo', *Free Radic Biol Med*, vol. 71, pp. 303–320, 2014, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.03.031.
- [76] H. Yu *et al.*, 'Conserved Sequence Preferences Contribute to Substrate Recognition by the Proteasome', *J Biol Chem*, vol. 291, no. 28, pp. 14526–14539, Jul. 2016, doi: 10.1074/JBC.M116.727578.
- [77] L. Budenholzer, C. L. Cheng, Y. Li, and M. Hochstrasser, 'Proteasome Structure and Assembly', *J Mol Biol*, vol. 429, no. 22, pp. 3500–3524, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.JMB.2017.05.027.
- [78] Y. Zhu, W. L. Wang, D. Yu, Q. Ouyang, Y. Lu, and Y. Mao, 'Structural mechanism for nucleotide-driven remodeling of the AAA-ATPase unfoldase in the activated human 26S proteasome', *Nature Communications 2018 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03785-w.
- [79] C. L. Jones and J. J. Tepe, 'Proteasome activation to combat proteotoxicity', *Molecules*, vol. 24, no. 15. MDPI AG, Aug. 05, 2019. doi: 10.3390/molecules24152841.
- [80] M. R. Eisele *et al.*, 'Expanded Coverage of the 26S Proteasome Conformational Landscape Reveals Mechanisms of Peptidase Gating', *Cell Rep*, vol. 24, no. 5, pp. 1301–1315.e5, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.CELREP.2018.07.004.
- [81] A. H. De la Peña, E. A. Goodall, S. N. Gates, G. C. Lander, and A. Martin, 'Substrate-engaged 26 S proteasome structures reveal mechanisms for ATP-hydrolysis-driven translocation', *Science*, vol. 362, no. 6418, Nov. 2018, doi: 10.1126/SCIENCE.AAV0725.
- [82] E. Kish-Trier and C. P. Hill, 'Structural biology of the proteasome', *Annu Rev Biophys*, vol. 42, no. 1, pp. 29–49, May 2013, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-083012-130417.
- [83] B. M. Stadtmueller and C. P. Hill, 'Proteasome activators', *Mol Cell*, vol. 41, no. 1, pp. 8–19, Jan. 2011, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.12.020.
- [84] C. Realini *et al.*, 'Characterization of recombinant REGalpha, REGbeta, and REGgamma proteasome activators', *J Biol Chem*, vol. 272, no. 41, pp. 25483–25492, Oct. 1997, doi: 10.1074/JBC.272.41.25483.

- [85] J. Li and M. Rechsteiner, 'Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators', *Biochimie*, vol. 83, no. 3–4, pp. 373–383, 2001, doi: 10.1016/S0300-9084(01)01236-6.
- [86] M. Rechsteiner, C. Realini, and V. Ustrell, 'The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation.', *Biochemical Journal*, vol. 345, no. Pt 1, p. 1, Jan. 2000, doi: 10.1042/0264-6021:3450001.
- [87] M. T. Khan, K. Wang, and B. D. Roufogalis, 'Identification and purification of a 90-kDa membrane-bound endogenous inhibitor of multicatalytic proteinase from human erythrocytes.', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 214, no. 3, pp. 957–62, Sep. 1995, doi: 10.1006/bbrc.1995.2379.
- [88] L. Kuehn and B. Dahlmann, 'Proteasome activator PA28 and its interaction with 20 S proteasomes', *Arch Biochem Biophys*, vol. 329, no. 1, pp. 87–96, May 1996, doi: 10.1006/ABBI.1996.0195.
- [89] K. Sadre-Bazzaz, F. G. Whitby, H. Robinson, T. Formosa, and C. P. Hill, 'Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening', *Mol Cell*, vol. 37, no. 5, p. 728, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.02.002.
- [90] Y. Dong *et al.*, 'Cryo-EM structures and dynamics of substrate-engaged human 26S proteasome', *Nature*, vol. 565, no. 7737, pp. 49–55, Jan. 2019, doi: 10.1038/S41586-018-0736-4.
- [91] A. Förster, E. I. Masters, F. G. Whitby, H. Robinson, and C. P. Hill, 'The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions', *Mol Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 589–599, May 2005, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2005.04.016.
- [92] A. Förster, E. I. Masters, F. G. Whitby, H. Robinson, and C. P. Hill, 'The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions', *Mol Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 589–599, May 2005, doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.016.
- [93] A. Förster, F. G. Whitby, and C. P. Hill, 'The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation', *EMBO J*, vol. 22, no. 17, p. 4356, Sep. 2003, doi: 10.1093/EMBOJ/CDG436.
- [94] J. Ortega, J. B. Heymann, A. V. Kajava, V. Ustrell, M. Rechsteiner, and A. C. Steven, 'The Axial Channel of the 20 S Proteasome Opens Upon Binding of the PA200 Activator', *J Mol Biol*, vol. 346, no. 5, pp. 1221–1227, Mar. 2005, doi: 10.1016/J.JMB.2004.12.049.
- [95] B. Khor *et al.*, 'Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis', *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 8, pp. 2999–3007, Apr. 2006, doi: 10.1128/MCB.26.8.2999-3007.2006.
- [96] A. Javitt *et al.*, 'The proteasome regulator PSME4 drives immune evasion and abrogates anti-tumor immunity in NSCLC', *bioRxiv*, p. 2021.10.24.464690, Oct. 2021, doi: 10.1101/2021.10.24.464690.

- [97] V. Ustrell, L. Hoffman, G. Pratt, and M. Rechsteiner, 'PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair', *EMBO J*, vol. 21, no. 13, pp. 3516–3525, Jul. 2002, doi: 10.1093/EMBOJ/CDF333.
- [98] A. F. Savulescu and M. H. Glickman, 'Proteasome Activator 200: The HEAT is on...', *Mol Cell Proteomics*, vol. 10, no. 5, May 2011, doi: 10.1074/MCP.M110.006890.
- [99] H. Guan *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*, vol. 18, no. 3, 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000654.
- [100] A. Toste Rêgo and P. C. A. da Fonseca, 'Characterization of Fully Recombinant Human 20S and 20S-PA200 Proteasome Complexes', *Mol Cell*, vol. 76, no. 1, pp. 138-147.e5, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2019.07.014.
- [101] A. Scaiola *et al.*, 'The 3.2-Å resolution structure of human mTORC2', *Sci Adv*, vol. 6, no. 45, Nov. 2020, doi: 10.1126/SCIADV.ABC1251.
- [102] M. R. Macbeth, H. L. Schubert, A. F. VanDemark, A. T. Lingam, C. P. Hill, and B. L. Bass, 'Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing', *Science*, vol. 309, no. 5740, pp. 1534–1539, Sep. 2005, doi: 10.1126/SCIENCE.1113150.
- [103] A. S. Yazgili, F. Ebstein, and S. Meiners, 'The Proteasome Activator PA200/PSME4: An Emerging New Player in Health and Disease', *Biomolecules 2022, Vol. 12, Page 1150*, vol. 12, no. 8, p. 1150, Aug. 2022, doi: 10.3390/BIOM12081150.
- [104] T. Dange *et al.*, 'Blm10 protein promotes proteasomal substrate turnover by an active gating mechanism', *J Biol Chem*, vol. 286, no. 50, pp. 42830–42839, Dec. 2011, doi: 10.1074/JBC.M111.300178.
- [105] K. Tar *et al.*, 'Proteasomes associated with the Blm10 activator protein antagonize mitochondrial fission through degradation of the fission protein Dnm1', *J Biol Chem*, vol. 289, no. 17, pp. 12145–12156, Apr. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.554105.
- [106] B. Khor *et al.*, 'Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis', *Mol Cell Biol*, vol. 26, no. 8, pp. 2999–3007, Apr. 2006, doi: 10.1128/MCB.26.8.2999-3007.2006.
- [107] M. Fehlker, P. Wendler, A. Lehmann, and C. Enenkel, 'Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly', *EMBO Rep*, vol. 4, no. 10, pp. 959–963, 2003, doi: 10.1038/SJ.EMBOR.EMBOR938.
- [108] M. X. Qian *et al.*, 'Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis', *Cell*, vol. 153, no. 5, p. 1012, May 2013, doi: 10.1016/J.CELL.2013.04.032.
- [109] I. K. Mandemaker *et al.*, 'DNA damage-induced replication stress results in PA200-proteasome-mediated degradation of acetylated histones', *EMBO Rep*, vol. 19, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.15252/EMBR.201745566.
- [110] K. Sadre-Bazzaz, F. G. Whitby, H. Robinson, T. Formosa, and C. P. Hill, 'Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate

- opening', *Mol Cell*, vol. 37, no. 5, pp. 728–735, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.02.002.
- [111] K. Sadre-Bazzaz, F. G. Whitby, H. Robinson, T. Formosa, and C. P. Hill, 'Structure of a Blm10 complex reveals common mechanisms for proteasome binding and gate opening', *Mol Cell*, vol. 37, no. 5, pp. 728–735, Mar. 2010, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.02.002.
- [112] J. J. Y. Chuah, T. A. Thibaudeau, and D. M. Smith, 'Minimal mechanistic component of HbYX-dependent proteasome activation that reverses impairment by neurodegenerative-associated oligomers', *Communications Biology* 2023 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2023, doi: 10.1038/s42003-023-05082-9.
- [113] M. Gizińska *et al.*, 'Proline- and Arginine-Rich Peptides as Flexible Allosteric Modulators of Human Proteasome Activity', *J Med Chem*, vol. 62, no. 1, pp. 359–370, Oct. 2019, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B01025/SUPPL\_FILE/JM8B01025\_SI\_001.PDF.
- [114] H. M. Schnell, J. Ang, S. Rawson, R. M. Walsh, Y. Micoogullari, and J. Hanna, 'Mechanism of proteasome gate modulation by assembly chaperones Pba1 and Pba2', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 298, no. 5, p. 101906, May 2022, doi: 10.1016/j.jbc.2022.101906.
- [115] Y. Hirano *et al.*, 'A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes', *Nature*, vol. 437, no. 7063, pp. 1381–1385, Oct. 2005, doi: 10.1038/NATURE04106.
- [116] B. M. Stadtmueller *et al.*, 'Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function', *J Biol Chem*, vol. 287, no. 44, pp. 37371–37382, Oct. 2012, doi: 10.1074/JBC.M112.367003.
- [117] D. Ruano, 'Proteostasis Dysfunction in Aged Mammalian Cells. The Stressful Role of Inflammation', *Front Mol Biosci*, vol. 8, Jun. 2021, doi: 10.3389/FMOLB.2021.658742.
- [118] N. Frankowska, K. Lisowska, and J. M. Witkowski, 'Proteolysis dysfunction in the process of aging and age-related diseases', *Frontiers in Aging*, vol. 3, p. 927630, Jul. 2022, doi: 10.3389/FRAGI.2022.927630/BIBTEX.
- [119] N. Chondrogianni, F. L. L. Stratford, I. P. Trougakos, B. Friguet, A. J. Rivett, and E. S. Gonos, '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*, vol. 278, no. 30, pp. 28026–28037, Jul. 2003, doi: 10.1074/JBC.M301048200.
- [120] J. N. Keller, F. F. Huang, and W. R. Markesbery, 'Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord', *Neuroscience*, vol. 98, no. 1, pp. 149–156, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0306-4522(00)00067-1.
- [121] J. R. Hawse, J. F. Hejtmancik, J. Horwitz, and M. Kantorow, 'Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract

- and clear human lenses and aged human lenses', *Exp Eye Res*, vol. 79, no. 6, pp. 935–940, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.exer.2004.04.007.
- [122] Y. Arata *et al.*, 'Defective induction of the proteasome associated with T-cell receptor signaling underlies T-cell senescence', *Genes Cells*, vol. 24, no. 12, pp. 801–813, Dec. 2019, doi: 10.1111/GTC.12728.
- [123] A. Tylutka and A. Zembroń-Łacny, 'Starzenie się układu immunologicznego i jego konsekwencje dla zdrowia Immunological aging and clinical consequences immunosenescence • T lymphocytes • B lymphocytes • NK cells • immune risk profile', doi: 10.5604/01.3001.0014.3054.
- [124] U. Ponnappan, M. Zhong, and G. U. Trebilcock, 'Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: A role in immune senescence', *Cell Immunol*, vol. 192, no. 2, pp. 167–174, Mar. 1999, doi: 10.1006/CIMM.1998.1418.
- [125] D. J. Selkoe, 'Alzheimer's disease', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 7, pp. 1–16, Jul. 2011, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A004457.
- [126] C. A. Dickey *et al.*, 'Akt and CHIP coregulate tau degradation through coordinated interactions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 9, pp. 3622–3627, Mar. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0709180105.
- [127] R. J. O'Brien and P. C. Wong, 'Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease', *Annu Rev Neurosci*, vol. 34, pp. 185–204, Jul. 2011, doi: 10.1146/ANNUREV-NEURO-061010-113613.
- [128] T. A. Thibaudeau, R. T. Anderson, and D. M. Smith, 'A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers', *Nature Communications 2018 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Mar. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03509-0.
- [129] K. S. P. McNaught, D. P. Perl, A. L. Brownell, and C. W. Olanow, 'Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease', *Ann Neurol*, vol. 56, no. 1, pp. 149–162, Jul. 2004, doi: 10.1002/ANA.20186.
- [130] N. Matsuda and K. Tanaka, '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*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, 2010, doi: 10.3233/JAD-2010-1231.
- [131] M. Bi, X. Du, Q. Jiao, X. Chen, and H. Jiang, 'Expanding the role of proteasome homeostasis in Parkinson's disease: beyond protein breakdown', *Cell Death & Disease 2021 12:2*, vol. 12, no. 2, pp. 1–16, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03441-0.
- [132] K. S. P. McNaught, R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner, and C. W. Olanow, 'Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease', *Exp Neurol*, vol. 179, no. 1, pp. 38–46, 2003, doi: 10.1006/exnr.2002.8050.
- [133] C. McKinnon *et al.*, 'Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by  $\alpha$ -synuclein', *Acta Neuropathol Commun*, vol. 8, no. 1, Feb. 2020, doi: 10.1186/S40478-020-0894-0.

- [134] S. Finkbeiner, 'Huntington's Disease', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 6, pp. 1–24, Jun. 2011, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A007476.
- [135] D. Vilchez *et al.*, 'RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions', *Nature*, vol. 489, no. 7415, pp. 263–268, Sep. 2012, doi: 10.1038/NATURE11315.
- [136] I. Saez and D. Vilchez, 'The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases', *Curr Genomics*, vol. 15, no. 1, p. 38, Mar. 2014, doi: 10.2174/138920291501140306113344.
- [137] S. D. Staerz, C. L. Jones, and J. J. Tepe, 'Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Potent 20S Proteasome Activators for the Potential Treatment of  $\alpha$ -Synucleinopathies', *J Med Chem*, 2021, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C02158/SUPPL\_FILE/JM1C02158\_SI\_006.PDB.
- [138] A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, 'Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera', *Biochim Biophys Acta*, vol. 1666, no. 1–2, pp. 105–117, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2004.04.011.
- [139] L. Huang, P. Ho, and C. H. Chen, 'Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives', *FEBS Lett*, vol. 581, no. 25, pp. 4955–4959, Oct. 2007, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2007.09.031.
- [140] D. J. Trader, S. Simanski, P. Dickson, and T. Kodadek, 'Establishment of a suite of assays that support the discovery of proteasome stimulators', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1861, no. 4, pp. 892–899, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2017.01.003.
- [141] R. A. Coleman, C. S. Muli, Y. Zhao, A. Bhardwaj, T. R. Newhouse, and D. J. Trader, 'Analysis of chain length, substitution patterns, and unsaturation of AM-404 derivatives as 20S proteasome stimulators', *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 29, no. 3, pp. 420–423, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.BMCL.2018.12.030.
- [142] C. L. Jones, E. Njomen, B. Sjögren, T. S. Dexheimer, and J. J. Tepe, 'Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins', *ACS Chem Biol*, vol. 12, no. 9, pp. 2240–2247, Sep. 2017, doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.7B00489.
- [143] T. J. Fiolek *et al.*, 'Dihydroquinazolines enhance 20S proteasome activity and induce degradation of  $\alpha$ -synuclein, an intrinsically disordered protein associated with neurodegeneration', *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 36, p. 127821, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.BMCL.2021.127821.
- [144] A. M. Santoro *et al.*, 'Pyrazolones Activate the Proteasome by Gating Mechanisms and Protect Neuronal Cells from  $\beta$ -Amyloid Toxicity', *ChemMedChem*, vol. 15, no. 3, pp. 302–316, Feb. 2020, doi: 10.1002/CMDC.201900612.
- [145] T. J. Fiolek, K. L. Keel, and J. J. Tepe, 'Fluspirilene Analogs Activate the 20S Proteasome and Overcome Proteasome Impairment by Intrinsically Disordered Protein Oligomers', *ACS Chem Neurosci*, vol. 12, no. 8, pp. 1438–1448, Apr. 2021, doi: 10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00099.

- [146] F. H. Dal Vechio, F. Cerqueira, O. Augusto, R. Lopes, and M. Demasi, 'Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation', *Free Radic Biol Med*, vol. 67, pp. 304–313, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.11.017.
- [147] E. Njomen and J. J. Tepe, 'Proteasome Activation as a New Therapeutic Approach To Target Proteotoxic Disorders', *J Med Chem*, vol. 62, no. 14, p. 6469, Jul. 2019, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.9B00101.
- [148] J. Witkowska *et al.*, 'Crystal structure of a low molecular weight activator Blm-pep with yeast 20S proteasome - insights into the enzyme activation mechanism', *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-05997-4.
- [149] J. Witkowska *et al.*, 'Crystal structure of a low molecular weight activator Blm-pep with yeast 20S proteasome - Insights into the enzyme activation mechanism', *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05997-4.
- [150] E. S. Chocron *et al.*, 'Genetic and pharmacologic proteasome augmentation ameliorates Alzheimer's-like pathology in mouse and fly APP overexpression models', *Sci Adv*, vol. 8, no. 23, p. eabk2252, Jun. 2022, doi: 10.1126/SCIADV.ABK2252/SUPPL\_FILE/SCIADV.ABK2252\_SM.PDF.
- [151] M. Gaczynska, K. L. Rock, T. Spies, and A. L. Goldberg, 'Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no. 20, pp. 9213–9217, Sep. 1994, doi: 10.1073/PNAS.91.20.9213.
- [152] N. Chondrogianni, C. Tzavelas, A. J. Pemberton, I. P. Nezis, A. J. Rivett, and E. S. Gonos, 'Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates', *J Biol Chem*, vol. 280, no. 12, pp. 11840–11850, Mar. 2005, doi: 10.1074/JBC.M413007200.
- [153] Y. Liu, X. Liu, T. Zhang, C. Luna, P. B. Liton, and P. Gonzalez, 'Cytoprotective effects of proteasome  $\beta$ 5 subunit overexpression in lens epithelial cells', *Mol Vis*, vol. 13, p. 31, Jan. 2007, Accessed: Jul. 03, 2023. [Online]. Available: </pmc/articles/PMC2503187/>
- [154] T. Nguyen, C. S. Yang, and C. B. Pickett, 'The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress', *Free Radic Biol Med*, vol. 37, no. 4, pp. 433–441, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.033.
- [155] M.-K. Kwak, N. Wakabayashi, J. L. Greenlaw, M. Yamamoto, and T. W. Kensler, 'Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway', *Mol Cell Biol*, vol. 23, no. 23, pp. 8786–8794, Dec. 2003, doi: 10.1128/MCB.23.23.8786-8794.2003.
- [156] Y. B. Cui *et al.*, 'Pharmacological activation of the Nrf2 pathway by 3H-1, 2-dithiole-3-thione is neuroprotective in a mouse model of Alzheimer disease', *Behavioural brain research*, vol. 336, pp. 219–226, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.BBR.2017.09.011.

- [157] S. Kapeta, N. Chondrogianni, and E. S. Gonos, 'Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts', *J Biol Chem*, vol. 285, no. 11, pp. 8171–8184, Mar. 2010, doi: 10.1074/JBC.M109.031575.
- [158] N. Papaevgeniou *et al.*, '18 $\alpha$ -Glycyrrhetic Acid Proteasome Activator Decelerates Aging and Alzheimer's Disease Progression in *Caenorhabditis elegans* and Neuronal Cultures', *Antioxid Redox Signal*, vol. 25, no. 16, pp. 855–869, Dec. 2016, doi: 10.1089/ARS.2015.6494.
- [159] J. Jang, Y. Wang, H. S. Kim, M. A. Lalli, and K. S. Kosik, 'Nrf2, a regulator of the proteasome, controls self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells', *Stem Cells*, vol. 32, no. 10, pp. 2616–2625, Oct. 2014, doi: 10.1002/STEM.1764.
- [160] D. Vilchez *et al.*, 'Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11', *Nature*, vol. 489, no. 7415, pp. 304–308, Sep. 2012, doi: 10.1038/NATURE11468.
- [161] W. H. Choi *et al.*, 'Open-gate mutants of the mammalian proteasome show enhanced ubiquitin-conjugate degradation', *Nat Commun*, vol. 7, Mar. 2016, doi: 10.1038/NCOMMS10963.
- [162] X. Guo, X. Huang, and M. J. Chen, 'Reversible phosphorylation of the 26S proteasome', *Protein Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 255–272, Apr. 2017, doi: 10.1007/S13238-017-0382-X.
- [163] F. Zhang, Y. Hu, P. Huang, C. A. Toleman, A. J. Paterson, and J. E. Kudlow, 'Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6', *J Biol Chem*, vol. 282, no. 31, pp. 22460–22471, Aug. 2007, doi: 10.1074/JBC.M702439200.
- [164] D. E. George and J. J. Tepe, 'Advances in Proteasome Enhancement by Small Molecules', *Biomolecules*, vol. 11, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/BIOM11121789.
- [165] S. J. Park *et al.*, 'Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases', *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 421–433, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.CELL.2012.01.017.
- [166] N. Myeku *et al.*, 'Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling', *Nat Med*, vol. 22, no. 1, pp. 46–53, Jan. 2016, doi: 10.1038/NM.4011.
- [167] A. W. Schaler and N. Myeku, 'Cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, activates proteasome-mediated proteolysis and attenuates tauopathy and cognitive decline', *Transl Res*, vol. 193, pp. 31–41, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.TRSL.2017.11.004.
- [168] 'Cilostazol Monograph for Professionals - Drugs.com'. Accessed: Jul. 04, 2023. [Online]. Available: <https://www.drugs.com/monograph/cilostazol.html>
- [169] Y. Leestemaker *et al.*, 'Proteasome Activation by Small Molecules', *Cell Chem Biol*, vol. 24, no. 6, pp. 725–736.e7, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2017.05.010.



- [170] A. Henninot, J. C. Collins, and J. M. Nuss, 'The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future?', *J Med Chem*, vol. 61, no. 4, pp. 1382–1414, Feb. 2018, doi: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B00318.
- [171] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, and D. Price, 'The future of peptide-based drugs', *Chem Biol Drug Des*, vol. 81, no. 1, pp. 136–147, Jan. 2013, doi: 10.1111/CBDD.12055.
- [172] D. A. Scott and C. H. Best, 'The Preparation of Insulin', *Ind Eng Chem*, vol. 17, no. 3, pp. 238–240, Mar. 1925, doi: 10.1021/IE50183A004/ASSET/IE50183A004.FP.PNG\_V03.
- [173] J. A. DeSimone, A. Ojha, R. Pathak, and J. Cohn, 'Successful desensitization to enfuvirtide after a hypersensitivity reaction in an HIV-1-infected man', *Clin Infect Dis*, vol. 39, no. 10, 2004, doi: 10.1086/425502.
- [174] K. Fosgerau and T. Hoffmann, 'Peptide therapeutics: current status and future directions', *Drug Discov Today*, vol. 20, no. 1, pp. 122–128, 2015, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2014.10.003.
- [175] K. Imai and A. Takaoka, 'Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer', *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 9, pp. 714–727, Sep. 2006, doi: 10.1038/NRC1913.
- [176] J. L. Lau and M. K. Dunn, 'Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions', *Bioorg Med Chem*, vol. 26, no. 10, pp. 2700–2707, Jun. 2018, doi: 10.1016/J.BMC.2017.06.052.
- [177] L. Diao and B. Meibohm, 'Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides', *Clin Pharmacokinet*, vol. 52, no. 10, pp. 855–868, Oct. 2013, doi: 10.1007/S40262-013-0079-0.
- [178] J. Vagner, H. Qu, and V. J. Hruby, 'Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery', *Curr Opin Chem Biol*, vol. 12, no. 3, pp. 292–296, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.CBPA.2008.03.009.
- [179] M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, and T. N. Grossmann, 'Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes', *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 54, no. 31, pp. 8896–8927, Jul. 2015, doi: 10.1002/ANIE.201412070.
- [180] G. R. Marshall, 'A hierarchical approach to peptidomimetic design', *Tetrahedron*, vol. 49, no. 17, pp. 3547–3558, Mar. 1993, doi: 10.1016/S0040-4020(01)90214-5.
- [181] E. Lenci and A. Trabocchi, 'Peptidomimetic toolbox for drug discovery', *Chem Soc Rev*, vol. 49, no. 11, pp. 3262–3277, Jun. 2020, doi: 10.1039/D0CS00102C.
- [182] R. Yamada and Y. Kera, 'D-amino acid hydrolysing enzymes', *EXS*, vol. 85, pp. 145–155, 1998, doi: 10.1007/978-3-0348-8837-0\_9.
- [183] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, and M. Khrestchatsky, 'Synthetic therapeutic peptides: science and market', *Drug Discov Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 40–56, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2009.10.009.

- [184] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, and W. H. Moos, 'Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers', *Drug Dev Res*, vol. 35, no. 1, pp. 20–32, May 1995, doi: 10.1002/DDR.430350105.
- [185] L. Gentilucci *et al.*, 'Inhibition of cancer cell adhesion by heterochiral Pro-containing RGD mimetics', *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 17, no. 8, pp. 2329–2333, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.BMCL.2007.01.073.
- [186] H. Li *et al.*, 'Novel retro-inverso peptide inhibitor reverses angiotensin receptor autoantibody-induced hypertension in the rabbit', *Hypertension*, vol. 65, no. 4, pp. 793–799, Apr. 2015, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05037.
- [187] Y. Linde *et al.*, 'Structure-activity relationship and metabolic stability studies of backbone cyclization and N-methylation of melanocortin peptides', *Biopolymers*, vol. 90, no. 5, pp. 671–682, 2008, doi: 10.1002/BIP.21057.
- [188] E. Lenci and A. Trabocchi, 'Peptidomimetic toolbox for drug discovery', *Chemical Society Reviews*, vol. 49, no. 11. Royal Society of Chemistry, pp. 3262–3277, Jun. 07, 2020. doi: 10.1039/d0cs00102c.
- [189] I. Oren, S. J. Fleishman, A. Kessel, and N. Ben-Tal, 'Free Diffusion of Steroid Hormones Across Biomembranes: A Simplex Search with Implicit Solvent Model Calculations', *Biophys J*, vol. 87, no. 2, pp. 768–779, Aug. 2004, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.103.035527.
- [190] B. J. Bennion *et al.*, 'Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated with in Vitro Permeability Assay Data', *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 121, no. 20, pp. 5228–5237, May 2017, doi: 10.1021/ACS.JPCB.7B02914/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2017-02914T\_0004.JPEG.
- [191] S. Mitragotri, P. A. Burke, and R. Langer, 'Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies', *Nature Reviews Drug Discovery 2014 13:9*, vol. 13, no. 9, pp. 655–672, Aug. 2014, doi: 10.1038/nrd4363.
- [192] A. D. Frankel and C. O. Pabo, 'Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus', *Cell*, vol. 55, no. 6, pp. 1189–1193, Dec. 1988, doi: 10.1016/0092-8674(88)90263-2.
- [193] B. C. Evans *et al.*, 'An anionic, endosome-escaping polymer to potentiate intracellular delivery of cationic peptides, biomacromolecules, and nanoparticles.', *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12906-y.
- [194] E. Vivès, P. Brodin, and B. Lebleu, 'A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 25, pp. 16010–16017, Jun. 1997, doi: 10.1074/JBC.272.25.16010.
- [195] J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray, and P. A. Wender, 'Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells', *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 31, pp. 9506–9507,

Aug. 2004, doi:  
10.1021/JA0482536/SUPPL\_FILE/JA0482536SI20040610\_011835.PDF.

- [196] H. Binder and G. Lindblom, ‘Charge-Dependent Translocation of the Trojan Peptide Penetratin across Lipid Membranes’, *Biophys J*, vol. 85, no. 2, pp. 982–995, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74537-8.
- [197] G. C. Kim, D. H. Cheon, and Y. Lee, ‘Challenge to overcome current limitations of cell-penetrating peptides’, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1869, no. 4. Elsevier B.V., Apr. 01, 2021. doi: 10.1016/j.bbapap.2021.140604.
- [198] M. S. Robinson, C. Watts, and M. Zerial, ‘Membrane Dynamics in Endocytosis’, *Cell*, vol. 84, no. 1, pp. 13–21, Jan. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80988-5.
- [199] J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, and L. V. Chernomordik, ‘Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 15, pp. 15300–15306, Apr. 2005, doi: 10.1074/JBC.M401604200.
- [200] S. Afonin *et al.*, ‘The Cell-Penetrating Peptide TAT(48-60) Induces a Non-Lamellar Phase in DMPC Membranes’, *ChemPhysChem*, vol. 7, no. 10, pp. 2134–2142, Oct. 2006, doi: 10.1002/CPHC.200600306.

## Wykaz rysunków

Rysunek 1. Model uproszczony oraz struktura krystaliczna eukariotycznego proteasomu 20S.	16
Rysunek 2. Modelowe mechanizmy wiązania substratu przez proteasom 20S [19].	18
Rysunek 3. Uprozczone modele podtypów proteasomu.	19
Rysunek 4. Szlaki degradacji białek.	22
Rysunek 5. System proteolityczny ubikwityna – proteasom 26S (UPS).	24
Rysunek 6. Mechanizm autokatalityczny oraz proteolityczny proteasomu 20S. A) Przedstawienie głównych kroków prowadzących do uzyskania aktywnej formy podjednostki $\beta$ . B) Mechanizm prowadzący do hydrolizy wiązania peptydowego substratu przez <i>N</i> -końcową resztę Thr1 [5].	26
Rysunek 7. Wyznaczona metodą mikroskopii krioelektronowej (krio-EM) struktura ludzkiego proteasomu 26S z przyłączoną pojedynczą cząsteczką regulatora 19S. Struktura jest pokazana w trzech orientacjach obróconych względem siebie o kąt 90° [68].	28
Rysunek 8. Sugerowane interakcje między fragmentami <i>C</i> -końców podstawy regulatora 19S z jednostkami $\alpha$ proteasomu 20S, w stanie otwartej bramy proteasomu. Schemat przedstawia miejsca zakotwiczenia fragmentu danej podjednostki Rpt. Kolory schematu są skoordynowane kolorystycznie z przedstawionym obrazem struktury krystalicznej [73].	29
Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie wiązania <i>C</i> -końcowych fragmentów podjednostek Rpt do kieszeni proteasomu 20S w siedmiu konformacjach, które proteasom przyjmuje po związaniu substratu białkowego. E <sub>A1</sub> (przed rozpoznaniem ubikwityny), E <sub>A2</sub> (po rozpoznaniu ubikwityny), E <sub>B</sub> (deubikwitynacja), E <sub>C1</sub> oraz E <sub>C2</sub> (inicjacja translokacji substratu), E <sub>D1</sub> oraz E <sub>D2</sub> (translokacja) [74], [75].	30
Rysunek 10. Aktywator 11S. A) Aktywator 11S z monomerami oznaczonymi różnymi kolorami. B) Widok z góry drożdżowego kompleksu 11S-20S-11S. C) Widok z boku drożdżowego kompleksu 11S-20S-11S. W czerwonym obramowaniu powiększenie ilustrujące oddziaływanie 11S-20S. Fioletowe reszty ilustrują konserwatywną sekwencję w podjednostce $\alpha$ proteasomu: Tyr8, Asp9, Pro17, Tyr26, oddziałującą z podjednostką 11S (żółty kolor). Pętla aktywacyjna 11S została przedstawiona w czerwonym kolorze [73].	31
Rysunek 11. Struktura PA200. A) Ogólny widok złożonej struktury PA200-20S-PA200, B) Widok z góry PA200 z przyłączonymi dwiema ujemnie naładowanymi cząsteczkami, C) 5,6[PP]2-InsP4 (tetrakisfosforanem (5,6)-bisdifosfoinozytolu i D) InsP6 (heksakisfosforanem inozytolu) [93].	35
Rysunek 12. Blm10. A) Kompleks proteasomu 20S z Blm10, rzut z boku. B) Mapa gęstości elektronowej dla przedostatniej tyrozyny Blm10 (Tyr2142) i otaczających ją reszt z podjednostek $\alpha$ . C) Nałożone na siebie ostatnie trzy reszty PA26 (zielone) i Blm10 (czerwone) z kompleksów tych białek z proteasomem. Reszta Tyr2142 aktywatora Blm10 stabilizuje otwartą bramę proteasomu przez wiązanie wodorowe z atomem tlenu Gly19 $\alpha_5$ , natomiast PA26 - poprzez wiązania wodorowe pętli aktywacyjnej z resztą Glu102 [102].	36
Rysunek 13. a) Reszty konserwatywne w kieszeni między podjednostkami $\alpha$ proteasomu 20S z <i>T. acidophilum</i> , oddziałujące z motywem HbYX. b) ZYA zadokowany w kieszeni $\alpha_5$ - $\alpha_6$ h20S.	38
Rysunek 14. a) Motyw HbYX Pba1 oraz Blm10 oraz otaczające je reszty aminokwasowe proteasomu, pokazane po wyrównaniu struktur względem podjednostek $\beta$ . Elementy struktury i reszty aminokwasowe Blm10 mają kolor jasnoniebieski, b) Reszty <i>C</i> -końcowe Pba1 i Pba2 nałożone na siebie. Pba1 Gly-269 i Pba2 Phe-262 oznaczono odpowiednio różowymi i zielonymi gwiazdkami. Przy porównaniu sekwencji reszty równoważne strukturalnie ujęto w ramki. [116].	39
Rysunek 15. Dziewięć cech charakterystycznych dla starzenia oraz neurodegeneracji. AD, choroba Alzheimerera; ALS, stwardnienie zanikowe boczne; AT, ataksja-teleangiektazja; HD, choroba Huntingtona; PD choroba Parkinsona.	40
Rysunek 16. Przykłady znanych małowcząsteczkowych aktywatorów proteasomu.	45
Rysunek 17. Szkielet aktywatora bazujący na a) dihydrochinazolinie oraz b) fenotiazynie.	46
Rysunek 18. Struktura fluspirylenu i acylofluspirylenu.	47

Rysunek 19. Sekwencja PAP1 oraz Blm-pep.....	48
Rysunek 20. a) Aromatyczne reszty aminokwasowe (czerwone) otaczające wejście do kanału katalicznego proteasomu. b) Skierowana na zewnątrz N-końcowa reszta Phe2 (czerwona) podjednostki $\alpha_6$ proteasomu. c) Kompleks proteasomu z Blm10. Ta sama reszta $\alpha_6$ Phe2 skierowana jest w górę po związaniu z Blm10, i wchodzi w kontakt aromatyczny z Phe2120 aktywatora. Reszty C-końcowe sekwencji aktywatora i N-koniec podjednostki $\alpha_6$ są przedstawione z wykorzystaniem pogrubionych wiązań, fragment pochodzący od aktywatora zaznaczono na czerwono [149].....	49
Rysunek 21. Sekwencja aktywatorów TAT1-8,9TOD oraz TAT1-DEN.....	50
Rysunek 22. Cząsteczki modulujące aktywność kinaz.....	53
Rysunek 23. Przykłady peptydów terapeutycznych oraz ich peptydomimetycznych odpowiedników.....	55
Rysunek 24. Schemat procesu projektowania peptydomimetyków.....	57
Rysunek 25. Mimetyki peptydu.....	57
Rysunek 26. Budowa L-peptydu i jego analogu D-peptydowego oraz peptydu retro-inverso. .	58
Rysunek 27. Struktura naturalnego aminokwasu w porównaniu z N-metylowanym.....	59
Rysunek 28. Różne układy cyklizacji: (a) typu „głowa – ogon”; (b) typu „głowa - łańcuch boczny” ; (c) łańcuch boczny - łańcuch boczny; (d) „ogon – łańcuch boczny” [171], [172]. .....	60
Rysunek 29. Oddziaływanie dodatnich ładunków CPP z ujemnymi ładunkami lipidów i węglowodanów błony komórkowej.....	63
Rysunek 30. Wpływ otrzymanych analogów na aktywność A: chymotrypsynopodobną, B: trypsynopodobną, C: kaspazopodobną, D: ogólną aktywność proteasomu h20S. Względna aktywność obliczono przez porównanie przyrostów fluorescencji w obecności modulatorów z wartościami uzyskanymi dla latentnego proteasomu (kontrola), które przyjęto jako 100%. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ SEM, liczba powtórzeń n=4. Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns – brak istotności statystycznej.....	101
Rysunek 31. Wpływ aktywatorów Bis na aktywność proteasomu h20S. Pomiar został wykonany przy użyciu substratu A: Suc-LLVY-AMC, B: Suc-LRR-AMC, C: Suc-LLE-AMC, D: Dabcyl-EDANS. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ SEM, liczba powtórzeń n=4. Statystykę wykonano porównując za pomocą testu One-way ANOVA dane uzyskane dla modulatorów z kontrolą : *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns – brak istotności statystycznej.....	106
Rysunek 32. Widma CD rozpuszczonych w wodzie aktywatorów o stężeniu 0,2 mg/ml. ....	107
Rysunek 33. Porównanie stabilności proteolitycznej aktywatorów w ludzkim osoczu. Ilość niestrawionego związku obliczylam poprzez porównanie pól powierzchni pików na chromatogramach zarejestrowanych dla aktywatorów inkubowanych z ludzkim osoczem przez 0 (kontrola) oraz 30 min. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ SEM., liczba powtórzeń n=3.....	108
Rysunek 34. Postęp degradacji aktywatorów z grupy peptydomimetyków Blm podczas inkubacji z ludzkim osoczem.....	110
Rysunek 35. Postęp degradacji aktywatorów z grupy Bis podczas inkubacji z ludzkim osoczem.....	112
Rysunek 36. Wpływ aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP na aktywność ChTL i TL proteasomu h20S. Pomiar został wykonany przy użyciu substratu A: Suc-LLVY-AMC, B: Suc-LRR-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ SEM, liczba powtórzeń n=6. Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: *p<0,05, , **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns – brak istotności statystycznej.....	115
Rysunek 37. Wpływ aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP na aktywność kaspazopodobną proteasomu h20S. Pomiar został wykonany przy użyciu substratu Z-LLE-AMC. Wyniki zostały	

przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=6$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.....116

Rysunek 38. A: Porównanie stabilności proteolitycznej aktywatorów w ludzkim osoczu. Ilość niestrawionego związku obliczyłam poprzez porównanie pól powierzchni pików na chromatogramach zarejestrowanych dla aktywatorów inkubowanych z ludzkim osoczem przez 0 (kontrola) i 30 minut. Liczba powtórzeń  $n=3$ , B: Postęp degradacji aktywatorów z sekwencją CPP w czasie.....117

Rysunek 39. Cytotoksyczność aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP wobec linii komórkowej H293T podczas 24-godzinnej inkubacji. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=3$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej. ....118

Rysunek 40. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające komórki linii HEK293T inkubowane w ciągu 3 godzin z wyznakowanymi aktywatorami. Na rysunku przedstawiono reprezentatywne zdjęcia, wybrane z trzech niezależnych powtórzeń. Skala wynosi 100  $\mu\text{m}$ ..... 123

Rysunek 41. Wpływ na aktywność proteasomu w lizacie komórkowym A: peptydomimetycznych aktywatorów B1m, B: aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP. Podczas badań wykorzystałam substrat Suc-LLVY-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=4$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej..... 125

Rysunek 42. Wpływ na aktywność proteasomu w lizacie komórkowym aktywatorów z grupy Bis. Podczas badań wykorzystałam substrat Suc-LLVY-AMC. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=4$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej..... 126

Rysunek 43. Wpływ aktywatorów na aktywność proteasomu w hodowli komórkowej HEK293T. Badania zostały wykonane przy użyciu sondy fluorescencyjnej TAS3. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM. Liczba powtórzeń  $n=6$ ..... 127

Rysunek 44. Przyrost fluorescencji pochodzącej od degradacji substratu TAS3 w komórkach w obecności aktywatora Bis1-tat. .... 128

Rysunek 45. Przyrost fluorescencji pochodzącej od degradacji substratu TAS3 w komórkach w obecności aktywatora A: A1-tat, B: A1-6r. .... 128

Rysunek 46. Przenikalność przez barierę krew-mózg określona za pomocą testu PAMPA. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM. Liczba powtórzeń  $n=3$ ..... 129

Rysunek 47. Wpływ aktywatorów na degradację A:  $\alpha$ -synukleiny, B: złożonego z 441 reszt aminokwasowych fragmentu białka Tau. Wykresy przedstawiają względną ilość substratu białkowego pozostałego po zakończeniu inkubacji z proteasomem 20S, bez obecności aktywatorów (próba kontrolna) oraz w ich obecności w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=3$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej. Poniżej wykresów dołączono przykładowe elektroforegramy. .... 131

Rysunek 48. Wpływ aktywatorów bez dodatku SDS na degradację A:  $\alpha$ -synukleiny, B: białka Tau-441. Wykresy przedstawiają względną ilość substratu białkowego pozostałego po zakończeniu inkubacji z proteasomem 20S, bez obecności aktywatorów (próba kontrolna) oraz w ich obecności w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM, liczba powtórzeń  $n=3$ . Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej. Poniżej wykresów dołączono przykładowe elektroforegramy. .... 133

Rysunek 49. Wiązanie się aktywatorów ze znakowanym fluorescencyjnie proteasomem, określone za pomocą techniki MST. Liczba powtórzeń n=3. ....	135
Rysunek 50. Wpływ aktywatorów na przeżywalność komórek hipokampalnych po 7 dniach inkubacji. Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej ± SD. Liczba powtórzeń biologicznych wynosiła 3, natomiast liczba powtórzeń technicznych 9-11.....	137
Rysunek 51. Ilość ciał Lewy'ego po 7 dniach inkubacji z aktywatorem bądź bez dodatku modulatorów (kontrola). Wyniki zostały przedstawione w postaci średniej arytmetycznej ± SD. Statystykę wykonano porównując uzyskane wyniki z kontrolą za pomocą testu One-way ANOVA: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns – brak istotności statystycznej, liczba powtórzeń biologicznych wynosiła 3, natomiast powtórzeń technicznych wykonano 9-11. ....	138
Rysunek 52. Porównanie obrazów mikroskopowych komórek hipokampalnych inkubowanych bez aktywatora i w obecności A1-6r w trzech różnych stężeniach. Na rysunku przedstawiono reprezentatywne zdjęcia, wybrane z trzech niezależnych powtórzeń. Skala wynosi 100 μm. Obrazy otrzymane na podstawie immunofluorescencji DAPI (kolor niebieski), NeuN (kolor czerwony), pS129- $\alpha$ syn (kolor biały).....	139

## Wykaz tabel

Tabela 1. Klasyfikacja CPP. ....	62
Tabela 2. Przykładowy cykl syntezy. ....	70
Tabela 3. Przykładowy cykl syntezy z zastosowaniem syntezy mikrofalowej. ....	71
Tabela 4. Przykłady amin wykorzystanych w syntezie poszczególnych związków.....	72
Tabela 5. Przykłady N-metylowanych aminokwasów zastosowanych w syntezie. ....	73
Tabela 6. Szczegóły dotyczące syntezy poszczególnych związków . ....	79
Tabela 7. Warunki oczyszczania związków oraz ich masy cząsteczkowe. ....	82
Tabela 8. Nazwy oraz sekwencje otrzymanych peptydomimetyków B1m.....	95
Tabela 9. Nazwy i struktury związków z grupy aktywatorów Bis.....	103
Tabela 10. Zidentyfikowane za pomocą LC-MS miejsca degradacji w aktywatorach. Kolorem czerwonym został oznaczony fragment sekwencji modulatora, pozostały po zakończeniu inkubacji.....	111
Tabela 11. Nazwy oraz sekwencje aktywatorów z dołączoną sekwencją CPP.....	113
Tabela 12. Stała EC50 wyznaczona dla wybranych aktywatorów. ....	134