

Załącznik 2

do wniosku o przeprowadzenie

postępowania habilitacyjnego z dnia 18.12.2018

## Autoreferat w języku polskim

---

**dr Dawid Dębowski**

Pracownia Chemii Bioorganicznej

Katedra Biochemii Molekularnej

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 18.12.2018

## **I. IMIĘ I NAZWISKO**

**Dawid Dębowski**

## **II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE - Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

1. Dyplom doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 2010. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Peptomeryczne ligandy: ocena specyficzności w układzie inhibitor – enzym oraz antygen – przeciwciało*. Promotorzy: prof. dr hab. Krzysztof Rolka (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) i dr hab. Marian Kruszyński (Centocor Research&Development Inc., Radnor, USA).

2. Dyplom magistra ochrony środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, 2005. Tytuł pracy magisterskiej: *Próba chemicznej syntezy inhibitora trypsyny CyPTI-IV oraz jego analogu [Ala<sup>8</sup>]CyPTI-IV*. Opiekun pracy: dr Hanna Miecznikowska (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański).

## **III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:**

2010.05 – obecnie      adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

2009.10 - 2010.04      asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

## **IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 r. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311):**

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:


**PEPTYDOWE INHIBITORY PROTEAZ – PROJEKTOWANIE, CHEMICZNA SYNTEZA, OCENA AKTYWNOŚCI ORAZ ICH WYKORZYSTANIE DO BADANIA MECHANIZMU PROTEOLIZY**

B) Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (chronologiczna kolejność prac):


H.1. ☒ **Dębowski D.**, Łukajtis R., Łęgowska A., Karna N., Pikuła M., Wysocka M., Maliszewska I., Sieńczyk M., Lesner A., Rolka K. *Inhibitory and antimicrobial activities of OGTI and HV-BBI peptides, fragments and analogs derived from amphibian skin Peptides*, 35, 276-284 (2012)

IF<sub>2012</sub> **2,522**, IF<sub>2017</sub> **2,851**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,761**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **3**


*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współdziałaniu w planowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu i koordynowaniu prowadzonych badań - współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji inhibitorów, ich syntezie chemicznej i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec trzech proteinaz serynowych, a także analizie zebranych wyników. Odpowiadałem za redakcję manuskryptu, korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 40%***

H.2.  **Dębowski D.** *Natural proteinaceous inhibitors of serine proteases* Curr. Pharm. Des., 19, 1068-1084 (2013)


IF<sub>2013</sub> **3,288**, IF<sub>2017</sub> **2,757**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,962**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **30**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **1**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu tematyki, dokonaniu przeglądu literaturowego, analizie zebranego materiału, napisaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład wyniósł 100%***

H.3. Karna N.,  **Dębowski D.**, Gitlin A., Łęgowska A., Rolka K. *Investigation of peptide splicing using two-peptide-chained analogues of trypsin inhibitor SFTI-1* FEBS J., 280, 6213-22 (2013)

IF<sub>2013</sub> **3,986**, IF<sub>2017</sub> **4,53**, IF<sub>5-cio letni</sub> **4,237**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **30**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **0**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji analogów inhibitora SFTI-1, ich syntezie chemicznej (uczestniczyłem w opracowywaniu metody syntezy peptydów połączonych mostkiem disulfidowym) i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec dwóch proteinaz serynowych. Współuczestniczyłem w wykonywaniu eksperymentów ukazujących proces splicingu peptydowego. Brałem udział w analizie zebranych wyników, przygotowaniu manuskryptu, odpowiadałem za korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 40%***

H.4.  **Dębowski D.**, Pikuła M., Lubos M., Langa P., Trzonkowski P., Lesner A., Łęgowska A., Rolka K. *Inhibition of human and yeast 20S proteasome by analogues of trypsin inhibitor SFTI-1* PLoS ONE, 9, e89465 (2014)

IF<sub>2014</sub> **3,234**, IF<sub>2017</sub> **2,766**, IF<sub>5-cio letni</sub> **3,352**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **35**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **1**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu i koordynowaniu prowadzonych badań - współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji inhibitorów, ich syntezie chemicznej i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec drożdżowego i ludzkiego proteasomu 20S. Współuczestniczyłem w analizie zebranych wyników. Odpowiadałem za przygotowanie manuskryptu, korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłem kierownikiem (Sonata 1). **Mój wkład oceniam na: 55%***

H.5.  **Dębowski D.**, Wyrzykowski D., Lubos M., Rolka K. *Interactions between trypsin and its peptidic inhibitors studied by isothermal titration calorimetry (ITC)* J. Therm. Anal. Calorim., 123, 807–812 (2015)

IF<sub>2015</sub> **1,781**, IF<sub>2017</sub> **2,209**, IF<sub>5-cio letni</sub> **1,917**, punkty MNI<sub>SW2016</sub> **20**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **3**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu i koordynowaniu prowadzonych badań - syntezy chemicznej peptydów, ich oczyszczania oraz pomiarów aktywności inhibitorowej wobec trypsyny z wykorzystaniem izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego - a także analizie zebranych wyników. Brałem udział w przygotowaniu manuskryptu, odpowiadałem za korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 60%***

H.6. Karna N., ☒ **Dębowski D.**, Łęgowska A., Bąchor R., Szewczuk Z., Rolka K. *Peptide splicing in a double-sequence analogue of trypsin inhibitor SFTI-1 substituted in the P<sub>1</sub> positions by peptoid monomers* Biopolymers, 104, 206-212 (2015)

IF<sub>2015</sub> **2,248**, IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNI<sub>SW2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **0**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w planowaniu koncepcji pracy oraz nadzorowaniu i koordynowaniu prowadzonych badań. Odpowiadałem za pomiary aktywności inhibitorowej analogów SFTI-1 wobec trypsyny. Brałem udział w analizie zebranych wyników, przygotowaniu manuskryptu, odpowiadałem za korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 30%***

H.7. Karna N., ☒ Łęgowska A., Malicki S., **Dębowski D.**, Golik P., Gitlin A., Grudnik P., Władyka B., Brzozowski K., Dubin G., Rolka K. *Investigation of serine proteinase catalyzed peptide splicing in analogues of sunflower trypsin inhibitor 1 (SFTI-1)* ChemBioChem., 16, 2036-45 (2015)

IF<sub>2015</sub> **2,85**, IF<sub>2017</sub> **2,774**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,71**, punkty MNI<sub>SW2016</sub> **30**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **3**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współuczestnictwie w syntezie chemicznej i oczyszczaniu analogów SFTI-1, badaniach mechanizmu procesu splicingu peptydowego i analizie zebranych wyników. Brałem udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 20%***

H.8. ☒ Gitlin A., **Dębowski D.**, Karna N., Łęgowska A., Stirnberg M., Gütschow M., Rolka K. *Inhibitors of matriptase-2 based on trypsin inhibitor SFTI-1* ChemBioChem., 16, 1601-7 (2015)

IF<sub>2015</sub> **2,85**, IF<sub>2017</sub> **2,774**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,71**, punkty MNI<sub>SW2016</sub> **30**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **12**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w planowaniu koncepcji pracy, współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji analogów inhibitora SFTI-1, ich syntezie chemicznej i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec matryptazy-1 i matryptazy-2, a także analizie zebranych wyników. Brałem udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 40%***

H.9. ☒ Grudnik P., **Dębowski D.**, Łęgowska A., Malicki S., Golik P., Karna N., Rolka K., Dubin G. *Atomic resolution crystal structure of HV-BBI protease inhibitor from amphibian skin in complex with bovine trypsin* Proteins., 83, 582-9 (2015)

IF<sub>2015</sub> **2,499**, IF<sub>2017</sub> **2,274**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,328**, punkty MNI<sub>SW2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **1**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wyselekcjonowaniu peptydu HV-BBI(3-18) do badań, jego syntezie i oczyszczaniu. Brałem udział w analizie zebranych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 30%***

H.10. ✉**Dębowski D.**, Cichorek M., Lubos M., Wójcik S., Łęgowska A., Rolka K. *Non-covalent inhibitors of human 20S and 26S proteasome based on trypsin inhibitor SFTI-1* Biopolymers, 106, 685-96 (2016)

IF<sub>2016</sub> **1,908**, IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **1**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu i koordynowaniu prowadzonych badań, współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji inhibitorów, ich syntezie chemicznej i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec ludzkiego proteasomu 20S i 26S. Współuczestniczyłem w analizie zebranych wyników. Odpowiadałem za przygotowanie manuskryptu, korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłem kierownikiem (Sonata 1). **Mój wkład oceniam na: 50%***

H.11. Filipowicz M., Ptaszyńska N., Olkiewicz K., **Dębowski D.**, Ćwikłowska K., Burster T., Piłkuła M., Krzystyniak A., ✉Łęgowska A., Rolka K. *Spliced analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 and their application for tracing proteolysis and delivery of cargos inside the cells* Biopolymers, 108:e22988, doi: 10.1002/bip.22988 (2017)

IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **1**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współuczestnictwie w syntezie chemicznej i oczyszczaniu analogów SFTI-1, badaniach mechanizmu procesu splicingu peptydowego, interpretacji wyników. Przeprowadziłem pomiary aktywności inhibitorowej wobec tryptyny. Brałem udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 20%***

H.12. ✉Gitlin-Domagalska A., **Dębowski D.**, Łęgowska A., Stirnberg M., Okońska J., Gütschow M., Rolka K. *Design and chemical syntheses of potent matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds* Biopolymers, 108, e23031, doi: 10.1002/bip.23031 (2017)

IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **1**  
*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w planowaniu koncepcji pracy, współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji analogów inhibitora SFTI-1, ich syntezie chemicznej i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec matryptazy-1 i -2, plazminy, trombiny i tryptyny, a także analizie zebranych wyników. Brałem udział w przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 40%***

H.13. Lubos M., ✉**Dębowski D.**, Barcińska E., Meid A., Inkielewicz-Stepniak I., Burster T. Rolka K. *Inhibition of human constitutive 20S proteasome and 20S immunoproteasome with novel N-terminally modified peptide aldehydes and their anti-tumor activity* Biopolymers, e24100 doi: 10.1002/pep2.24100 (2018)

IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **0**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu i koordynowaniu prowadzonych badań, współuczestnictwie w projektowaniu sekwencji inhibitorów, ich syntezie chemicznej i oczyszczaniu, pomiarach ich aktywności inhibitorowej wobec ludzkiego proteasomu konstytutywnego 20S i immunoproteasomu 20S. Współuczestniczyłem w analizie zebranych wyników. Odpowiadałem za przygotowanie manuskryptu, korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. Opisane badania sfinansowane zostały przez NCN, w ramach projektu, którego byłem kierownikiem (Sonata 1). **Mój wkład oceniam na: 55%***

H.14. Gitlin-Domagalska A., Mangold M., ✉ **Dębowski D.**, Ptaszyńska N., Łęgowska A., Gütschow M., Rolka K. *Matriptase-2: Monitoring and Inhibiting its Proteolytic Activity* Future Med. Chem., <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0346> (2018)

IF<sub>2017</sub> **3,969**, IF<sub>5-cio letni</sub> **3,973**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **40**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **0**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaproponowaniu tematyki. Wraz z innymi autorami dokonywałem przeglądu literaturowego oraz analizy zebranego materiału. Jestem głównym autorem rozdziałów: „Serine proteases” , „Monitoring the activity of matriptase-2 with fluorogenic & chromogenic substrates” , „Matriptase-2 in cancer development & progression” oraz „Future perspective” uczestniczyłem również w pisaniu pozostałych. Odpowiadałem za korespondencję z edytorem oraz przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów. **Mój wkład oceniam na: 40%***

Wskaźniki bibliometryczne dotyczące prac **H.1 – H.14**:

- Sumaryczna wartość współczynnika wpływu IF<sub>5-cio letniego</sub> **37,775**
- Sumaryczna wartość współczynnika wpływu IF<sub>2017</sub> **36,854**
- Sumaryczna wartość współczynnika wpływu IF zgodnie z rokiem\* opublikowania **37,101**
- Sumaryczna wartość punktów MNiSW<sub>2016</sub> **390**
- Sumaryczna liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS **27**

\* Dla prac z roku 2018 podano IF z roku 2017

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Prezentowane osiągnięcie naukowe opisane zostało w 14. publikacjach [**H.1–H.14**], przedstawiających wykorzystanie wybranych peptydowych inhibitorów proteaz do realizacji różnych zadań badawczych. Niektóre z tych zadań można określić mianem klasycznych, polegających na projektowaniu nowych inhibitorów będących analogami dobrze znanych związków - głównie inhibitora trypsyny wydzielonego z nasion słonecznika (*ang. sunflower trypsin inhibitor, SFTI-1*) oraz inhibitorów obecnych w wydzielinie skórnej żab. Związki te otrzymano na drodze syntezy chemicznej, ich

aktywność inhibitorową mierzono wobec wybranych proteaz serynowych (bydłęcej  $\beta$ -trypsyny i  $\alpha$ -chymotrypsyny, ludzkiej  $\beta$ -trypsyny, matrypazy-1, matrypazy-2, plazminy, trombiny i elastazy leukocytarnej) oraz proteaz treoninowych (drożdżowego proteasomu 20S, ludzkiego konstytutywnego proteasomu 20S i immunoproteasomu 20S). Niektóre związki przebadano również pod kątem ich właściwości antydrobnoustrojowych wobec bakterii. Zrealizowane zostało również zadanie, w którym wspomniany SFTI-1 wraz z jego odpowiednio zaprojektowanymi analogami, posłużyły jako narzędzia umożliwiające poznanie i opisanie procesu nazwanego *splicingiem peptydowym* katalizowanym przez proteiny serynowe.

### **Wprowadzenie - proteazy serynowe i treoninowe**

Prawidłowe funkcjonowanie każdej żywej komórki wymaga obecności i aktywności enzymów proteolitycznych (proteaz) katalizujących hydrolityczny rozpad wiązań peptydowych w substratach białkowych i peptydowych. Ponad 2% ludzkich genów koduje proteazy i ich naturalne inhibitory [1]. Zgodnie z systemem klasyfikacji enzymów, ustanowionym w latach 50. XX wieku przez Międzynarodową Unię Biochemii i Biologii Molekularnej (*ang. International Union of Biochemistry and Molecular Biology* [2]), proteazy stanowią podklasę EC 3.4 w klasie hydrolaz EC 3. W ramach podklasy wyróżniane są podpodklasy, np. endopeptydazy (proteiny) serynowe EC 3.4.21, do których należą takie enzymy jak np. chymotrypsyna EC 3.4.21.1 i trypsyna EC 3.4.21.4.

Inny, bardziej szczegółowy sposób systematyzacji enzymów proteolitycznych zaprezentowany został w postaci bazy internetowej MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) w roku 1993 przez Rawlingsa i Barretta [3]. Proteazy podzielono na: klasy, klany, rodziny i podrodziny. Obecnie wyróżnianych jest 9 klas enzymów różniących się budową centrów aktywnych oraz odmiennym sposobem przeprowadzania hydrolizy. Są to proteazy aspartyłowe (A), cysteinowe (C), glutaminyłowe (G), asparaginyłowe (N), serynowe (S), treoninowe (T), metaloproteazy (M), enzymy prezentujące mieszany typ katalityczny (P) oraz enzymy o nieznanym mechanizmie działania (U). Poszczególne klasy dzielą się na klany skupiające enzymy spokrewnione filogenetycznie. Ich wspólną cechą jest posiadanie domen proteolitycznych mających podobną strukturę trzeciorzędową. Klany to zbiory rodzin, do których należą proteazy wykazujące znaczne podobieństwo struktur pierwszorzędowych do tzw. holotypu, czyli reprezentanta danej rodziny. Takim holotypem jest np. chymotrypsyna (S1.001) z rodziny S1, należącej do klanu PA, zawierającego proteiny serynowe i cysteinowe.

Ponad jedną trzecią wszystkich enzymów proteolitycznych stanowią proteazy serynowe [4]. Ich nazwa pochodzi od reszty Ser195 (numeracja zgodna z kolejnością reszt aminokwasowych w bydłęcej  $\alpha$ -chymotrypsynie), tworzącej wraz z His57 i Asp102 aparat katalityczny enzymu zwany triadą

---

<sup>1</sup> Puente X.S., et al. *A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems*. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, 33(Pt 2), 331-4.

<sup>2</sup> <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/>

<sup>3</sup> Rawlings N.D., Barrett A.J. *Evolutionary families of peptidases*. *Biochem. J.* **1993**, 290, 205–218

<sup>4</sup> Page M.J., Di Cera E. *Serine peptidases: classification, structure and function*. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2008**, 65, 1220-36.

katalityczną lub układem przenoszenia ładunku [5]. Grupa  $\beta$ -hydroksylowa Ser inicjuje hydrolityczny rozpad wiązania peptydowego w białkowym substracie. Proteazy serynowe funkcjonują w środowisku wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowym. Biorą udział w takich procesach fizjologicznych jak: trawienie pokarmów, krzepnięcie krwi, fibrynoliza, odpowiedź hormonalna i immunologiczna oraz zapłodnienie i rozwój komórki jajowej. Znacznie mniejszą grupę stanowią proteazy treoninowe wykorzystujące grupy  $\beta$ -hydroksylowe reszt Thr do ataku na karbonylowy atom węgla wiązania peptydowego substratu. Jej najlepiej poznanym przedstawicielem jest proteasom 20S występujący u ssaków głównie w postaci trzech form: proteasomu konstytutywnego, immunoproteasomu i tymoproteasomu [6]. Najlichnieszym z nich jest proteasom konstytutywny obecny niemal w każdej komórce eukariotycznej. Jego rolą jest usuwanie większości białek wewnątrzkomórkowych, m.in. białek posiadających mutacje lub wadliwe sfałdowanych, których nadmierne nagromadzenie mogłoby doprowadzić do zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy), a także białek sygnałowych, regulatorowych i wielu innych, które spełniły już swoje zadania. Ekspresja immunoproteasomu następuje głównie w odpowiedzi na działanie stymulujące cytokin prozapalnych. Enzym ten hydrolizuje białka wirusowe i bakteryjne, które przedostały się do wnętrza komórki zdrowej organizmu lub zostały pochłonięte przez komórki prezentujące antygeny, np. przez komórki dendrytyczne. Zadaniem immunoproteasomu jest wytwarzanie antygenów prezentowanych następnie komórkom układu odpornościowego (np. limfocytom T cytotoksycznym) poprzez białka głównego układu zgodności tkankowej typu I (MHC-I). Ostatni z wymienionych, tymoproteasom, występuje w komórkach nabłonkowych kory grasicy, gdzie uczestniczy w pozytywnej selekcji tymocytów.

Ze względu na fakt, że proteazy funkcjonują w otoczeniu bogatym w białka, ich aktywność proteolityczna podlegać musi ścisłej kontroli. Istnieje kilka rodzajów zabezpieczeń chroniących przed niepożądaną proteolizą, począwszy od regulacji ekspresji genów kodujących enzymy, a skończywszy na usuwaniu proteaz w lizosomach lub poprzez szlak ubiquityna-proteasom. Jednym z ważniejszych regulatorów aktywności proteaz są ich naturalne inhibitory. W przypadku inhibitorów proteaz serynowych, wyróżnić można trzy główne grupy różniące się mechanizmem oddziaływania z enzymami: inhibitory kanoniczne, niekanoniczne i serpiny [7]. W przygotowanej przeze mnie pracy przeglądowej **H.2** opisane zostały wybrane peptydowe i białkowe inhibitory pochodzenia zwierzęcego i roślinnego.

### **Inhibitor trypsyny wydzielony z nasion słonecznika SFTI-1**

W roku 1999 opisany został po raz pierwszy niewielki bicykliczny peptyd pochodzenia naturalnego, wykazujący bardzo silne właściwości inhibitorowe wobec niektórych proteinaz

---

<sup>5</sup> Hedstrom L. *Serine protease mechanism and specificity*. Chem. Rev. **2002**, 102, 4501-24.

<sup>6</sup> Borissenko L., Groll M. *20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development*. Chem. Rev. **2007**, 107, 687-717.

<sup>7</sup> Krowarsch D., et al. *Canonical protein inhibitors of serine proteases*. Cell. Mol. Life. Sci. **2003**, 60, 2427-44.



serynowych, w szczególności wobec trypsyny [8]. Ponieważ inhibitor ten wydzielony został z nasion słonecznika, otrzymał nazwę SFTI-1 (w niniejszym referacie będzie on oznaczany numerem **1**) będącą akronimem angielskiego wyrażenia - *sunflower trypsin inhibitor-1*. SFTI-1 zbudowany jest zaledwie z 14 reszt aminokwasowych połączonych ze sobą w sposób ciągły, nieprzerwany (rys. 1A). Jego zwartą i sztywną strukturę przestrzenną stabilizuje układ kilku wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, jeden mostek disulfidowy, a także wiązanie peptydowe o konfiguracji *cis* między resztami aminokwasowymi Ile7 i Pro8 [9]. Mostek ten wydziela w obrębie struktury SFTI-1 dwie pętle spełniające odmienne funkcje. Większa z nich, zbudowana z dziewięciu reszt aminokwasowych, to pętla wiążąca (*ang. binding loop*) odpowiedzialna za bezpośredni kontakt inhibitora z enzymem. Jej kształt jest typowy dla inhibitorów kanonicznych blokujących proteazy według mechanizmu standardowego opisanego w roku 1980 przez Laskowskiego Jr. i Kato [10]. Centralną część tej pętli stanowi miejsce reaktywne (*ang. reactive site*). W przypadku SFTI-1 jest to wiązanie peptydowe między Lys5 i Ser6 ulegające katalizowanej enzymatycznie, powolnej hydrolizie oraz następującej po niej resyntezie. Miejsce to oznaczane jest według obowiązującej nomenklatury jako P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' , gdzie P<sub>1</sub> to reszta aminokwasowa leżąca bliżej N-końca inhibitora (Lys5 w SFTI-1), natomiast P<sub>1</sub>' bliżej C-końca (Ser6; więcej informacji na temat wspomnianej nomenklatury znajduje się na rys. 1B) [11]. Mniejsza pętla złożona z pięciu reszt aminokwasowych tworzących  $\beta$ -zgięcie to tzw. pętla cykliczna. Pierwotnie przypisywano jej rolę strukturotwórczą, jednakże szybko okazało się, że jej rozcięcie nie powoduje istotnego spadku aktywności inhibitorowej [9]. Otrzymany w ten sposób peptyd monocykliczny (**2**), będący analogiem natywnego SFTI-1, posiada mostek disulfidowy oraz nowe wolne grupy funkcyjne:  $\alpha$ -aminową N-końcowej reszty Gly i  $\alpha$ -karboksylową C-końcowej reszty Asp. Geometria przestrzenna jego pętli wiążącej, jak również sposób oddziaływania z enzymem, są takie same jak w natywnym SFTI-1. W komunikacie opublikowanym w roku 2002, grupa badawcza prof. Krzysztofa Rolki z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, przedstawiła niemal identyczne wartości stałych asocjacji ( $K_a$ ) dla otrzymanych w warunkach *in vitro* kompleksów bydlęcej  $\beta$ -trypsyny z natywnym SFTI-1 (**1**) oraz z jego monocyklicznym analogiem (**2**) [12]. Wartości te, wynoszące odpowiednio  $1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  i  $9,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , świadczyły o jednakowym poziomie aktywności inhibitorowej obu peptydów wobec  $\beta$ -trypsyny.

---

<sup>8</sup> Luckett S., et al. *High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds*. J. Mol. Biol. **1999**, 290, 525-33.

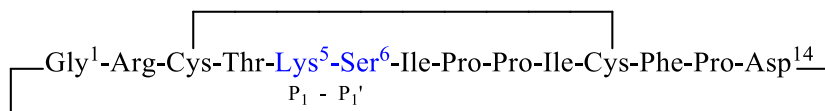
<sup>9</sup> Korsinczyk M.L., et al. *Solution structures by 1H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant*. J. Mol. Biol. **2001**, 311, 579-91.

<sup>10</sup> Laskowski M. Jr, Kato I. *Protein inhibitors of proteinases*. Annu. Rev. Biochem. **1980**, 49, 593-626.

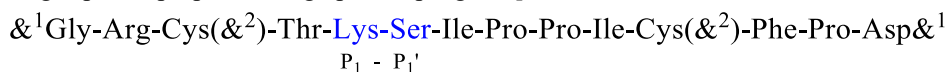
<sup>11</sup> Schechter I., Berger A., *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **1967**, 27, 157-162.

<sup>12</sup> Zabłotna E., et al. *Chemical synthesis and kinetic study of the smallest naturally occurring trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds and its analogues*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **2002**, 292, 855-9.

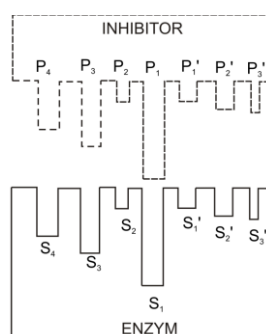
(A)



lub według zapisu zaproponowanego przez Spenglera [13]:



(B)



Rys. 1. (A) Struktura inhibitora SFTI-1; (B) Schemat oddziaływania enzym-substrat. Reszty tworzące miejsce reaktywne oznaczono jako P<sub>1</sub> i P<sub>1</sub>'. Kolejne reszty w sekwencji peptydu, leżące w kierunku jego N-końca, oznaczane są jako P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> itd., natomiast reszty leżące w kierunku C-końca, jako P<sub>2</sub>', P<sub>3</sub>' itd. Reszty te oddziałują z odpowiednimi kieszeniami substratowymi obecnymi na powierzchni enzymu określanymi jako S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> itd. oraz S<sub>1</sub>', S<sub>2</sub>', S<sub>3</sub>' itd.

Do dziś grupa prof. Rolki, którą od roku 2005 mam przyjemność współtworzyć, opublikowała łącznie 26 prac naukowych (jestem współautorem 18 z nich), opisujących realizację różnych celów badawczych przy użyciu SFTI-1 i jego analogów. Warto podkreślić, że ze względu na swój niewielki rozmiar, a także zwartą i sztywną budowę przestrzenną, SFTI-1 traktowany jest jako niezwykle atrakcyjny związek wyjściowy do projektowania zarówno nowych, silnych i wysoce selektywnych inhibitorów blokujących różne proteazy (np. katepsynę G [14,15,16] i kalikreinę [17,18]), jak również, peptydów o różnych właściwościach biologicznych, takich jak agon receptora melanokortyny (MC1R) [19] i antagonist receptora bradykininy B<sub>1</sub> [20] lub peptyd identyfikujący i neutralizujący wybrane

<sup>13</sup> Spengler J., et al. *Abbreviated nomenclature for cyclic and branched homo- and hetero-detic peptides*. J. Pept. Sci., **2005**, 65, 550-5.

<sup>14</sup> Swedberg J.E., et al. *Design of potent and selective cathepsin G inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor-1 scaffold*. J. Med. Chem. **2017**, 60, 658-667.

<sup>15</sup> Łęgowska A., et al. *Introduction of non-natural amino acid residues into the substrate-specific P1 position of trypsin inhibitor SFTI-1 yields potent chymotrypsin and cathepsin G inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. **2009**, 17, 3302-7

<sup>16</sup> Łęgowska A., et al. *Selection of peptomeric inhibitors of bovine alpha-chymotrypsin and cathepsin G based on trypsin inhibitor SFTI-1 using a combinatorial chemistry approach*. Mol. Divers. **2010**, 14, 51-8.

<sup>17</sup> Chen W., et al. *Tissue kallikrein inhibitors based on the sunflower trypsin inhibitor scaffold - a potential therapeutic intervention for skin diseases*. PLoS One. **2016**, 11(11):e0166268.

<sup>18</sup> de Veer S.J., et al. *Exploring the active site binding specificity of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) guides the design of new peptide substrates and inhibitors*. Biol. Chem. **2016**, 397, 1237-1249.

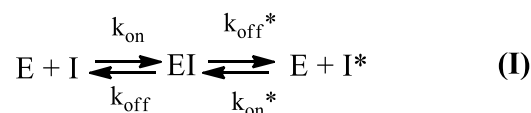
<sup>19</sup> Durek T., et al. *Development of novel melanocortin receptor agonists based on the cyclic peptide framework of sunflower trypsin inhibitor-1*. J. Med. Chem. **2018**, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00170.

<sup>20</sup> Qiu Y., et al. *An orally active bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonist engineered as a bifunctional chimera of Sunflower Trypsin Inhibitor*. J. Med. Chem. **2017**, 60, 504-510.

autoprzeciwiała powiązane z reumatoidalnym zapaleniem stawów [21]. W wielu z wymienionych powyżej prac, SFTI-1 wykorzystywany był jako związek bazowy w procesie nazywanym w języku angielskim - *molecular grafting* - co w wolnym tłumaczeniu oznacza *przeszczepianie molekularne*. Koncepcja ta polega na zastąpieniu reszt aminokwasowych tworzących jedną z pętli natywnego (1) lub monocyklicznego (2) SFTI-1 przez krótki fragment peptydowy posiadający określone właściwości biologiczne. Zabieg ten ma na celu otrzymanie nowego, biologicznie czynnego związku o wysokiej odporności na działanie enzymów proteolitycznych.

### Mechanizm działania kanonicznych inhibitorów proteinaz serynowych

Inhibitor kanoniczny łączy się z określoną proteinazą serynową w sposób podobny do typowego substratu białkowego, nazywany mechanizmem standardowym [10]. Różnice polegają na tym, że utworzony kompleks enzymu i inhibitora (EI) jest zdecydowanie trwalszy niż przejściowy kompleks Michaelisa enzymu i substratu, a także, że oddziaływanie inhibitora z enzymem jest procesem odwracalnym (schemat I). Wiązanie reaktywne P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' inhibitora może zostać zhydrolizowane przez enzym, choć proces ten przebiega znacznie wolniej niż w przypadku hydrolizy wiązania peptydowego w substracie. Ponadto, połączenie to może zostać odtworzone na drodze resyntezy katalizowanej przez ten sam enzym. Zablokowanie enzymu może więc nastąpić również od strony inhibitora zmodyfikowanego ze zhydrolizowanym wiązaniem reaktywnym, choć szybkość tworzenia kompleksu (EI) jest wówczas wyraźnie niższa niż w przypadku działania inhibitora niezmodyfikowanego (dziewiczego). Przykładowo, stosunek wartości stałych tworzenia  $k_{on}/k_{on}^*$  i rozpadu  $k_{off}/k_{off}^*$  wynosić może nawet milion, jeśli enzymem jest chymotrypsyna albo świńska elastaza trzustkowa, lub od 100 do 10 w przypadku bydlęcej  $\beta$ -trypsyny [22].



gdzie: E - enzym; I - inhibitor dziewiczy (*ang. virgin*) z nienaruszonym wiązaniem P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'; EI - stabilny kompleks enzym-inhibitor; I\* - inhibitor zmodyfikowany za zhydrolizowanym wiązaniem P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>';  $k_{on}$  i  $k_{on}^*$  - drugorzędowe stałe szybkości tworzenia kompleksu, odpowiednio z inhibitorem dziewiczym i zmodyfikowanym;  $k_{off}$  i  $k_{off}^*$  - pierwszorzędowe stałe szybkości rozpadu kompleksu do wolnego enzymu i inhibitora dziewiczego lub zmodyfikowanego.

W większości przypadków, w pH obojętnym lub bliskim obojętnego, stała szybkości  $k_{off}$  jest dużo wyższa niż  $k_{off}^*$ . Stąd też kompleks (EI) dysocjuje głównie w kierunku wolnego enzymu (E) i inhibitora dziewiczego (I). Równowaga ustala się wówczas pomiędzy wolnym enzymem, wolnym inhibitorem dziewiczym i stabilnym kompleksem enzym-inhibitor, co wyraża stała asocjacji  $K_a$ .

<sup>21</sup> Gunasekera S., et al. *Stabilized cyclic peptides as scavengers of autoantibodies: neutralization of anti-citrullinated protein/peptide antibodies in rheumatoid arthritis*. ACS Chem. Biol. **2018**, doi: 10.1021/acscchembio.8b00118.

<sup>22</sup> Laskowski M., Qasim M.A. *What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?* Biochim. Biophys. Acta. **2000**, 1477, 324-37.

$$K_a = \frac{[EI]}{[E] \times [I]} \quad \text{(II)}$$

Jeśli przyjąć, że:

$$\begin{aligned} [EI] &= [E_0] - [E] \\ [I] &= [I_0] - [EI] = [I_0] - [E_0] + [E] \end{aligned}$$

gdzie: [E] - równowagowe stężenie wolnego enzymu; [E<sub>0</sub>] - początkowe stężenie enzymu; [I] - równowagowe stężenie wolnego inhibitora; [I<sub>0</sub>] - początkowe stężenie inhibitora; [EI] - równowagowe stężenie stabilnego kompleksu enzym-inhibitor;

to równowagowa stała asocjacji  $K_a$  będzie miała postać:

$$K_a = \frac{[E_0] - [E]}{([I_0] - [E_0] + [E]) \times [E]} \quad \text{(III)}$$

W celu wyznaczenia wartości stałej  $K_a$  ustalić należy początkowe stężenie enzymu [E<sub>0</sub>] i inhibitora [I<sub>0</sub>] oraz równowagowe stężenie wolnego enzymu [E]. Równanie (III) jest równaniem kwadratowym ze względu na [E], z jednym rozwiązaniem mającym sens fizyczny, które po przekształceniu przyjmuje postać:

$$E = \frac{1}{2} \left( [E_0] - [I_0] - K_a^{-1} + \sqrt{([E_0] + [I_0] + K_a^{-1})^2 - 4[E_0][I_0]} \right) \quad \text{(IV)}$$

Stosowana w naszej grupie badawczej procedura wyznaczenia stałej asocjacji  $K_a$  zaproponowana została przez Greena i Worka [23], a następnie rozwinięta przez M. Laskowskiego Jr. oraz jego współpracowników [24,25]. Polega ona na stopniowym dodawaniu roztworu inhibitora [I<sub>0</sub>] do enzymu [E<sub>0</sub>] znajdującego się w buforze pomiarowym. Po odpowiednim czasie inkubacji wyznaczane jest stężenie wolnego enzymu [E]. Odbywa się to najczęściej poprzez pomiar spadku jego aktywności wobec odpowiednio dobranego syntetycznego substratu chromo- lub fluorogenicznego. Hydroliza substratu powoduje uwalnianie produktu będącego odpowiednio: chromoforem lub fluoroforem, co monitorowane jest za pomocą spektrofotometru UV/Vis. Podczas wyznaczenia wysokich wartości stałych asocjacji dla silnych inhibitorów ( $K_a \geq 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) spełnione muszą zostać następujące warunki:

$$(A) \quad 2 < K_a \times E_0 < 50$$

$$(B) \quad [I_0] = 0 \div 2 [E_0]$$

Spełnienie warunku (A) nie jest konieczne w trakcie wyznaczenia niskich stałych asocjacji charakteryzujących słabe inhibitory ( $K_a < 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), gdyż wymagałoby to użycia relatywnie wysokich stężeń enzymu ( $E_0 > 10^{-6} \text{ M}$ ). Skutkiem tego byłaby zbyt gwałtowna hydroliza substratu powodująca nieliniowy przyrost absorbancji/fluorescencji w czasie.

<sup>23</sup> Green N.M., Work E. *Pancreatic trypsin inhibitor. I. Preparation and properties*. *Biochem. J.* **1953**, 54, 347.

<sup>24</sup> Empie M.W., Laskowski M. Jr. *Thermodynamics and kinetics of single residue replacements in avian ovomucoid third domains: effect on inhibitor interactions with serine proteinases*. *Biochemistry*, **1982**, 21, 2274.

<sup>25</sup> Park S.J. *Effect of amino acid replacement in ovomucoid third domains upon their association with serine proteinases*. Rozprawa doktorska, Purdue University USA **1985**.

Kolejnym niezwykle ważnym aspektem jest odpowiednio dobrany czas inkubacji potrzebny do osiągnięcia równowagi w układzie: wolny enzym [E], wolny inhibitor [I] i kompleks enzym-inhibitor [EI]. Mieszanie enzymu z inhibitorem inkubuje się zwykle przez czas nie krótszy niż dziesięciokrotność czasu połowkowego ( $t_{1/2}$ ) obliczonego wedle wzoru:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_{on} \times E_0}$$

gdzie:  $E_0$  - początkowe stężenie enzymu,  $k_{on}$  - drugorzędową stałą szybkości tworzenia kompleksu EI.

Dane uzyskane z przeprowadzonego eksperymentu wykorzystuje się w procedurze obliczeniowej przeprowadzanej w oparciu o równanie **IV** oraz:

$$E = \frac{1}{2} \left( [E_0] - F[I_0] - K_a^{-1} + \sqrt{([E_0] + F[I_0] + K_a^{-1})^2 - 4[E_0]F[I_0]} \right) \quad (\mathbf{V})$$

W powyższym równaniu występuje współczynnik równomolowości  $F$ , który wyraża stechiometrię oddziaływania enzymu z inhibitorem. W przypadku inhibitorów posiadających jedną pętlę wiążącą (takich jak SFTI-1) łączących się w danym momencie tylko z jedną cząsteczką enzymu, obliczona wartość tego współczynnika powinna mieścić się w przedziale od 0,9 do 1,1. Ważne jest również to, aby wyznaczona w trakcie eksperymentu wartość całkowitego stężenia enzymu  $[E_0]$  nie różniła się o więcej niż 2% od wartości obliczonej ze wzoru **(V)**. Opisana powyżej procedura wyznaczania wartości stałych asocjacji  $K_a$  wykorzystana została przeze mnie w pracach z cyklu habilitacyjnego: **H.1**, **H.3** i **H.4** oraz w pracach spoza cyklu: **A.1 – A.4**, **B.1 – B.3**.

### **Badanie kompleksu EI za pomocą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego**

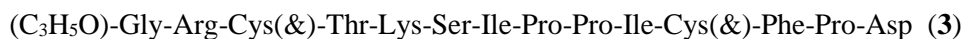
W publikacji **H.5** zaprezentowany został inny sposób wyznaczania wartości stałej asocjacji  $K_a$ , niewymagający stosowania substratów chromo- lub fluorogenicznych. Związki tego typu nie tylko podnoszą koszt badań, ale mogą też wpływać na tworzenie i stabilność kompleksu inhibitora z enzymem. Dzieje się to zwłaszcza wtedy, gdy analizowany model inhibicji ma charakter kompetycyjny, w którym substrat i inhibitor rywalizują ze sobą o dostęp do tego samego miejsca aktywnego enzymu. Dodatkową wadą metod opartych na pomiarach spektrofotometrycznych (metod kolorymetrycznych) jest ich niska użyteczność, bądź nawet jej brak, w przypadku roztworów, w których pojawia się zmętnienie. Alternatywą może być wykorzystanie izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, ITC (*ang. Isothermal Titration Calorimetry*). Jest to metoda termoanalityczna, oparta na prowadzonych w stałej temperaturze pomiarach efektów energetycznych towarzyszących oddziaływaniom zachodzącym pomiędzy reagentami [26].

Użyteczność metody ITC potwierdziłem we współpracy z **dr. Dariuszem Wyrzykowskim** z Wydziału Chemii UG. Do buforu pomiarowego zawierającego bydlęcą  $\beta$ -trypsynę dodawano stopniowo równe porcje roztworu inhibitora. Był nim natywny SFTI-1 (**1**) lub jeden z dwóch jego

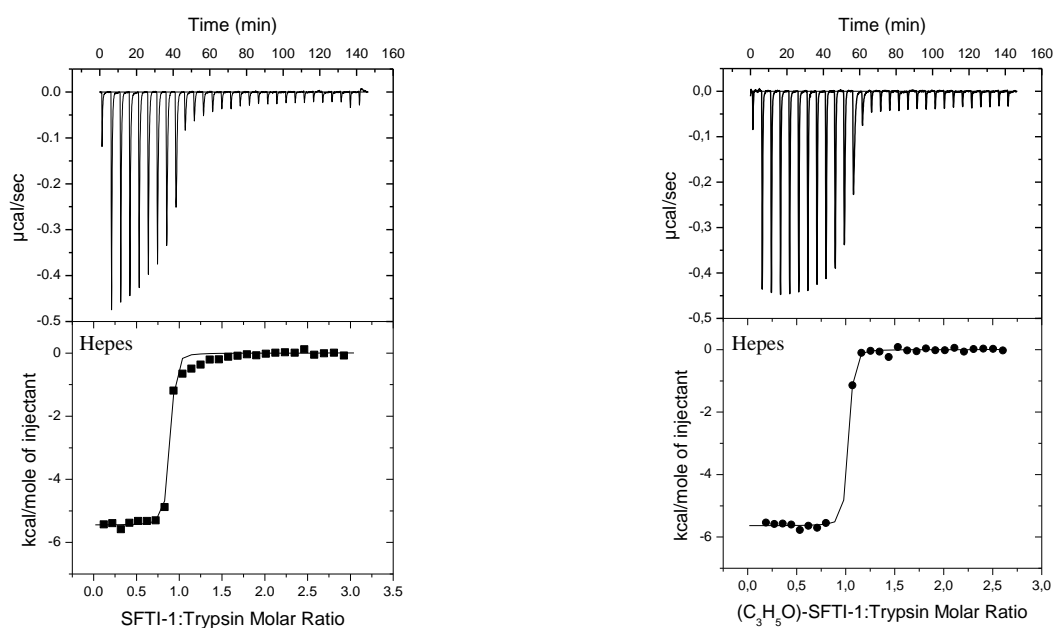
---

<sup>26</sup> Falconer R.J. *Applications of isothermal titration calorimetry - the research and technical developments from 2011 to 2015*. J. Mol. Recognit. **2016**, 10, 504-15.

monocyklicznych analogów posiadających mostek disulfidowy, różniących się długością *N*-końcowego hydrofobowego łańcucha węglowego:



Pomiar energii uwalnianej w trakcie takiego miareczkowania kalometrycznego (rys. 2) umożliwił wyznaczenie stałej tworzenia kompleksu  $K_a$ , określenie stechiometrii oraz wartości takich funkcji termodynamicznych jak: zmiany entalpii swobodnej ( $\Delta G$ ), zmiany entalpii ( $\Delta H$ ) oraz zmiany entropii ( $\Delta S$ ).



Rys. 2. Termogramy i krzywe miareczkowania kalometrycznego dla bydlęcej  $\beta$ -trypsyny oraz natywnego SFTI-1 (**1**) i monocyklicznego  $(C_3H_5O)$ -SFTI-1 (**3**). Badania przeprowadzone zostały na izotermicznym kalymetrze miareczkującym AutoITC firmy MicroCal (USA).

Porównanie wartości stałych  $K_a$ , jak również  $\Delta G$  wskazuje, że natywny SFTI-1 (**1**) oraz oba jego analogi są jednakowo silnymi inhibitorami trypsyny. Rodzaj *N*-końcowego łańcucha nie wpływa więc w żadnym stopniu na blokowanie enzymu. Ponadto, ujemne wartości  $\Delta H$  oraz obserwowany wzrost entropii ( $T\Delta S$ ) układu dowodzą, że za trwałość powstającego kompleksu odpowiadają oba czynniki: entalpowy i entropowy. **Zaprezentowane badania dowiodły wysokiej użyteczności metody ITC w analizie oddziaływań między inhibitorem i enzymem.** Metoda ITC może więc być stosowana zarówno jako uzupełnienie rutynowo stosowanej przez mnie metody kolorymetrycznej, lub - w szczególnych przypadkach - jako jej zamiennik.

### Otrzymanie nowych, niekowalencyjnych inhibitorów matryptazy-2

Matryptaza-2 (MT2) jest enzymem proteolitycznym kodowanym przez gen *TMPRSS6* (*ang. transmembrane protease serine 6*). Należy do rodziny transmembranowych proteinaz serynowych typu

2 (TTPPs, *ang. type II transmembrane serine proteases*) [27] i wraz z poliserazą-1 oraz dwiema homologicznymi proteinazami, matryptazą-1 (MT1) i matryptazą-3, tworzą podrodzinę matryptaz. MT2 zakotwiczona jest w błonie komórkowej za pomocą *N*-końcowego hydrofobowego fragmentu zwanego domeną transmembranową. Pozostałe domeny, w tym *C*-końcowa domena proteolityczna o specyficzności trypsynopodobnej, znajdują się po zewnętrznej stronie komórki. Zainteresowanie MT2 wynika z jej udziału w procesach mających na celu utrzymanie prawidłowego poziomu żelaza w organizmie [28]. Aby lepiej zrozumieć rolę MT2, wspomnieć najpierw należy o hepcydynie - hormonie peptydowym pełniącym kluczową funkcję w regulacji homeostazy żelaza. Ten 25-cio aminokwasowy peptyd, syntezowany w hepatocytach i uwalniany do krwioobiegu, inicjuje degradację białka błonowego zwanego ferroportyną [29]. Białko to odpowiada za transport jonów żelaza ( $Fe^{2+}$ ) z wnętrza komórek jelita cienkiego (enterocytów) do krwi, a w makrofagach, bierze udział w odzyskiwaniu żelaza ze sfagocytowanych erytrocytów. Przyłączenie hepcydyny do ferroportyny powoduje fosforylację jej reszt tyrozyny, co skutkuje internalizacją i degradacją w lizosomach. Usuwanie ferroportyny obniża stężenie jonów żelaza we krwi. Na poziom hepcydyny wpływa pośrednio MT2, choć szczegółowy mechanizm tego procesu nie został jeszcze poznany. Przez długi czas panowało przekonanie, że głównym zadaniem MT2 jest hydroliza białka błonowego zwanego hemojuwelina (HJV) [30]. HJV jest koreceptorem białek morfogenetycznych kości (BMP, *ang. bone morphogenetic proteins*) należących do cytokin z rodziny transformującego czynnika wzrostu (*ang. transforming growth factor beta*). Białka te, a w szczególności jedno z nich, BMP6, wiążąc się ze swoimi receptorami na powierzchni komórek uruchamiają szlak sygnałowy regulujący ekspresję genu hepcydyny *Hamp* (*ang. hepcidin antimicrobial peptide*). HJV powoduje wzmocnienie przekazywanego sygnału, prowadząc do intensywniejszej ekspresji *Hamp*. Degradacja HJV obniża poziom hepcydyny, a tym samym podwyższa stężenie jonów żelaza we krwi. Niedobór MT2 w organizmie, spowodowany przykładowo mutacją genu kodującego tę proteinazę, skutkuje wzrostem poziomu hepcydyny, czego następstwem jest spadek stężenia żelaza. Może to doprowadzić do rozwoju choroby zwanej zespołem niedokrwistości syderopenicznej odpornej na żelazo (IRIDA, *ang. iron-refractory iron-deficiency anemia*) [31]. Podobne wnioski płyną z badań nad myszami pozbawionymi genu kodującego MT2 [32] lub wytwarzającymi skróconą, nieaktywną proteolitycznie formę tego enzymu [33].

---

<sup>27</sup> Velasco G., et al. *Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins*. J. Biol. Chem. **2002**, 277, 37637–37646.

<sup>28</sup> Muckenthaler M.U., et al. *A red carpet for iron metabolism*. Cell **2017**, 168, 344–361.

<sup>29</sup> Ramsay A.J., et al. *Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis*. Haematologica, **2009**, 94, 840–849

<sup>30</sup> Silvestri L. et al. *The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin*. Cell. Metab. **2008**, 8, 502–511.

<sup>31</sup> Finberg K.E., et al. *Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)*. Nat. Genet. **2008**, 40, 569–571

<sup>32</sup> Folgueras A.R., et al. *Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis*. Blood **2008**, 112, 2539–45.

<sup>33</sup> Du X., et al. *The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency*. Science **2008**, 320, 1088–92.

Niektóre doniesienia literaturowe kwestionują opisany powyżej mechanizm oparty na degradacji HJV przez MT2. Stwierdzono na przykład, że u myszy bez genu kodującego MT2, poziom HJV był niższy niż u myszy posiadających ten gen [34]. Okazało się, że u myszy pozbawionych genu kodującego HJV, wzrost stężenia egzogennej MT2 w wątrobie spowodował niezależny od HJV spadek ekspresji genu kodującego hepcydynę [35]. Pokazano również, że substratami hydrolizowanymi przez MT2 jest wiele innych białek uczestniczących w regulacji produkcji hepcydyny. Więcej szczegółowych informacji dotyczących MT2, jej roli w organizmie, jej inhibitorów i substratów chromogenicznych znaleźć można w pracy przeglądowej **H.14**.

Niezależnie od przedstawionych powyżej rozbieżności, udział MT2 w utrzymaniu właściwego poziomu żelaza w ustroju jest niepodważalny i enzym ten rozpatrywany jest obecnie jako potencjalny cel molekularny [36,37]. Silne i selektywne inhibitory tej proteiny mogłyby stać się narzędziami umożliwiającymi szczegółowe poznanie mechanizmu kształtowania się homeostazy żelaza, a także zostać wykorzystane w poszukiwaniach nowych terapii chorób objawiających się nadmiernym stężeniem tego pierwiastka w organizmie np. hemochromatozy dziedzicznej. W pracach **H.8** i **H.12** opisane zostały badania nad inhibitorami peptydowymi blokującymi MT2 (a ściślej rzecz ujmując, hamującymi jej domenę katalityczną), zaprojektowanymi w oparciu o strukturę SFTI-1. Ponadto, w oparciu o otrzymane wyniki powstała rozprawa doktorska autorstwa Agaty Gitlin-Domagalskiej, pt. *Designing and chemical syntheses of selective matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds* (2016), w której pełniłem funkcję **promotora pomocniczego**.

**Jednym z moich najważniejszych osiągnięć naukowych było uzyskanie dwóch wysoce selektywnych inhibitorów MT2, hamujących ten enzym w warunkach *in vitro* 176- (peptyd 11 w tabelach 1 i 2) i 228-razy (peptyd 16) mocniej niż homologiczną MT1. Ponadto otrzymane zostały dwa inhibitory MT2 charakteryzujące się bardzo niskimi wartościami stałych inhibicji  $K_i$ , wynoszącymi 15 i 19 nM (peptydy 33 i 15). Według mojej wiedzy, oba związki są najsilniejszymi peptydowymi inhibitorami MT2 spośród wszystkich dotychczas opisanych w literaturze.**

Oba enzymy, MT1 i MT2, choć bardzo podobne do siebie, pełnią zupełnie inne funkcje. W zdrowym organizmie MT1 obecna jest przede wszystkim na powierzchni komórek nabłonkowych, a także monocytów, limfocytów B i komórek tucznych [38]. Bierze udział m.in. w degradowaniu białek macierzy zewnątrzkomórkowej, co wpływa na kształtowanie się i utrzymywanie integralności tkanek nabłonkowych. Mutacje w obrębie genu kodującego MT1 łączone są np. z chorobami skóry z grupy

---

<sup>34</sup> Finberg K.E., et al. *Down-regulation of Bmp/Smad signaling by Tmprss6 is required for maintenance of systemic iron homeostasis*. Blood **2010**, 115, 3817-26.

<sup>35</sup> Wahedi M., et al. *Matriptase-2 suppresses hepcidin expression by cleaving multiple components of the hepcidin induction pathway*. J. Biol. Chem. **2017**, 292, 18354-18371.

<sup>36</sup> Sisay M.T., et al. *Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2*. J. Med. Chem. **2010**, 53, 5523-35.

<sup>37</sup> Maurer E., et al. *Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 (HAI-2) modulates hepcidin expression by inhibiting the cell surface protease matriptase-2*. Biochem. J. **2013**, 450, 583-93.

<sup>38</sup> Bugge T.H., et al. *Type II transmembrane serine proteases*. J. Biol. Chem. **2009**, 284, 23177-81.



rybiej łuski (*lac. ichthyosis*) [39]. Zainteresowanie MT1 wynika jednak z jej podwyższonej aktywności towarzyszącej rozwojowi nowotworów pochodzenia nabłonkowego, m.in. piersi, prostaty, jajnika [40]. Ponadto istnieją dowody na udział MT1 w procesie replikacji wirusa grypy [41], rozwoju chorób zwyrodnieniowych stawów oraz miażdżycy tętnic [42].

Wspomniane wyżej inhibitory MT2 wyłoniono spośród 40-tu zsyntezowanych analogów SFTI-1 (tabela 1), zaprojektowanych w oparciu o następujące dane: (i) struktury pierwszorzędowe substratów syntetycznych MT2 [43], w tym substratu wykazującego efekt rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji FRET (*ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer*) otrzymanego w naszej Katedrze na drodze chemii kombinatorycznej [44]; (ii) dane literaturowe dotyczące znanych inhibitorów MT1 otrzymanych na bazie struktury pierwszorzędowej SFTI-1 [45,46,47,48]; oraz (iii) wyniki modelowania homologicznego, w trakcie którego, korzystając z dostępnej struktury krystalicznej MT1, wygenerowano model domeny katalitycznej MT2 [36,49]. Modelowanie przeprowadzone zostało przez współpracującą z nami grupę **prof. Michaela Gütschowa** z Uniwersytetu Fryderyka Wilhelma w Bonn. Stamtąd również pochodził stosowany w badaniach *in vitro* preparat zawierający domenę katalityczną MT2.

---

<sup>39</sup> Alef T., et al. *Ichthyosis, follicular atrophoderma, and hypotrichosis caused by mutations in ST14 is associated with impaired profilaggrin processing*. J. Invest. Dermatol. **2009**, 129, 862-9.

<sup>40</sup> Uhland K. *Matriptase and its putative role in cancer*. Cell. Mol. Life Sci. **2006**, 63, 2968-78.

<sup>41</sup> Baron J., et al. *Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses*. J. Virol. **2013**, 87, 1811-20.

<sup>42</sup> Seitz I., et al. *Membrane-type serine protease-1/matriptase induces interleukin-6 and -8 in endothelial cells by activation of protease-activated receptor-2: potential implications in atherosclerosis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **2007**, 27, 769-75.

<sup>43</sup> Beliveau F., et al. *Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides*. FEBS J. **2009**, 276, 2213-2226

<sup>44</sup> Wysocka M., et al. *Substrate specificity of human matriptase-2*. Biochimie **2014**, 97, 121-127.

<sup>45</sup> Avrutina O., et al. *Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redox-stable SFTI-1 variants at near physiological pH*. Org. Biomol. Chem. **2012**, 10, 7753-7762.

<sup>46</sup> Fittler H., et al. *Combinatorial tuning of peptidic drug candidates: high-affinity matriptase inhibitors through incremental structure-guided optimization*. Org. Biomol. Chem. **2013**, 11, 1848-1857

<sup>47</sup> Fittler H., et al. *Potent inhibitors of human matriptase-1 based on the scaffold of sunflower trypsin inhibitor*. J. Pept. Sci. **2014**, 20, 415-420.

<sup>48</sup> Quimbar P., et al. *High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors*. J. Biol.Chem. **2013**, 288, 13885-13896.

<sup>49</sup> Maurer E., et al. *Insights into matriptase-2 substrate binding and inhibition mechanisms by analyzing active-site-mutated variants*. ChemMedChem. **2012**, 7, 68-72.

Tabela 1. Struktury pierwszorzędowe peptydowych i peptomerycznych inhibitorów matryptyazy-1 i -2. Reszty niewystępujące w natywnym SFTI-1 zostały pogrubione, a reszta w pozycji P<sub>1</sub> podkreślona.

Peptyd	Struktura pierwszorzędowa	Nr w publikacji
SFTI-1 (1)	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	
SFTI-1 (2)	Gly-Arg-Cys(&)-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	
5	Gly-Arg-Cys(&)- <b>Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Tyr</b> -Cys(&)-Phe-Pro-Asp	1/H8
6	Gly-Arg-Cys(&)- <b>Ile-D-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Tyr</b> -Cys(&)-Phe-Pro-Asp	2/H8
7	Gly-Arg-Cys(&)- <b>Arg-Ala-Arg-Ser-Ala</b> -Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	3/H8
8	Gly-Arg-Cys(&)- <b>D-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala</b> -Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	4/H8
9	<b>Ile-Arg-Cys(&amp;)-Arg-Ser-Ala-Ser-Tyr</b> -Cys(&)-Phe-Pro-Asp	5/H8
10	Gly-Arg-Cys(&)-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	6/H8
11	Gly- <b>D-Arg</b> -Cys(&)-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	7/H8
12	Gly-Arg-Cys(&)- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	8/H8
13	Gly- <b>D-Arg</b> -Cys(&)- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	9/H8
14	Gly-Arg-Cys(&)- <b>Pro-Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	10/H8
15	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	11/H8
16	& <sup>1</sup> Gly- <b>D-Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	12/H8
17	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	13/H8
18	Gly-Arg-Cys(&)-Thr- <b>Arg</b> -Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	14/H8
19	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	15/H8
20	Gly-Arg-Cys(&)- <b>Arg</b> -Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	16/H8
21	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )- <b>Arg</b> -Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	17/H8
22	<b>Lys</b> -Arg-Cys(&)-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	18/H12
23	& <sup>1</sup> <b>Lys</b> -Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	19/H12
24	<b>Lys</b> (& <sup>1</sup> )-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	20/H12
25	<b>Lys</b> -Arg-Cys(&)-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(&)-Phe-Pro-Asp	21/H12
26	& <sup>1</sup> <b>Lys</b> -Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	22/H12
27	<b>Lys</b> (& <sup>1</sup> )-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	23/H12
28	& <sup>1</sup> <b>Lys-D-Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	24/H12
29	<b>Lys</b> (& <sup>1</sup> )- <b>D-Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp& <sup>1</sup>	25/H12
30	Gly-Arg-Cys(&)-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(&)- <b>His</b> -Pro-Asp	26/H12
31	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	27/H12
32	Gly-Arg-Cys(&)-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(&)- <b>His</b> -Pro-Asp	28/H12
33	& <sup>1</sup> Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	29/H12
34	& <sup>1</sup> Gly- <b>D-Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	30/H12
35	<b>Lys</b> -Arg-Cys(&)-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(&)- <b>His</b> -Pro-Asp	31/H12
36	& <sup>1</sup> <b>Lys</b> -Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	32/H12
37	<b>Lys</b> (& <sup>1</sup> )-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <u>Lys</u> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	33/H12
38	<b>Lys</b> -Arg-Cys(&)-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(&)- <b>His</b> -Pro-Asp	34/H12
39	& <sup>1</sup> <b>Lys</b> -Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	35/H12
40	<b>Lys</b> (& <sup>1</sup> )-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	36/H12
41	& <sup>1</sup> <b>Lys-D-Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	37/H12
42	<b>Lys</b> (& <sup>1</sup> )- <b>D-Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Arg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro- <b>Arg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )- <b>His</b> -Pro-Asp& <sup>1</sup>	38/H12
43	Gly-Arg-Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Narg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp	39/H12
44	Gly- <b>Narg</b> -Cys(& <sup>2</sup> )-Thr- <b>Narg</b> -Ser-Ile-Pro-Pro-Ile-Cys(& <sup>2</sup> )-Phe-Pro-Asp	40/H12

Wszystkie peptydy posiadały mostek disulfidowy. W niektórych występował dodatkowy rodzaj cyklizacji: ciągły łańcuch główny (np. 15-17) lub – jak w przypadku peptydów z N-kończącą resztą Lys – wiązanie izopeptydowe między grupą ε-aminową tego aminokwasu i grupą α-karboksylową C-

końcowej reszty Asp (np. **40** i **42**). W porównaniu z SFTI-1, większość peptydów posiadała inne reszty aminokwasowe w co najmniej jednej z pięciu pozycji: 1, 4, 5, 10 i 12. W przypadku peptydów **5-9**, w miejsce reszt aminokwasowych tworzących pętlę wiążącą SFTI-1 wstawiono reszty występujące w strukturze pierwszorzędowej wspomnianego substratu FRET o sekwencji ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> [44] (gdzie ABZ to reszta kwasu 2-aminobenzoowego pełniąca rolę donora fluorescencji, a Tyr(3-NO<sub>2</sub>) to 3-nitro-L-tyrozyna będąca jej akceptorem).

Niektóre peptydy (np. **12** i **18**) projektowano z myślą o otrzymywaniu związków krótszych, a więc generujących niższe koszty w trakcie syntezy chemicznej na nośniku stałym. Wśród otrzymanych analogów SFTI-1 były też peptomery **43** i **44** będące związkami hybrydowymi złożonymi z  $\alpha$ -aminokwasów i *N*-podstawionych reszt glicyny (*ang. peptide-peptoid hybrid polymers, peptomers*). Struktura chemiczna obu rodzajów monomerów jest podobna. Jediną różnicą jest umiejscowienie łańcucha bocznego, który w  $\alpha$ -aminokwasach połączony jest z atomem węgla  $\alpha$ , natomiast w resztach peptoidowych przesunięty jest na atom azotu grupy  $\alpha$ -aminowej. Polimery złożone wyłącznie z reszt peptoidowych to peptoidy. W porównaniu z peptydami wykazują one wysoką - określaną niekiedy jako całkowitą - odporność na działanie enzymów proteolitycznych, niższą podatność na agregację, wyższą hydrofobowość i tym samym lepszą przenikalność przez błony komórkowe, niższą cytotoksyczność, a także zwiększoną odporność termiczną i swobodę konformacyjną [50].

Wybrane związki poddano bardziej szczegółowym badaniom, prowadzonym w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem odpowiednio dobranych substratów fluorogenicznych, mającym na celu wyznaczenie wartości stałych inhibicji  $K_i$  ich kompleksów z enzymami (tabela 2). Oprócz wspomnianych MT1 i MT2, do badań wybrano inne ludzkie proteiny serynowe o podobnej specyficzności substratowej - trombinę, plazminę i  $\beta$ -trypsynę. Okazało się, że zastąpienie reszty Lys5 (P<sub>1</sub>) w natywnym (**1**) i monocyklicznym SFTI-1 (**2**) przez Arg (peptydy **15** i **10**) powoduje blisko 12-krotny wzrost aktywności inhibitorowej wobec MT2. Dodatkowa modyfikacja w pozycji 2, polegająca na zamianie L-Arg przez jej izomer D, skutkowałą co prawda spadkiem inhibicji MT2 (peptydy **11** i **16**), jednak w tym przypadku większe znaczenie miało drastyczne obniżenie ich aktywności inhibitorowej wobec MT1. Dzięki temu, otrzymane zostały wysoce selektywne inhibitory wiążące się znacznie mocniej z MT2, niż z MT1. Ponadto oba peptydy nie wykazywały istotnego wpływu na aktywność proteolityczną plazminy, mocno obniżały aktywność ludzkiej trypsyny oraz powodowały dość znaczącą aktywację trombiny. Ten ostatni, dość zaskakujący wynik, może być skutkiem oddziaływania jonowego między peptydem - zwłaszcza jego C-końcową resztą Asp obdarzoną ładunkiem ujemnym, a dodatnio naładowanym fragmentem trombiny zwanym miejscem wiązania fibrynogenu (*ang. exosite I*). Może to wywołać modyfikację struktury przestrzennej enzymu powodującą wzrost jego aktywności proteolitycznej. Natomiast jednoczesne, silne hamowanie trypsyny oraz MT1 lub MT2 nie powinno

---

<sup>50</sup> Patch J.A., et al. *Versatile oligo(N-substituted)glycines: the many roles of peptoids in drug discovery* w *"PseudoPeptides In Drug Development* (red. Nielsen P.E.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2004**.

stanowiąc przeszkodę w ewentualnym wykorzystaniu analizowanych peptydów w warunkach *in vivo*. Trypsyna jako enzym trawienny produkowany przez trzustkę, pełni swe funkcje w dwunastnicy, podwyższona ekspresja MT1 obserwowana jest głównie w komórkach nowotworowych piersi, prostaty, jajnika, zaś MT2 obecna jest przede wszystkim w komórkach wątroby i w makrofagach.

Tabela 2. Wartości stałych inhibicji ( $K_i$ ) wybranych analogów wobec badanych proteinaz serynowych. Symbole:  $\uparrow$  oraz  $\uparrow\uparrow$  oznaczają, że przy stężeniu 9,8 nM i 98  $\mu$ M zaobserwowano odpowiednio umiarkowany lub znaczący wzrost aktywności trombiny.  $\leftrightarrow$  wskazuje brak zmian aktywności trombiny. n.b. – nie badano.

Analog	$K_i \pm$ SEM (nM)					Selektywność wobec MT
	Matryptaza-2	Matryptaza-1	Plazmina	Trombina	Trypsyna	
1	218 $\pm$ 21	102 $\pm$ 7	25 $\pm$ 5	$\uparrow$	3,4 $\pm$ 0,3	2,14 MT1
2	1370 $\pm$ 330	61 $\pm$ 4	28 $\pm$ 10	$\uparrow\uparrow$	9,1 $\pm$ 0,7	22,5 MT1
10	115 $\pm$ 16	91 $\pm$ 11	2260 $\pm$ 410	$\uparrow$	15,2 $\pm$ 0,6	1,26 MT1
11	433 $\pm$ 62	76300 $\pm$ 27200	>100 000	$\uparrow\uparrow$	191 $\pm$ 13	<b>176 MT2</b>
15	<b>19 <math>\pm</math> 3</b>	269 $\pm$ 270	365 $\pm$ 97	$\uparrow$	13,4 $\pm$ 0,8	14,2 MT2
16	278 $\pm$ 19	63400 $\pm$ 10500	>100 000	$\uparrow\uparrow$	44,9 $\pm$ 3,2	<b>228 MT2</b>
27	370 $\pm$ 27	179 $\pm$ 18	n.b.	n.b.	n.b.	2,1 MT1
28	2640 $\pm$ 340	4110 $\pm$ 520	>100 000	$\uparrow\uparrow$	17,1 $\pm$ 1,0	1,6 MT2
32	288 $\pm$ 017	<b>6,4 <math>\pm</math> 0,7</b>	7760 $\pm$ 880	$\leftrightarrow$	10,6 $\pm$ 4,8	45 MT1
33	<b>15 <math>\pm</math> 1</b>	<b>4,9 <math>\pm</math> 0,7</b>	n.b.	n.b.	n.b.	3,1 MT1
38	318 $\pm$ 25	<b>4,3 <math>\pm</math> 0,7</b>	5790 $\pm$ 720	$\leftrightarrow$	5,3 $\pm$ 1,0	74 MT1
39	102 $\pm$ 8	<b>8,3 <math>\pm</math> 1,2</b>	3050 $\pm$ 570	$\leftrightarrow$	9,0 $\pm$ 3,6	12 MT1
40	257 $\pm$ 12	<b>2,6 <math>\pm</math> 0,2</b>	3310 $\pm$ 360	$\leftrightarrow$	5,1 $\pm$ 0,9	100 MT1
41	607 $\pm$ 41	<b>27,6 <math>\pm</math> 2,0</b>	>100 000	$\leftrightarrow$	21,8 $\pm$ 11,4	22 MT1

Warto również zwrócić uwagę na silne inhibitory MT1 (**32-40**) blokujące ten enzym znacznie mocniej niż MT2 i plazminę oraz nie wpływające na aktywność katalityczną trombiny.

### Otrzymanie nowych, niekowalencyjnych inhibitorów proteasomu

Wykorzystanie SFTI-1 jako związku wyjściowego do otrzymania silnych inhibitorów proteaz innych niż serynowe przedstawiono w pracach **H.4** i **H.10**. Prezentowane w tym rozdziale wyniki znajdują się również w rozprawie doktorskiej przygotowywanej obecnie przez mgr Martę Lubos pt. *Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania kinetyczne peptydowych niekowalencyjnych i kowalencyjnych inhibitorów proteasomu*, w której jestem **promotorem pomocniczym** (planowany rok obrony, 2019). Wspomnieć należy, że badania te sfinansowane zostały przez Narodowe Centrum Nauki (konkurs Sonata 1) w ramach projektu pt. *Poszukiwanie nowych inhibitorów i substratów fluorogenicznych ludzkiego proteasomu*, którego byłem kierownikiem.

Proteasom jest białkowym, wielkocząsteczkowym kompleksem enzymatycznym, którego prawidłowe funkcjonowanie wymaga energii z ATP oraz współdziałania z innym białkiem - ubikwityną

[51]. Degradacja większości białek w komórkach eukariotycznych odbywa się poprzez szlak ubiquityna-proteasom [52]. Eukariotyczny proteasom 26S złożony jest z jednostki katalitycznej 20S, do której przyłączone są najczęściej dwie jednostki regulatorowe 11S lub 19S [53]. Jednostka 20S ma postać tuby zbudowanej z czterech leżących na sobie pierścieni. Dwa pierścienie zewnętrzne złożone są z 7 podjednostek  $\alpha$ , dwa wewnętrzne z 7 podjednostek  $\beta$ . Każdy z pierścieni  $\beta$  zawiera po 3 podjednostki katalityczne ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 5$ ) odpowiedzialne za hydrolizę substratów białkowych. Wszystkie jednostki katalityczne posiadają *N*-końcową resztę Thr, która inicjuje hydrolizę poprzez atak grupy  $\beta$ -hydroksylowej na karbonylowy atom węgla substratu białkowego. Proteasom jest więc proteazą treoninową. Kręgowce posiadają trzy główne rodzaje proteasomu 20S różniące się budową podjednostek katalitycznych - proteasom konstytutywny (c20S), immunoproteasom (i20S) i tymoproteasom (t20S). Podjednostka proteasomu konstytutywnego  $\beta 1c$  hydrolizuje wiązania peptydowe głównie po aminokwasach z ujemnie naładowanymi łańcuchami bocznymi. Preferuje resztę Asp nad Glu, co pokazane zostało m.in. przez naszą [C.11] oraz inne grupy badawcze [54,55]. Jej aktywność określana jest mianem kaspazopodobnej (*ang. caspase-like activity, C-L*). Analogiczna podjednostka w immunoproteasomie,  $\beta 1i$ , preferuje rozgałęzione reszty hydrofobowe, takie jak np. Leu. Niemal identyczne podjednostki  $\beta 2c$  i  $\beta 2i$  wykazują aktywność trypsynopodobną (*ang. trypsin-like, T-L*) i hydrolizują wiązania po Lys i Arg [56, B.5]. Większe różnice w specyficzności wykazują podjednostki  $\beta 5$ . Wynika to z odmiennego ułożenia przestrzennego łańcucha bocznego Met45 w ich głównej kieszeni wiążącej  $S_1$ . Kieszeń ta w  $\beta 5i$  jest większa i bardziej dostępna dla dużych reszt, takich jak Phe, Tyr i Trp. Aktywność tej podjednostki nazywana jest chymotrypsynopodobną (*ang. chymotrypsin-like, ChT-L*). Mniejsza kieszeń w  $\beta 5c$  sprawia, że podjednostka ta wykazuje raczej zdolność do hydrolizowania po niewielkich, obojętnych resztach aminokwasowych, takich jak Val i Ala (*ang. small neutral amino acid preferring, SNAAP*) [55,57].

Proteasom c20S występuje niemal w każdej komórce, w której odpowiada za usuwanie zbędnych białek. Immunoproteasom obecny jest głównie w komórkach układu immunologicznego, lecz także w innych komórkach stymulowanych cytokinami prozapalnymi: interferonem- $\gamma$  i czynnikiem martwicy nowotworów  $\alpha$  [58]. Jego nadrzędną funkcją jest hydrolizowanie białek wirusowych i

---

<sup>51</sup> Hershko A., Ciechanover A. *The ubiquitin system*. Annu. Rev. Biochem. **1998**, 67, 425-79

<sup>52</sup> Lee D.H., Goldberg A.L. *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. Trends Cell Biol. **1998**, 8, 397-403.

<sup>53</sup> Borissenko L., Groll M. *20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development*. Chem. Rev. **2007**, 107, 687-717.

<sup>54</sup> Kisselev A.F., et al. *The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites*. Biol. Chem. **2003**, 278, 35869-77.

<sup>55</sup> Huber E.M., et al. *Systematic analyses of substrate preferences of 20S proteasomes using peptidic epoxyketone inhibitors*. J. Am. Chem. Soc. **2015**, 137, 7835-42.

<sup>56</sup> Harris J.L., et al. *Substrate specificity of the human proteasome*. Chem. Biol. **2001**, 8, 1131-41.

<sup>57</sup> Groll M, Huber R. *Purification, crystallization, and X-ray analysis of the yeast 20S proteasome*. Methods Enzymol. **2005**, 398, 329-36.

<sup>58</sup> Aki M., et al. *Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes*. J. Biochem. **1994**, 115, 257-269.

bakteryjnych w celu wytwarzania antygenów prezentowanych komórkom układu odpornościowego w postaci kompleksu z MHC typu I. Podwyższona aktywność proteasomu, głównie konstytutywnego, obserwowana jest w komórkach nowotworowych, które są jednocześnie bardziej wrażliwe na inhibicję proteasomu niż komórki prawidłowe [59]. Nadaktywność immunoproteasomu towarzyszy wielu chorobom o podłożu autoimmunologicznym: reumatoidalnemu zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianemu czy nieswoistemu zapaleniu jelit [60,61]. Zablokowanie immunoproteasomu osłabia objawy chorób autoimmunologicznych w modelach zwierzęcych [62].

Obecnie znanych jest kilka grup związków blokujących proteasom w sposób kowalencyjny lub niekowalencyjny [63]. Wśród tych pierwszych, bardziej licznych, największym zainteresowaniem cieszą się krótkie peptydy zbudowane z trzech lub czterech reszt aminokwasowych, posiadające na swym C-końcu reaktywne ugrupowanie elektrofilowe. Ugrupowanie to wiąże się z N-końcową resztą Thr w sposób odwracalny (aldehydy peptydowe i peptydowe pochodne kwasu boronowego) lub nieodwracalny (peptydowe epoksyketony i winylosulfony). Inhibitorami kowalencyjnymi są m.in. trzy inhibitory stosowane w leczeniu pacjentów ze szpiczakiem mnogim (*ang. multiple myeloma*) oraz pacjentów z chłoniakiem z komórek płaszczka (*ang. mantle cell lymphoma*) – dwie pochodne kwasu boronowego, bortezomib (zatwierdzony do leczenia w roku 2003) i ixazomib (2015) oraz peptydowy epoksyketon, carfilzomib (2012).

Inhibitory niekowalencyjne proteasomu stanowią mniej liczną grupę. Zainteresowanie tymi związkami wynika z ich odmiennego sposobu oddziaływania z enzymem: niekowalencyjnego, odwracalnego, niekiedy wykorzystującego efekt allosteryczny. Takie właściwości mogą zapobiegać typowym skutkom ubocznym towarzyszącym stosowaniu reaktywnych inhibitorów kowalencyjnych: niskiej specyficzności działania (np. bortezomib hamuje również aktywność komórkowych proteinaz serynowych, katepsyny G, A i HtrA2/Omi [64]) oraz przypadkom pojawiania się oporności proteasomu uniemożliwiającej związanie inhibitora, która wynika np. z pojedynczej mutacji w obrębie reszt aminokwasowych w centrum aktywnym enzymu.

Przystępując do realizacji tego zadania badawczego wiedziałem, że natywny SFTI-1 należący do rodziny inhibitorowej Bowmana i Birki nie wpływa na aktywność szczurzego proteasomu 20S [65]. Natomiast dwa inne inhibitory kanoniczne - należący do rodziny Kunitza inhibitor trypsyny z bydłowej

---

<sup>59</sup> Adams J. *Development of the proteasome inhibitor PS-341*. The Oncologist **2002**, 7, 9-16.

<sup>60</sup> Fierabracci A. *Proteasome inhibitors: a new perspective for treating autoimmune diseases*. Curr. Drug Targets. **2012**, 13, 1665-75.

<sup>61</sup> Moran E. et al. *Proteasome inhibitors as immunosuppressants: biological rationale and clinical experience*. Semin. Hematol. **2012**, 49, 270-6.

<sup>62</sup> Basler M., et al. *The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases*. Clin. Exp. Rheumatol. **2015**, 33, S74-9.

<sup>63</sup> Kisselev A.F., et al. *Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target*. Chem. Biol. **2012**, 19, 99-115.

<sup>64</sup> Arastu-Kapur S., et al. *Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events*. Clin. Cancer Res. **2011**, 17, 2734-43.

<sup>65</sup> Yabe K., Koide T. *Inhibition of the 20S proteasome by a protein proteinase inhibitor: evidence that a natural serine proteinase inhibitor can inhibit a threonine proteinase*. J. Biochem. **2009**, 145, 217.-27

trzustki, BPTI (*ang. bovine pancreatic trypsin inhibitor*, 58 reszt aminokwasowych) oraz zaliczany do rodziny roślin dyniowatych, inhibitor trypsyny wydzielony z nasion *Momordica charantina*, MoCTI-I (*ang. Momordica charantina trypsin inhibitor*, 30 reszt) - blokują ten enzym w warunkach *in vitro* i *ex vivo* [65]. Autorzy cytowanej pracy przeprowadzili nawet eksperyment na podstawie którego stwierdzili, że BPTI, pomimo swego rozmiaru, jest w stanie dotrzeć do wnętrza proteasomu i przyłączyć się do jego wszystkich jednostek katalitycznych. Porównując struktury pierwszorzędowe inhibitorów proteinaz, aktywnych i nieaktywnych wobec proteasomu stwierdzono, że zdolność do jego hamowania wykazują tylko te związki spośród badanych, które posiadają w jednej z dwóch pozycji swej pętli wiążącej - P<sub>2</sub>' lub P<sub>3</sub>' - zasadową resztę aminokwasową. W BPTI jest to Arg (P<sub>2</sub>'), w MoCTI-I Lys (P<sub>3</sub>'), natomiast w nieaktywnym SFTI-1 występują Ile (P<sub>2</sub>') i Pro (P<sub>3</sub>'). Pierwsza seria zaprojektowanych peptydów zawierała 9 analogów monocyklicznego SFTI-1 (**45-53** w tabeli 3), w których co najmniej jedna ze wspomnianych pozycji zawierała resztę Lys. Wyjątkiem był peptyd **52** z resztami Ala w obu pozycjach.

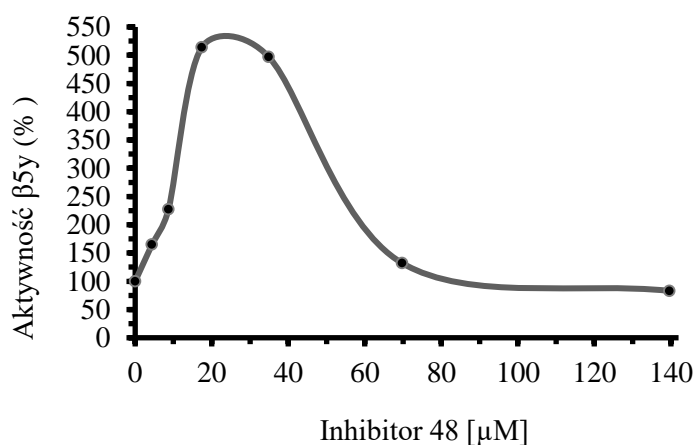
Stopień zablokowania podjednostki katalitycznej  $\beta$ 5y (litera y pochodzi od *ang. yeast*) drożdżowego proteasomu 20S przez peptydy **2** i **45-53** oraz podjednostek  $\beta$ 1c,  $\beta$ 5c ludzkiego proteasomu 20S przez peptydy **2** i **45-83** badano w obecności dodecylosiarczanu sodu (SDS), który jest powszechnie stosowanym w badaniach *in vitro* czynnikiem stymulującym proteasom 20S, umożliwiającym wnikanie substratów i inhibitorów do jego wnętrza. Inhibicję podjednostki  $\beta$ 2c przez peptydy **2** i **45-83** analizowano bez dodatku SDS. W badaniach stosowano odpowiednie substraty fluorogeniczne hydrolizowane selektywnie przez poszczególne podjednostki katalityczne. Proteasom ludzki pochodził ze źródeł komercyjnych, a proteasom drożdżowy otrzymany został od **prof. Michaela Grolla** z Wydziału Chemii Uniwersytetu Technicznego w Monachium, w ramach nawiązanej współpracy.

Okazało się, że umieszczenie Lys w pozycjach P<sub>2</sub>' i P<sub>3</sub>' spowodowało znaczący wzrost aktywności inhibitorowej związku **53** w porównaniu z niemodyfikowanym SFTI-1 (**2**): 52-krotny wobec  $\beta$ 1c i 40-krotny wobec podjednostki  $\beta$ 5c. Kolejna modyfikacja, polegająca na zastąpieniu obecnej w peptydzie **53** reszty Lys z pozycji P<sub>1</sub> przez Arg poskutkowało otrzymaniem peptydu **48** będącego najsilniejszym inhibitorem (spośród peptydów pierwszej serii **45-53**) wszystkich trzech podjednostek ludzkiego proteasomu konstytutywnego. Związek ten blokował mocno również drożdżową podjednostkę  $\beta$ 5y. Analiza wykresu Lineweaver-Burka wskazała na kompetycyjny charakter tej inhibicji, taki sam jak w przypadku BPTI i szczurzego 20S [65].

Zaobserwowane hamowanie podjednostek katalitycznych proteasomu wykazujących odmienną specyficzność substratową świadczy o tym, że reszta Arg<sub>5</sub> (będąca w pozycji P<sub>1</sub> w kompleksie z proteinazą serynową) nie odgrywała w tych oddziaływaniach aż tak istotnej roli jak podczas blokowania proteinaz serynowych. Co więcej, inhibitory zaprojektowane z myślą o selektywnym blokowaniu podjednostki  $\beta$ 5 preferującej hydrofobowe reszty aminokwasowe (peptydy **49-51** z Tyr, Phe i Ala w pozycji P<sub>1</sub>), wykazywały niższą aktywność inhibitorową niż związek **48** z Arg w P<sub>1</sub>. Jest więc wątpliwe,

aby otrzymane inhibitory blokowały proteasom w sposób analogiczny jak odbywa się to w przypadku proteinaz serynowych, gdzie czynnikiem kluczowym jest bezpośrednie oddziaływanie reszty P<sub>1</sub> z kieszenią S<sub>1</sub> enzymu. Należy jednak podkreślić, że były one w stanie wnikać do wnętrza proteasomu, o czym świadczyła obecność zhydrolizowanych produktów pozbawionych N-końcowego dipeptydu Gly-Arg, zarejestrowana po 24-godzinnej inkubacji wybranych peptydów (m.in. **46** i **47**) z drożdżowym proteasomem 20S.

Większy wpływ na oddziaływanie z proteasomem zdaje się mieć ładunek wypadkowy badanych peptydów, który w przypadku najsilniejszych inhibitorów z tej serii wynosił w warunkach eksperymentu (pH 8,1) +2 lub +3, natomiast w przypadku najslabiej działających peptydów **2** i **52** wynosił +1. Na istotną rolę ładunku wskazują także wyniki eksperymentu przeprowadzonego z udziałem proteasomu drożdżowego i peptydu **48** w buforze bez dodatku SDS. Zaobserwowano wówczas wyraźną, 5-krotną aktywację podjednostki  $\beta 5y$  (rys. 3).



Rysunek 3. Aktywacja drożdżowej podjednostki  $\beta 5y$  przez peptyd **48** w badaniu bez udziału SDS.



Tabela 3. Struktury pierwszorzędowe SFTI-1 (2) i jego analogów, oraz ich aktywności inhibitorowe wobec podjednostek katalitycznych ludzkiego c20S oraz drożdżowej  $\beta$ 5y. Oznaczenia: \* - IC<sub>50</sub> [ $\mu$ M] to stężenie inhibitora obliczone z wykresu zależności aktywności enzymatycznej od ilości dodanego inhibitora, powodujące spadek początkowej aktywności enzymu o 50%; # - I<sub>50</sub> [ $\mu$ M] to stężenie inhibitora przy którym obserwowano około 50% początkowej aktywności enzymu; n.b. – nie badany.

Nr	Struktura pierwszorzędowa	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]				Nr w publikacji
		$\beta$ 1c	$\beta$ 2c	$\beta$ 5c	$\beta$ 5y	
<b>PIERWSZA SERIA (praca H4)</b>						
2	GRC(&)TKSIPPIC(&)FPD	58,2*	>100*	26,98	51,96*	I / H4
45	GRC(&)TKSLKPIC(&)FPD	6,7*	>100*	1,23	2,15*	II / H4
46	GRC(&)TRSLKPIC(&)FPD	2,4*	>100*	1,76	1,07*	III / H4
47	GRC(&)TKSRIPIC(&)FPD	2,4*	60,5*	1,31	5,36*	IV / H4
48	GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,68	20,14	0,31	1,23*	V / H4
49	GRC(&)TYSKKPIC(&)FPD	4,0*	93,1*	1,43	6,60*	VI / H4
50	GRC(&)TFSKKPIC(&)FPD	2,8*	45,3*	1,75	5,34*	VII / H4
51	GRC(&)TASKKPIC(&)FPD	5,4*	>100*	2,99	8,82*	VIII / H4
52	GRC(&)TKSAAPIC(&)FPD	>100*	62,1*	>100*	>100*	IX / H4
53	GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	1,1*	86,7*	0,66	16,66	X / H4
<b>DRUGA SERIA (praca H10)</b>						
54	&GRATRSKKPIAFP&	1,16	35,97	2,24		II / H10
55	& <sup>1</sup> GRC(& <sup>2</sup> )TRSKKPIC(& <sup>2</sup> )FPD& <sup>1</sup>	0,51	5,14	0,45		III / H10
56	GRATRSKKPIAFP	2,40	32,37	3,63		IV / H10
57	C(&)TRSKKPIC(&)FPD	56,02	57,55	48,87		V / H10
58	GC(&)TRSKKPIC(&)FPD	11,89	43,16	9,88		VI / H10
59	RC(&)TRSKKPIC(&)FPD	1,52	35,97	1,01		VII / H10
60	GGC(&)TRSKKPIC(&)FPD	9,51	35,97	10,35		VIII / H10
61	RGC(&)TRSKKPIC(&)FPD	1,12	34,53	0,93		IX / H10
62	RRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,14	14,00	0,22		X / H10
63	GHC(&)TRSKKPIC(&)FPD	5,66	50,38	5,96		XI / H10
64	G(Nlys)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,89	41,74	0,92		XII / H10
65	G(D-Arg)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,89	43,18	0,90		XIII / H10
66	GKC(&)TRSKKPIC(&)FPD	1,31	39,58	1,13		XIV / H10
67	G(Orn)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	1,43	38,14	1,23		XV / H10
68	G(Gnf)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,38	38,86	0,54		XVI / H10
69	R(Gnf)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,10	18,00	0,12		XVII / H10
70	G(Narg)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,40	20,86	0,37		XVIII / H10
71	R(Narg)C(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,14	14,00	0,08		XIX / H10
72	Fmoc-GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,43	3,60	0,15		XX / H10
73	(CH <sub>3</sub> CO)-GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	3,02	14,40	3,51		XXI / H10
74	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CO)-GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	1,22	7,19	1,23		XXII / H10
75	(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> CO)-GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,32	2,24	0,22		XXIII / H10
76	O <sub>2</sub> Oc-GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,35	1,15	0,31		XXIV / H10
77	Ahx-GRC(&)TRSKKPIC(&)FPD	0,46	5,75	0,39		XXV / H10
78	GRC(&)TRSKKPIAbuFPDGRAbuTRSKKPIC(&)FPD	0,07	15*	0,10		XXVI / H10
79	GRC(&)TRSKKPIAFPDRATRSKKPIC(&)FPD	0,03	n.b.	0,04		XXVII / H10
80	RGC(& <sup>1</sup> )TRSKKPIC(& <sup>2</sup> )FPDRGC(& <sup>2</sup> )TRSKKPIC(& <sup>1</sup> )FPD	n.b.	~15 <sup>#</sup>	0,05		XXVIII / H10
81	RGC(& <sup>1</sup> )TRSKKPIC(& <sup>2</sup> )GPGGGC(& <sup>2</sup> )TRSKKPIC(& <sup>1</sup> )FPD	0,02	~15 <sup>#</sup>	0,03		XXIX / H10
82	RGC(& <sup>1</sup> )TRSKKPIC(& <sup>1</sup> )GPGGGC(& <sup>2</sup> )TRSKKPIC(& <sup>2</sup> )FPD	0,02	n.b.	0,03		XXX / H10
83	C(&)TRSKKPIAbuFPDAbuTRSKKPIC(&)FPD	0,32	90 <sup>#</sup>	0,31		XXXI / H10

Podobny skutek wywołują opisane w literaturze zasadowe peptydy zawierające liczne reszty Arg i Pro (peptyd PR39) oraz fragmenty białka TAT (*ang. trans-activator of transcription*), będącego jednym z głównych czynników ekspresji genów wirusa HIV. Efekt allosteryczny będący następstwem przyłączenia się tych dodatnio naładowanych peptydów do zewnętrznych powierzchni proteasomu,

obdarzonych silnym ładunkiem ujemnym, podnosi aktywność proteolityczną enzymu [66]. Związki stymulujące proteasom są obecnie rozpatrywane pod kątem ich przydatności w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (np. Alzheimer, Parkinsona) oraz w spowalnianiu procesu starzenia się [67]. W obu przypadkach aktywność proteolityczna proteasomu jest niewystarczająca lub ulega systematycznemu obniżaniu. Warto jednak wspomnieć, że w warunkach, w których prowadzony był nasz eksperyment, nie została zaobserwowana znacząca aktywacja ludzkiego proteasomu 20S.

Próby zarejestrowania gęstości elektronowej dla inhibitora **48** w kompleksie z drożdżowym proteasomem 20S zakończyły się niepowodzeniem [68]. Eksperymenty te prowadzone były zarówno w laboratorium **prof. Michaela Grolla**, uznanego na świecie eksperta w dziedzinie badań krystalograficznych nad proteasomem i jego inhibitorami, jak również w laboratorium **dr. hab. Grzegorza Dubina** z Zakładu Mikrobiologii, Laboratorium Krystalografii Rentgenowskiej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Z tego też powodu dokładny sposób oddziaływania inhibitorów zaprojektowanych na bazie SFTI-1 z enzymem nie został jak dotąd poznany.

**Zdolność otrzymanych inhibitorów do równoczesnego blokowania w warunkach *in vitro* więcej niż jednej podjednostki katalitycznej, głównie  $\beta 1c$  i  $\beta 5c$ , należy rozpatrywać jako zaletę.** Trzeba podkreślić, że podjednostka  $\beta 5c$  jest traktowana jako najważniejszy cel terapeutyczny i większość inhibitorów proteasomu projektowana jest w taki sposób aby właśnie ją blokować. Do tej grupy zaliczyć można większość inhibitorów kowalencyjnych. Istnieją jednak dowody, że jednoczesne blokowanie dwóch podjednostek proteasomu ( $\beta 5$  oraz  $\beta 1$  lub  $\beta 2$ ) przekłada się na wyższą skuteczność zwalczania komórek nowotworowych [69]. Aby to zweryfikować, nawiązałem współpracę z **prof. Piotrem Trzonkowskim** z Zakładu Immunologii i Transplantologii Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Wybrane inhibitory poddano badaniom pod kątem ich cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych linii A431 (*ang. epidermal squamous cancer cell line*) oraz komórek HaCaT (*ang. immortal cell line derived from normal epidermal keratinocytes*). Jednak poziom cytotoksyczności obserwowany po 48 godzinach, nawet przy wysokich stężeniach peptydów (500 i 1000  $\mu\text{M}$ ) był niewielki (wyniki te nie zostały opublikowane).

Dalsze badania prowadzono nad inhibitorami zaprojektowanymi na podstawie struktury pierwszorzędowej związku **48** (peptydy **54-83** w tabeli 3). Wyniki zamieszczono w publikacji **H.10**. Celem badań było określenie zależności między aktywnością inhibitorową, a:

---

<sup>66</sup> Jankowska E, et al. *Potential allosteric modulators of the proteasome activity*. Biopolymers **2010**, 93, 481–95.

<sup>67</sup> Chondrogianni N, et al. *Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites*. Ageing Res. Rev. **2015**, 23, 37-55.

<sup>68</sup> Beck P., et al. *Identification of a  $\beta 1/\beta 2$ -specific sulfonamide proteasome ligand by crystallographic screening*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2015**, 54, 11275-8.

<sup>69</sup> Britton M, et al. *Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites*. Chem. Biol. **2009**, 16, 1278-89.

- typem cyklizacji peptydu; stąd też oprócz monocyklicznego inhibitora **48** z mostkiem disulfidowym do badań użyto jego analogi: liniowy (**56**), monocykliczny z ciągłym łańcuchem głównym (**54**) oraz bicykliczny zawierający obie wspomniane formy cyklizacji (**55**);
- usunięciem jednej lub dwóch *N*-końcowych reszt, Gly1 i Arg2, lub zastąpieniem ich za pomocą innych reszt białkowych i niebiałkowych, w tym peptoidowych (**57-71**);
- przyłączeniem grup acylowych różniących się rozmiarem i hydrofilowością do *N*-końcowej grupy  $\alpha$ -aminowej peptydu **48** (**72-77**);
- podwojeniem struktury pierwszorzędowej wybranych peptydów oraz obecnością jednego lub dwóch mostków disulfidowych (**78-83**).

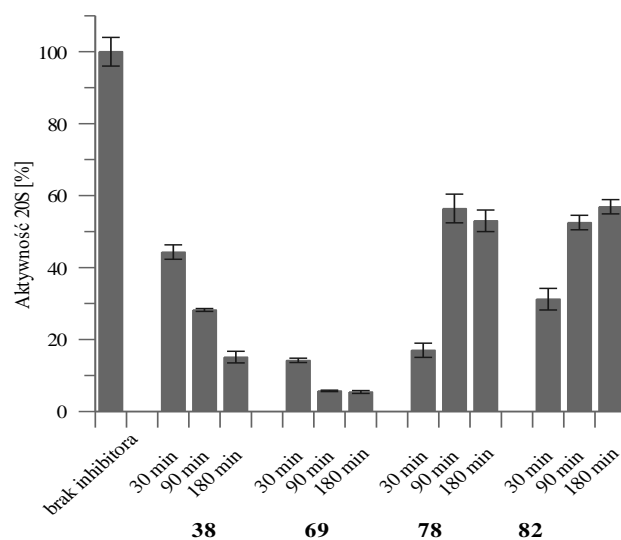
Spśród związków różniących się stopniem cyklizacji (**48** i **54-56**), peptydy **48** i **55** z mostkiem disulfidowym blokowały podjednostki  $\beta$ 1c i  $\beta$ 5c ludzkiego proteasomu 20S z niemal taką samą siłą. Na uwagę zasługuje fakt, że wartość  $K_i$  wyznaczona dla bicyklicznego **55** wobec podjednostki trypsynopodobnej  $\beta$ 2c (5,14  $\mu$ M) była blisko 4-krotnie niższa niż wartość  $K_i$  monocyklicznego **48** (20,14  $\mu$ M). Oba peptydy były mocniejszymi inhibitorami niż ich analogi **54** i **56**. Drugi z nich, będący związkiem liniowym, prezentował najniższą aktywność wobec  $\beta$ 1c i  $\beta$ 5c w omawianej grupie związków. Należy jednak zaznaczyć, że był on wyraźnie silniejszym inhibitorem  $\beta$ 5c ( $K_i=3,63 \mu$ M) niż monocykliczne peptydy **57** i **58** (48,87  $\mu$ M i 9,88  $\mu$ M). Wyniki te dowodzą, że obecność mostka disulfidowego, choć istotna, nie gwarantuje wysokiej aktywności inhibitorowej.

Większe znaczenie zdaje się mieć obecność i rodzaj reszty zasadowej w pozycji 2 peptydu **48**. Jej usunięcie (peptydy **57** i **58**) lub zastąpienie przez Gly (**60**) i His (**63**), obniżało znacząco zdolność do hamowania proteasomu. Najkrótszy z badanych związków, peptyd **57**, był zarazem najsłabszym - słabszym nawet od monocyklicznego SFTI-1 (**2**) - inhibitorem podjednostek  $\beta$ 1c i  $\beta$ 5c. Podstawienie Arg2 innymi resztami o charakterze zasadowym - peptoidowymi Nlys (**64**) i Narg (**70**), izomerem D-Arg (**65**), Lys (**66**) lub Orn (**67**) - powodowało nieznaczny spadek aktywności inhibitorowej, natomiast w przypadku inhibitora z resztą 4-guanidyno-L-fenylalaniny (Gnf, **68**) obserwowano jej niewielki wzrost. Okazało się również, że zmiana kolejności dwóch *N*-końcowych aminokwasów w sekwencji peptydowej, Gly i Arg, wpływała na blokowanie proteasomu, co widać na przykładzie peptydów **48** (Gly<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>;  $K_i=0.31 \mu$ M wobec  $\beta$ 5c) i **61** (Arg<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>;  $K_i=0.93 \mu$ M). Wyraźny wzrost aktywności obserwowano w przypadku inhibitorów, w których *N*-końcową resztę Gly1 (**48**, **68** i **70**) zastąpiono Arg (**62**, **69** i **71**). Peptydy takie, posiadające dodatkowe ugrupowanie guanidynowe, mocniej blokowały wszystkie podjednostki katalityczne 20S.

Interesujące wyniki przyniosła modyfikacja polegająca na acylowaniu *N*-końcowej grupy  $\alpha$ -aminowej peptydu **48**. Wszystkie otrzymane peptydy (**72-77**) charakteryzowała wyższa, w porównaniu z większością związków pokazanych w tabeli 3, aktywność względem podjednostki  $\beta$ 2c. Na szczególną uwagę zasługuje peptyd **76** z hydrofilową pochodną poli(tlenku etylenu) (O2Octa, struktura chemiczna pokazana została w tabeli 4), który był nie tylko najsilniejszym inhibitorem  $\beta$ 2c ( $K_i=1,15 \mu$ M), ale

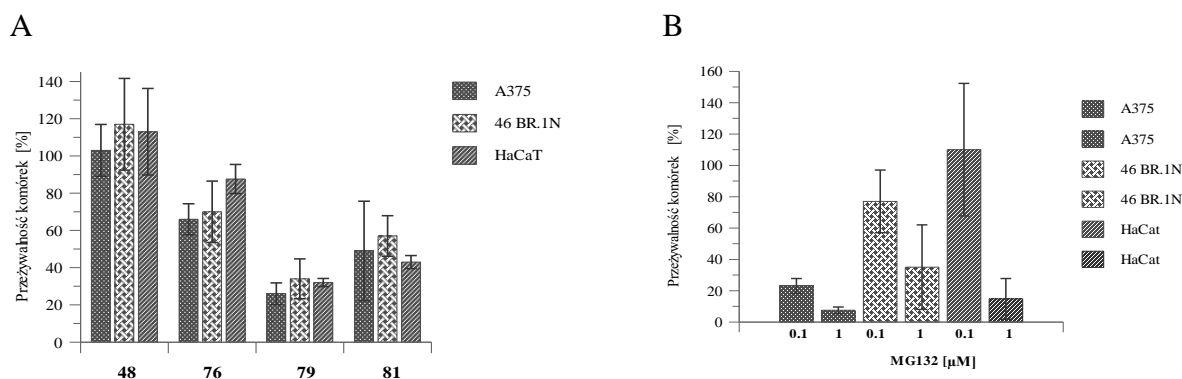
również, w przeciwieństwie do wysoce hydrofobowego peptydu **75** ( $K_i=2,24 \mu\text{M}$ ), dobrze rozpuszczał się w wodnym buforze pomiarowym Tris-HCl stosowanym podczas badań *in vitro*.

Ostatnią grupę stanowiły peptydy o podwojonej sekwencji aminokwasowej (**78-83**), posiadające jeden lub dwa mostki disulfidowe. Związki te, z wyjątkiem najkrótszego z nich **83**, były najsilniejszymi inhibitorami podjednostek  $\beta 1c$  i  $\beta 5c$  spośród wszystkich badanych peptydów. Na właściwości inhibitorowe nie miało przy tym wpływu odmienne rozmieszczenie mostków disulfidowych, co najlepiej ilustrują jednakowe wartości  $K_i$  wyznaczone względem  $\beta 1c$  ( $0,02 \mu\text{M}$ ) i  $\beta 5c$  ( $0,03 \mu\text{M}$ ) dla peptydów **81** i **82**. Należy podkreślić, że peptydy o podwojonej sekwencji wykazywały niższą odporność na proteolizę w porównaniu z ich krótszymi analogami, czego następstwem był spadek ich właściwości inhibitorowych w miarę wydłużania czasu inkubacji z proteosomem 20S (rys. 4).



Rysunek 4. Aktywność podjednostki  $\beta 5c$  po 30, 90 i 180 minutach inkubacji z wybranymi inhibitorami.

Właściwości cytotoksyczne wybranych peptydów - najsilniejszego inhibitora podjednostek  $\beta 1c$  i  $\beta 5c$  spośród związków z pierwszej serii (**48**), najsilniejszego inhibitora  $\beta 2c$  (**76**) oraz najsilniejszych inhibitorów  $\beta 1c$  i  $\beta 5c$  spośród wszystkich związków (**79** i **81**) - zbadane zostały wobec następujących ludzkich linii komórkowych: czerniaka A375, fibroblastów 46 BR.1N i keratynocytów HaCaT (rys. 5). Badania te zostały przeprowadzone w ramach nawiązanej przeze mnie współpracy z **dr hab. Mirosławą Cichorek** z Zakładu Embriologii Katedry Anatomii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Za odnośnik posłużył dobrze znany inhibitor kowalencyjny, aldehyd peptydowy Z-Leu-Leu-Leu-al (MG-132, gdzie Z to osłona benzyloksykarbonylowa). Eksperymenty wykonano za pomocą testu kolorymetrycznego XTT umożliwiającego ocenę metabolizmu mitochondrialnego. Peptydowe analogi inhibitora SFTI-1 obniżały przeżywalność komórek przy wysokich, sięgających  $500 \mu\text{M}$  stężeniach i po długim, wynoszącym 72 godzin, czasie inkubacji. Dla porównania, inhibitor MG-132 przy stężeniu wynoszącym zaledwie  $0,1 \mu\text{M}$ , wywierał taki sam wpływ na komórki linii A375 jak najbardziej aktywny inhibitor niekowalencyjny **79** przy stężeniu  $500 \mu\text{M}$  (rys. 5B)



Rysunek 5. Cytotoksyczność peptydów **48**, **76**, **79** i **81** w stężeniu 500 μM (A) oraz MG-132 (B).

Pokazano również, że peptydy **48** i **79** z fluoresceiną przyłączoną do ich *N*-końcowej grupy  $\alpha$ -aminowej przenikają do wnętrza komórek linii A375. W ramach współpracy z **dr. hab. med. Sławomirem Wójcikiem** z Zakładu Anatomii i Neurobiologii Katedry Anatomii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, wykonany został eksperyment z wykorzystaniem przeciwciał pierwszorzędowych wiążących się z podjednostkami  $\alpha$  proteasomu 20S oraz przeciwciał drugorzędowych znakowanych fluoroforem Cy3. Eksperyment ten pozwolił na oznaczenie proteasomu wewnątrz komórek A375 oraz potwierdził istnienie wspólnej lokalizacji (kolokalizacji) enzymu i znakowanych peptydów, co może sugerować istnienie wewnątrzkomórkowych kompleksów złożonych z proteasomu i jego inhibitorów. Zdjęcia obrazujące wynik tego badania znajdują się w pracy **H.10. Za moje osiągnięcie naukowe uważam otrzymanie nowych analogów SFTI-1 blokujących aktywność proteasomu 20S, co przyczyniło się do wydłużenia i wzbogacenia dość krótkiej listy dotychczas poznanych niekowalencyjnych inhibitorów tej proteazy. Ponadto, wykorzystanie SFTI-1 jako struktury bazowej do projektowania inhibitorów proteasomu, będącego proteazą treoninową, podkreśla uniwersalność oraz potencjał tego peptydu.**

#### Otrzymanie nowych, kowalencyjnych inhibitorów proteasomu 20S i immunoproteasomu 20S

Kolejną grupę inhibitorów stanowiły tetrapeptydy z *C*-końcową grupą aldehydową. Ich struktury pierwszorzędowe (tabela 4) zaprojektowane zostały w oparciu o sekwencje aminokwasowe nowych, niezwykle czułych substratów proteasomu konstytutywnego 20S, wykazujących efekt rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia fluorescencji FRET [**B.5, B.7, C.11**]. Ponadto, przy planowaniu sekwencji peptydów pod uwagę brano dość niedawno poznane struktury krystaliczne ludzkiego konstytutywnego proteasomu 20S [70] i humanizowanego drożdżowego proteasomu 20S zawierającego ludzką podjednostką  $\beta 5i$  [71]. Wspomniane substraty otrzymane zostały na drodze

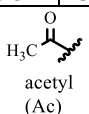
<sup>70</sup> Harshbarger W, et al. *Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with Carfilzomib*. Structure **2015**, 23, 418–424

<sup>71</sup> Huber E.M, et al. *A humanized yeast proteasome identifies unique binding modes of inhibitors for the immunosubunit  $\beta 5i$* . EMBO J. **2016**, 35, 2602-2613.

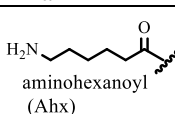
chemii kombinatorycznej w ramach projektu pt. *Poszukiwanie nowych inhibitorów i substratów fluorogenicznych ludzkiego proteasomu* (NCN, Sonata 1) którego byłem kierownikiem. Przystępując do realizacji tego zadania miałem świadomość, że aldehydy peptydowe stanowią najstarszą grupę inhibitorów proteasomu i że ich wykorzystanie ograniczone jest do badań prowadzonych w warunkach *in vitro* [72]. Wynika to z takich cech grupy aldehydowej jak: jej wysoka reaktywność, a tym samym niska selektywność posiadających ją inhibitorów, oraz relatywnie niska trwałość w układach *in vivo*. Za wyborem aldehydów peptydowych przemawiają jednak następujące argumenty: szeroka dostępność niezbędnych odczynników i relatywnie niskie koszty syntezy chemicznej, a także prostsze - zwłaszcza w porównaniu z peptydowymi winylosulfonami i epoksyketonami - procedury ich otrzymywania. Szczegółowe wyniki omawianych badań przedstawia praca **H.13**.

Tabela 4. Struktury pierwszorzędowe peptydów z ugrupowaniem aldehydowym na C-końcu.

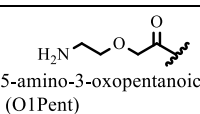
Nr	Inhibitory $\beta$ 1c	Nr	Inhibitory $\beta$ 2c	Nr	Inhibitory $\beta$ 5c i $\beta$ 5i
84	O2Octa-ILMD-al	94	O2Octa-VSMR-al	103	O2Octa-VVSF-al
85	O2Octa-IPPD-al	95	O2Octa-VVFR-al	104	O2Octa-VLSF-al
86	O2Octa-ILPD-al	96	O2Octa-VSFR-al	105	O2Octa-VNSF-al
87	O2Octa-IAAD-al	97	O2Octa-VVMR-al	106	O2Octa-VVAF-al
88	O2Octa-IPMD-al	98	Ahx-VVMR-al	107	O2Octa-VVQF-al
89	Ahx-IPMD-al	99	O1Pent-VVMR-al	108	O2Octa-VVFF-al
90	O1Pent-IPMD-al	100	O3Nona-VVMR-al	109	O2Octa-VNFF-al
91	O3Nona-IPMD-al	101	(O2Octa) <sub>2</sub> -VVMR-al	110	O2Octa-VLFF-al
92	(O2Octa) <sub>2</sub> -IPMD-al	102	U-VVMR-al	111	O2Octa-hF-LFF-al
93	U-IPMD-al			112	O2Octa-F(4-NO <sub>2</sub> )-LFF-al
				113	O2Octa-VAFF-al
				114	O2Octa-hF-AFF-al
				115	O2Octa-F(4-NO <sub>2</sub> )-AFF-al
				116	O2Octa-Nval-Nleu-FF-al
				117	O2Octa-Nval-Nleu-Nphe-F-al
				118	Ac-VVSF-al
				119	Ahx-VVSF-al
				120	O1Pent-VVSF-al
				121	O3Nona-VVSF-al
				122	(O2Octa) <sub>2</sub> -VVSF-al
				123	U-VVSF-al



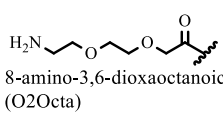
acetyl  
(Ac)



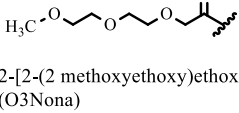
aminohexanoyl  
(Ahx)



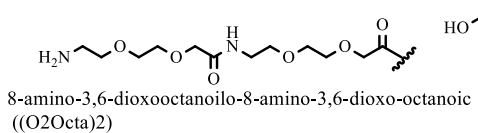
5-amino-3-oxopentanoic  
(O1Pent)



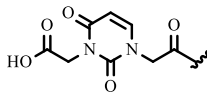
8-amino-3,6-dioxaoctanoic  
(O2Octa)



2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetic  
(O3Nona)



8-amino-3,6-dioxooctanoilo-8-amino-3,6-dioxo-octanoic  
((O2Octa)<sub>2</sub>)



Uracil derivative  
(U)

Najsilniejszymi inhibitorami podjednostki  $\beta$ 1c ludzkiego proteasomu 20S, prezentującej specyficzność substratową określaną mianem kaspazopodobnej, były peptydowe aldehydy o sekwencji IPMD. Warto podkreślić, że na siłę hamowania  $\beta$ 1c miał wpływ rodzaj grupy dołączonej do N-końcowej grupy  $\alpha$ -aminowej. Aldehyd peptydowy z krótkim hydrofilowym łańcuchem (**90**), jak również dwa peptydy pozbawione terminalnej grupy aminowej (**91**, **93**) wykazywały niższą aktywność inhibitorową w porównaniu z peptydami posiadającymi dłuższy łańcuch, zarówno hydrofilowy (**88** i **92**) jak i hydrofobowy (**89**), zwieńczony grupą aminową. Wśród peptydów zaprojektowanych z myślą o

<sup>72</sup> Vinitzky A., et al. *Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex*. *Biochemistry* **1992**, 31, 9421-8.

blokowaniu podjednostki  $\beta 2c$ , wykazujących działanie trypsynopodobne, najsilniejszym inhibitorem był O1Pent-VVMR-al (**99**). Mając na uwadze szczególne znacznie podjednostki  $\beta 5$ , związki **103-123** z resztą Phe w pozycji P<sub>1</sub> testowano wobec ludzkiego proteasomu konstytutywnego 20S i immunoproteasomu 20S celem znalezienia inhibitorów o jak najwyższej selektywności działania. Większość związków nie rozróżniała podjednostek  $\beta 5c$  oraz  $\beta 5i$  i blokowała je z podobną siłą (tabela 5). Niewielką różnicę zaobserwowano jedynie w przypadku peptydów **104** i **105**, które hamowały 2,7-razy mocniej podjednostkę  $\beta 5i$  niż  $\beta 5c$ .

Tabel 5. Wartości IC<sub>50</sub> dla wybranych inhibitorów wobec c20S i i20S; n.a – brak aktywności; IC<sub>50</sub> [nM], stężenie inhibitora powodujące spadek początkowej aktywności enzymu o około 50%;

Nr	Inhibitor	IC <sub>50</sub> [nM]		
<i><math>\beta 1c</math></i>				
<b>88</b>	O2Octa-IPMD-al	192 ± 6		
<b>89</b>	Ahx-IPMD-al	141 ± 24		
<i><math>\beta 2c</math></i>				
<b>98</b>	O2Octa-VVMR-al	46 ± 6		
<b>99</b>	O1Pent-VVMR-al	19 ± 3		
		<i><math>\beta 5c</math></i>	<i><math>\beta 5i</math></i>	<i><math>\beta 5c/\beta 5i</math></i>
<b>103</b>	O2Octa-VVSF-al	81 ± 15	51 ± 7	1,6
<b>104</b>	O2Octa-VLSF-al	83 ± 9	31 ± 8	<b>2,7</b>
<b>105</b>	O2Octa-VNSF-al	485 ± 47	178 ± 25	<b>2,7</b>
<b>107</b>	O2Octa-VVQF-al	49 ± 0,004	45 ± 5	1,1
<b>108</b>	O2Octa-VVFF-al	21 ± 3	22 ± 3	1,0
<b>109</b>	O2Octa-VNFF-al	264 ± 50	109 ± 9	<b>2,4</b>
<b>110</b>	O2Octa-VLFF-al	24 ± 1	27 ± 1	0,9
<b>111</b>	O2Octa-hF-LFF-al	28 ± 1	19 ± 2	1,5
<b>112</b>	O2Octa-F(4-NO <sub>2</sub> )-LFF-al	106 ± 25	85 ± 7	1,2
<b>113</b>	O2Octa-VAFF-al	627 ± 80	382 ± 42	1,6
<b>114</b>	O2Octa-hF-AFF-al	83 ± 19	143 ± 3	0,6
<b>115</b>	O2Octa-F(4-NO <sub>2</sub> )-AFF-al	I <sub>50</sub> ~750	I <sub>50</sub> ~750	
<b>117</b>	O2Octa-Nval-Nleu-Nphe-F-al	n.a	n.a	
	MG132	251 ± 12	281 ± 15	0,9

Warto w tym miejscu wspomnieć, że lista wysoce specyficznych inhibitorów blokujących tylko jedną podjednostkę katalityczną, należącą do proteasomu konstytutywnego lub immunoproteasomu (np. tylko  $\beta 5c$ , a nie  $\beta 5i$ ), jest dość krótka. Przykładowo, oba najbardziej znane inhibitory proteasomu, bortezomib i carfilzomib, nie wykazują wysokiej specyficzności. Bortezomib blokuje podjednostki  $\beta 5c$  (IC<sub>50</sub>=4 nM) i  $\beta 5i$  (IC<sub>50</sub>=7 nM), a przy wyższych stężeniach również  $\beta 1c$  i  $\beta 1i$  (IC<sub>50</sub>=74 nM) [73]. Bardziej selektywny jest carfilzomib łączący się wyłącznie z proteasomem za pomocą grupy  $\alpha',\beta'$ -epoksyketonowej, tworząc charakterystyczny pierścień morfolinowy. Chociaż również w tym przypadku blokowane są tożsame podjednostki:  $\beta 5c$  (IC<sub>50</sub>=6 nM) i  $\beta 5i$  (IC<sub>50</sub>=33 nM). Najlepiej poznanym, wysoce selektywnym inhibitorem  $\beta 5i$  jest peptydowy epoksyketon ONX-0914. Wartość IC<sub>50</sub>

<sup>73</sup> Altun M., et al. *Effects of PS-341 on the activity and composition of proteasomes in multiple myeloma cells.* Cancer Res. **2005**, 65, 7896-901.

mierzona dla tego tripeptydu wobec  $\beta 5i$  jest blisko 50-krotnie niższa od wartości wyznaczonej względem  $\beta 5c$  [74]. Pozostałe obserwacje płynące z omawianych badań:

- spośród najsilniejszych inhibitorów podjednostki  $\beta 5c$ , większość (**108-112**, **114**) posiadała resztę Phe w pozycji  $P_2$ . Niemniej jednak, obecność Phe nie gwarantowała wysokiej aktywności czego dowodem są słabe inhibitory **113** i **115**;
- wbrew doniesieniom literaturowym faworyzującym resztę Ala w pozycji  $P_3$  selektywnych inhibitorów immunoproteasomu (kieszon substratowa  $S_3$  w  $\beta 5i$  jest mniejsza i bardziej polarna niż w  $\beta 5c$  [75]; wysoce selektywny inhibitor ONX-0914 posiada w  $P_3$  resztę Ala) tylko jeden (**113**) z trzech (**113-115**) aldehydów peptydowych z Ala w  $P_3$  blokował mocniej  $\beta 5i$  niż  $\beta 5c$ . Wyższą selektywność wobec i20S wykazywały peptydy z Asn (**105**, **109**) oraz Leu (**104**) w  $P_3$ ;
- zastąpienie reszty Val (**113**) w pozycji  $P_4$  przez występującą w carfilzomibie niebiałkową resztę homo-fenylalaniny (**114**) obniżyło wartość  $IC_{50}$  wobec  $\beta 5c$  blisko 7-krotnie;
- brak istotnej aktywności inhibitorowej peptomerów **116** i **117** będących hybrydami złożonymi z białkowych reszt aminokwasowych oraz z reszt peptoidowych pokazuje, że efektywne związanie inhibitora z enzymem nie odbywa się tylko poprzez kowalencyjne połączenie elektrofilowej grupy aldehydowej z nukleofilową grupą  $\beta$ -hydroksylową Thr enzymu. Istotne znaczenie mają również wiązania wodorowe współtworzone przez grupy amidowe inhibitora. Zastąpienie reszt  $\alpha$ -aminokwasów przez ich peptoidowe odpowiedniki, których cechą charakterystyczną jest brak amidowego atomu wodoru, wyklucza występowanie takich wiązań wodorowych;
- peptyd **111** będący silnym inhibitorem obu podjednostek  $\beta 5$ , hamował nieznacznie podjednostkę  $\beta 2c$  o trypsynopodobnej specyficzności substratowej. Wynik ten jest zgodny ze spostrzeżeniami Huber i współpracowników [55], którzy wykazali, że  $\beta 2c$  może akceptować w pozycji  $P_1$  nie tylko aminokwasy zasadowe, takie jak Arg i Lys, ale również aminokwasy hydrofobowe;
- wybrane inhibitory **104** i **111** wykazywały niższą aktywność wobec linii raka trzustki MiaPaCa-2, osteosarkomy ludzkiej MG-63, białaczki T limfoblastycznej Jurkat i nienowotworowej linii ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, w porównaniu z powszechnie stosowanym peptydowym aldehydem MG132 (tabela 6)
- inhibitor **111** wykazywał wyższą toksyczność względem komórek glejaka U87-MG. Ponadto mieszanina **111** i dinacliclibu (niskocząsteczkowego inhibitora kinaz cyklinozależnych [76]) mocniej obniżała aktywność metaboliczną komórek glejaka niż zastosowanie obu związków osobno (rys. 6).

---

<sup>74</sup> Muchamuel T., et al. *A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis*. Nat. Med. **2009**, 15, 781–787

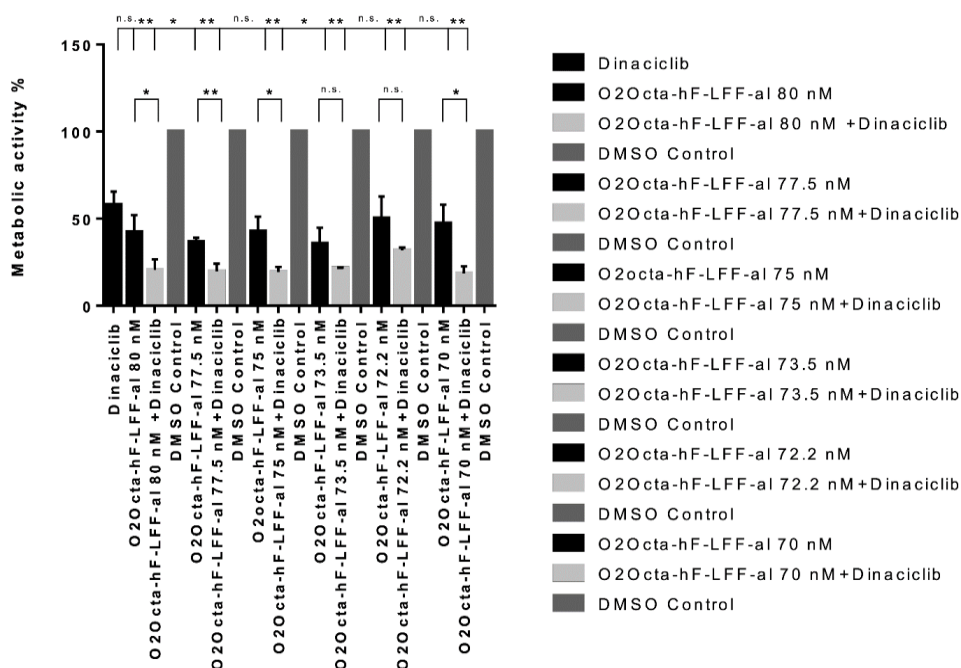
<sup>75</sup> Huber E.M. et al. *Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity*. Cell **2012**, 148, 727-38.

<sup>76</sup> Chen Z., et al. *Multiple CDK inhibitor dinacliclib suppresses neuroblastoma growth via inhibiting CDK2 and CDK9 activity*. Sci. Rep. **2016**, 6, 29090.



Tabela 6. Toksyczność peptydów wobec wybranych linii komórkowych.

Linia komórkowa	IC <sub>50</sub> [μM]		
	O2Octa-hF-LFF-al ( <b>111</b> )	O2Octa-VLSF-al ( <b>104</b> )	MG132
hFOB 1.19	67,72	134,4	1,07
MG-63	55,38	83,59	6,27
MiaPaCa-2	110,3	102,7	13,54
Jurkat	56,28	86,35	5,66
EC <sub>50</sub> [nM]			
	O2Octa-hF-LFF-al ( <b>111</b> )	O2Octa-hF-AFF-al ( <b>114</b> )	MG132
U87-MG	72,2	815,9	95,08



Rysunek 6. Aktywność metaboliczna komórek U87-MG po inkubacji z peptydem **111** i dinaciclubem.

### **Splicing peptydowy katalizowany przez proteiny serynowe**

*Splicing* to termin kojarzony przede wszystkim z modyfikacją post-transkrypcyjną prekursorowego mRNA (pre-mRNA), w trakcie której dochodzi do usuwania fragmentów niekodujących zwanych intronami i łączenia fragmentów kodujących zwanych egzonami. Produktem jest dojrzały mRNA stanowiący matrycę do biosyntezy białek. *Splicing* nie jest jednak procesem, któremu ulegają wyłącznie kwasy RNA. W roku 1990 opisany został proces autokatalicznego *splicingu białkowego* polegający na samo-wycinaniu się wewnętrznych fragmentów białka prekursorowego zwanych inteinami (*ang. internal protein*) i następnie na łączeniu za pomocą wiązań peptydowych pozostałych segmentów zwanych eksteinami (*ang. external protein*) [77]. Taki rodzaj modyfikacji post-translacyjnej obserwowany jest głównie u eubakterii, archebakterii oraz nielicznych eukariontów.

<sup>77</sup> Volkman G., Mootz H.D. *Recent progress in intein research: from mechanism to directed evolution and applications.* Cell Mol. Life. Sci. **2013**, 70, 1185-206.

Kolejnym przykładem jest opisany w roku 2004 *splicing peptydowy* katalizowany przez proteasom [78,79]. Przez wiele lat panowało przekonanie, że antygeny peptydowe są liniowymi, ciągłymi fragmentami struktury pierwszorzędowej białek. Pogląd ten zakwestionowano odkrywając antygeny złożone z krótkich fragmentów peptydowych, które w natywnym białku są od siebie oddalone. Hanada wraz ze współpracownikami [78] dowiedli, że antygen o sekwencji aminokwasowej NTYASPRFK, wywodzący się z białka FGF-5 (czynnika wzrostu fibroblastów), powstaje poprzez połączenie dwóch oddalonych od siebie fragmentów: pentapeptydu o sekwencji N<sup>172</sup>TYAS<sup>176</sup> z tetrapeptydem P<sup>217</sup>RFK<sup>220</sup>. Połączenie to poprzedzone jest usunięciem peptydu złożonego z 40 reszt aminokwasowych, oddzielającego oba fragmenty w natywnym białku FGF-5. Kolejne przykłady to antygeny powstające na drodze *splicingu* z glikoproteiny gp100, prezentowane na powierzchni komórek czerniaka [80], z białka SP110 [81] oraz z tyrozynazy [82]. Badania nad mechanizmem procesu *splicingu peptydowego* w proteasomie wykazały, że przebiega on na drodze bezpośredniej transpeptydacji (rys. 7, [77,83]). Kluczowe etapy w tym procesie to: (i) utworzenie acylo-enzymu między *N*-końcowym fragmentem peptydowym (na rysunku jest to tripeptyd RTK) i grupą  $\beta$ -hydroksylową reszty treoniny znajdującej się w jednej z jednostek katalitycznych proteasomu; oraz (ii) atak nukleofilowy grupy  $\alpha$ -aminowej uwolnionej w wyniku hydrolizy *C*-końcowego fragmentu peptydowego (QLYPEW) na karbonylowy atom węgla acylo-enzymu. Prowadzi to do utworzenia nowego wiązania peptydowego i produktu o sekwencji RTKQLYPEW, który następnie tworzy kompleks z MHC-I i jest prezentowany na powierzchni komórki limfocytom CD8+. Energia potrzebna do utworzenia nowego wiązania peptydowego jest uzyskiwana w wyniku rozszczepienia innego wiązania. Wspomniany atak nukleofilowy grupy  $\alpha$ -aminowej nastąpić musi szybciej niż przyłączenie cząsteczki wody do acylo-enzymu, co skutkowałoby rozpadem acylo-enzymu na drodze hydrolizy. *Splicing peptydowy* można więc rozpatrywać jako proces konkurencyjny wobec proteolizy. Warto nadmienić, że *splicing peptydowy* może również prowadzić do powstania antygenów peptydowych (np. QLYPEWRTK), w których oba połączone fragmenty są w położeniu odwrotnym niż ma to miejsce w wyjściowym peptydzie [84].

---

<sup>78</sup> Hanada K., et al. *Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing*. Nature **2004**, 427, 252–256

<sup>79</sup> Vigneron N., et al. *An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome*. Science **2004**, 304, 587–590

<sup>80</sup> Michaux A., et al. *A spliced antigenic peptide comprising a single spliced amino acid is produced in the proteasome by reverse splicing of a longer peptide fragment followed by trimming*. J. Immunol. **2014**, 192, 1962–1971

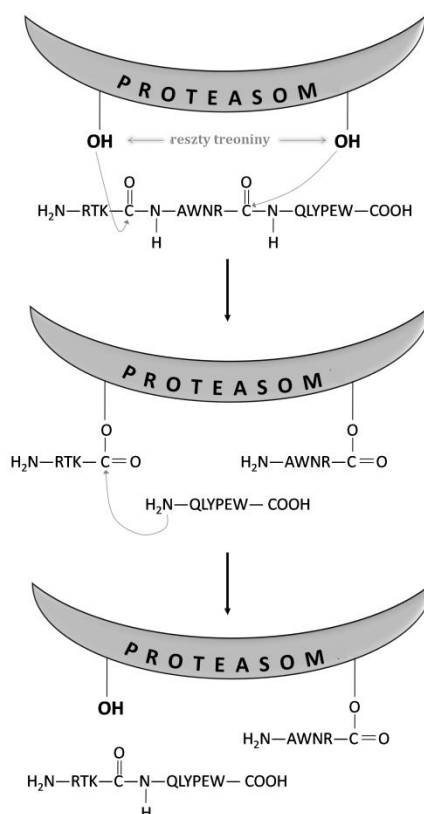
<sup>81</sup> Warren E.H., et al. *An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order*. Science **2006**, 313, 1444–1447

<sup>82</sup> Dalet A., et al. *An antigenic peptide produced by reverse splicing and double asparagine deamidation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2011**, 108, E323–E331

<sup>83</sup> Mishto M. et al. *Driving forces of proteasome-catalyzed peptide splicing in yeast and humans*. Mol. Cell. Proteomics **2012**, 11, 1008–1023

<sup>84</sup> Ebstein F., et al. *Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes*. Sci. Rep. **2016**, 6, 24032

Liczbę peptydów powstających w warunkach *in vitro* w proteasomie na drodze *splicingu* ocenia się na 1-2% wszystkich peptydów będących produktami działalności proteasomu [83]. Niemniej jednak szacuje się, że aż 25% peptydów prezentowanych limfocytom za pomocą ludzkiego MHC-I to właśnie produkty *splicingu* [85]. Wiele z nich wywołuje istotną odpowiedź układu immunologicznego prowadzącą np. do znaczącej regresji guza nowotworowego u pacjentów z czerniakiem [86].



Rysunek 7. Schemat *splicingu* peptydowego zachodzącego w proteasomie na drodze bezpośredniej transpeptydacji [78].

Grupa badawcza prof. Krzysztofa Rolki z Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii UG zademonstrowała, że *splicing peptydowy* może być katalizowany również przez proteiny serynowe, które znacząco różnią się swą budową od proteasomu [87]. W badaniach wykorzystano monocykliczne analogi inhibitora SFTI-1 (posiadające jeden mostek disulfidowy) o podwojonej sekwencji aminokwasowej składającej się z 28 reszt aminokwasowych (rys. 8A pochodzi z rozprawy habilitacyjnej dr hab. Anny Łęgowskiej [88]). Inkubacja takich peptydów z odpowiednim enzymem w warunkach *in vitro* (w zależności od potrzeb stosowano bydlęcą  $\beta$ -trypsynę lub bydlęcą  $\alpha$ -chymotrypsynę w ilościach katalitycznych, tj. 1-2 mol%) skutkowało usunięciem środkowego,

<sup>85</sup> Liepe J., et al. A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science* **2016**, 354, 354–358

<sup>86</sup> Vigneron N., et al. Peptide splicing by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 21170-21179

<sup>87</sup> Łęgowska A., et al. Inhibitory activity of double-sequence analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds: an example of peptide splicing. *FEBS J.* **2010**, 277, 2351-9.

<sup>88</sup> Łęgowska A. Poszukiwania proteolitycznie trwałych peptydów i peptydomimetyków, jako narzędzi kontroli aktywności wybranych proteinaz serynowych. Rozprawa habilitacyjna **2010**.

liniowego fragmentu peptydowego złożonego z 14 reszt aminokwasowych. Następnie dochodziło do złączenia dwóch pozostałych fragmentów zespolonych mostkiem disulfidowym: *N*-końcowego o sekwencji GRCTX (gdzie X to Lys lub Phe) i *C*-końcowego, SIPPICFPD. W ten sposób odtworzona została struktura pierwszorzędowa monocyklicznego inhibitora SFTI-1 (**2**).

W tym samym czasie proces *splicingu* katalizowanego przez proteiny serynowe zaobserwowany został również przez grupę prof. Davida Craika z Uniwersytetu w Queensland w Australii [89]. Obiektem ich badań był m.in. cykliczny analog inhibitora SFTI-1 pozbawiony mostka disulfidowego (reszty Cys zastąpiono w nim resztami kwasu 2-aminobutanowego, Abu), posiadający ciągły, nieprzerwany łańcuch główny złożony z 14 aminokwasów (rys. 8B). Inkubacja równomolowych ilości takiego peptydu i bydlęcej  $\beta$ -trypsyny prowadziła do natychmiastowej hydrolizy dwóch wiązań peptydowych, czego następstwem było wycięcie tripeptydu i otrzymanie produktu liniowego zbudowanego z 11 reszt aminokwasowych. Dokładniejsza analiza wykazała również obecność niewielkiej ilości związku cyklicznego powstałego najprawdopodobniej w wyniku resyntezy wiązania peptydowego w produkcie liniowym. Warto podkreślić, że takie same wyniki otrzymano również mieszając peptyd z enzymem w innych stosunkach molowych (1:10 i 1:100).

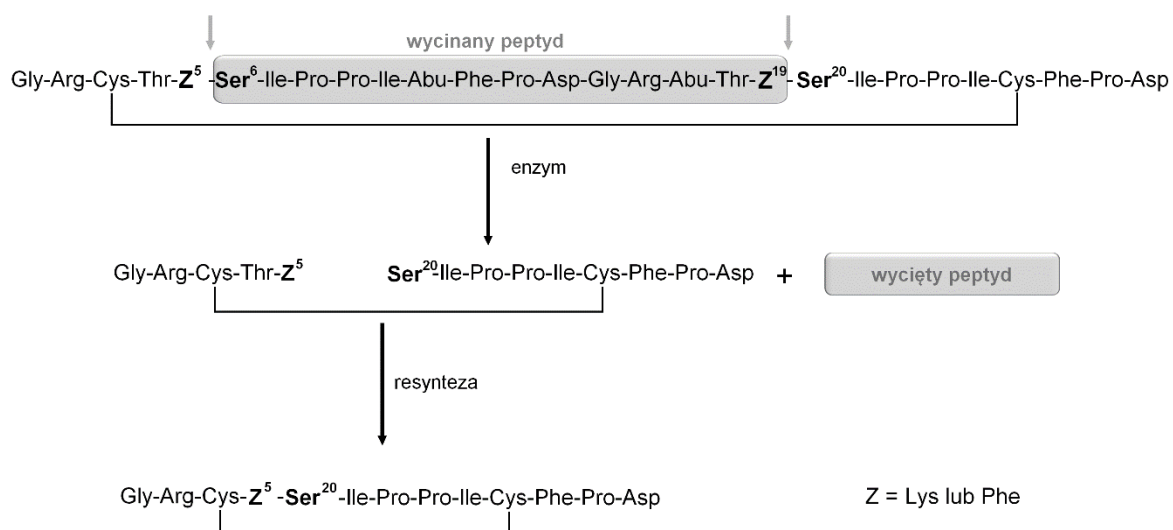
Kolejnym z celów mojej działalności naukowej było rozwinięcie prac zapoczątkowanych przez **prof. Krzysztofa Rolkę** i **dr hab. Annę Łęgowską** nad *splicingiem* peptydowym katalizowanym przez proteiny serynowe. Badania te opisane zostały w pracach **H.3**, **H.6**, **H.7**, **H.11**. W tabeli 7 umieszczono listę zaprojektowanych i otrzymanych na drodze syntezy chemicznej peptydów, które posłużyły do badań nad *splicingiem* (peptydy **141-148** zamieszczone zostały w rozprawie doktorskiej dr Magdaleny Filipowicz [90]). Pierwsza seria peptydów - oznaczona numerami od **125** do **132** - obejmowała związki zaprojektowane na podstawie sekwencji aminokwasowej monocyklicznego inhibitora SFTI-1 (**2**). Związki te składały się z dwóch łańcuchów peptydowych połączonych międzycząsteczkowym mostkiem disulfidowym, stanowiących *N*- i *C*-końcowe fragmenty SFTI-1.

---

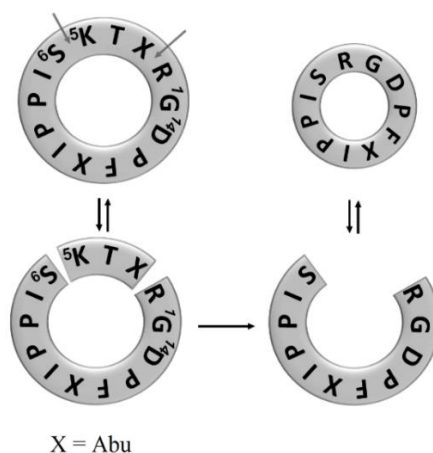
<sup>89</sup> Colgrave M.L., et al. *Sunflower trypsin inhibitor-1, proteolytic studies on a trypsin inhibitor peptide and its analogs*. Biopolymers **2010**, 94, 665-72.

<sup>90</sup> Filipowicz M., *Analogi SFTI-1 ulegające splicingowi peptydowemu, jako wektory do wprowadzania peptydów o aktywności cytotoksycznej lub sond fluorescencyjnych*. Praca doktorska **2016**

A



B



Rysunek 8. Schemat *splicing*u peptydowego opisanego przez grupy prof. Rolki (A) i prof. Craika (B).

Doświadczenia mające na celu lepsze zrozumienie procesu *splicing*u peptydowego katalizowanego przez proteiny serynowe prowadzono w warunkach *in vitro* stosując katalityczne (1-2 mol%) oraz równomolowe ilości enzymu względem analogów SFTI-1 (**H.3**, **H.7**). Okazało się, że stosunek ilościowy peptydu i enzymu ma duży wpływ na otrzymane wyniki. Badania z wykorzystaniem spektrometrii mas wykazały, że jedynie dwa peptydy - **129** i **130** - ulegały *splicing*owi podczas inkubacji z katalitycznymi ilościami enzymu. W obu przypadkach, półtoragodzinna inkubacja z enzymem prowadziła do pojawienia się sygnału odpowiadającego monocyklicznemu SFTI-1 (**2**). Poprzedzone to było katalizowaną enzymatycznie hydrolizą wiązania Lys-Ser w *N*-końcowym łańcuchu, prowadzącą do usunięcia reszty Ser (w przypadku peptydu **130** usuwana była również reszta *N*-końcowej Lys z *C*-końcowego fragmentu). W opisywanych warunkach eksperymentu (przy zastosowaniu katalitycznych ilości enzymu) hydrolityczne usunięcie *C*-końcowej reszty Ser z *N*-końcowego fragmentu wydaje się być warunkiem umożliwiającym zajście *splicing*u. Wskazuje na to wynik badań z udziałem peptydu **131**, który nie posiadał tej reszty. W tym przypadku nukleofilowy atak grupy  $\beta$ -hydroksylowej

enzymatycznej reszty Ser odbywał się na karbonylowy atom węgla Lys połączonej z Ser w C-końcowym fragmencie analogu SFTI-1. Natomiast pomiędzy grupą  $\alpha$ -karboksylową Lys (*N*-końcowy fragment) i enzymem nie powstawało wiązanie estrowe, które mogłoby stać się obiektem ataku nukleofilowego ze strony wolnej grupy aminowej Ser. W rezultacie wiązanie P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' nie ulegało resyntezie. Okazało się również, że w opisywanych warunkach badawczych znaczenie miał rodzaj reszty leżącej na C-końcu *N*-końcowego peptydu. W analogach **126** i **128** odpowiednia proteinaza serynowa nie była w stanie odciąć znajdującego się tam kwasu *Anb*-NH<sub>2</sub>, czego efektem był brak resyntezy wiązania P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'. W przypadku peptydu **127**, posiadającego w porównaniu z peptydem **126** dodatkową resztą Lys na *N*-końcu swego C-końcowego fragmentu, reszta *Anb*-NH<sub>2</sub> była usuwana, jednakże tu również nie zaobserwowano odtworzenia wiązania reaktywnego. Można spekulować, że hydroliza wiązania Lys-Ser w peptydzie **127** stymulowała odcinanie reszty *Anb*-NH<sub>2</sub>.

Zhydrolizowane wiązanie peptydowe w analogu **125** nie ulegało resyntezie w obecności katalitycznych ilości enzymu. Wynik ten był dość zaskakujący w obliczu wcześniejszych doniesień literaturowych [91], według których inkubacja z trypsyną natywnego, bicyklicznego SFTI-1 (**1**) prowadziła do ustalenia się stanu równowagi, gdzie proporcja między nietkniętym, natywnym peptydem oraz peptydem ze zhydrolizowanym wiązaniem między Lys5 (P<sub>1</sub>) i Ser6 (P<sub>1</sub>') wynosiła 9:1. Warto dodać, że nie miało znaczenia to, czy inkubację rozpoczynano z peptydem niezmodyfikowanym, posiadającym wiązanie między resztami P<sub>1</sub> i P<sub>1</sub>', czy też z jego analogiem pozbawionym tego wiązania. W omawianym badaniu, wspomniana równowaga osiągnana była już po blisko 2-godzinnej inkubacji równomolowych ilości peptydu i enzymu. Eksperyment ten został powtórzony przez Colgrave i współpracowników [89], którzy zwiększyli stężenia reagentów oraz wydłużyli czas inkubacji do 24 godzin. Stosunek molowy natywnego SFTI-1, którym rozpoczynano inkubację, i jego analogu ze zhydrolizowanym wiązaniem P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' osiągnął poziom 1:1. Taka równowaga inhibitora dziewiczego i zmodyfikowanego jest cechą charakterystyczną dla standardowego mechanizmu oddziaływania inhibitorów kanonicznych z proteinazami, opisanego przez Laskowskiego Jr. i współpracowników [10]. Sytuacja odwrotna, czyli inkubacja zhydrolizowanego SFTI-1 (z rozciętym wiązaniem P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'), skutkowałą pojawieniem się mieszaniny złożonej z trzech produktów – bicyklicznego SFTI-1 (stanowiącego ilościowo ~50% wszystkich produktów), startowego peptydu monocyklicznego (~25%) oraz nowego peptydu z rozciętymi dwoma wiązaniami peptydowymi (Arg<sup>2</sup>-Cys<sup>3</sup> i Lys<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>; ~25%).

---

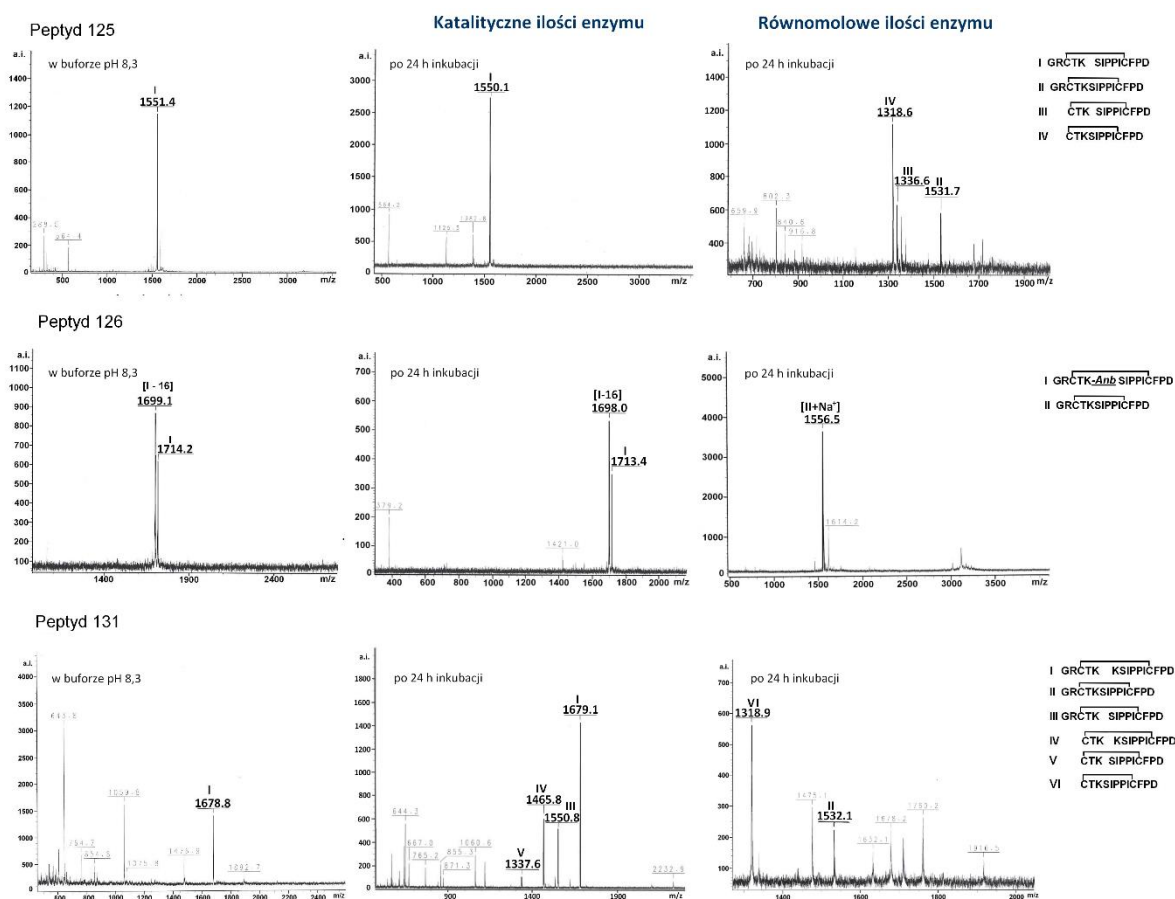
<sup>91</sup> Marx U.C. et al. *Enzymatic cyclization of a potent Bowman-Birk protease inhibitor, sunflower trypsin inhibitor-1, and solution structure of an acyclic precursor peptide*. J. Biol. Chem. **2003**, 278, 21782-9.

Tabela 7. Analogi monocyklicznego SFTI-1 (2) wykorzystane w badaniach *splicingu peptydowego* katalizowanego przez proteiny serynowe. *Fluo*- fluoresceina; *Rhd* – rodamina.

Nr	Sekwencja peptydu	Ilości katal.	Ilości równomolowe	nr zw./nr pub.
124	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-S-I-P-P-I-Abu-F-P-D-G-R-Abu-T-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		
125	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K}} \quad \overbrace{\text{S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	1/H.3
126	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-Anb-NH}_2} \quad \overbrace{\text{S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	2/H.3
127	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-Anb-NH}_2} \quad \overbrace{\text{K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	3/H.3
128	$\overbrace{\text{G-R-C-T-F-Anb-NH}_2} \quad \overbrace{\text{S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	4/H.3
129	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-S}} \quad \overbrace{\text{S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK	TAK	5/H.3
130	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-S}} \quad \overbrace{\text{K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK	TAK	6/H.3
131	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K}} \quad \overbrace{\text{K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	7/H.3
132	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-S-I-P-P-I-Abu-F-P-D}} \quad \overbrace{\text{G-R-Abu-T-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK	TAK	8/H.3
133	$\overbrace{\text{G-r-C-T-Nlys-S-I-P-P-I-Abu-F-P-D-G-r-Abu-T-Nlys-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	1/H.6
134	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		1/H.11
135	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-K-S-R-G-D-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		2/H.11
136	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-K-S-(O}_2\text{Octa)}_2\text{-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	NIE	3/H.11
137	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-K-S-F-P-D-G-R-Abu-T-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		4/H.11
138	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-G-R-G-D-N-P-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	TAK	5/H.11
139	$\overbrace{\text{G-r-C-T-k-S-G-R-G-D-N-P-k-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	NIE	6/H.11
140	$\overbrace{\text{G-r-C-T-k-G-R-G-D-N-P-k-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	NIE	[desSer <sup>6</sup> ]/6/ H.11
141	$\overbrace{\text{G-R-C-T-F-S-R-G-D-F-S-F-P-D-G-R-Abu-T-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		1/[90]
142	$\overbrace{\text{G-R-C-T-F-S-R-G-D-F-S-R-G-D-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		2/[90]
143	$\overbrace{\text{G-R-C-T-F-S-R-G-D-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		3/[90]
144	$\overbrace{\text{G-R-C-T-F-S-R-G-D-F-S-(O}_2\text{Octa)}_2\text{-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	NIE	4/[90]
145	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-F-S-F-P-D-G-R-Abu-T-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		9/[90]
146	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-F-S-R-G-D-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		10/[90]
147	$\overbrace{\text{G-r-C-T-K-S-R-G-D-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	TAK		11/[90]
148	$\overbrace{\text{G-R-C-T-K-S-R-G-D-F-S-(O}_2\text{Octa)}_2\text{-F-S-I-P-P-I-C-F-P-D}}$	NIE	NIE	12/[90]
149	$\overbrace{\text{Fluo-Ala-r-C-T-K-S-I-K-T-K-S-I-P-P-I-C-F-P-D}} \quad \overbrace{\text{Rhd}}$	NIE	TAK	7/H.11

Badania przeprowadzone z użyciem równomolowych ilości enzymu i analogów SFTI-1 (**125-132**, rys. 9, H.7) pokazały jednoznacznie, że *splicingu* nie musi poprzedzać wcześniejsza hydroliza wiązania peptydowego, jak wynikało z naszych eksperymentów z udziałem katalitycznych ilości enzymu, oraz jak sugerowała Vigneron wraz ze współpracownikami [79]. Przykładowo, w wyniku 1,5-godzinnej inkubacji peptydu **131** z enzymem zarejestrowane zostały na widmie mas sygnały odpowiadające monocyklicznemu SFTI-1 (m/z 1531,1) oraz monocyklicznemu SFTI-1 pozbawionemu *N*-końcowego dipeptydu Gly-Arg (m/z 1318,9).

Warunkiem niezbędnym do zajścia *splicingu* było powstanie acylo-enzymu. Najłatwiej tworzył się on wtedy, gdy atak nukleofilowy enzymatycznej grupy  $\beta$ -hydroksylowej Ser odbywał się na karbonylowy atom węgla reszty Lys, jak miało to miejsce w peptydach **129** i **130**. Jednakże przy wysokich stężeniach enzymu, acylo-enzym mógł powstać również na skutek oddziaływania wspomnianej grupy  $\beta$ -hydroksylowej Ser z grupą  $\alpha$ -karboksylową reszty Lys analogu **125** i **131**.



Rysunek 9. Widma mas produktów po 24 h inkubacji analogów SFTI-1 z bydlęcą  $\beta$ -trypsyną.

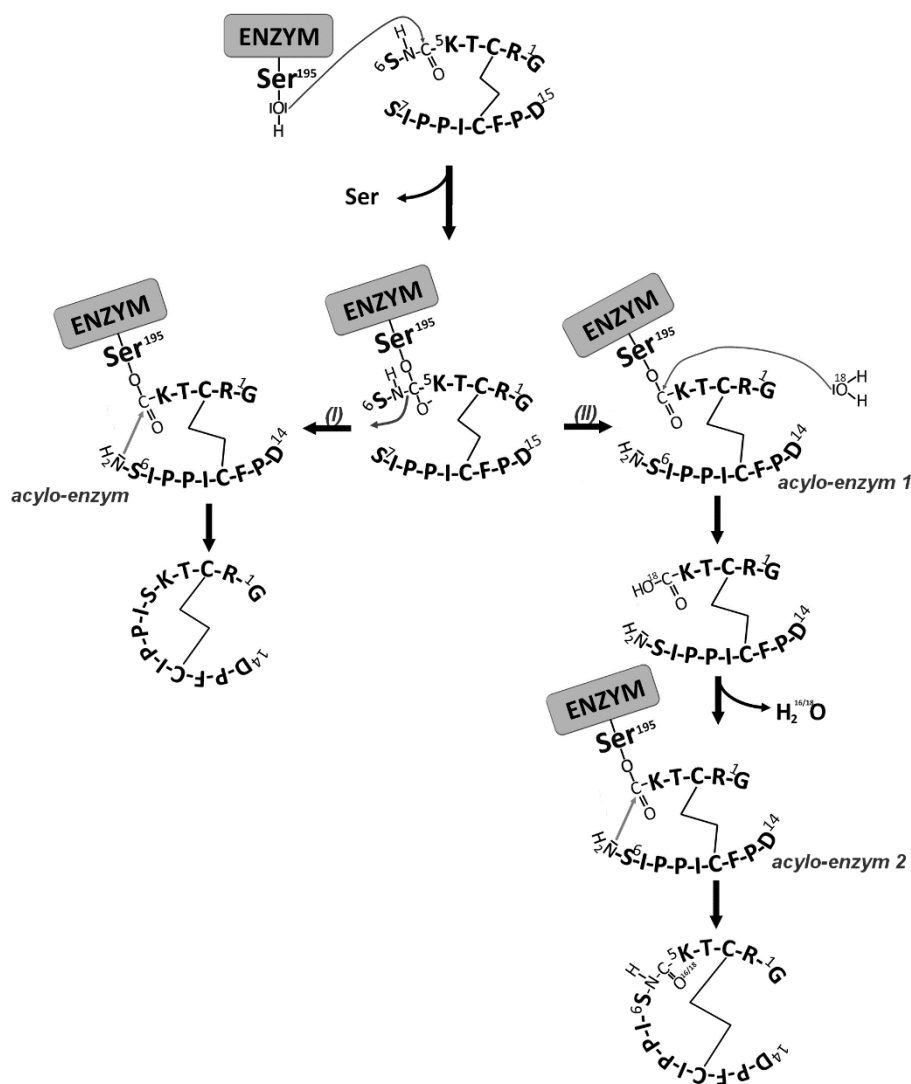
Inkubacja związku **128** mającego analogiczną budowę jak peptyd **126** - z tą różnicą, że zamiast reszty Lys w pozycji  $P_1$  występuje Phe - z równomolową ilością bydlęcej  $\alpha$ -chymotrypsyny, spowodowała (już po 1,5 h) całkowitą hydrolizę połączenia Phe-Anb-NH<sub>2</sub> i utworzenie wiązania Phe-Ser ( $P_1$ - $P_1'$ ). Wyniki uzyskane dla analogu **128** potwierdziły wcześniejsze doniesienia [87], że proces *splicingu* może być katalizowany również przez inne niż trypsyna proteinazy serynowe. Zachodzenie



*splicing* w opisywanych warunkach dodatkowo potwierdziły badania rentgenostrukturalne kompleksów trypsyny z wybranymi analogami - **125**, **126** i **132** - przeprowadzone w ramach współpracy z **dr. hab. Grzegorzem Dubinem** z Zakładu Mikrobiologii, Laboratorium Krystalografii Rentgenowskiej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (**H.7**). Należy podkreślić, iż w procesie krystalizacji stosowane były wysokie (2,57 mM), często równomolowe stężenia enzymu i peptydów. Pomimo różnic w budowie wspomnianych peptydów, analiza rentgenostrukturalna wykazywała w każdym przypadku obecność monocyklicznego SFTI-1 zakotwiczonego w centrum aktywnym trypsyny.

Kolejnym zadaniem badawczym było jednoznaczne określenie mechanizmu *splicing* katalizowanego przez proteiny serynowe. Pierwszym brany pod uwagę mechanizmem była bezpośrednia transpeptydacja, która zachodzi podczas *splicing* przebiegającego wewnątrz proteasomu [83]. W trakcie tego procesu, powstały acylo-enzym jest atakowany przez *N*-końcową grupę  $\alpha$ -aminową obecnego w pobliżu peptydu. Sprzyja temu ograniczona przestrzeń wnętrza proteasomu 20S, zapewniająca wysokie stężenie reagujących fragmentów peptydowych. Na bezpośrednią transpeptydację wskazywały wyniki naszych eksperymentów z zastosowaniem katalitycznych ilości enzymu. Jednak, z drugiej strony, badania z użyciem równomolowych ilości enzymu nie wykluczały procesu dwuetapowego, w którym pierwotnie utworzony acylo-enzym mógłby najpierw ulec rozpadowi na drodze hydrolizy (I etap, rys. 10), a następnie, ponownie utworzony acylo-enzym (między grupą  $\alpha$ -karboksylową peptydu a enzymem) stałby się obiektem ataku ze strony grupy  $\alpha$ -aminowej innego peptydu lub fragmentu peptydowego (II etap).

Aby wskazać właściwy mechanizm, enzym i wybrane peptydy (**125** i **129**) inkubowano w buforze Tris-HCl zawierającym wodę  $H_2^{18}O$  (**H.7**). Produkty analizowano za pomocą wysokorozdzielczego aparatu TripleTOF 5600+. Przy tak dobranych warunkach (obecność wody  $H_2^{18}O$ ), produkt *splicing* przebiegającego według mechanizmu dwuetapowego, uwzględniającego hydrolizę, posiadać powinien masę cząsteczkową (wartość *m/z* na widmie mas) wyższą o 2 Da. Taką sytuację zaobserwowano w próbnym eksperymencie polegającym na hydrolizie liniowego substratu [D-Arg<sup>2</sup>,Abu<sup>3,11</sup>]SFTI-1. Analiza mas peptydów **125** i **129** nie wykazała jednak obecności takiego sygnału, co dowodzi, że głównym mechanizmem *splicing* katalizowanego przez proteiny serynowe jest bezpośrednia transpeptydacja. **Eksperymentalne potwierdzenie tego faktu uważam za moje istotne osiągnięcie naukowe.**



Rysunek 10. Dwa możliwe mechanizmy *Splicing* peptydowego: (I) bezpośrednia transpeptydacja; (II) hydroliza i transpeptydacja.

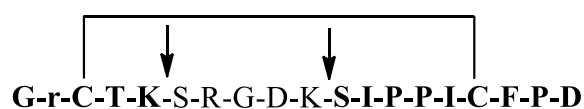
Dalsze prace wykazały, że *splicingowi* ulegać mogą także związki hybrydowe zbudowane z  $\alpha$ -aminokwasów i *N*-podstawionych reszt glicyny, zwane peptomerami (H.6). Wcześniejsze badania pokazywały, że umieszczenie w pozycji P<sub>1</sub> *N*-podstawionej reszty glicyny imitującej Phe lub Lys (określanych jako Nphe lub Nlys) prowadzi do otrzymania selektywnych i mocnych inhibitorów  $\alpha$ -chymotrypsyny ([Nphe<sup>5</sup>]SFTI-1) oraz  $\beta$ -trypsyny ([Nlys<sup>5</sup>]SFTI-1), dla których stałe asocjacji  $K_a$  wynosiły odpowiednio  $3,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  oraz  $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  [92]. Co najistotniejsze, dodatkowym atutem obu peptomerów była ich bardzo wysoka odporność na hydrolizę enzymatyczną, zarówno w środowisku kwaśnym jak i zasadowym [93]. Katalizowany enzymatycznie proces *splicing*, któremu ulegają peptomery, pokazany został na przykładzie związku [Nlys<sup>5,19</sup>]BiSFTI-1 (133) o podwójnej sekwencji

<sup>92</sup> Stawikowski M., et al. *Examples of peptide-peptoid hybrid serine protease inhibitors based on the trypsin inhibitor SFTI-1 with complete protease resistance at the P1-P1' reactive site.* Chembiochem. **2005**, 6, 1057-61.

<sup>93</sup> Krzywda S., et al. *Structure of a proteolytically resistant analogue of (Nlys)<sup>5</sup>SFTI-1 in complex with trypsin: evidence for the direct participation of the Ser214 carbonyl group in serine protease-mediated proteolysis.* Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **2014**, 70(Pt 3), 668-75.

aminokwasowej inhibitora SFTI-1, w którym białkowe reszty Lys zastąpiono ich *N*-podstawionymi odpowiednikami. Wynikiem trwającej 24 godziny inkubacji [Nlys<sup>5,19</sup>]BiSFTI-1 z równomolową ilością bydlęcej  $\beta$ -trypsyny było pojawienie się na widmie mas sygnałów odpowiadających monocyklicznemu peptomerowi [Nlys<sup>5</sup>]SFTI-1 oraz jego analogowi ze zhydrolizowanym wiązaniem pomiędzy Nlys5 (P<sub>1</sub>) i Ser6 (P<sub>1</sub>'). W przypadku inkubacji peptomeru z katalityczną ilością enzymu (1,5 mol%) nie zaobserwowano podobnych wyników. Dla porównania, katalityczna ilość trypsyny wystarczyła aby już po 1,5-godzinnej inkubacji z peptydem [Lys<sup>5,19</sup>]BiSFTI-1 powstał monocykliczny SFTI-1 (**2**). Dodatkowa analiza mas produktów inkubacji równomolowych ilości enzymu i peptomeru [Nlys<sup>5,19</sup>]BiSFTI-1, wykonana techniką ESI-Q-TOF, potwierdziła wystąpienie procesu *splicingu*. Wykazana została również obecność kompleksu, w którym miejsce aktywne trypsyny obsadzone było peptomerem [Nlys<sup>5</sup>]SFTI-1 ze zhydrolizowanym wiązaniem P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'. Potwierdzono zatem fakt, że wiązanie peptydowe współtworzone przez resztę peptoidową jest bardziej odporne na hydrolizę. Jednakże, reszta ta nie stanowi pełnej ochrony przed degradacją takiego wiązania, jak również nie stwarza przeszkody w jego resyntezie.

Ostatnim celem badawczym było pokazanie praktycznego zastosowania procesu *splicingu* peptydowego (**H.11**). Inhibitor SFTI-1 wykorzystany został jako związek bazowy do - wspomnianego już w tym referacie - przeszczepiania molekularnego (*ang. molecular grafting*). Zaprojektowanych i otrzymanych zostało 15 monocyklicznych analogów inhibitora SFTI-1, zawierających w swej sekwencji co najmniej jeden motyw RGD (lub DGR) lub GRGDNP (związki **134** – **148** w tabeli 7, rys. 11). Tripeptyd RGD (Arg-Gly-Asp) znany jest z efektywnego oddziaływania z receptorami integrynowymi – głównie  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  – obecnymi w dużych ilościach na powierzchni wielu komórek nowotworowych [94]. Receptory te uczestniczą w tak ważnych procesach jak: adhezja komórek, ich migracja, proliferacja, angiogeneza, różnicowanie oraz apoptoza. Peptydy zawierające w swej sekwencji motyw RGD pełnić mogą funkcję inhibitorów integryn hamujących wzrost guza nowotworowego.



Rysunek 11. Struktura peptydu **134**; strzałkami oznaczono wiązania peptydowe hydrolizowane przez trypsynę. Uwolniony fragment zawiera motyw RGD.

Większość peptydów ulegała *splicingowi* w warunkach *in vitro* pod wpływem katalitycznych ilości enzymu. Wyjątkiem były peptydy z resztami D-lizyny w miejscach spodziewanej hydrolizy (**139**, **140**) oraz związki posiadające wbudowany w ich strukturę pierwszorzędową fragment poli(tlenku etylenu) (O<sub>2</sub>O<sub>octa</sub>)<sub>2</sub> (**136**, **144**, **148**). Większość peptydów (z wyjątkiem **135** i **138**) wykazywała wysoką stabilność w ludzkiej surowicy, a peptydy ulegające *splicingowi* wykazywały najwyższy poziom aktywności inhibitorowej (zwłaszcza **134** i **137**), co najprawdopodobniej związane było z odtwarzaniem

<sup>94</sup> Desgrosellier J.S., Cheres D.A. *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. Nat. Rev. Cancer. **2010**, 10, 9–22

się struktury monocyklicznego SFTI-1 (**2**). Wbrew wcześniejszym doniesieniom literaturowym [95,96], peptydy **138**, **139** i **140**, jak również związki referencyjne GRGDNP i SGRGDNP, nie wpływały na metabolizm komórek Jurkat. Natomiast niezależnie od skłonności do ulegania *splicingowi*, badane analogii SFTI-1 wykazywały porównywalną toksyczność wobec linii komórek glejaka U87-MG.

Peptyd **149** z fluoresceiną (*Fluo*) przyłączoną do jego *N*-końcowej grupy  $\alpha$ -aminowej oraz rodaminą (*Rhd*) dołączoną do grupy  $\varepsilon$ -aminowej Lys8, zaprojektowany został w celu zbadania *splicingu* zachodzącego wewnątrz komórek. Obecność obu fluoroforów umożliwiała bezpromienne przekazywanie energii wzbudzenia między cząsteczką donora (*Fluo*) i cząsteczką akceptora (*Rhd*). Badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, jak również analiza lizatu komórkowego pokazały, że peptyd wnikał do wnętrza komórek HaCaT gdzie ulegał proteolizie. Rozpad mostka disulfidowego, spowodowany najprawdopodobniej przez obecny w komórkach glutation, uniemożliwiał jednak odtworzenie wiązania P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'.

### **Badania nad inhibitorami pochodzenia zwierzęcego**

W swojej działalności badawczej nie ograniczyłem się tylko do roślinnego inhibitora SFTI-1. Obiektem mojego zainteresowania były także peptydowe inhibitory proteaz wydzielone ze skóry żab. Wątek ten stanowił kontynuację prac rozpoczętych przez dr hab. Annę Łęgowską (Wydział Chemii, UG). Wyniki zaprezentowane zostały w pracach **H.1** z roku 2012 oraz **H.9** z roku 2014. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że część wyników - wartości stałych asocjacji  $K_a$  wyznaczone wobec bydlęcych  $\beta$ -trypsyny i  $\alpha$ -chymotrypsyny oraz ludzkiej elastazy leukocytarnej, jak również wstępne wyniki badań mikrobiologicznych (także pokazane tutaj wartości MIC, *ang. minimal inhibitory concentration*, mierzone na podłożu mineralnym Davisa i płynnym podłożu Muellera-Hintona) - zawarta została w rozprawie habilitacyjnej dr hab. A. Łęgowskiej z roku 2010, zatytułowanej „*Poszukiwania proteolitycznie trwałych peptydów i peptydomimetyków, jako narzędzi kontroli aktywności wybranych proteinaz serynowych*” [88].

Naszą uwagę przyciągnęły dwa peptydy opisywane w literaturze jako silne inhibitory trypsyny wydzielone ze skóry żab *Odorrana grahami* (OG) [97] i *Huia versabilis* (HV) [98]. Pierwszy z nich, OGTI (*ang. OG trypsin inhibitor*) o sekwencji AVNIPFKVHFRC(&)KAAFC(&) (**150**, tabela 8), posiada unikalną *N*-końcową pętlę wiążącą złożoną z 6-ciu reszt aminokwasowych, z Lys13 w pozycji P<sub>1</sub>. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że OGTI był w stanie hamować aktywność proteolityczną trypsyny tylko przez kilka minut, po czym ulegał degradacji enzymatycznej. Stanowił więc, w warunkach naszego eksperymentu, raczej substrat niż inhibitor trypsyny. Dodatkowo pokazano

<sup>95</sup> Buckley C.D., et al. *RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation*. *Nature* **1999**, 397, 534-9.

<sup>96</sup> Okrój M., et al. *In vitro and in vivo analyses of the biological activity of RGD peptides towards Ab Bomirski melanoma*. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2003**, 8, 873-84.

<sup>97</sup> Li J., et al. *A small trypsin inhibitor from the frog of Odorrana grahami* *Biochimie.* **2008**, 90, 1356-61.

<sup>98</sup> Song G., et al. *HV-BBI - a novel amphibian skin Bowman-Birk-like trypsin inhibitor* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 372, 191-6.

(we współpracy z **dr hab. Ireną Maliszewską** z Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej), że peptyd ten wykazuje niewielkie właściwości antydrobnoustrojowe, obserwowane tylko na płynnym podłożu mineralnym Davisa (*Davis Minimal Broth*). Wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii *Staphylococcus aureus*, MIC, wynosiła 50 µg/mL.

Znacznie mocniejszym i trwalszym inhibitorem był drugi z wymienionych peptydów HV-BBI. Jego kompleks z trypsyną charakteryzowała niska stała inhibicji  $K_i=3$  nM (**H.9**) (lub  $K_i=18,8$  nM według [98]). HV-BBI (**151**) jest peptydem zbudowanym z 18 reszt aminokwasowych, posiadającym ugrupowanie amidowe na C-końcu i jeden mostek disulfidowy, który wydziela 11-sto aminokwasową pętlę wiążącą z miejscem reaktywnym współtworzonym przez reszty Lys8 i Ser9. Pętla swym kształtem przypomina pętle inhibitorów kanonicznych z rodziny Bowmana-Birki (BBI), dlatego też, omawiany związek jest do niej zaliczany. Podkreślić jednak należy, że pętle tych, pochodzących w większości z roślin, peptydów są krótsze, złożone najczęściej z 9 reszt aminokwasowych (np. w SFTI-1). W pracy **H.9**, zrealizowanej we współpracy z **dr. Przemysławem Grudnikiem** z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, przedstawiona została analiza struktury krystalicznej kompleksu peptydu **152** (tabela 8), będącego analogiem HV-BBI bez dwóch N-końcowych reszt aminokwasowych, z bydlęcą  $\beta$ -trypsyną. Znaleźć tam można porównanie budowy tego związku z najmniejszym przedstawicielem rodziny BBI, inhibitorem SFTI-1, oraz z analogiem peptydu ORB obecnym w wydzielinie skórnej żaby *Odorrana grahami*, o sekwencji AALKGC(&)WTKSIPKPC(&)FGKR [99].

Ze skóry żab wydzielonych zostało jak dotąd kilka inhibitorów trypsyny posiadających pętle wiążące o podobnej do HV-BBI sekwencji aminokwasowej i kształcie. Interesującym jest fakt, że niektóre z nich, takie jak wspomniany peptyd ORB oraz ranacyklina-T wydzielona z żaby *Rana temporaria* ( GALRGC(&)WTKSYPPKPC(&)K-NH<sub>2</sub> ) [100], są nie tylko silnymi inhibitorami, ale wykazują również właściwości antydrobnoustrojowe. Można je więc zaliczyć do peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (AMPs, *ang. antimicrobial peptides*) [101]. Zainteresowanie AMPs wynika z rozwoju lekooporności mikroorganizmów patogennych wobec powszechnie stosowanych antybiotyków. Słabością większości AMPs, posiadających w swej strukturze liczne zasadowe reszty aminokwasowe, jest wysoka podatność na hydrolizę katalizowaną m.in. przez enzymy o specyficzności trypsynopodobnej. Dlatego peptydy antydrobnoustrojowe, będące w stanie same zapewnić sobie ochronę przed proteazami, wydają się być szczególnie atrakcyjnymi związkami. BBI wykazuje zauważalną aktywność wobec gram-dodatniego *S. aureus* (MIC=60 µg/mL) w testach prowadzonych na podłożu mineralnym, zaś jego krótszy analog, peptyd **152**, posiada właściwości bakteriobójcze

---

<sup>99</sup> Li J., et al. *Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides*. FASEB J. **2007**, 21, 2466–2473.

<sup>100</sup> Mangoni M.L., et al. *Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity*. Biochemistry **2003**, 42, 14023–14035.

<sup>101</sup> <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

również względem gram-ujemnej *E. coli* (MIC=160 µg/mL) (**H.1**). Warto w tym miejscu podkreślić, że HV-BBI oraz jego analogi (zarówno te posiadające C-końcową grupę amidową, jak i te z grupą karboksylową) nie wykazują aktywności w badaniach prowadzonych na podłożach Muellera-Hintona, Muellera-Hintona 2 oraz Lurii-Bertani (badania nieopublikowane). Nie odnotowano również – w warunkach przeprowadzonego eksperymentu – jakiegokolwiek działania antybakteryjnego peptydu ORB-1 o sekwencji LKGC(&)WTKSIPPKPC(&)F (będącego skróconym analogiem wspomnianego powyżej peptydu ORB, posiadającego C-końcową grupę karboksylową). W literaturze jest on opisywany (choć tylko przez jedną grupę badawczą) jako silny peptyd antydrobnoustrojowy wykazujący dodatkowo właściwości inhibitorowe względem trypsyny [97,102].

Kolejne moje badania (wyniki również nie zostały jak dotąd opublikowane) polegające na systematycznym skracaniu sekwencji HV-BBI i pomiarach aktywności inhibitorowej otrzymanych w ten sposób analogów, wyłoniły niezwykle interesujący peptyd **154** (tabela 8), blokujący bydłęcą  $\beta$ -trypsynę i ludzką plazminę z taką samą siłą jak HV-BBI. To co go wyróżnia, to silne hamowanie ludzkiej matryptazy-1 i niezwykła trwałość w trakcie wielogodzinnej inkubacji w ludzkim serum.

Tabela 8. Właściwości inhibitorowe oraz antydrobnoustrojowe peptydów OGTI (**150**) oraz HV-BBI (**151**) i jego analogów. n.a.- brak aktywności [wyniki w większości nieopublikowane]. \* - szybka hydroliza

Nr	Sekwencja peptydu	bydłęca $\beta$ -trypsyna	ludzka matryptaza -1	ludzka plazmina	MIC [ $\mu$ g/mL] (podłoże Davisa) [ <b>H1</b> ]	
		IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
<b>150</b>	AVNIPFKVHFRC(&)KAAFC(&)	n.a.*	-	-	>1000	50
<b>151</b>	SVIGC(&)WTKSIPPRPC(&)FVK-NH <sub>2</sub>	0,250 ±0,035	0,820 ±0,024	<b>0,0821</b> ±0,0112	>1000	>1000
<b>152</b>	IGC(&)WTKSIPPRPC(&)FVK-NH <sub>2</sub>	0,394 ±0,018	0,085 ±0,003	-	160	60
<b>153</b>	GC(&)WTKSIPPRPC(&)FVK-NH <sub>2</sub>	0,408 ±0,056	0,039 ±0,005	0,223 ±0,030	-	-
<b>154</b>	GC(&)WTKSIPPRPC(&)F-NH <sub>2</sub>	0,316 ±0,029	<b>0,0082</b> ±0,0017	0,119 ±0,020	-	-

<sup>102</sup> Hu K., et al. *Small-anion selective transmembrane "holes" induced by an antimicrobial peptide too short to span membranes.* J. Phys. Chem. B. **2015**, 119, 8553-60.

## Podsumowanie najważniejszych osiągnięć

- Otrzymanie dwóch wysoce selektywnych inhibitorów matryptazy-2, hamujących ten enzym w warunkach *in vitro* 176- i 228-razy mocniej niż homologiczną matryptazę-1 (odpowiednio peptydy **11** i **16**).
- Otrzymanie dwóch - wedle mojej wiedzy, najsilniejszych z dotychczas opisanych w literaturze - peptydowych inhibitorów matryptazy-2 charakteryzujących się bardzo niskimi wartościami stałych inhibicji  $K_i$  wynoszącymi 15 i 19 nM (peptydy **33** i **15**).
- Otrzymanie po raz pierwszy nowych niekowalencyjnych inhibitorów ludzkiego proteasomu 20S zaprojektowanych w oparciu o strukturę inhibitora SFTI-1. Potwierdzenie, że SFTI-1 może być traktowany jako doskonały związek wyjściowy do projektowania inhibitorów dla różnych klas proteaz, nie tylko serynowych.
- Otrzymanie silnych kowalencyjnych inhibitorów proteasomu konstytutywnego 20S i immunoproteasomu 20S na bazie struktur pierwszorzędowych nowych substratów syntetycznych proteasomu konstytutywnego 20S.
- Rozwinięcie badań nad *splicingiem peptydowym* katalizowanym przez proteiny serynowe. Jednoznaczne wykazanie, że głównym mechanizmem obserwowanego *splicingu* jest bezpośrednia transpeptydacja.
- Pokazanie, że wiązanie peptydowe współtworzone przez resztę peptoidową może ulegać hydrolizie i resyntezie katalizowanej przez proteiny serynowe.

Realizacja opisanych powyżej zadań badawczych wymagała **współpracy z wieloma naukowcami** z różnych ośrodków naukowych:

**Dr hab. Timo Burster** z Wydziału Biologii Uniwersytetu Nazarbajewa w Astanie (wcześniej z Wydziału Neurochirurgii, Uniwersytetu Medycznego w Ulm) – badania nad toksycznością inhibitorów proteasomu oraz peptydów zawierających motyw RGD wobec ludzkiej linii komórek glejaka.

**Dr hab. Mirosława Cichorek** z Zakładu Embriologii Katedry Anatomii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – badania nad toksycznością inhibitorów proteasomu (analogów SFTI-1) wobec komórek prawidłowych i nowotworowych.

**Dr hab. Grzegorz Dubin** z Zakładu Mikrobiologii, Laboratorium Krystalografii Rentgenowskiej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego – badania nad *splicingiem peptydowym* katalizowanym przez proteiny serynowe (badania rentgenostrukturalne).

**Prof. Michael Groll** z Wydziału Chemii Uniwersytetu Technicznego w Monachium – badania nad inhibitorami proteasomu.

**Dr Przemysław Grudnik** z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego – badania rentgenostrukturalne kompleksów inhibitorów z trypsyną.

**Prof. Michael Gütschow** z Uniwersytetu Fryderyka Wilhelma w Bonn – badania nad inhibitorami matryptazy-1 i -2.

**Dr hab. Iwona Inkielewicz-Stępnik** z Katedry i Zakładu Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego - badania nad toksycznością inhibitorów proteasomu (aldehydów peptydowych) wobec komórek prawidłowych i nowotworowych.

**Dr hab. Irena Maliszewska** z Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej – analiza właściwości antydrobnoustrojowych peptydów wydzielonych ze skóry żab.

**Prof. Zbigniew Szewczuk** z Zespołu Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek, Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego – analiza mas produktów powstających w wyniku katalizowanego przez trypsynę *splicingu* peptomerycznego analogu SFTI-1.

**Prof. Piotr Trzonkowski** z Zakładu Immunologii i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – badania nad cytotoksycznością inhibitorów proteasomu wobec komórek prawidłowych i nowotworowych.

**Dr hab. med. Sławomir Wójcik** z Zakładu Anatomii i Neurobiologii Katedry Anatomii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – badanie przenikalności inhibitorów proteasomu znakowanych fluoresceiną do wnętrza komórek nowotworowych.

**Dr Dariusz Wyrzykowski** z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – pomiary aktywności inhibitorów wobec trypsyny z wykorzystaniem izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, ITC.



## V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH:

W latach 2000–2005 studiowałem na kierunku ochrona środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę magisterską wykonałem pod opieką dr Hanny Miecznikowskiej. W roku 2005 uzyskałem tytuł zawodowy magistra.

### *Lata 2005–2010, okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora*

W roku 2005 rozpocząłem studia doktoranckie w Katedrze Chemii Bioorganicznej (obecnie Biochemii Molekularnej) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorami mojej pracy doktorskiej pt. „*Peptomeryczne ligandy: ocena specyficzności w układzie inhibitor-enzym oraz antygen-przeciwciało*” byli: prof. dr hab. Krzysztof Rolka (Uniwersytet Gdański) oraz dr hab. Marian Kruszyński (Centocor Research and Development, Inc. USA). Pracę obroniłem w roku 2010 uzyskując stopień naukowy doktora w dyscyplinie chemia. Moja praca polegała na projektowaniu i syntezie chemicznej analogów inhibitora SFTI-1, a także na pomiarach - w warunkach *in vitro* - ich aktywności wobec różnych proteaz. Analogami tymi były m.in. związki hybrydowe zbudowane z białkowych  $\alpha$ -aminokwasów oraz *N*-podstawionych reszt glicyny (tzw. monomerów peptoidowych), nazywane peptomerami. Syntezowane były również peptydy, w których białkowe reszty aminokwasowe zastąpiono niebiałkowymi, między innymi  $\gamma$ -aminokwasami. W ten sposób otrzymane zostały peptydomimetyki zdolne do hamowania bydlęcej trypsyny i chymotrypsyny (pokazane poniżej prace **A.1**, **A.4**) oraz ludzkiej katepsyny G (**A.2**, **A.3**), wykazujące zwykle wyższą trwałość na degradację enzymatyczną niż ich peptydowe odpowiedniki. Warto wspomnieć, iż opisane w pracy **A.3** peptomeryczne inhibitory otrzymane zostały dzięki zastosowaniu chemii kombinatorycznej.

W trakcie studiów doktoranckich odbyłem trzymiesięczny staż naukowy (w ramach programu Association for International Practical Training) pod opieką dr. hab. Mariana Kruszyńskiego w firmie biotechnologicznej Centocor Research and Development, Inc., Radnor, PA, USA, należącej do koncernu Johnson&Johnson. Moim zadaniem było zaprojektowanie i chemiczna synteza kilku peptydowych i peptomerycznych analogów fragmentu lizozymu białka jaja kurzego HEL (*ang. henn egg white lysozyme*), wykazującego właściwości immunogenne. Fragmentem tym był peptyd HEL(46-61) prezentowany limfocytom T przez komórki dendrytyczne w postaci kompleksu z białkami głównego układu zgodności tkankowej typu II (MHC-II). Otrzymane peptydy i peptomery łączyłem w sposób kowalencyjny z przeciwciałem monoklonalnym N418 (mającym przede wszystkim umożliwić dostarczenie antygeny wprost do komórek dendrytycznych) oraz z ludzką apotransferyną. Koniugaty z przeciwciałem wykorzystane zostały do immunizacji myszy Balb/c, natomiast koniugaty z apotransferyną posłużyły do późniejszej analizy serum pobranego od tych zwierząt. Badania biologiczne wykonane zostały przez immunologów z Centocor R&D, Inc. W serum myszy poddanych immunizacji peptomerami stwierdzono obecność limfocytów T specyficznych wobec tych peptomerów, lecz niezdolnych do rozpoznania peptydu niezmodyfikowanego HEL(46-61) oraz natywnego białka HEL. Okazało się, że pojedyncza modyfikacja nie blokuje wiązania się analogu HEL(46-61) z MHC-II

oraz stymuluje powstawanie limfocytów T o odmiennym specyficzności. Mimo dużego nakładu pracy i dostrzegalnego potencjału tych badań - np. w walce z chorobami o podłożu autoimmunologicznym – otrzymane wyniki nie zostały nigdy opublikowane przez ich dysponenta, firmę Centocor R&D, Inc.

A) Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora:

A.1. ☒Łęgowska A., Bulak E., Wysocka M., Jaśkiewicz A., Lesner A., **Dębowski D.**, Rolka K., *Peptomeric analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds* Bioorg. Med. Chem., 16, 5644-5652 (2008)

IF<sub>2008</sub> **3,075**, IF<sub>2017</sub> **2,881**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,911**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 4

A.2. ☒Łęgowska A., **Dębowski D.**, Lesner A., Wysocka M., Rolka K., *Introduction of non-natural amino acid residues into the substrate-specific P<sub>1</sub> position of trypsin inhibitor SFTI-1 yields potent chymotrypsin and cathepsin G inhibitors* Bioorg. Med. Chem., 17, 3302-3307 (2009)

IF<sub>2009</sub> **2,822**, IF<sub>2017</sub> **2,881**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,911**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 14

A.3. ☒Łęgowska A., **Dębowski D.**, Lesner A., Wysocka M., Rolka K., *Selection of peptomeric inhibitors of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin and cathepsin G based on trypsin inhibitor SFTI-1 using a combinatorial chemistry approach* Mol. Divers., 14, 51-58 (2010)

IF<sub>2010</sub> **3,721**, IF<sub>2017</sub> **2,229**, IF<sub>5-cio letni</sub> **1,997**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 3

A.4 ☒Łęgowska A., **Dębowski D.**, Łukajtis R., Wysocka M., Czaplewski C., Lesner A., Rolka K., *Implication of the disulfide bridge in trypsin inhibitor SFTI-1 in its interaction with serine proteinases.* Bioorg. Med. Chem., 18, 8188-8193 (2010)

IF<sub>2010</sub> **2,978**, IF<sub>2017</sub> **2,881**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,911**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 5

B) Oryginalne prace opublikowane w sprawozdaniach pozjazdowych:

C.1. Łęgowska A., Zabłotna E., Jaśkiewicz A., **Dębowski D.**, Kossakowska J., Łozińska W., Rolka K. *Peptomeric analogues of trypsin inhibitor SFTI-1*, Peptides **2006**, Proceedings of 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Gdańsk 2006, Poland, Kenes International, Geneva 2007 (K. Rolka, P. Rekowski, J. Silebring, eds.), strony 274-275.

C.2. **Dębowski D.**, Łęgowska A., Wysocka M., Lesner A., Rolka K., *Selection of peptomeric inhibitors of bovine  $\alpha$ -chymotrypsin and cathepsin G based on trypsin inhibitor SFTI-1 using combinatorial chemistry approach*, Peptides **2008**, Chemistry of Peptides in Life Science, Technology and Medicine, Proceedings of 30<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Helsinki 2008, Finland, The Finish Peptide Society (H. Lankinen, ed.), strony 262-263.

C.3. Łukajtis R., Łęgowska A., **Dębowski D.**, Wysocka M., Lesner A., Rolka K., *Analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 modified in absolutely conserved P<sub>1</sub>' position by synthetic or non-proteinogenic amino acids*, Peptides **2010**, Proceedings of 31<sup>st</sup> European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, European Peptide Society, Copenhagen 2010, (M. Lebl, M. Meldal, K. J. Jensen, T. Høeg-Jensen, eds.), strony 470-471.


C.4. Łęgowska A., **Dębowski D.**, Wysocka M., Lesner A., Rolka K., *The influence of disulfide bridge of trypsin inhibitor SFTI-1 for enzyme-inhibitor interaction*, Peptides **2010**, Proceedings of 31<sup>st</sup> European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, European Peptide Society, Copenhagen 2010, (M. Lebl, M. Meldal, K. J. Jensen, T. Høeg-Jensen, eds.), strony 472-473.

### **Lata 2010–2018, okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**

Uczestniczyłem w następujących badaniach:

- projektowaniu, syntezie z wykorzystaniem chemii kombinatorycznej oraz badaniu aktywności nowych substratów fluorescencyjnych ludzkiego proteasomu konstytutywnego 20S. Badania te, których część finansowana była z projektu Sonata 1, NCN (UMO-2011/01/D/ST5/02778), którego byłem kierownikiem. Prace **B.5**, **B.7**, **C.6**, **C.11**, patent **P.1**.
- modyfikowaniu struktury pierwszorzędowej inhibitora SFTI-1 w celu otrzymania jego mimetyków zachowujących właściwości inhibitorowe oraz wykazujących wyższą trwałość na degradację proteolityczną. Zmiany te dotyczyły m.in. uważanej za wysoce konserwatywną pozycji 6 (P<sub>1</sub>'), gdzie w miejsce obecnej w natywnym SFTI-1 reszty Ser wstawiano: L-homoserynę, jej peptoidowy odpowiednik N-homoserynę, sarkozynę i alaninę (**B.1**), a także L-prolinę i jej analogi o różnym rozmiarze pierścienia (**B.2**). Po raz pierwszy wykazano, że możliwe jest modyfikowanie pozycji P<sub>1</sub>', biorącej bezpośredni udział w oddziaływaniu inhibitora z enzymem.
- badaniach biologicznych z udziałem analogów inhibitora SFTI-1 z dołączonymi fluoroforami (**B.4**). Związki te wnikały do wnętrza fibroblastów i komórek nowotworowych raka piersi (linia MCF-7) bez wywierania efektu cytotoksycznego.
- opracowaniu metody znakowania peptomerycznych analogów SFTI-1 deuterem w celu wykorzystania ich do analizy LC-MS (**B.6**). Badania prowadzone we współpracy z **prof. Zbigniewem Szewczukiem** i **dr. Remigiuszem Bąchorem** z Zespołu Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

C) Pozostałe prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora:

B.1. Łukajtis R.,  Łęgowska A., Wysocka M., **Dębowski D.**, Lesner A., Rolka K., *Analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 modified in the conserved P<sub>1</sub>' position by synthetic or non-proteinogenic amino acids retain their inhibitory activity* J. Pept. Sci., 17, 281-7 (**2011**)

IF<sub>2011</sub> **1,799**, IF<sub>2017</sub> **1,969**, IF<sub>5-cio letni</sub> **1,905**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **20**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 3

B.2. ☒Łęgowska A., **Dębowski D.**, Łukajtis R., Sztabkowska E., Mizeria A., Brzozowski K., Wysocka M., Lesner A., Rolka K., *Introduction of Pro and its analogues in the conserved P<sub>1</sub>' position of trypsin inhibitor SFTI-1 retains its inhibitory activity.* Protein Pept. Lett., 18, 1158-67 (**2011**)

IF<sub>2011</sub> **1,942**, IF<sub>2017</sub> **1,039**, IF<sub>5-cio letni</sub> **1,052**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **15**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 2

B.3. ☒**Dębowski D.**, Łukajtis R., Filipowicz M., Strzelecka P., Wysocka M., Łęgowska A., Lesner A., Rolka K. *Hybrid analogues of SFTI-1 modified in P<sub>1</sub> position by  $\beta$ - and  $\gamma$ -amino acids and N-substituted  $\beta$ -alanines* Biopolymers, 100, 154-9 (**2013**)

IF<sub>2013</sub> **2,288**, IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 2

B.4. ☒Lesner A., Karna N., Psurski M., Łęgowska A., Wysocka M., Guzow K., Sieradzan A., Sieńczyk M., Trzonkowski P., Piłkuła M., Zieliński M., Kosikowska P., Łukajtis R., Łęgowska M., **Dębowski D.**, Wiczak W., Rolka K. *Fluorescent analogs of trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds - synthesis and applications.* Biopolymers, 102, 124-35 (**2014**)

IF<sub>2014</sub> **2,385**, IF<sub>2017</sub> **1,99**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,165**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 3

B.5. Gruba N., Wysocka M., Brzezińska M., **Dębowski D.**, Rolka K., Martin N. · ☒Lesner A. *Novel internally quenched substrate of the trypsin-like subunit of 20S eukaryotic proteasome* Anal. Biochem., 508, 38-45 (**2016**)

IF<sub>2016</sub> **2,334**, IF<sub>2017</sub> **2,275**, IF<sub>5-cio letni</sub> **2,16**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **25**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 2

B.6. ☒Bańchor R., **Dębowski D.**, Łęgowska A., Stefanowicz P., Rolka K., Szewczuk Z. *Convenient preparation of deuterium-labeled analogs of peptides containing N-substituted glycines for a stable isotope dilution LC-MS quantitative analysis.* J. Pept. Sci., 21, 819-25 (**2015**)

IF<sub>2015</sub> **1,546**, IF<sub>2017</sub> **1,969**, IF<sub>5-cio letni</sub> **1,905**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **20**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 2

B.7. Gruba N., Wysocka M., Brzezińska M., **Dębowski D.**, Sieńczyk M., Gorodkiewicz E., Guszcz T., Czapplewski C., Rolka K., ☒Lesner A. *Bladder cancer detection using a peptide substrate of the 20S proteasome* FEBS J., 283, 2929-48 (**2016**)

IF<sub>2016</sub> **3,902**, IF<sub>2017</sub> **4,53**, IF<sub>5-cio letni</sub> **4,237**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **30**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = 2

B.8. Ptaszyńska N., Gucwa K., Łęgowska A., **Dębowski D.**, Gitlin-Domagalska A., Lica J., Heldt M., Martynow D., Olszewski M., Milewski S., Ng TB., Rolka K. *Antimicrobial Activity of Chimera Peptides Composed of Human Neutrophil Peptide 1 (HNP-1) Truncated Analogues and Bovine Lactoferrampin* Bioconjug. Chem., doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00440 (2018)

IF<sub>2017</sub> **4,485**, IF<sub>5-cio letni</sub> **4,416**, punkty MNiSW<sub>2016</sub> **35**, liczba cytowań (bez autocytowań) wg WoS = **0**

#### D) Patent:

P.1 **Patent** Polska PL 225341 B1, data: 31.03.2017, WUP 03/2017

TYTUŁ WYNALAZKU: *Nowy związek, sposób jego otrzymywania, roztwór farmaceutyczny zawierający nowy związek, sposób określania obecności choroby nowotworowej, zestaw do wykrywania nowotworów oraz zastosowanie hydrolizy nowego związku do wykrywania nowotworów.*

**Dębowski D.**, Gruba N., Wysocka M., Lesner A.

#### E) Oryginalne prace opublikowane w sprawozdaniach pozjazdowych:

C.5. **Dębowski D.**, Mizeria A, Lesner A, Łęgowska A., Rolka K., *Analogues of SFTI-1 as the potential inhibitors of the 20S proteasome* Peptides **2012**, Proceedings of 32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium, Athens 2012, Greece, European Peptide Society, (edited by G. Kokotos, V. Constantinou-Kokotou, J. Matsoukas) strony 258-259.

C.6. Łęgowska A, Łukajtis R., Filipowicz M., Łęgowska M., **Dębowski D.**, Wysocka M., Lesner A., Rolka K., *The analogues of SFTI-1 modified in the P<sub>1</sub> position by  $\beta$ - and  $\gamma$ -amino acids and N-substituted  $\beta$ -alanines.* Peptides **2012**, Proceedings of 32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium, Athens 2012, Greece, European Peptide Society, (edited by G. Kokotos, V. Constantinou-Kokotou, J. Matsoukas) strony 398-399.

C.7. Gruba N., Wysocka M., **Dębowski D.**, Gorodkiewicz E., Lesner A., Rolka K. *New internally quenched substrates of human 20S proteasome.* Peptides **2014** Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia 2014, Bulgaria, European Peptide Society (edited by E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev) strony 48-50.

C.8. Gitlin A., **Dębowski D.**, Karna N., Łęgowska A., Strinberg M., Gütschow M., Rolka K. *Analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 and their inhibitory activity against matriptase-2* Peptides **2014** Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia 2014, Bulgaria, European Peptide Society (edited by E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev) strony 225-226.

C.9. **Dębowski D.**, Karna N., Gitlin A., Lubos M., Łęgowska A., Rolka K. *Non-covalent peptidic inhibitors of human 20S proteasome* Peptides **2014** Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia 2014, Bulgaria, European Peptide Society (edited by E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev) strony 332-333.

C.10. Karna N., **Dębowski D.**, Gitlin A., Łęgowska A., Rolka K., Dubin G., Grudnik P. *Investigation of peptide splicing using peptides analogues consisting of two fragments of SFTI-1* Peptides **2014** Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia 2014, Bulgaria, European Peptide Society (edited by E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev) strony 334-335.

C.11. Gruba N., Wysocka M., Lesner A., **Dębowski D.**, Rolka K. *Characteristics of caspase-like specificity of human 20S proteasome using combinatorial chemistry methods* Peptides **2014** Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia 2014, Bulgaria, European Peptide Society (edited by E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev) strony 344-345.

C.12. Ptaszyńska N., Filipowicz M., **Dębowski D.**, Gitlin-Domagalska A., Łęgowska A., Burster T., Rolka K., *Spliced analogues of trypsin inhibitor SFTI-1 and their application for elucidation of the peptide splicing, tracing proteolysis and delivery of cargos to the cells* Peptides **2016**, Proceedings of the 34<sup>th</sup> EPS and the 8<sup>th</sup> IPS, Leipzig, Germany, DFG Universität Leipzig, 2016, (edited by A. Beck-Sickinger, K. Mörl, K. Bellmann-Sickert, S. Els-Heindl, U. Diederichsen), strony 115-116

C.13. Gitlin-Domagalska A., **Dębowski D.**, Ptaszyńska N., Łęgowska A., Stirnberg M., Gütschow M., Rolka K., *Designing and chemical syntheses of selective matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor sfti-1 isolated from sunflower seeds* Peptides **2016**, Proceedings of the 34<sup>th</sup> EPS and the 8<sup>th</sup> IPS, Leipzig, Germany, DFG Universität Leipzig, 2016, (edited by A. Beck-Sickinger, K. Mörl, K. Bellmann-Sickert, S. Els-Heindl, U. Diederichsen), strony 144-145.

F) Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.

- Projekt pt. *Projektowanie, chemiczna synteza oraz badania kinetyczne inhibitorów proteinaz serynowych będących analogami inhibitora trypsyny SFTI-1 wyodrębnionego z nasion słonecznika* finansowany w latach 2008-2011 przez **MNiSW** (kierownik Prof. Krzysztof Rolka, UG). Pełniona funkcja - **wykonawca**.
- Projekt pt. *Wpływ modyfikacji mostka disulfidowego inhibitora trypsyny SFTI-1 wyodrębnionego z nasion słonecznika na aktywność inhibitorową analogów monocyklicznych* finansowany w 2010 roku przez **Uniwersytet Gdański**. Pełniona funkcja - **kierownik**.
- Projekt pt. *Poszukiwanie nowych inhibitorów i substratów fluorogenicznych ludzkiego proteasomu* finansowany w lata 2011-2015 przez **Narodowe Centrum Nauki** (NCN) w ramach konkursu Sonata 1 (UMO-2011/01/D/ST5/02778). Pełniona funkcja - **kierownik**.
- Projekt pt. *Chemiczna synteza oraz badanie aktywności inhibitorowej i przeciwdrobnoustrojowej inhibitorów trypsyny OGTI i HV-BBI oraz ich analogów* finansowany w 2011 roku przez **Uniwersytet Gdański**. Pełniona funkcja - **kierownik**.

- Projekt pt. *Zaprojektowanie, chemiczna synteza oraz badanie właściwości biologicznych peptydów będących substratami i aktywatorami proteiny HtrA wyodrębnionej z Escherichii coli* finansowany w 2012 roku przez **Uniwersytet Gdański**. Pełniona funkcja - **kierownik**.
- Projekt pt. *Metoda izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego jako suplement i potencjalny substytut metody spektroskopowej w procesie charakterystyki inhibitorów proteinaz serynowych* finansowany w 2013 roku przez **Uniwersytet Gdański**. Pełniona funkcja - **kierownik**.

G) Podsumowanie danych bibliometrycznych (według Web of Science, WoS).

	Łącznie	Przed doktoratem	Po doktoracie	Cykl habilitacyjny
Publikacje naukowe z bazy WoS	26	4	22	14
Sumaryczny IF w roku publikacji *	70,378	12,596	57,782	37,101
Sumaryczny IF <sub>2017</sub>	67,973	10,872	57,101	36,854
Liczba punktów MNiSW <sub>2016</sub>	686	100	585	390
Liczba cytowań (bez autocytowań)	75	32	43	27
Indeks Hirscha	6			
Oryginalne prace opublikowane w sprawozdaniach pozjazdowych	13	4	9	
Kierowanie projektem z NCN **	1		1	
Kierowanie projektami UG ***	4	1	3	

\* Dla prac z roku 2018 podano IF z roku 2017

\*\* Narodowe Centrum Nauki (grant w konkursie Sonata 1)

\*\*\* Uniwersytet Gdański

David Dębowski