

**NIENATURALNE AMINOKWASY JAKO  
STRATEGIA DO OTRZYMYWANIA  
SUBSTRATÓW, INHIBITORÓW I  
NISKOCZĄSTECZKOWYCH SOND AKTYWNOŚCI  
DLA ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH**

UNNATURAL AMINO ACIDS AS A CHEMICAL TOOL  
FOR THE DEVELOPMENT OF PROTEASE  
SUBSTRATES, INHIBITORS AND ACTIVITY-  
BASE PROBES

**Marcin Poręba\*, Paulina Kasperkiewicz, Wioletta  
Rut, Marcin Drąg\***

*Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wydział Chemiczny,  
Politechnika Wroclawska, Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Polska*

*\*e-mail: marcin.poreba@pwr.edu.pl, marcin.drag@pwr.edu.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Enzymy proteolityczne i specyficzność substratowa
2. Neutrofilowe proteazy serynowe w obronie przed patogenami
3. Badanie szlaków apoptozy
4. Katepsyny i legumaina w nowotworach
5. Szlak ubikwityna-proteasom
6. Proteazy wirusa SARS-CoV-2

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr hab. inż. Marcin Poręba, prof. uczelni** – W 2014 roku otrzymał stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk chemicznych (promotor: prof. Marcin Drąg). W latach 2016-2018 realizował staż podoktorski w Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute w La Jolla (CA, USA) w laboratorium prof. Guya Salvesena. W 2020 roku otrzymał stopień naukowy doktora habilitowanego w dziedzinie nauk chemicznych. Zespół naukowy dr hab. Poręby zajmuje się obecnie (1) wykorzystaniem cytometrii masowej do analizy enzymów proteolitycznych w nowotworach, (2) projektowaniem i syntezą proleków przeciwnowotworowych aktywowanych przez proteazy oraz (3) badaniem mechanizmów śmierci komórki w tym apoptozy i pyroptozy.



<https://orcid.org/0000-0002-0214-6252>



**Dr inż. Paulina Kasperkiewicz-Wasilewska** - W 2014 roku otrzymała stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk chemicznych w laboratorium prof. Marcina Drąga. W latach 2016-2017 odbyła staż podoktorski w grupie prof. Guya Salvesena w Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute w La Jolla (CA, USA), gdzie pracowała na zastosowaniem markerów chemicznych do badania aktywności enzymów proteolitycznych w neutrofilach oraz liniach komórkowych. Obecnie jej grupa badawcza skupia się na badaniu roli proteaz w biologii neutrofilii, ze szczególnym uwzględnieniem ich heterogeniczności oraz ich roli w procesach obrony przed patogenami, a także w chorobach nowotworowych.



<https://orcid.org/0000-0002-1291-047X>



**Dr inż. Wioletta Rut** obroniła pracę doktorską w 2018 roku pod opieką prof. Marcina Drąga. Praca ta dotyczyła poszukiwania selektywnych narzędzi chemicznych do badania ludzkiego proteasomu 20S. Obecnie dr Rut pracuje nad technologią do wizualizacji enzymów deubikwitynujących opartą o zastosowanie mono-ubikwitynowanych substratów i markerów chemicznych. W ostatnim czasie dr Rut włączyła się również w badania nad proteazami Mpro i PLpro z wirusa SARS-CoV-2, czego efektem są peptydowe struktury wiodące o dużym potencjale diagnostycznym i terapeutycznym.



<https://orcid.org/0000-0003-1261-5566>



**Prof. dr hab. Marcin Drąg** uzyskał stopień naukowy doktora w 2003 w grupie prof. Pawła Kafarskiego. W latach 2005-2008 realizował staż podoktorski w laboratorium prof. Guya Salvesena w The Burnham Institute for Medical Research w La Jolla (CA, USA). W 2011 otrzymał stopień dra habilitowanego, a w 2016 roku tytuł naukowy profesora. Prof. Drąg jest jednym ze światowych autorytetów w badaniu enzymów proteolitycznych. Jego laboratorium stworzyło technologię HyCoSuL, która służy do profilowania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych za pomocą nienaturalnych aminokwasów. Do tej pory technologia ta została z powodzeniem wykorzystana do opracowania substratów, inhibitorów i markerów chemicznych dla ponad 50 medycznie istotnych proteaz. Zainteresowania naukowe prof. Drąga skupiają się na poszukiwaniu nowych narzędzi chemicznych w celu lepszego zrozumienia roli enzymów proteolitycznych w patogenezie chorób.



<https://orcid.org/0000-0001-8510-1967>

---

**ABSTRACT**

Proteolytic enzymes are molecular scissors that are responsible for the amide bond breakdown in peptide and protein substrates. Over the years, the view on proteases has been considerably changed from non-specific digestive enzymes to sophisticated biocatalysts, which by performing limited proteolysis control virtually all biological processes. In order to better understand how proteases work and what are their biologically relevant target substrates, it is indispensable to determine their catalytic preferences. This knowledge can be further utilized to develop selective substrates, inhibitors and activity-based probes (ABPs) enabling the monitoring of proteases activity in various settings, from *in vitro* analysis on recombinant enzymes or cell lysates to *ex vivo* and *in vivo* imaging at the single cell level. Among many chemical-based approaches that have been developed and applied over the years, the Hybrid Combinatorial Substrate Library (HyCoSuL) technology has emerged as one of the most powerful one. HyCoSuL is a combinatorial peptide-based library of fluorogenic substrates, that comprise natural and unnatural amino acids, that can deeply explore the chemical space in proteases active site, providing a structural framework for the development of highly-selective chemical tools. In this review we present the most prominent examples of proteolytic enzymes that have been profiled with HyCoSuL approach yielding selective substrates, potent inhibitors, and very sensitive activity-based probes.

Keywords: proteolytic enzymes, substrate specificity, unnatural amino acids, substrates, inhibitors, activity-based probes, caspases, cathepsins, neutrophil serine proteases, proteasome, SARS-CoV-2 proteases

Słowa kluczowe: enzymy proteolityczne, specyficzność substratowa, nienaturalne aminokwasy, niskocząsteczkowe sondy aktywności, kaspazy, katepsyny, proteasom, proteazy wirusa SARS-CoV-2

---

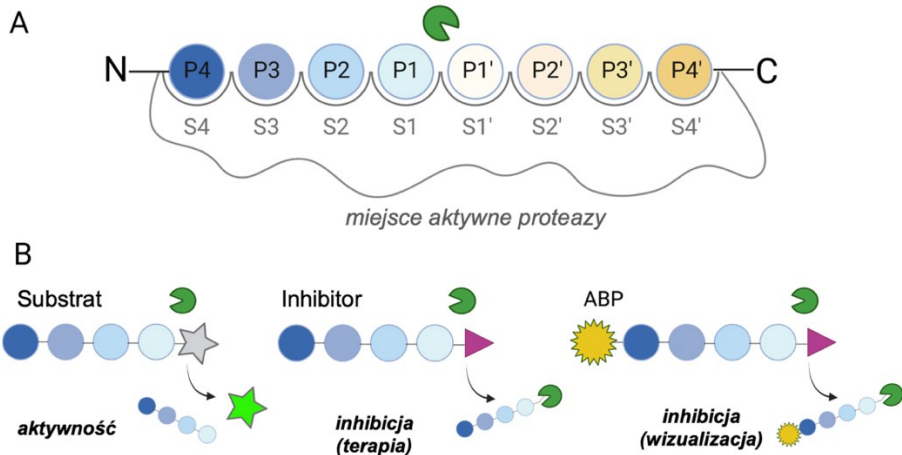
---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABP	– niskocząsteczkowa sonda aktywności, marker chemiczny, <i>ang. activity-based probe</i>
ADAM	– a dysintegrina i metaloproteaza, <i>ang. a disintegrin and metalloproteinase</i>
ATP	– adenozyno trójfosforan, <i>ang. adenosine triphosphate</i>
DUBs	– enzymy deubikwitynujące, <i>ang. deubiquitinating enzymes</i>
COVID-19	– choroba wywołana zakażeniem wirusem SARS-CoV-2, <i>ang. coronavirus disease 2019</i>
HyCoSuL	– hybrydowa kombinatoryczna biblioteka substratów, <i>ang. hybrid combinatorial substrate library</i>
IL-1 $\beta$	– interleukina 1 $\beta$ , <i>ang. interleukin 1<math>\beta</math></i>
IL-18	– interleukina 18, <i>ang. interleukin 18</i>
M <sup>pro</sup>	– proteaza główna wirusa SARS-CoV-2, <i>ang. main protease of SARS-CoV-2</i>
MMP	– macierzowa metaloproteaza, <i>ang. matrix metalloprotease</i>
NETs	– zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe <i>ang. neutrophil extracellular traps</i>
NSPs	– neutrofilowe proteazy serynowe, <i>ang. neutrophil serine proteases</i>
PL <sup>pro</sup>	– papainopodobna proteaza wirusa SARS-CoV-2, <i>ang. papain-like protease</i>
PMNs	– polimorfojądrowe leukocyty/ granulocyty wielojądrzaste, <i>ang. polymorphonuclear neutrophils</i>
PS-SCL	– skanowanie pozycyjne kombinatorycznych bibliotek substratów <i>ang. positional scanning – substrate combinatorial library</i>
SARS-CoV-2	– drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, <i>ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
TNF- $\alpha$	– czynnik martwicy nowotworu <i>ang. tumor necrosis factor</i>

## WPROWADZENIE

Obecnie choroby powodowane przez zaburzenie pracy enzymów proteolitycznych, w tym nowotwory, choroby metaboliczne, degeneracyjne czy autoimmunologiczne, stanowią poważne wyzwanie w obszarze zdrowia publicznego [1]. W związku z tym poznanie mechanizmów działania tych enzymów, m.in. poprzez selektywną wizualizację ich aktywności katalitycznej w układach biologicznych jest jedną z głównych strategii do opracowywania skutecznych narzędzi diagnostycznych oraz produktów terapeutycznych [2, 3]. Jednym z podstawowych narzędzi chemii biologicznej do monitorowania proteaz są małowczątkowe związki chemiczne, które wchodząc w reakcje z enzymem, wskazują na jego aktywność [4, 5]. Związki te są reprezentowane głównie przez substraty, które na drodze hydrolizy enzymatycznej emitują silny sygnał fluorescencyjny lub luminescencyjny [6]. Takie substraty charakteryzują się dużą czułością, ponieważ jedna cząsteczka enzymu, działając jak odtwarzalny katalizator, może hydrolizować wiele cząsteczek substratu prowadząc do amplifikacji sygnału. Innym narzędziem są niskocząsteczkowe sondy aktywności (nazywane również markerami chemicznymi), które wiążą się kowalencyjnie do centrum aktywnego enzymu na zasadzie inhibicji, wskazując na jego aktywność [4, 7]. Sondy te, są mniej czułe niż substraty, ponieważ wiążą się do enzymu w proporcjach stechiometrycznych, jednak pozwalają na lokalizację tego enzymu w tkance czy komórce. Większość obecnie stosowanych substratów i sond aktywności enzymatycznej składa się z peptydów, które oddziaływując z miejscem aktywnym proteaz, są odpowiedzialne za selektywne wiązanie do określonych celów molekularnych. Niestety przez wiele lat, związki te zawierały w swojej strukturze jedynie naturalne aminokwasy, które nie zapewniały wystarczającej selektywności, gdyż często oddziaływały z proteazami w obrębie jednego klanu czy rodziny. W 2014 roku nasza grupa po raz pierwszy opisała zastosowanie szerokiej gamy nienaturalnych aminokwasów do badania specyficzności substratowej proteaz, dzięki czemu możliwe stało się opracowanie bardziej aktywnych i selektywnych substratów, inhibitorów i niskocząsteczkowych sond aktywności do wizualizacji tych enzymów [8-10]. Co więcej, selektywne inhibitory stanowią punkt wyjścia do poszukiwania nowych leków będących inhibitorami wybranych proteaz. W tym rozdziale opisujemy nasze starania naukowe na polu badania specyficzności substratowej proteaz z zastosowaniem nienaturalnych aminokwasów.



Rysunek 1. Narzędzia chemiczne do badania enzymów proteolitycznych. A Specyficzność substratowa proteaz według nomenklatury Schechtera i Bergera. B Powszechnie stosowane niskocząsteczkowe narzędzia chemiczne do detekcji aktywności proteaz: substraty, inhibitory oraz sondy aktywności (markery chemiczne, ABPs)

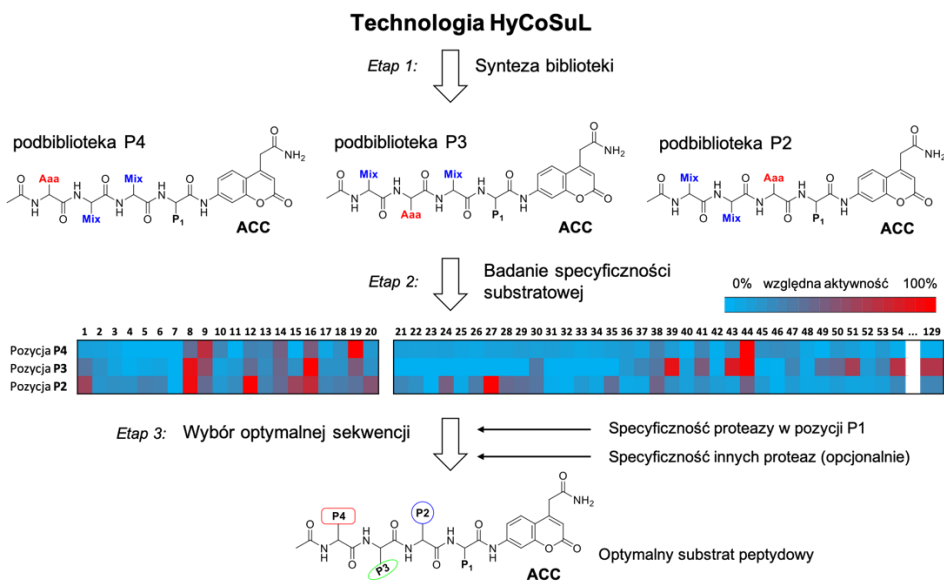
Figure 1. Chemical tools for the investigation of proteolytic enzymes. A. Substrate specificity of proteases according to Schechter and Berger nomenclature. B. Commonly used small molecule chemical tools for the investigation of proteases activity: substrates, inhibitors and activity-based probes (ABPs)

## 1. ENZMY PROTEOLITYCZNE I ICH SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA

Jedną z największych grup enzymów są enzymy proteolityczne, nazywane również proteazami czy peptydazami [11]. Enzymy te katalizują jedną z najstarszych i najbardziej konserwatywnych reakcji biologicznych jaką jest hydroliza wiązania peptydowego (amidowego) w peptydach i białkach. Proteazy są niezbędne dla wielu procesów biologicznych, jednak deregulacja ich aktywności prowadzi również do rozwoju wielu chorób [1, 2]. Enzymy te odgrywają kluczową rolę w prawie wszystkich procesach związanych z nowotworzeniem: (a) apoptoza jest regulowana przez apoptotyczne kaspazy, (b) stany zapalne są inicjowane przez prozapalne kaspazy i neutrofilowe proteazy serynowe, (c) katepsyny i metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej są odpowiedzialne za inwazję i agresywność nowotworów, oraz (d) liczne proteazy, w tym MMPs, czy ADAMs, kontrolują angiogenezę. Co więcej, enzymy te biorą także udział w chorobach neurodegeneracyjnych (kaspazy, legumaina), (auto)immunologicznych (katepsyny cysteinowe, kaspazy, proteasom), czy infekcjach wirusowych lub bakteryjnych. Niektóre proteazy stoją także na pierwszej linii obrony organizmu przed patogenami, tak jak neutrofilowe serynowe proteazy. Tak wyraźna rola proteaz w rozwoju chorób pokazuje, że enzymy te są bardzo atrakcyjnymi celami molekularnymi w kontekście diagnostyki klinicznej czy

projektowania nowych leków. Jednak do dokładnego monitorowania aktywności poszczególnych enzymów potrzebne są narzędzia chemiczne do ukierunkowanego działania na ich centra katalityczne. Okazuje się bowiem, że enzymy proteolityczne hydrolizują jedynie te peptydy, które są komplementarne z budową ich centrum aktywnego [12]. Preferencje katalityczne proteaz do hydrolizowania tylko wybranej grupy substratów nazywane są specyficznością substratową i odgrywają ogromną rolę przy projektowaniu niskocząsteczkowych narzędzi chemicznych. W 1967 roku Schechter i Berger zaproponowali system określania specyficzności substratowej proteaz, według którego w miejscu aktywnym proteazy wyodrębniono kieszenie, do których wiąże się substrat (**Rysunek 1A**) [13]. W ogólnym ujęciu łańcuchy boczne poszczególnych aminokwasów, nazywane pozycjami od Pn poprzez P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4' do Pn' (konwencja od N- do C-końca) wiążą się do kieszeni budujących miejsce aktywne enzymu (odpowiednio Sn-...-S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4'-...-Sn'). Według tego systemu, jeśli substrat i enzym wykazują komplementarność, hydroliza wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy pozycjami P1 i P1' (czyli w kieszeniach S1 i S1'). Enzymy hydrolizujące wiązania amidowe wewnątrz łańcucha peptydowego nazywane są endoproteazami. Jednak nie wszystkie proteazy mają możliwość wiązania tak dużej liczby aminokwasów w centrum aktywnym. Na przykład aminopeptydazy potrafią wiązać tylko jeden aminokwas po stronie N-końca (pozycja P1), podczas gdy diaminopeptydazy potrafią wiązać dwa aminokwasy po stronie N-końca (pozycje P2-P1). Enzymy te należą do grupy egzopeptydaz. Każdy enzym proteolityczny ma ściśle zdefiniowany profil specyficzności substratowej, który pozwala mu na hydrolizę tylko określonych substratów. Ta specyficzność może być bardzo szeroka, jak w przypadku katepsyn czy macierzowych metaloproteaz, czy bardzo wąska, tak jak w przypadku kaspaz, które hydrolizują substraty tylko po karboksylowej stronie kwasu asparaginowego [14, 15]. Co więcej, niektóre proteazy w obrębie swoich rodzin jak np. kaspazy, katepsyny, czy macierzowe metaloproteazy potrafią hydrolizować strukturalnie podobne substraty, przez co wykazują tzw. nakładającą się specyficzność substratową [15-17]. Cecha ta stanowi ogromne wyzwanie podczas projektowania selektywnych narzędzi chemicznych do badania wybranych enzymów proteolitycznych (**Rysunek 1B**). Określanie specyficzności substratowej proteaz odbywa się za pomocą metod biologicznych (biblioteki peptydów produkowane przez bakteriofagi, badania proteomiczne) lub chemicznych (biblioteki substratów, biblioteki inhibitorów, badania proteomiczne) [6]. Przez ostatnie 30 lat badania specyficzności substratowej proteaz za pomocą bibliotek substratów opierały się na zastosowaniu peptydów, które w swojej strukturze zawierały jedynie naturalne aminokwasy. Jedną z takich metod jest szeroko stosowana metoda pozycyjnego skanowania syntetycznych kombinatorycznych bibliotek (ang. *Positional Scanning*

*Synthetic Combinatorial Libraries, PS-SCL*) [17, 18]. Choć badania te doprowadziły do znaczących odkryć na polu chemii biologicznej, to jednak nie zawsze pozwoliły na opracowanie selektywnych i aktywnych narzędzie do badania poszczególnych enzymów. W 2014 roku nasza grupa opracowała nową technologię badania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych, która opierała się za zastosowaniu szerokiej gamy nienaturalnych aminokwasów w peptydowych bibliotekach substratów fluorogenicznych [9] (**Rysunek 2**). Metoda ta zyskała nazwę HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Library*) i w ciągu ostatnich lat została wykorzystana do określenia preferencji katalitycznych ponad 100 proteaz i ich wariantów, co doprowadziło do opracowania wielu bardzo aktywnych i selektywnych substratów, inhibitorów oraz niskocząsteczkowych sond aktywności.



Rysunek 2. Metodologia identyfikacji optymalnej sekwencji peptydowej dla wybranego enzymu proteolitycznego za pomocą technologii HyCoSuL. Biblioteka HyCoSuL składa się zazwyczaj z trzech podbibliotek do badania preferencji katalitycznych proteazy w kieszeniach S4, S3, S2 (pozycje P4, P3, P2 w bibliotece). W każdej z badanych pozycji (np. P2) znajdują się ściśle określone aminokwasy naturalne i nienaturalne, podczas gdy w pozostałych pozycjach (np. P4, P3) znajdują się równomolowe mieszaniny naturalnych aminokwasów. Po określeniu specyficzności substratowej wybierane są najlepsze (lub najbardziej selektywne) aminokwasy, które są wykorzystywane do syntezy optymalnych substratów fluorogenicznych czy markerów chemicznych. Zaadaptowano z [10]

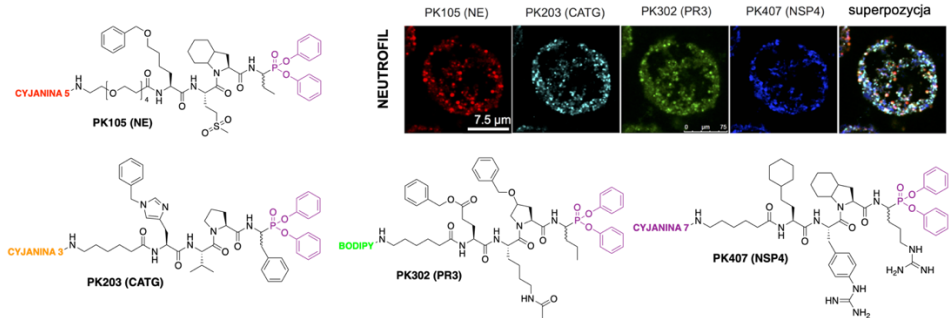
Figure 2. The methodology for the identification of optimal peptide sequence for selected proteases using HyCoSuL technology. HyCoSuL contains three sub-libraries for the profiling of substrate preferences at the S4, S3 and S3 pockets (positions P4, P3, and P2). In each sub-library one position (for example P2) is occupied by defined individual natural and unnatural amino acids, whereas the remaining positions (P4, P3) contain equimolar mixtures of natural amino acids. Once the substrate profiling is performed, most active or most selective amino acids are selected for the synthesis of fluorescent substrates or activity-based probes. Adapted from [10]



## 2. NEUTROFILOWE PROTEAZY SERYNOWE

Neutrofile to tzw. granulocyty obojętnochłonne, które stanowią ponad połowę białych krwinek krążących w krwiobiegu. Charakterystyczną cechą tych komórek jest wielopłatowe, posegmentowane jądro, dlatego też często nazywane są one leukocytami wielojądrzastymi (ang. *polymorphonuclear leukocytes, PMNs*) [19]. Neutrofile różnicują się z progenitora promielocytów i są komórkami terminalnymi, co oznacza, że nie mają zdolności do namnażania się, a po osiągnięciu dojrzałej formy po kilkunastu godzinach w krążeniu obumierają. Podczas infekcji te leukocyty ulegają wynaczynieniu (diapedezie), czyli migrują z naczyń krwionośnych do środowiska zapalnego pod wpływem czynników wabiących, tzw. chemoatraktantów [20]. Neutrofile są jednymi z pierwszych komórek, które docierają do ognisk zapalnych, dlatego stanowią jeden z najbardziej istotnych elementów wrodzonego układu odpornościowego [21]. Głównymi enzymami znajdującymi się w neutrofilach są proteazy serynowe z grupy NSPs (ang. *Neutrophil Serine Proteases*), wśród których wyróżnia się elastazę (NE, ang. *neutrophil elastase*), katepsynę G (ang. *cathepsin G, CatG*), proteinazę 3 (ang. *proteinase 3, PR3*) i neutrofilową serynową proteinazę 4 (ang. *neutrophil serine protease 4, NSP4*), ale także granzymy A i B, które pełnią kluczowe funkcje efektorowe w tych komórkach [22]. Enzymy te hydrolizują liczne substraty, co prowadzi do destrukcji patogenów, aktywacji receptorów, a także immunosupresji. Na przykład stwierdzono, że elastaza neutrofilowa jest zaangażowana w proces tworzenia pułapek neutrofilowych (ang. *Neutrophil Extracellular Traps, NETs*), czyli uwalnianiu DNA i tworzeniu struktury przypominającej pajęczynę, która zatrzymuje bakterie, ograniczając ich rozprzestrzenianie [23]. Inne funkcje poszczególnych NSPs w układzie odpornościowym to regulacja aktywności cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), chemokin (IL-8), receptorów komórkowych i czynników wzrostu (progranulina). Przez wiele lat aktywność katalityczną elastazy neutrofilowej badano za pomocą substratów lub inhibitorów zawierających w swojej strukturze motyw peptydowy Ala-Ala-Pro-Val (pozycje P4-P3-P2-P1) [24]. W 2014 roku za pomocą metody HyCoSuL określono profil specyficzności substratowej tego enzymu, co pozwoliło uzyskać substrat peptydowy z sekwencją Nle(OBzl)-Met(O)<sub>2</sub>-Oic-Abu, który był ponad 10,000-razy szybciej hydrolizowany (według parametru  $k_{cat}/K_M$ ), niż substrat referencyjny [9]. Dzięki temu po raz pierwszy potwierdzono użyteczność stosowania nienaturalnych aminokwasów w bibliotekach substratów do profilowania specyficzności proteaz. Optymalny substrat dla elastazy został następnie przekształcony w biotynylowany marker chemiczny (PK101), za pomocą którego zbadano status aktywności elastazy podczas tworzenia się pułapek neutrofilowych w odpowiedzi na stres [9]. Co więcej, rozwiązanie struktury krystalicznej elastazy z inhibitorem PK101, pozwoliło zrozumieć w jaki sposób nienaturalne aminokwasy wiążą się do poszczególnych kieszeni miejsca aktywnego enzymu, co bezpośrednio wpływa na aktywność inhibi-

tora [25]. Metodę HyCoSuL wykorzystano także do określenia specyficzności substratowej pozostałych neutrofilowych proteaz serynowych, dzięki czemu możliwe było opracowanie fluorescencyjnych markerów chemicznych do równoległej wizualizacji tych enzymów w neutrofilach (**Rysunek 3**) [26, 27]. Badania te doprowadziły do obserwacji, że neutrofile wykazują znaczącą heterogeniczność w kontekście lokalizacji i aktywności poszczególnych enzymów proteolitycznych. Biologiczne podłoże i dalsze konsekwencje tego zjawiska są obecnie przedmiotem badań w grupie badawczej dr Pauliny Kasperkiewicz.



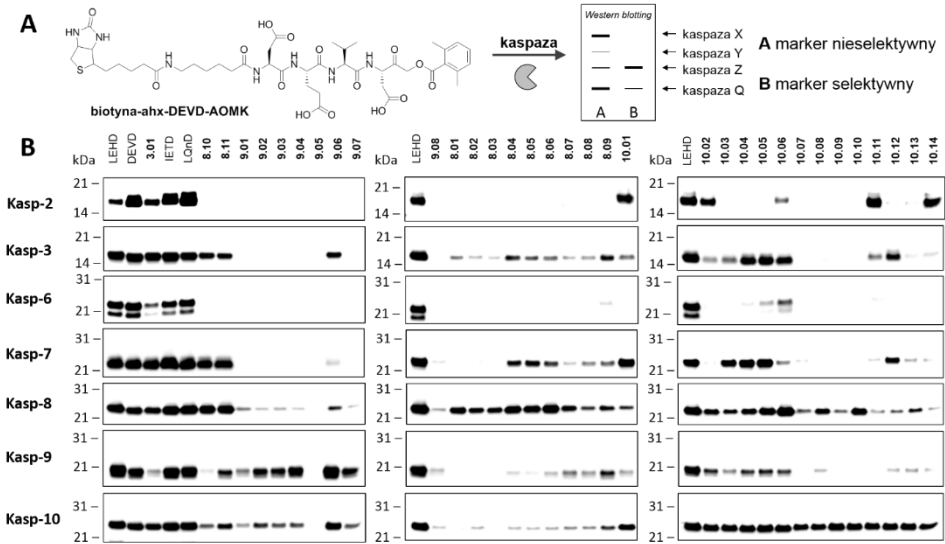
Rysunek 3. Równoległa wizualizacja czterech neutrofilowych proteaz serynowych za pomocą serii fluorescencyjnych markerów chemicznych oraz konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. Zaadaptowano z [27]

Figure 3. The parallel visualization of serine neutrophil proteases using fluorescent activity-based probes and confocal microscopy. Adapted from [27]

### 3. KASPAZY APOPTOTYCZNE

Śmierć komórki jest jednym z najważniejszych procesów biologicznych, który jest niezbędny do zachowania równowagi w organizmie. Śmierć pojedynczej komórki może odbywać się na wiele sposobów, wśród których najczęściej występuje apoptoza, pyroptoza, autofagia, nekroptoza, czy śmierć niekontrolowana jak nekroza [28]. Do tej pory najlepiej zbadanym procesem programowanej śmierci komórki jest apoptoza, dzięki której z organizmu usuwane są komórki niefunkcjonalne, starzejące się, zainfekowane lub zmienione chorobowo (np. nowotworowe) [29]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają kaspazy, które zarówno inicjują jak i przeprowadzają apoptozę [30]. U ludzi kaspazy są ekspresjonowane jako nieaktywne zymogeny (proenzymy), które czekają w cytozolu na aktywację. Inicjacja procesu apoptozy jest ściśle regulowanym procesem, który może zachodzić na dwa różne sposoby [14, 30]. Pierwszym z nich jest inicjacja na drodze zewnątrzkomórkowej. Proces ten rozpoczyna się gdy receptor śmierci (ang. *Death Receptor*, *DR*) znajdujący się po zewnętrznej stronie błony komórkowej wiąże się ze swoimi ligandami, którymi najczęściej są bodźce apoptotyczne. Utworzenie kompleksu powoduje aktywację prokaspazy 8 oraz prokaspazy 10, które następnie aktywują prokaspazy egzekucyjne

(kaspazy 3, 6 oraz 7). Drugim sposobem inicjacji apoptozy w komórce jest ścieżka wewnątrzkomórkowa, na drodze której rekrutowana jest kaspaza 9. Ścieżka ta rozpoczyna się gdy do wnętrza komórki trafi bodziec apoptotyczny np. cząsteczki powstałe w wyniku uszkodzenia DNA. W wyniku kaskady zdarzeń, tworzy się apoptosom (kompleks kaspazy 9, białka Apaf, cząsteczki ATP i cytochromu C), który aktywuje prokaspazy egzekucyjne. Kaspazy były pierwszymi enzymami, których specyficzność substratowa została zbadana za pomocą kombinatorycznych bibliotek substratów fluorogenicznych (PS-SCL) [17, 18]. Dzięki temu udało się zaprojektować bardzo aktywne tetrapeptydowe substraty i inhibitory o sekwencjach DEVD, LEHD, IETD, LETD, czy WEHD, które były rutynowo stosowane w badaniu aktywności tych enzymów *in vitro* i *in vivo*. Niestety, mimo że te związki chemiczne były aktywne, to nakładająca się specyficzność substratowa kaspaz powodowała, że nie były one wystarczająco selektywne by monitorować aktywność katalityczną wybranych enzymów [31, 32]. W 2014 za pomocą metody HyCoSuL określono specyficzność substratową siedmiu kaspaz apoptotycznych, co zaowocowało opracowaniem nowych substratów fluorescencyjnych [8]. Selektywność tych narzędzi została potwierdzona *in vitro* w modelu wewnątrzkomórkowej aktywacji kaspazy 3 poprzez apoptosom zawierający kaspazę 9. Kolejne badania z wykorzystaniem nienaturalnych aminokwasów doprowadziły także do opracowania bardzo selektywnych inhibitorów do kaspazy 2 oraz markerów chemicznych dla pozostałych kaspaz apoptotycznych (**Rysunek 4**) [33, 34]. Markery te zostały wykorzystane m.in. do określenia ścieżki apoptotycznej w komórkach Jurkat T na drodze stymulacji zewnątrzkomórkowej białkiem TRAIL. Okazało się, że kaspaza 8 odgrywa dominującą rolę w tym procesie, podczas gdy katalityczna rola kaspazy 10 jest zaniedbywalna. Obecnie zarówno technologia HyCoSuL jak i selektywne inhibitory i markery chemiczne dla kaspaz są wykorzystywane przez naszą grupę do badania pyroptozy, programowanej śmierci komórki, wywołującej reakcję zapalną, którą kontrolują kaspazy prozapalne.



Rysunek 4. Selektyność markerów chemicznych względem kaspaz apoptotycznych. A Struktura biotylnowanego markera chemicznego dla kaspaz na przykładzie markera biotylna-ahx-DEVD-AOMK dla kaspazy 3. Selektyność markerów była mierzona poprzez ich inkubację z rekombinowanymi kaspazami, a następnie wizualizację za pomocą techniki Western blotting B Selektyność poszczególnych markerów chemicznych względem siedmiu rekombinowanych kaspaz apoptotycznych. Trzy markery (LEHD, DEVD i IETD) zawierały standardowe sekwencje, natomiast pozostałe zawierały naturalne i nienaturalne aminokwasy, co zwiększyło ich selektyność względem poszczególnych kaspaz. Zaadaptowano z [34]

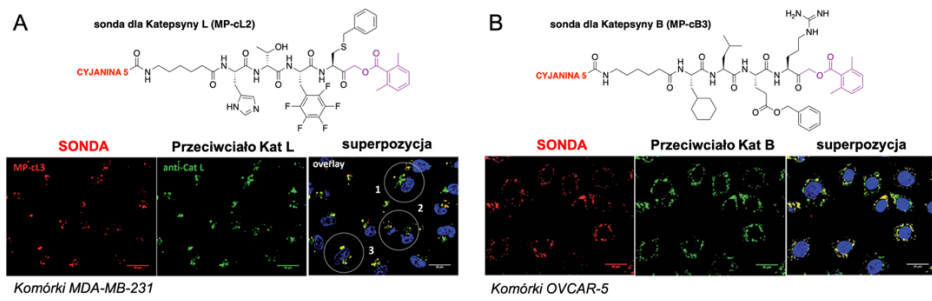
Figure 4. The selectivity of activity-based probes towards apoptotic caspases. A The structure of biotin-labelled chemical probe for caspases exemplified with biotin-ahx-DEVD-AOMK probe for caspase 3. The selectivity of chemical probes was measured by their incubation with recombinant caspases, following by the enzyme-probe complex visualization using Western blot approach. B The selectivity of individual chemical probes towards seven recombinant apoptotic caspases. Three probes (LEHD, DEVD and IETD) contain classical sequences, while other ABPs contain natural and unnatural amino acids, which improved their selectivity towards individual caspases. Adapted from [34]

#### 4. KATEPSYNY CYSTEINOWE I LEGUMAINA

Kolejną ważną grupą enzymów proteolitycznych, które podobnie jak kaspazy wykazują nakładającą się specyficzność substratową są cysteinowe katepsyny i legumaina, które działają w kwaśnym środowisku lizosomów [16, 35]. Katepsyny cysteinowe należą do grupy enzymów papaino-podobnych (klan CA, rodzina C1). Większość z nich to relatywnie małe białka, których masa cząsteczkowa mieści się w zakresie 20-35 kDa. Enzymy te są syntezowane jako nieaktywne praproteazy, które po wyjściu z retikulum endoplazmatycznego tracą prapeptyd, a następnie na drodze specyficznej proteolizy (lub autoproteolizy) są przekształcane w aktywne enzymy [36]. Jak wskazuje nazwa "lizosomalne", proteazy te są najbardziej aktywne

w kwaśnym środowisku, tak więc występują przede wszystkim w endosomach i lizosomach. Stężenie katepsyn w lizosomach może przekraczać nawet 1 mM, co w połączeniu z ich wysoką aktywnością katalityczną czyni je bardzo wydajnymi narzędziami molekularnymi do rozkładu wielu białek zamkniętych w tych organellach [37]. Jednak aktywność katalityczna katepsyn kontrolowana jest na kilku poziomach, od wspomnianej wcześniej aktywacji zymogenów i zmian pH do oddziaływań z ich endogennymi inhibitorami tj. cystatynami i tyropinami [36]. Zbadano, że cystatyny inhibują katepsyny niespecyficznie, tym samym kontrolują ich aktywność lizosomalną polegającą na degradacji białek. Natomiast tyropiny są bardziej specyficznymi inhibitorami, co ma związek z nielizosomalną aktywnością katepsyn. Główną rolą katepsyn jest hydroliza białek i peptydów w celu prezentacji antygenów przez makrofagi, przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej czy proteolityczna aktywacja innych enzymów [38-40]. Jednak podwyższony poziom aktywności katepsyn prowadzi do rozwoju chorób, w tym wielu typów nowotworów charakteryzujących się agresywnością i zdolnością do przerzutowania [41, 42]. Do tej pory opracowano wiele substratów, inhibitorów i markerów chemicznych do badania katepsyn cysteinowych, co było bezpośrednią konsekwencją analizy ich preferencji katalitycznych za pomocą narzędzi proteomicznych czy bibliotek substratów lub inhibitorów. Jednak, podobnie jak w przypadku kaspaz, dużym problemem był brak selektywności tych narzędzi względem pojedynczych katepsyn [16]. Zastosowanie metody HyCoSuL do określenia specyficzności substratowej katepsyny L w pozycjach P4-P1, pozwoliło znaleźć sekwencję peptydową zawierającą nienaturalne aminokwasy, która posłużyła do opracowania bardzo selektywnych substratów i markerów dla tej proteazy [43]. W badaniach *in vitro* na modelu linii potrójnie ujemnego raka piersi z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej pokazano aktywność tego enzymu w lizosomach i co więcej udowodniono, że marker chemiczny (MP-cL2) jest selektywny i nie reaguje z innymi enzymami (**Rysunek 5A**). Następnie w podobny sposób opracowano selektywne narzędzia do wizualizacji katepsyny B. Jeden z fluorescencyjnych markerów chemicznych (MP-cB3) selektywnie znakował aktywność tego enzymu w ponad 20 różnych liniach nowotworowych, od nowotworów hematologicznych, po agresywne nowotwory raka piersi lub raka kości (**Rysunek 5B**) [44]. Co więcej, marker MP-cB3 wykorzystano także do selektywnej detekcji aktywnej katepsyny B w komórkach nowotworu płuc pobranych od pacjenta. Dzięki temu pokazano, że selektywne markery chemiczne zawierające nienaturalne aminokwasy są użyteczne nie tylko w badaniach *in vitro* ale również w analizach *ex vivo*, dzięki czemu zyskują dodatkowy potencjał diagnostyczny. Inną proteazą, która jest obecna w lizosomach i bierze udział w rozwoju nowotworów jest legumaina, która jako jeden z niewielu enzymów potrafi hydrolizować substraty po karboksylowej stronie asparaginy [35]. Badania specyficzności substratowej tego enzymu za pomocą HyCoSuL również

pozwołyły na opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających śledzenie aktywności katalitycznej tego enzymu w komórkach [45]. Selektywne sekwencje peptydowe dla poszczególnych enzymów mogą być wykorzystane do konstrukcji dowolnego typu markerów chemicznych. Jednym z takich przykładów są niskocząsteczkowe sondy zawierające jako znaczniki stabilne izotopy metali zamiast fluoroforów [46]. Dzięki temu markery te mogą być użyteczne w badaniach z wykorzystaniem cytometrii masowej do równoległej analizy aktywności katalitycznej wielu proteaz na poziomie pojedynczych komórek, co niesie ze sobą ogromny potencjał medyczny w obszarze spersonalizowanej diagnostyki klinicznej. Obecnie badania nad wykorzystaniem cytometrii masowej do badania aktywności enzymatycznej proteaz są prowadzone w grupie badawczej dra hab. Marcina Poręby.



Rysunek 5. Struktury fluorescencyjnych markerów chemicznych dla katepsyny L (A) i katepsyny B (B) oraz ich wykorzystanie do oznaczenia aktywności tych enzymów w komórkach nowotworowych za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. Zaadaptowano z [43] (A) oraz z [44] (B)

Figure 5. Structures of fluorescent activity-based probes for cathepsin L (A) and cathepsin B (B) and their application for the detection of enzyme activities in cancer cells using confocal microscopy. Adapted from [43] (A) and [44] (B)

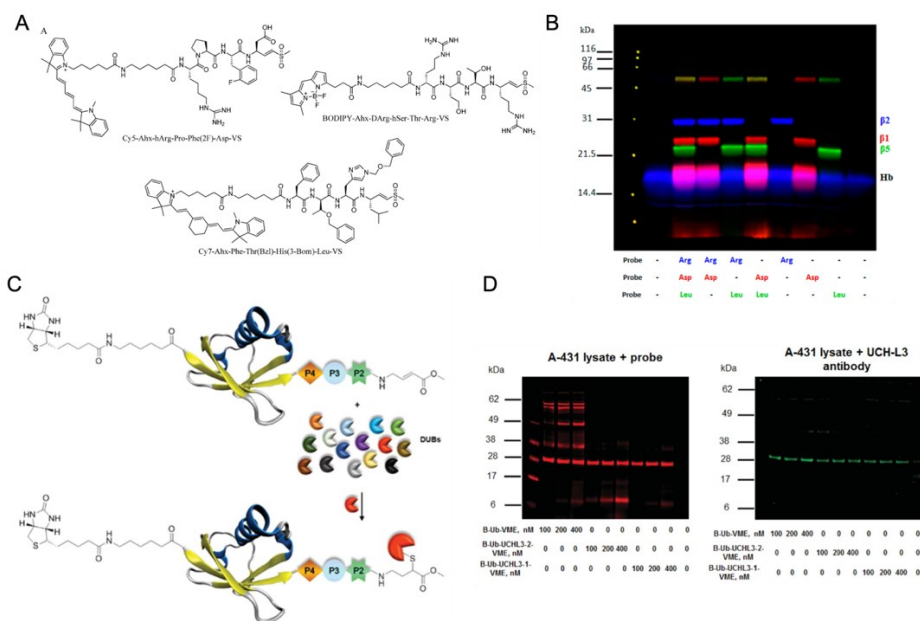
## 5. SZLAK UBIKWITYNA-PROTEASOM

W komórkach organizmów eukariotycznych białka są degradowane na drodze dwóch szlaków [47]. Pierwszym z nich jest szlak lizosomalny, w którym główną rolę odgrywają wspomniane wcześniej lizosomalne katepsyny. Hydroliza białek w lizosomach odbywa się na drodze nieselektywnej hydrolizy i prowadzi do recyklingu aminokwasów. Drugim szlakiem jest natomiast szlak pozalizosomalny (cytozolowy), który jest bardziej selektywny i kontrolowany głównie przez system ubikwityna-proteasom 26S. Proteasom 26S składa się natomiast z proteasomu 20S, który stanowi katalityczny rdzeń, oraz z kompleksu regulatorowego 19S [48, 49]. Jednak to właśnie proteasom 20S, który należy do proteaz treoninowych, odpowiada za hydrolizę białek w cytozolu [11]. Aby ten kompleks mógł przeprowadzić wydajną katalizę szerokiej grupy białek komórkowych, musi posiadać szeroką specyficzność

substratową, co zapewnia mu posiadanie aż trzech podjednostek katalitycznych, z których każda rozpoznaje i hydrolizuje inne substraty [50]. Podjednostka beta-1 rozpoznaje w pozycji P1 kwas asparaginowy, przez co nazywana jest również podjednostką kaspazopodobną. Podjednostka beta-2 hydrolizuje substraty po karboksylowej stronie aminokwasów zasadowych (arginina, lizyna), w związku z czym zyskała nazwę podjednostki trypsypodobnej. Natomiast chymotrypsynopodobna podjednostka beta-5 hydrolizuje substraty zawierające hydrofobowe aminokwasy w P1, tj. tyrozynę, fenyloalaninę czy leucynę. Tak szeroki wachlarz możliwości katalitycznych, czyni proteasom 20S bardzo wydajną maszyną do degradacji białek. Jednak proteasom, który jest konstytutywnie aktywny w komórce, nie hydrolizuje przypadkowych białek. Aby taka hydroliza zaszła, białka przeznaczone do degradacji muszą być najpierw odpowiednio oznaczone. Dzieje się to na drodze procesu ubikwitynacji, podczas którego do białek substratowych dołączane są cząsteczki ubikwityny i tylko takie kompleksy są kierowane do degradacji [51]. Jednocześnie sama ubikwityna nie jest hydrolizowana, gdyż przed degradacją jest odłączana przez specjalne enzymy z grupy deubikwitynaz (ang. *DeUbiquitinating Enzymes*, *DUBs*), które najczęściej są proteazami cysteinowymi, rzadziej metaloproteazami [11, 52]. U człowieka do tej pory zidentyfikowano niemal 100 genów kodujących te białka, dzięki czemu hydroliza ubikwityny z substratu białkowego odbywa się w sposób kontrolowany i selektywny przy udziale odpowiedniego enzymu z grupy DUBs [53]. Opracowanie specyficznych narzędzi chemicznych zarówno dla proteasomu jak i enzymów deubikwitynujących może znacząco pomóc w zrozumieniu działania szlaku proteasom-ubikwityna. W 2018 Rut i współpracownicy określili profil specyficzności substratowej trzech podjednostek proteasomu 20S za pomocą bibliotek substratów fluorogenicznych skierowanych odpowiednio do podjednostek  $\beta 1$  (biblioteki P1-Asp),  $\beta 2$  (P1-Arg) oraz  $\beta 5$  (P1-Phe) [54]. Wyniki profilowania pozwoliły następnie na opracowanie trzech fluorescencyjnych markerów chemicznych do niezależnej detekcji aktywności poszczególnych jednostek proteasomu 20S zarówno w warunkach *in vitro*, jak również *ex vivo* przy wizualizacji aktywności proteasomu w erytrocytach (**Rysunek 6A,B**). Dzięki zastosowaniu tych markerów udało się określić wrażliwość poszczególnych podjednostek na działanie bortezomibu, inhibitora proteasomu 20S, który jest stosowany m.in. w leczeniu szpiczaka mnogiego. Okazało się, że bortezomib najpierw blokuje aktywność podjednostki  $\beta 5$ , następnie  $\beta 1$ , a na końcu  $\beta 2$ . Opracowane markery chemiczne mogą więc służyć np. do monitorowania aktywności proteasomu w terapii przeciwnowotworowej opartej na inhibitorach tego kompleksu katalitycznego (bortezomib, carfilozomib, ixazomib) [55]. Z drugiej strony monitorowanie aktywności enzymów deubikwitynujących, może być bardzo przydatne w identyfikacji nowych celów terapeutycznych, gdyż wiadomo, że te enzymy regu-

lują aktywność i stabilność wielu białek, a zaburzenie ich pracy może prowadzić do rozwoju stanów patologicznych, w tym chorób nowotworowych czy neurodegeneracyjnych [56, 57]. Niestety enzymy DUBs wykazują bardzo słabe powinowactwo do hydrolizy krótkich substratów fluorescencyjnych, co powoduje, że efektywne substraty i markery chemiczne muszą zawierać cząsteczkę ubikwityny (lub poli-ubikwitynę), która zapewni odpowiednio silne oddziaływania z tymi proteazami. Dodatkowo enzymy DUBs rozpoznają w pozycjach P2-P1 tylko dipeptydowy fragment glicyna-glicyna, co znacząco utrudnia znalezienie selektywnych narzędzi chemicznych dla poszczególnych enzymów [58]. Okazuje się jednak, że zastosowanie szerokiej gamy nienaturalnych aminokwasów w pozycjach P4 oraz P3, może znacząco zwiększyć selektywność względem wybranych enzymów DUBs, co zostało pokazane na przykładzie substratów fluorescencyjnych dla enzymów MERS PL<sub>pro</sub> oraz UCH-L3 (**Rysunek 6C**) [59]. Co więcej, przekształcenie optymalnego substratu dla UCH-L3 w biotynylowany marker chemiczny zawierający winylometylosulfon jako elektrofilową grupę wiążącą, pozwoliło na selektywną identyfikację aktywności tego enzymu w lizatach komórek raka skóry A-431 (**Rysunek 6D**). Badania te pokazały przede wszystkim, że możliwe jest zastosowanie nienaturalnych aminokwasów do syntezy mono-ubikwitynowanych substratów i markerów chemicznych. W przyszłości ta technologia może być również wykorzystana do opracowania poli-ubikwitynowanych narzędzi chemicznych, które mogłyby celować w wybrane proteazy DUBs lub inne enzymy (np. SENPs), które rozpoznają białka ubikwitynowopodobne takie jak np. SUMO [60].





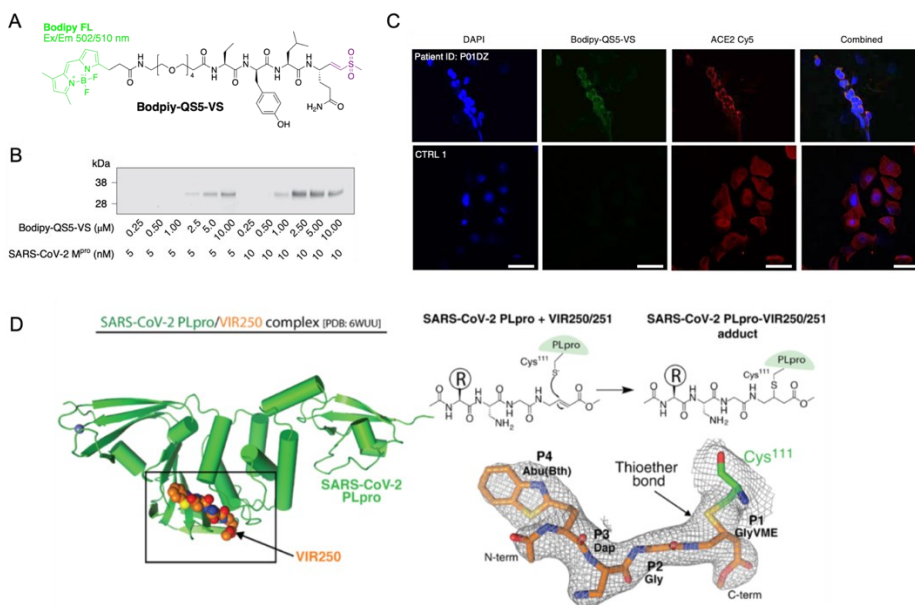
Rysunek 6. Markery chemiczne do badania szlaku ubikwityna-proteasom. A Struktury chemiczne fluorescencyjnych sond aktywności do badania aktywności katalitycznych poszczególnych podjednostek proteasomu 20S. B Wizualizacja aktywności proteasomu 20S w lizatach biotynylowanej sondy chemicznej zawierającej cząsteczkę ubikwityny do badania aktywności enzymów deubikwitynujących. D Detekcja proteazy DUB UCH-L3 w lizatach raka skóry A-431 za pomocą markera chemicznego (czerwony) oraz przeciwciała (zielony). Zaadaptowano z [59]

Figure 6. Activity-based probes for the investigation of ubiquitin-proteasome pathway. A Chemical structures of fluorescent chemical probes for the visualization of the activity of three proteasome 20S catalytic subunits. B Visualization of proteasome 20S activity in erythrocyte lysates using fluorescent chemical probes. Adapted from [54]. C The structure of biotin-labelled chemical probe that contain ubiquitin moiety for the detection of deubiquitinating enzymes (DUBs) activity. D Detection of DUB UCH-L3 in A-431 cancer cell lysates using chemical probe (red) and antibody (green). Adapted from [59]

## 6. PROTEAZY WIRUSA SARS-COV-2

Pandemia koronawirusa SARS-CoV-2 w ostatnim czasie zdominowała badania naukowe w wielu dyscyplinach oraz zintensyfikowała wysiłki na rzecz opracowania skutecznych szczepionek oraz leków. Jednym z głównych celów molekularnych do opracowania takich leków są dwie cysteinowe proteazy wirusowe, M<sup>pro</sup> oraz PL<sup>pro</sup>, które są kluczowe w procesie replikacji wirusa [61, 62]. Badania mające na celu znalezienie skutecznych inhibitorów tych enzymów obejmowały wiele technologii od badań *in silico* za pomocą dynamiki molekularnej i modelowania molekularnego, poprzez syntezę peptydowych i niepeptydowych związków, aż do retargetowania istniejących leków, które przeszły badania kliniczne i są w powszechnym użyciu

[63]. Jednym z takich podejść było również określenie specyficzności substratowej tych enzymów za pomocą technologii HyCoSuL [10]. Określenie preferencji katalitycznych proteazy M<sup>pro</sup> pozwoliło nie tylko opracować selektywne i aktywne substraty, ale również fluorescencyjne markery chemiczne, które z powodzeniem zostały wykorzystane do monitorowania aktywności tej proteazy w komórkach nosogardła pacjentów chorych na COVID-19 (**Rysunek 7A,B,C**) [64]. Wyniki te mają zatem wysoki potencjał diagnostyczny oraz farmakologiczny, gdyż wybrane sekwencje peptydowe mogą posłużyć jako struktury wiodące do projektowania leków. Hipoteza ta została bardzo szybko potwierdzona, gdy na rynku pojawił się pierwszy lek na COVID-19 nirmatrelwir (nazwa handlowa Paxlovid), który jest inhibitorem proteazy M<sup>pro</sup> [65]. Co więcej, nirmatrelwir w swojej strukturze (pozycja P3) posiada nienaturalny aminokwas *tert*-leucynę, który został zidentyfikowany jako optymalny aminokwas podczas skanowania tego enzymu metodą HyCoSuL [64, 65]. Drugim enzymem SARS-CoV-2 dla którego został określony pełny profil specyficzności substratowej jest proteaza PL<sup>pro</sup> [66]. W wyniku tych badań opracowano bardzo selektywne i aktywne inhibitory, dla których mechanizm wiązania został dodatkowo potwierdzony za pomocą struktur krystalicznych enzym-inhibitor (**Rysunek 7D**). Badania przeprowadzone na proteazach M<sup>pro</sup> i PL<sup>pro</sup> pokazały zatem, że zastosowanie nienaturalnych aminokwasów w syntezie substratów, inhibitorów i markerów chemicznych, jest nie tylko zasadne z perspektywy badań podstawowych, ale również niesie ze sobą realny potencjał w obszarze diagnostyki klinicznej oraz rozwoju nowych produktów farmaceutycznych.



Rysunek 7. Narzędzia chemiczne do badania proteaz SARS-CoV-2 opracowane za pomocą technologii HyCoSuL. A-C Wizualizacja aktywności proteazy Mpro w komórkach nosogardła pacjentów chorych na COVID-19 za pomocą markera chemicznego znakowanego BODIPY (A) na membranie nitrocelulozowej (B) oraz mikrografii fluorescencyjnej (C). Zaadaptowano z [64]. D Mechanizm wiązania tetrapeptydowego inhibitora VIR250 zawierającego nienaturalne aminokwasy do centrum aktywnego proteazy PLpro. Zaadaptowano z [66]

Figure 7. HyCoSuL-derived chemical tools for the investigation of SARS-CoV-2 proteases. A-C Visualization of Mpro catalytic activity in nasopharyngeal epithelial cells of COVID-19 patients using BODIPY-labelled chemical probe (A) via Western blot approach (B) and fluorescence microscopy (C). Adapted from [64]. D Mechanism of PLpro inhibition by tetrapeptide VIR250 inhibitor containing natural and unnatural amino acids. Adapted from [66]

## UWAGI KOŃCOWE

Badanie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych jest bardzo potężnym narzędziem chemii biologicznej do poszukiwania niskocząsteczkowych związków chemicznych, które reagując z tymi enzymami wskazują na ich aktywność katalityczną (substraty, markery) lub mogą blokować tę aktywność (inhibitory) wywołując odpowiedni efekt biologiczny. Do tej pory u ludzi zidentyfikowano ponad 700 różnych proteaz, co stanowi ogromne wyzwanie w poszukiwaniu selektywnych narzędzi chemicznych. Równoległe z odkrywaniem kolejnych enzymów proteolitycznych, pracowano także nad substratami i inhibitorami, które ułatwiłyby ich biochemiczną charakterystykę. Badania te opierały się zazwyczaj o testowanie bibliotek zdefiniowanych substratów i inhibitorów, zawierających co najwyżej kilkadziesiąt struktur. Dopiero opracowanie kombinatorycznej metody PS-SCL oraz metod proteomi-

czynnych opierających się na spektrometrii mas pozwoliło na dokładne zbadanie preferencji katalitycznej tych enzymów. Jednak nie zawsze udawało się znaleźć aktywne czy selektywne struktury, co było spowodowane ograniczoną liczną aminokwasów, które wiązały się do miejsca aktywnego enzymu. Znaczącym krokiem naprzód okazało się zastosowanie nienaturalnych łańcuchów bocznych aminokwasów, które umożliwiło znacznie dokładniejsze eksplorowanie przestrzeni chemicznej w centrum aktywnym protez. Oczywiście nienaturalne aminokwasy pojawiały się w substratach i inhibitorach proteaz od samego początku badania tych enzymów, jednak były to pojedyncze związki ukierunkowane na badanie wybranej kieszeni danego enzymu. Dopiero opracowanie metody HyCoSuL pozwoliło na systematyczne i kompleksowe mapowanie centrum aktywnego enzymu proteolitycznego, co doprowadziło do opracowania selektywnych narzędzi chemicznych dla wielu medycznie ważnych proteaz. Technologia HyCoSuL jest nadal rozwijana i stosowana dla nowych celów biologicznych i technologicznych, jak choćby opracowywanie nowych peptydowych proleków selektywnie aktywowanych przez wybrane proteazy. Tak szerokie zastosowanie tej technologii wynika przede wszystkim z faktu, że HyCoSuL będąc nowym konceptem i ideą badawczą może być adaptowana i aplikowana do rozwiązywania nowych problemów biologicznych, również takich, o których jeszcze nie wiemy, a z którymi przyjdzie nam się zmierzyć w przyszłości.

## PODZIĘKOWANIE

Publikacja została zrealizowana w ramach grantów z Narodowego Centrum Nauki: SONATA (UMO-2018/31/D/NZ5/02406, M.P.), SONATA BIS (UMO-2020/38/E/NZ3/00507, P.K.-W.) oraz HARMONIA (UMO-2018/30/M/ST5/00440, M.D.).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.S. Bond, *J. Biol. Chem.*, 2019, **294**, 1643.
- [2] M. Drag, G.S. Salvesen, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2010, **9**, 690.
- [3] B. Turk, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2006, **5**, 785.
- [4] L.E. Sanman, M. Bogyo, *Annu. Rev. Biochem.*, 2014, **83**, 249.
- [5] J.S. Dudani, A.D. Warren, S.N. Bhatia, *Annu. Rev. Can. Biol.*, 2017, **2**, 353.
- [6] M. Poreba, M. Drag, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 3968.
- [7] D. Kato, et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2005, **1**, 33.
- [8] M. Poreba, et al., *Cell Death Differ.*, 2014, **21**, 1482.
- [9] P. Kasperkiewicz, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2014, **111**, 2518.
- [10] M. Poreba, G.S. Salvesen, M. Drag, *Nat. Protoc.*, 2017, **12**, 2189.
- [11] N.D. Rawlings, et al. *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, D624.
- [12] P. Kasperkiewicz, et al., *FEBS J*, 2017, **284**, 1518.
- [13] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, **27**, 157.

- [14] C. Pop, G.S. Salvesen, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 21777.
- [15] B.I. Ratnikov, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2014, **111**, E4148.
- [16] Y. Choe, et al. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 12824.
- [17] N.A. Thornberry, et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 17907.
- [18] T.A. Rano, et al., *Chem. Biol.*, 1997, **4**, 149.
- [19] C. Rosales, *Front. Physiol.*, 2018, **9**, 113.
- [20] S. Janciauskiene, et al., *Front. Pharmacol.*, 2018, **9**, 341.
- [21] E. Kolaczowska, P. Kubes, *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, **13**, 159.
- [22] C.T. Pham, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, **40**, 1317.
- [23] V. Papayannopoulos, *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, **18**, 134.
- [24] A.J. Barrett, *Meth. Enzymol.*, 1981, **80**, 581.
- [25] B.C. Lechtenberg, et al., *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**, 945.
- [26] P. Kasperkiewicz, et al., *PLoS One*, 2015, **10**, e0132818.
- [27] P. Kasperkiewicz, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 10115.
- [28] L. Galluzzi, et al., *Cell Death Differ.*, 2018, **25**, 486.
- [29] S. Elmore, S., *Toxicol. Pathol.*, 2007, **35**, 495.
- [30] J.B. Denault, G.S. Salvesen, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 4489.
- [31] G.P. McStay, G.S. Salvesen, D.R. Green, *Cell Death Differ.*, 2008, **15**, 322.
- [32] A.B. Berger, K.B. Sexton, M. Bogyo, *Cell Res.*, 2006, **16**, 961.
- [33] M. Poreba, et al., *Cell Death Differ.*, 2019, **26**, 2695.
- [34] M. Poreba, et al., *Cell Death Differ.*, 2019, **26**, 229.
- [35] E. Dall, E. and H. Brandstetter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2013, **110**, 10940.
- [36] V. Turk, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1824**, 68.
- [37] B. Turk, D. Turk, V. Turk, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1477**, 98.
- [38] M. Vizovisek, M. Fonovic, B. Turk, *Matrix Biol.*, 2019, **75-76**, 141.
- [39] C.S. Hsieh, et al., *J. Immunol.*, 2002, **168**, 2618.
- [40] T. Yadati, et al. *Cells*, 2020, **9**, 7.
- [41] L. Kramer, D. Turk, and B. Turk, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2017, **38**, 873.
- [42] O.C. Olson, J.A. Joyce., *Nat. Rev. Cancer.*, 2015, **15**, 712.
- [43] M. Poreba, et al., *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 2113.
- [44] M. Poreba, et al., *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 8461.
- [45] M. Poreba, et al., *Cell Chem. Biol.*, 2016, **23**, 1023.
- [46] M. Poreba, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 16704.
- [47] A. Ciechanover., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, **6**, 79.
- [48] A. Wlodawer, *Structure*, 1995, **3**, 417.
- [49] D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, **68**, 1015.
- [50] M. Orłowski, S. Wilk, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **383**, 1.
- [51] H.C. Tai, E.M. Schuman, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, **9**, 826.
- [52] A.Y. Amerik, M. Hochstrasser, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, **1695**, 189.
- [53] F.E. Reyes-Turcu, K.H. Ventii, K.D. Wilkinson, *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, **78**, 363.
- [54] W. Rut, et al., *J. Med. Chem.*, 2018, **61**, 5222.
- [55] L.D. Fricker., *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.*, 2020, **60**, 457.
- [56] B. Liu, et al., *Mol. Psych.* 2022, **27**, 259.
- [57] N. Poondla, et al., *BMB Reports*, 2019, **52**, 3.
- [58] M. Drag, et al., *Biochem. J.*, 2008, **415**, 367.
- [59] W. Rut, et al., *Chem. Sci.*, 2020, **11**, 6058.
- [60] M. Drag, et al., *Biochem. J.*, 2008, **409**, 461.
- [61] L. Zhang, et al., *Science*, 2020, **368**, 409.
- [62] D. Shin, et al., *Nature*, 2020, **587**, 657.

- [63] Z. Lv, et al., *Front. Chem.*, 2021, **9**, 819165.
- [64] W. Rut, et al., *Nat .Chem. Biol.*, 2021, **17**, 222.
- [65] D.R. Owen, et al., *Science*, 2021, **374**, 1586.
- [66] W. Rut, et al., *Sci. Adv.*, 2020, **6**, 42.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 maja 2022 r.