

**WIZUALIZACJA ENZYMÓW
PROTEOLITYCZNYCH ZA POMOCĄ SOND
CHEMICZNYCH ORAZ CYTOMETRII MASOWEJ**

VISUALIZATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES
USING MASS CYTOMETRY-COMPATIBLE
CHEMICAL PROBES

Katarzyna Groborz¹, Marcin Poręba^{2,*}

¹ *Genentech Inc. South San Francisco, USA*

² *Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wydział Chemiczny,
Politechnika Wroclawska, Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Polska,*

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

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Enzymy proteolityczne i ich specyficzność substratowa
2. Sondy chemiczne do wizualizacji enzymów proteolitycznych
3. Wizualizacja aktywności enzymów proteolitycznych w aktywności nowotworów
4. Sondy chemiczne w cytometrii masowej

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Katarzyna Groborz – W 2021 roku otrzymała stopień naukowy doktora nauk chemicznych na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Narzędzia chemiczne do badania enzymów proteolitycznych przy użyciu cytometrii masowej” wykonanej pod opieką prof. Marcina Drąga i dr hab. Marcina Poręby, prof. uczelni. Obecnie realizuje staż podoktorski w firmie farmaceutycznej Genentech, w San Francisco, USA w laboratorium prof. Vishvy Dixita, światowego autorytetu w dziedzinie badań nad śmiercią komórki. Głównym osiągnięciem naukowym dr Groborz jest opracowanie panelu selektywnych narzędzi chemicznych do badania mechanizmów śmierci komórki. Wśród tych narzędzi znajdują się sondy chemiczne znakowane stabilnymi izotopami metali przejściowych, które zostały wykorzystane do analizy aktywności wybranych enzymów proteolitycznych w komórkach nowotworowych. Dr inż. Katarzyna Groborz jest współautorem 17 publikacji naukowych z listy JCR. W trakcie realizacji rozprawy doktorskiej autorka odbyła dwa staże naukowe w laboratorium prof. Guya Salvesena w Sanford Burnham Medical Discovery Institute, San Diego, USA. Dr Groborz kilkakrotnie była nagradzana za osiągnięcia naukowe: stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2015), stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej (2018), stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (2021). Do tej pory dr Groborz kierowała dwoma grantami badawczymi: Diamentowy Grant, finansowanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2015-2017) oraz PRELUDIUM, finansowanego z Narodowego Centrum Nauki (2018-2021).



<https://orcid.org/0000-0002-1894-4881>

Dr hab. inż. Marcin Poręba, prof. uczelni – W 2014 roku otrzymał stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk chemicznych (promotor: prof. Marcin Drąg). W 2015 roku jako pierwszy naukowiec z Polski otrzymał prestiżowe stypendium naukowe Marie Skłodowska-Curie Global Fellowship (MSCA) w programie Horyzont 2020. W ramach tego stypendium, w latach 2016-2018 realizował staż podoktorski w Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute w San Diego (CA, USA) w laboratorium prof. Guya Salvesena, światowego autorytetu w dziedzinie badania mechanizmów śmierci komórki. Do Polski wrócił w 2018 roku, podejmując pracę na Politechnice Wrocławskiej. W 2020 roku otrzymał stopień naukowy doktora habilitowanego w dziedzinie nauk chemicznych. Głównym osiągnięciem naukowym dr hab. Marcina Poręby, prof. uczelni jest opracowanie nowatorskiej technologii do ilościowego oznaczania aktywności enzymów proteolitycznych w układach biologicznych, za pomocą sond chemicznych i cytometrii masowej. Jest autorem ponad 50 artykułów naukowych w recenzowanych czasopismach zagranicznych z listy JCR, które były cytowane ponad 1500 razy. Prezentował wyniki swoich badań na ponad 40 konferencjach międzynarodowych, w tym wygłosił ponad 20 wykładów na zaproszenie. W trakcie swojej pracy badawczej był wielokrotnie nagradzany za osiągnięcia naukowe: stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla doktorantów (2013), stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2014, 2013), stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (2017), nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej (2019, 2017), Nagroda Uniwersytetu Zachodniej Australii (2019), Srebrny Krzyż Zasługi (2020), finalista konkursu Młody Promotor Polski (2021), nagroda Komitetu Chemii Analitycznej PAN za rozprawę habilitacyjną (2021), nagroda Polskiego Towarzystwa Chemicznego za habilitację (2021).



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

ABSTRACT

Proteolytic enzymes, also known as peptidases or proteases, are protein catalysts that are primarily responsible for the hydrolysis of a peptide (amide) bond in peptide and protein substrates. By selective hydrolysis of selected substrates, these enzymes control many physiologically important processes including programmed cell death, blood coagulation cascade, protein maturation, fibrinolysis and many others. On the other hand, however, the imbalance in proteases activity leads to the development of diseases, including cancer, neurodegenerative diseases and coronary diseases etc.. In recent decades there has been great progress in studying the biological functions of many proteolytic enzymes. These observations were made possible through the use of various research techniques including genomics, epigenomics and proteomics. However, a major limitation of these techniques is the lack of information about the exact catalytic activity of the enzymes. For this reason, chemical probes are the most convenient tool for functional investigation of proteolytic enzymes. According to the generally accepted convention, chemical probes are compounds that can detect the catalytic activity of proteolytic enzymes. In general, chemical-based probes (activity-based probes, ABPs) consist of three main components: (1) a reactive binding group that binds permanently to the enzyme active site, (2) a recognition sequence (usually a peptide), which is responsible for the selective binding of a given probe to an individual enzyme or group of enzymes, and (3) a tag, mainly a fluorophore, enabling for detection of the probe-enzyme complex. However, the current limitation of ABPs is that only up to four enzymes can be detected and visualized in parallel, which significantly impedes their application for multi-parametric analysis. To date, the detection of proteases with the use of ABPs was limited to individual enzymes being investigated one by one, thus the obtained picture was far from being complete. In this review we describe the development of a new type of enzyme ABPs, so called TOF-probes that are compatible with mass cytometry format. The application of metal isotopes instead of fluorophores, makes possible to significantly increase the number of enzymes, which can be simultaneously visualized using chemical probes. Mass cytometry is a revolutionary technology that adopts atomic mass spectrometry into flow cytometry applications. The excellence of this method is that each metal isotope (mostly from lanthanides) has its own peak on mass spectrum, which eliminates the problem of signal overlap, thus allows for monitoring of more than 40 parameters at single cell level.

Keywords: chemical probes, mass cytometry, proteolytic enzymes, cancer, cell death

Słowa kluczowe: sondy chemiczne, cytometria masowa, enzymy proteolityczne, nowotwory, śmierć komórki

WPROWADZENIE

Obecnie choroby nowotworowe stanowią bardzo poważne wyzwanie w obszarze zdrowia publicznego. Co więcej, proces powrotu do zdrowia po takiej chorobie jest zależny od kilku czynników, w tym wczesnej diagnozy, dokładnej klasyfikacji nowotworu oraz wyboru sposobu leczenia. Aby lepiej radzić sobie z nowotworami, istnieje potrzeba szczegółowej analizy ich biomarkerów, tak aby dokładniej zrozumieć ich rolę w tej chorobie. Większość takich biomarkerów została odkryta poprzez analizę genomu, proteomu i metabolomu komórek nowotworowych, ale ten obraz nie jest kompletny. Uważamy, że brakującym elementem tego systemu jest AKTYWOM, czyli zestaw katalitycznie aktywnych białek występujących w komórkach w danym momencie. Wokół tych białek, a w szczególności wokół enzymów proteolitycznych (proteaz) skupiają się nasze badania. Ich nadrzędnym celem jest stworzenie nowoczesnej strategii analizy pojedynczych komórek nowotworowych w kontekście aktywności poszczególnych enzymów proteolitycznych, przy użyciu cytometrii masowej oraz wykorzystanie tej wiedzy do spersonalizowanej diagnostyki onkologicznej. Jednym z głównych obszarów naszych badań jest analiza komórek nowotworowych za pomocą cytometrii masowej. Większość narzędzi wykorzystywanych w cytometrii masowej to przeciwciała połączone z polimerami zawierającymi metale. Jednak w ostatnim czasie nasza grupa badawcza opracowała sondy chemiczne znakowane metalami (*ang. TOF-probes, Time-Of-Flight*), które są kompatybilne z cytometrią masową. W odróżnieniu od przeciwciał, sondy TOF pozwalają na detekcję tylko aktywnych enzymów. Co więcej, zastosowanie sond TOF w połączeniu z przeciwciałami znakowanymi metalami pozwala na stworzenie bardzo szczegółowego obrazu proteolitycznego komórek nowotworowych.

1. ENZYMY PROTEOLITYCZNE I ICH SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA

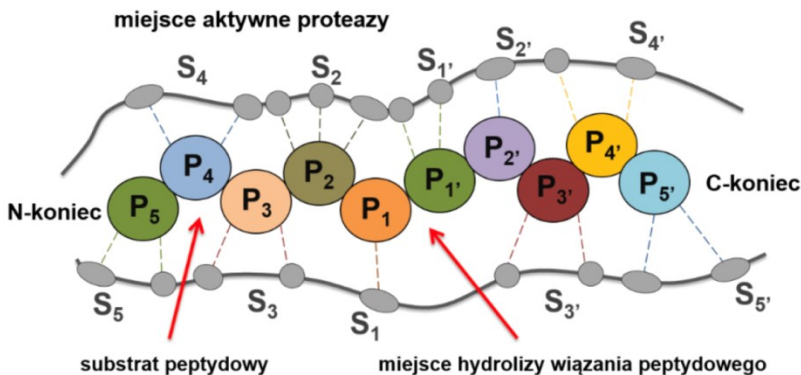
Enzymy proteolityczne, zwane inaczej peptydazami lub proteazami, to białkowe katalizatory, które są odpowiedzialne przede wszystkim za hydrolizę wiązania peptydowego (amidowego) w substratach peptydowych i białkowych. Poprzez selektywną hydrolizę wybranych substratów enzymy te kontrolują wiele fizjologicznie ważnych procesów włączając w to programowaną śmierć komórki, kaskadę krzepnięcia krwi, dojrzewanie białek, fibrylizację i wiele innych. Co więcej, hydroliza białek i peptydów prowadzi do recyklingu pojedynczych aminokwasów, które są następnie wykorzystywane jako bloki budulcowe w syntezie białek [1]. Jednak z drugiej strony, zaburzona równowaga w działaniu proteaz (ich nadaktywność katalityczna lub brak aktywności) prowadzi do rozwoju chorób, włączając w to choroby nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne czy choroby wieńcowe [2,3]. Aby zachować równowagę w organizmie, aktywność

enzymów proteolitycznych jest ściśle kontrolowana na kilku poziomach począwszy od ekspresji, poprzez dojrzewanie, modyfikacje post-translacyjne, a skończywszy na oddziaływaniach z naturalnymi inhibitorami i innymi proteazami [3].

Badania nad ludzkim genomem pozwoliły zidentyfikować prawie 600 różnych enzymów proteolitycznych, co stanowi ponad 2% wszystkich kodowanych białek [4]. Z mechanistycznego punktu widzenia, proteazy można podzielić na sześć grup: (1) proteazy serynowe, które w centrum katalitycznym posiadają nukleofilową resztę seryny, (2) proteazy cysteinowe z aktywną resztą cysteiny, (3) proteazy treoninowe z aktywną resztą treoniny, (4) metaloproteazy, które w centrum aktywnym wymagają obecności kationu metalu, (5) proteazy aspartyłowe, gdzie za katalizę odpowiada reszta kwasu asparaginowego oraz (6) proteazy o nieznanym typie katalizy. Co ciekawe, proteazy serynowe, cysteinowe i treoninowe wykazują kowalencyjny typ katalizy substratów, podczas gdy metaloproteazy i proteazy aspartyłowe cechują się niekowalencyjnym typem katalizy [1]. Jednak niezależnie od typu katalizy, którą przeprowadzają proteazy, podstawową właściwością ich aktywności katalitycznej jest tzw. specyficzność substratowa. Otóż proteazy mogą hydrolizować tylko te substraty, których struktura i sekwencja aminokwasowa jest ściśle dopasowana do ich centrum katalitycznego, czyli miejsca gdzie zachodzi reakcja rozpadu substratu na mniejsze produkty. W 1967 roku Schechter i Berger wprowadzili jednolity system określania specyficzności substratowej wszystkich enzymów proteolitycznych [5]. Wg tego systemu w miejscu aktywnym proteazy wyodrębniono kieszenie, do których wiąże się substrat peptydowy (**Rysunek 1**). W ogólnym ujęciu substrat wiąże się swoimi aminokwasami (nazywanymi ...-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-..., pozycje numerowane są od N- do C-końca peptydu) do centrum katalitycznego enzymu zbudowanego przez tzw. kieszenie wiążące substrat (odpowiednio ...-S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4'-...). Wg systemu Schechtera i Bergera, hydroliza wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy pozycjami P1 i P1' (czyli w kieszeniach S1 i S1'), ale tylko wtedy gdy substrat jest komplementarny z centrum aktywnym enzymu [5]. Jednak nie wszystkie proteazy mają możliwość wiązania tak dużej liczby aminokwasów w centrum aktywnym. 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 egzoproteaz. Niemniej jednak, przedstawiony ogólny schemat jest prawidłowy dla większości endoproteaz, czyli enzymów proteolitycznych które potrafią wiązać kilka aminokwasów po obu stronach hydrolizowanego wiązania peptydowego. Każdy enzym proteolityczny ma swój profil specyficzności substratowej czyli zestaw substratów, które potrafi hydrolizować. I tak na przykład jedne enzymy potrafią hydrolizować jedynie kilka substratów (wąska specyficzność substratowa), podczas gdy inne hydrolizują

tysiące białek i peptydów (szeroka specyficzność substratowa) [6]. 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 [7,8]. Cecha ta stanowi ogromne wyzwanie podczas projektowania selektywnych narzędzi chemicznych do badania wybranych enzymów proteolitycznych.

Poszukiwanie i opracowywanie nowych metod badania specyficzności substratowej proteaz jest od ponad 20 lat bardzo aktywnym obszarem badań [9,10]. Najbardziej powszechne metody opierają się badaniu naturalnych białek i peptydów będących substratami dla proteaz. Inne z kolei polegają na tworzeniu bibliotek substratów składających się z tysięcy peptydów i poddawaniu ich działaniu poszczególnych proteaz, celem wybrania optymalnej sekwencji peptydu. Przez długi czas biblioteki takie były produkowane na fagach (metoda biologiczna) lub w wyniku syntezy chemicznej (metoda chemiczna) i składały się jedynie z naturalnych aminokwasów. Mimo że metody te dostarczyły cennych informacji na temat budowy miejsca aktywnego wielu proteaz, często okazywały się nieskuteczne przy próbie rozróżniania enzymów wykazujących nakładającą się specyficzność substratową. Dopiero wprowadzanie nienaturalnych aminokwasów do sekwencji peptydowej substratów pomogło w znacznym stopniu rozwiązać ten problem [11].



Rysunek 1. Schemat oddziaływania substratu peptydowego z miejscem aktywnym proteazy. Kolorami zaznaczono aminokwasy substratu, natomiast przerywane linie oznaczają oddziaływania poszczególnych aminokwasów substratu z aminokwasami budującymi miejsce aktywne enzymu. Hydroliza wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy pozycjami P1 i P1'

Figure 1. Scheme of interaction of peptide substrate with the protease active site. The amino acids building the substrate are marked with colors, while the broken lines indicate the interaction of individual amino acids of the substrate with the amino acids that build the protease active site. Peptide bond hydrolysis occurs between positions P1 and P1' (in pockets S1 and S1')

2. SONDY CHEMICZNE DO WIZUALIZACJI ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

W ostatnich dekadach nastąpił ogromny postęp w badaniu biologicznych funkcji wielu enzymów proteolitycznych. Udało się między innymi wyjaśnić rolę kaspaz w procesie programowanej śmierci komórki lub przypisać katepsynom i macierzowym metaloproteazom ich rolę w rozwoju i przerzutowaniu nowotworów [12]. Było to możliwe dzięki wykorzystaniu różnych technik badawczych włączając w to genomikę, epigenomikę czy proteomikę. Jednak dużym ograniczeniem tych technik jest brak informacji o dokładnej aktywności katalitycznej badanego enzymu. Badania proteomiczne (np. za pomocą przeciwciał czy spektrometrii mas) pokazują poziom ekspresji enzymu, ale nie informują jaka część jego populacji jest aktywna. Ma to ogromne znaczenie zwłaszcza przy badaniu enzymów proteolitycznych, które podlegają kilkustopniowemu procesowi dojrzewania katalitycznego lub działają w obrębie strukturalnie podobnej grupy enzymów. Dobrym przykładem obrazującym ten problem są cysteinowe katepsyny. Od dawna wiadomo, że nadekspresja tych enzymów wykazuje dodatnią korelację z rozwojem i przerzutowaniem nowotworów [13]. Jednak do tej pory nie było wiadomo, które z poszczególnych katepsyn pełnią dominującą rolę w tym procesie. Pokazano bowiem, że wyciszenie (ang. *knock-down*) lub wycięcie (ang. *knock-out*) jednej katepsyny, może być skompensowane przez aktywność pozostałych katepsyn, które wykazując podobną specyficzność substratową mogą ją funkcjonalnie zastąpić [14]. Tak więc wyniki takich eksperymentów mogą prowadzić do błędnych wniosków. Innym przykładem są kaspazy. Ich nakładająca się specyficzność substratowa znacząco utrudnia przypisanie dokładnych funkcji poszczególnym kaspazom [15]. Do tej pory niejasna jest rola kaspazy 10 w zewnątrzkomórkowej inicjacji procesu apoptozy i nekroptozy, rola kaspaz 6 i 7 w fazie wykonawczej procesu apoptozy, czy rola kaspaz 4 i 5 w procesie pyroptozy. Z tego powodu, najlepszym narzędziem do funkcjonalnego badania enzymów proteolitycznych są sondy chemiczne (inaczej: niskocząsteczkowe sondy aktywności). [16].

Według ogólnie przyjętej konwencji sondy chemiczne to związki służące do detekcji aktywności katalitycznej enzymów proteolitycznych. W odróżnieniu od przeciwciał, sondy chemiczne wykrywają tylko aktywne proteazy i nie wiążą się z (1) proenzymami/zymogenami, (2) proteazami, których aktywność katalityczna jest zahamowana przez naturalne inhibitory, (3) proteazami, które są nieprawidłowo zwinięte, a także (4) z proteazami, które utraciły aktywność katalityczną na skutek braku obecności kofaktorów (np. jonów metali) lub poprzez ich dezaktywację przez inne proteazy [17]. Sondy chemiczne można ogólnie podzielić na dwie główne grupy: (1) sondy, które są substratami oraz (2) sondy, które działają jak inhibitory (**Rysunek 2**). Pierwszą grupę stanowią zazwyczaj peptydy, które są wyposażone

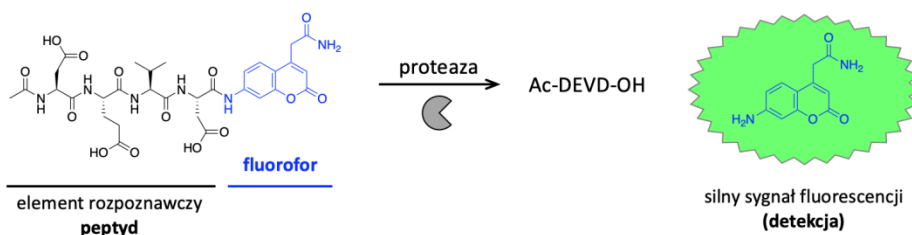
w znacznik (najczęściej fluorescencyjny). W efekcie reakcji hydrolizy, peptyd rozpada się na dwa fragmenty, z których jeden zaczyna emitować silny sygnał fluorescencyjny wskazujący na aktywność enzymu. Zaletą wykorzystania substratów jest amplifikacja sygnału, ponieważ enzym jako katalizator jest odtwarzany po każdym cyklu reakcji hydrolizy. Wadą tej metody jest brak możliwości dokładnej lokalizacji enzymu (np. w komórce), gdyż po hydrolizie fluorofor dyfunduje z miejsca aktywnego enzymu (**Rysunek 2A**). W drugim przypadku sonda będący inhibitorem wyposażonym w znacznik (najczęściej biotynę czy fluorofor) wiąże się trwale w miejscu aktywnym enzymu. Zaletą tego rozwiązania jest możliwość dokładnej lokalizacji enzymu. Jednak ograniczeniem tej metody jest brak amplifikacji sygnału, gdyż sonda/inhibitor wiąże się z enzymem w stosunku 1:1. Rozwiązaniem tego problemu jest stosowanie silnych fluoroforów, które emitują mocny sygnał nawet przy bardzo małym stężeniu (**Rysunek 2B**).

Pierwsze sondy chemiczne do detekcji enzymów proteolitycznych, działające jako substraty zostały opracowane ponad 70 lat temu [18]. W jednej z pionierskich prac Harkness i współpracownicy otrzymali prosty substrat chromogeniczny o strukturze leucyna-*beta*-naftyloamina, który służył do wykrywania aktywności leucylowej aminopeptydazy w osoczu [18]. Pierwszą natomiast sondą chemiczną działającą na zasadzie inhibitora była biotynylowana izokumaryna opracowana w 1993 przez grupę prof. Jamesa Powersa [19]. Sonda ta służyła do wykrywania aktywności enzymów proteolitycznych z grupy proteaz serynowych. W kolejnych latach nastąpił gwałtowny rozwój sond chemicznych działających na zasadzie inhibitora. Pionierami w tej dziedzinie (oprócz Powersa) byli Benjamin Cravatt i Matthew Bogoy [17,20].

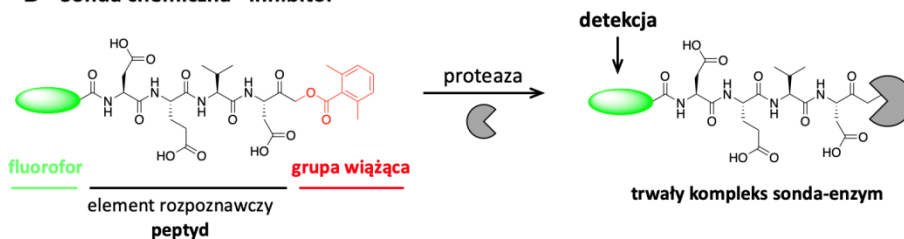
Wizualizacja enzymów proteolitycznych za pomocą sond chemicznych ma długą historię. Ponad 20 lat temu Benjamin Cravatt z Instytutu Scripps zaproponował terminy „*activity-based protein profiling*” oraz „*activity-based proteomics*” co oznaczało badanie proteomu za pomocą sond chemicznych opartych o aktywność katalityczną enzymów [21]. Pionierskie badania w tym obszarze dotyczyły badania aktywności hydrolaz serynowych w proteomie za pomocą fluorescencyjnych sond chemicznych. W późniejszym okresie metoda ta została skojarzona z tandemową spektrometrią mas co pozwoliło na analizę kilkudziesięciu enzymów w jednej próbce. W ogólnym ujęciu, sondy chemiczne działające na zasadzie inhibitorów (ang. *activity-based probes*, *ABPs*) składają się z trzech głównych elementów: (1) reaktywnej **grupy wiążącej**, która łączy się z trwale z enzymem, (2) **sekwencji rozpoznawczej** (zazwyczaj peptydu), która odpowiada za selektywne wiązanie się danej sondy z enzymem lub grupą enzymów oraz (3) **znacznika**, który umożliwia detekcję kompleksu sonda-enzym (**Rysunek 3**). Wśród najczęściej spotykanych reaktywnych **grup wiążących** stosowanych do

enzymów proteolitycznych należą epoksydy oraz acyloksymetyloketony (dla proteaz cysteinowych), estry diarylowe kwasów 1-aminoalkilofosfonowych (dla proteaz serynowych) oraz estry winylowe kwasu arylosulfonowego (dla proteaz treoninowych, głównie proteasomu) [22].

A Sonda chemiczna - substrat



B Sonda chemiczna - inhibitor



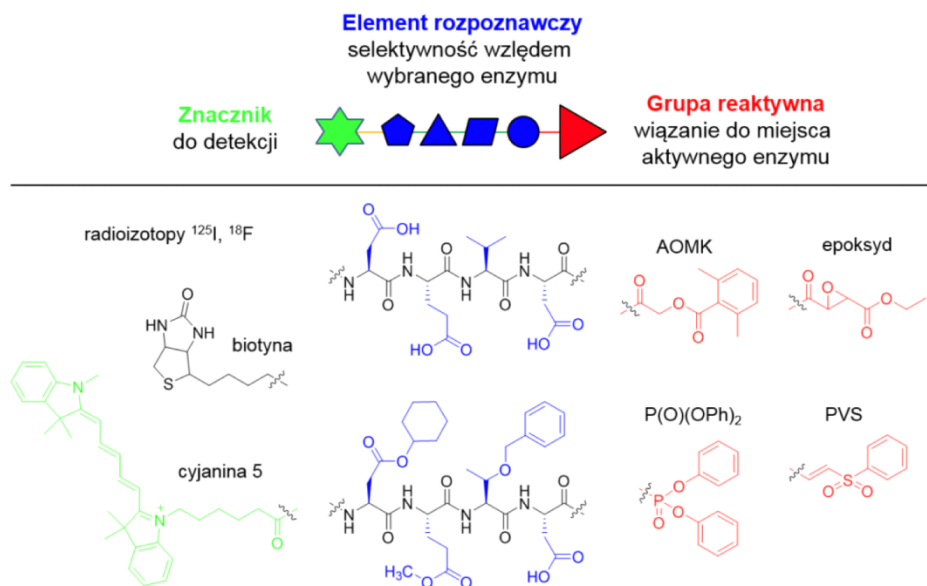
Rysunek 2. Schemat budowy i działania (fluorescencyjnych) sond chemicznych. Schemat A. Substrat fluorescencyjny dla kaspazy 3 o sekwencji Ac-Asp-Glu-Val-Asp-ACC, gdzie ACC to kumarynowy znacznik fluorescencyjny, który związany z peptydem nie wykazuje fluorescencji. Po hydrolizie substratu, znacznik jest uwalniany i następuje gwałtowny przyrost fluorescencji. Schemat B. Sonda chemiczna działająca na zasadzie inhibitora. Składa się ona z trzech elementów: znacznika (tu: fluorofor), elementu rozpoznawczego i elektrofilowej grupy wiążącej, która reaguje z nukleofilowym centrum aktywnym enzymu, tworząc trwały kompleks sonda-enzym, dzięki czemu możliwa jest lokalizacja enzymu

Figure 2. Schematic structure and mechanism of action of fluorescent chemical probes. Scheme A. Fluorescent substrate for caspase 3 with the Ac-Asp-Glu-Val-Asp-ACC sequence where ACC is a coumarin-based fluorescent label which is non-fluorescent when bound to the peptide. After hydrolysis of the substrate, the ACC is released and a rapid increase in fluorescence occurs. Scheme B. The inhibitor-based chemical probes (activity-based probe, ABP) consists of three elements: (1) a tag (here: fluorophore), (2) a recognition element and (3) an electrophilic binding group that reacts with the active nucleophilic center of the enzyme to form a stable marker-enzyme complex, making it possible to localize the enzyme

Zaletą tych grup wiążących, jest utworzenie trwałego, kowalencyjnego wiązania z enzymem, dzięki czemu możliwa jest dalsza praca z próbką, np. w zakresie jej rozdzielania elektroforetycznego i wizualizacji kompleksu za pomocą techniki *Western blotting*. Wśród najczęściej stosowanych sekwencji rozpozna-

wczych są peptydy i peptydomimetyki, które są projektowane tak by selektywnie oddziaływać z enzymem (lub grupą enzymów). Bardzo często te sekwencje składają się z naturalnych aminokwasów, które są wybierane na podstawie sekwencji naturalnych białkowych i peptydowych substratów lub na drodze profilowania danego enzymu za pomocą chemicznych kombinatorycznych bibliotek substratów fluorogenicznych. Jedną z takich metod jest szeroko stosowana metoda pozycyjnego skanowania syntetycznych kombinatorycznych bibliotek (ang. *Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries, PS-SCL*) [15]. Inną z metod jest metoda HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Library*) czyli biblioteki substratów fluorogenicznych, które oprócz naturalnych aminokwasów (jak w metodzie PS-SCL) zawierają także nienaturalne aminokwasy (stąd nazwa *hybrydowa*), dzięki czemu możliwa jest bardzo dokładna analiza miejsca aktywnego enzymu, co skutkuje opracowaniem bardziej selektywnych sekwencji peptydowych [11]. Ostatnim elementem sondy jest **znacznik**, dzięki któremu możliwa jest detekcja sondy związanej z enzymem. Istnieją trzy główne typy znaczników stosowanych w sondach chemicznych dla enzymów (w tym enzymów proteolitycznych): biotyna, fluorofory oraz radioizotopy. Zastosowanie biotyny w sondach należy do pośrednich metod wizualizacji, gdyż w celu detekcji biotyny musi być zastosowany dodatkowy znacznik, np. fluorescencyjnie znakowana streptawidyna. Pozwala to jednak na wykorzystanie różnych znaczników fluorescencyjnych, dobierając je odpowiednio do rodzaju eksperymentu. Kolejną zaletą biotyny jest możliwość wzbogacenia próbki (ang. *sample enrichment*) lub nawet izolacja danego enzymu poprzez inkubację kompleksu biotynylowana sonda-enzym z żywicą (lub kolumną), na której osadzono streptawidynę. Metoda ta jest stosowana głównie w analizie próbki za pomocą spektrometrii masowej lub w przypadku, gdy stężenie analitu (enzymu) jest bardzo niskie. Zdecydowanie najczęściej stosowanym obecnie typem znacznika są fluorofory. Związki te potrafią emitować światło w zakresie od 300 nm do nawet 800-850 nm, dzięki czemu możliwa jest jednoczesna analiza kilku enzymów za pomocą sond chemicznych wyposażonych w różne fluorofory (ang. *multiplexing*) [23]. Co więcej, niektóre z tych znaczników emitują bardzo silny sygnał fluorescencyjny (np. cyjanina 7, 800CW, UL766, ZW800-1), dzięki czemu możliwa jest analiza enzymów, które występują w stężeniach subnanomolarnych. Ponadto znaczniki takie, posiadając zdolność głębokiej penetracji tkanki, są coraz powszechniej wykorzystywane podczas operacjach chirurgicznych w celu lepszej wizualizacji np. nowotworów [24]. Ostatnią grupą znaczników są radioizotopy jak np. ^{125}I czy ^{18}F , używane głównie w aplikacjach biologicznych i medycznych, czasami również w sondach chemicznych do wizualizacji proteaz [25]. Obecnie jest to najrzadziej stosowana metoda ze względu na duże wymagania techniczne i odpowiednie kwalifikacje

personelu wykonującego pomiary. W ostatnich latach nasza grupa badawcza opracowała czwarty rodzaj znacznika dla sond chemicznych, który wykorzystuje cytometrię masową jako metodę ich detekcji [26,27]. Dzięki zastosowaniu takich znaczników możliwa stała się równoległa detekcja wielu enzymów na poziomie pojedynczych komórek, co z kolei otwiera nowe możliwości w dokładnym badaniu aktywnemu różnorodnych układów biologicznych. Sondy te są opisane szczegółowo w kolejnych rozdziałach.



Rysunek 3. Struktura sondy chemicznej działającej na zasadzie nieodwracalnego inhibitora. Sonda składa się z trzech elementów: (1) elektrofilowej grupy reaktywnej, która reaguje z nukleofilem w centrum aktywnym enzymu, (2) elementu rozpoznawczego odpowiadającego za selektywność oraz (3) znacznika służącego do detekcji. Grupy reaktywne to najczęściej acyloksymetyloketony (AOMK), epoksydy, estry difenylove kwasu 1-aminoalkilofosforowego ($P(O)(OPh)_2$), czy fenilo-winylo sulfoniany (PVS). Jako elementy rozpoznawcze używane są najczęściej peptydy zawierające naturalne (górną sekwencją) lub naturalne/nienaturalne (dolną sekwencją) aminokwasy. Znaczniki to najczęściej fluorofory oraz biotyna; radioizotopy stosuje się obecnie rzadko

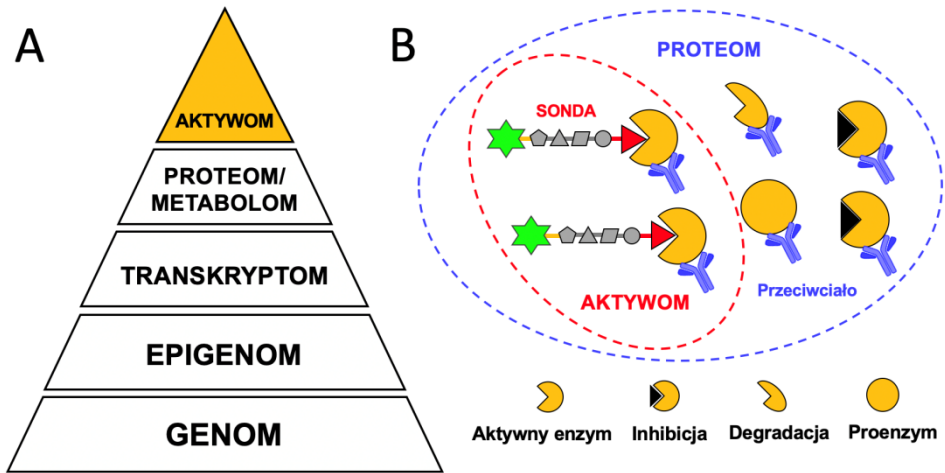
Figure 3. Structure of inhibitor-based chemical probe (ABP). The marker consists of three elements: (1) an electrophilic reactive group that reacts with a nucleophile in the active center of the enzyme, (2) the recognition element responsible for the selectivity of the marker and (3) the tag used for the ABP detection. Reactive groups are most often acyloxymethyl ketones (AOMK), epoxides, diphenyl esters of 1-aminoalkylphosphonic acid ($P(O)(OPh)_2$) or phenyl vinyl sulfonates (PVS). Peptides containing natural (top sequence) or natural / unnatural (bottom sequence) amino acids are most commonly used as recognition elements. Labels are most commonly fluorophores and biotin; radioisotopes are currently rarely used

3. WIZUALIZACJA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH W AKTYWOMIE NOWOTWORÓW

Nowotwory są bez wątpienia jednym z najbardziej złożonych systemów w biologii i pomimo ogromnej ilości badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich kilku dekad, choroba ta wciąż odpowiada za miliony zgonów rocznie na całym świecie [28]. Sukces w walce z chorobą nowotworową zależy od wielu czynników, m.in. odpowiednio wczesnej diagnozy, odpowiedniego sklasyfikowania pacjenta oraz wyboru skutecznego leczenia. Obecnie nasza wiedza dotycząca szeroko pojętej choroby nowotworowej jest wynikiem badań (epi)genetycznych, transkryptomicznych, metabolomicznych oraz proteomicznych. Tak znaczący postęp był możliwy dzięki rozwojowi nowoczesnych wysokoprzepustowych metod i narzędzi badawczych włączając w to sekwencjonowanie NGS-RNA w badaniach genetycznych, wykorzystanie wysokorozdzielczej spektrometrii masowej i magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach metabolomicznych i proteomicznych, czy wykorzystanie bardzo selektywnych przeciwciał w analizie białek. Wszystkie te dziedziny nauki tworzą tzw. piramidę omiczną, gdzie u podstawy znajduje się genom, natomiast na jej szczycie jest proteom (**Rysunek 4**). Jednak w badaniu aktywności enzymów, a zwłaszcza enzymów proteolitycznych wydaje się zasadne, by na szczycie tej piramidy (nad proteomem) umieścić kolejny element, zwany AKTYWOMEM (**Rysunek 4A**). W najprostszym ujęciu aktywom to funkcjonalna część proteomu. Jeśli przyjąć, że proteom to cała pula enzymów (aktywnych i nieaktywnych) to aktywom będzie stanowił tylko tę pulę enzymów, które wykazują aktywność katalityczną. Analiza enzymów poprzez badanie genomu czy transkryptomu dostarcza wielu informacji na temat np. mutacji w tych białkach, jednak nie informuje wprost, czy te białka będą katalitycznie aktywne. Podobnie z badaniem proteomu za pomocą przeciwciał. Biorąc pod uwagę, że aktywność enzymów proteolitycznych jest regulowana na kilku poziomach, zastosowanie przeciwciał dostarczy informacji tylko o ogólnym poziomie ekspresji danego białka. Informację na temat aktywności katalitycznej poszczególnych enzymów (aktywomu) można więc uzyskać tylko stosując odpowiednie sondy chemiczne (**Rysunek 4B**).

Wykorzystaniem sond chemicznych do badania enzymów zajmuje się dziedzina zwana „*activity-based protein profiling, ABPP*” czyli profilowanie białek pod kątem ich aktywności katalitycznej. Stworzyło to podstawy do rozwoju aktywomiki jako dziedziny zajmującej się badaniem **aktywomu**. Określenie to zostało zaproponowane przez Iaina Pemberton z firmy Photeomix w komunikacie konferencyjnym pt.: „Activomics: a novel approach to biomarker discovery, in chronic low back pain” w 2016 roku [29]. W komunikacie tym można przeczytać, że „*Activomics breaks away from conventional concentration-based omics*

technologies and places the focus on enzyme activity” co bardzo dobrze obrazuje zasadność wprowadzenia tego konceptu. W swoich badaniach autorzy skupili się na analizie modyfikacji post-translacyjnych będących wynikiem działania różnych enzymów, jednak pojęcie aktywomu (i aktywomiki) w ujęciu do sond chemicznych dla proteaz nie zostało jeszcze opisane. Zasadność badania aktywomu enzymów proteolitycznych w nowotworach poprzez ich selektywną wizualizację opiera się na kilku przesłankach. Po pierwsze, jak wcześniej wspomniano, proteaza jest funkcjonalna jedynie wówczas gdy jest katalitycznie aktywna. Utrata tej aktywności bardzo często oznacza utratę funkcji. Po drugie proteazy działają zawsze w danym systemie biologicznym oddziaływując z innymi proteazami, białkami czy małocząsteczkowymi związkami. Dynamika tego systemu jest pochodną aktywności wielu enzymów i oddziaływań, więc wizualizacja poszczególnych proteaz powinna być bardzo dokładna i specyficzna. Jedynie wtedy będzie można dokładnie określić funkcję danej proteazy np. w nowotworze. Po trzecie, utrata aktywności jednego enzymu proteolitycznego może być kompensowana przez inne enzymy, więc tylko określenie aktywności poszczególnych enzymów dostarczy pełnego obrazu danej sytuacji. Co więcej, w badaniach aktywności katalitycznej enzymów, bardzo często naukowcy próbują ją korelować z aktywnością i/lub poziomem ekspresji innych białek, np. białek immunologicznych czy onkologicznych, dzięki czemu możliwe jest określenie roli danego enzymu proteolitycznego w przerzutowaniu nowotworów czy lekooporności danego typu komórek rakowych. Biorąc to wszystko pod uwagę, dokładna analiza aktywomu za pomocą sond chemicznych może bardzo dobrze uzupełnić obraz danego systemu biologicznego w zakresie jego dynamiki będącej pochodną aktywności poszczególnych enzymów.



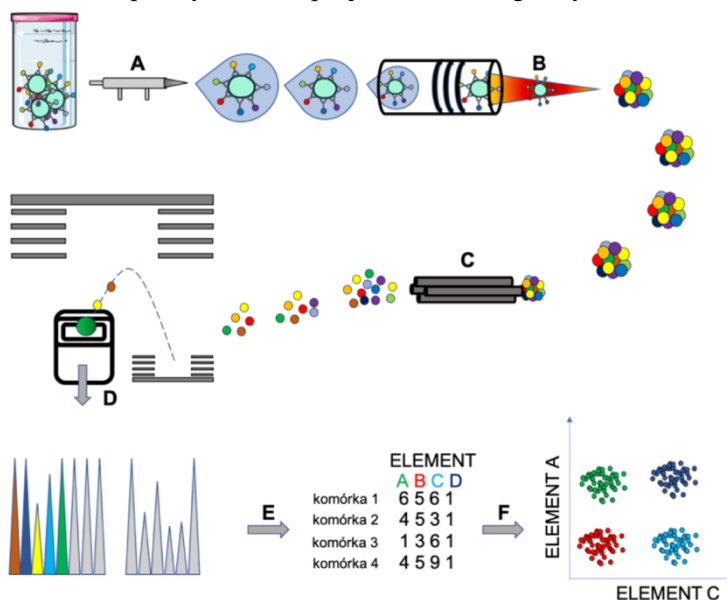
Rysunek 4. Zastosowanie sond chemicznych w badaniu aktywomu. Panel A. Piramida omiczna, na szczycie której znajduje się aktywom. Według tego schematu aktywom zawiera mniej informacji o enzymie, niż np. genom, czy proteom, gdyż ta informacja dotyczy jedynie jego aktywności katalitycznej. Panel B. Różnica pomiędzy aktywomem a proteomem. Aktywom to funkcjonalna część proteomu, do której zaliczają się jedynie te enzymy, które wykazują aktywność katalityczną. Jedną z najczęściej używanych metod do badania proteomu są przeciwciała, które oznaczają aktywne i nieaktywne białka. W odróżnieniu do nich, sonda chemiczna (do badania aktywomu) łączy się tylko z aktywnymi enzymami

Figure 4. The application of ABPs in the profiling of the activome Panel A. The “omics” pyramid, on top of which there is the activome. According to this scheme, the activome contains less information about the enzyme than, for example, the genome or proteome, because this information concerns only its catalytic activity. Panel B. The main difference between the activome and the proteome. The activome is a functional part of the proteome, which includes only those enzymes that show catalytic activity. Antibodies that detect active and inactive proteins are one of the most commonly used methods for proteome testing. In contrast to them, the ABP (for studying the activome) reacts with active proteins only

4. SONDY CHEMICZNE W CYTOMETRII MASOWEJ

Cytometria masowa jest nowoczesną techniką analityczną, która łączy w sobie zalety cytometrii przepływowej i spektrometrii mas. Technika ta polega na wykorzystaniu stabilnych izotopów metali przejściowych (głównie lantanowców) jako znaczników dla przeciwciał i sond DNA [30,31] (**Rysunek 5**). Z uwagi na fakt, że każdy z tych metali (znaczników) ma ściśle określoną masę cząsteczkową, możliwe jest wykorzystanie wielu takich metali podczas jednego eksperymentu, gdyż ich widma masowe się nie nakładają. Konsekwencją tego jest możliwość równoległego pomiaru ponad 50 markerów (białek, mRNA) na poziomie pojedynczych komórek, co znacząco przewyższa możliwości cytometrii przepływowej, która wykorzystuje znaczniki fluorescencyjne. W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił gwałtowny rozwój cytometrii masowej zarówno od strony

technicznej, jak i jej aplikacji w badaniach nad rozwojem wielu chorób, włączając w to choroby immunologiczne czy choroby nowotworowe. Dzięki cytometrii masowej stało się możliwe dokładne określenie immunofenotypu poszczególnych (pod)typów nowotworów, co przyczyniło się do ich lepszej klasyfikacji i w konsekwencji do doboru optymalnego leczenia [32]. Co więcej, cytometria masowa znajduje obecnie coraz większe zastosowanie w badaniach klinicznych, będąc bardzo użyteczną technologią np. w monitorowaniu postępów leczenia i prognozowaniu skuteczności terapii, a co za tym idzie ma kluczowe znaczenie w szacowaniu czasu przeżywalności pacjentów onkologicznych.



Rysunek 5. Schemat działania cytometru masowego. Komórki znakowane np. przeciwciałami skoniugowanymi z metalami przechodzą przez tzw. nebulizator służący do rozpylania zawiesiny komórek (A), tak aby każda z nich znajdowała się w pojedynczej kropli wody (roztworu). Uformowany aerozol jest następnie kierowany do źródła plazmy wzbudzonej indukcyjnie (B) gdzie pojedyncze krople zawierające komórki zostają odparowane, zatemizowane, a poszczególne jony zostają zjonizowane. Jony o niskiej masie są usuwane (C), w wyniku czego chmura pozostałych jonów (w tym metali) jest kierowana do analizatora masy TOF (ang. *Time Of Flight*- czas przelotu). Jony są rozdzielane na podstawie masy i kierowane do detektora (D). Detektor mierzy ilość poszczególnych izotopów metali dla każdej (pojedynczej) komórki w próbce; kolejno generowane są dane w formacie FCS (E) i analizowane (F) przy użyciu dedykowanego oprogramowania

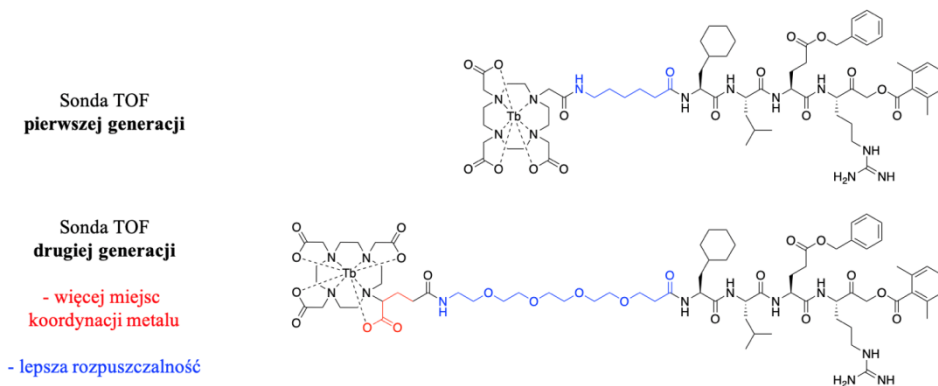
Figure 5. Scheme of operation of a mass cytometer. Cells labeled with e.g. metal-conjugated antibodies pass through a nebulizer to spray the suspension of cells (A) so that each of them is in a single drop of water (solution). The formed aerosol is then directed to the inductively induced plasma source (B) where the individual droplets containing the cells are vaporized, atomized, and the individual ions are ionized. Low-mass ions are removed (C), as a result of which the cloud of residual ions (including metals) is directed to the TOF (Time Of Flight) mass analyzer. The ions are separated on the basis of mass and directed to the detector (D). The detector measures the amount of individual metal isotopes for each (single) cell in the sample; successively, data in FCS (E) format is generated and analyzed (F) using dedicated software

W związku z tym, że cytometria masowa pozwala na wielowymiarową analizę na poziomie pojedynczych komórek, znajduje ona zastosowanie w wielu obszarach nauk o życiu. W naszych badaniach postanowiliśmy wykorzystać tę technologię do wizualizacji enzymów. Jednak z uwagi na fakt, że badania te skupiają się na wizualizacji aktywnych enzymów (aktywomu), stosowanie przeciwciał z metalami dla proteaz byłoby niewystarczające. Z tego względu podjęliśmy próbę opracowania całkowicie nowej technologii do badania aktywnych enzymów, która odpowiadałaby formatowi cytometrii masowej [26]. W tym celu opracowaliśmy nowy typ sond chemicznych, które zamiast znaczników fluorescencyjnych posiadają stabilne izotopy wybranych metali (**Rysunek 6**). Jako cele molekularne do wizualizacji wybraliśmy trzy proteazy cysteinowe: legumainę, katepsynę L oraz katepsynę B, gdyż dla tych enzymów opracowaliśmy już selektywne sekwencje peptydowe (elementy rozpoznawcze), które z powodzeniem wykorzystaliśmy w syntezie fluorescencyjnych sond chemicznych [33-35]. Jony metali zostały wprowadzone do struktury sond chemicznych za pomocą tetraxetanu (DOTA), który jest bardzo dobrym środkiem kompleksującym, szczególnie dla jonów lantanowców. Do wyznakowania sond chemicznych wybraliśmy terb (^{159}Tb), lutet (^{175}Lu) oraz gadolin (mieszanina izotopów, Gd).

Kluczowym dla powodzenia projektu było sprawdzenie, czy wymiana fluoroforów na poszczególne metale (skompleksowane za pomocą DOTA) nie wpłynie na właściwości sond w kontekście ich selektywności oraz zdolności pasywnego transportu do wnętrza komórki. Badania przeprowadzone na rekombinowanych enzymach oraz na dwóch liniach komórkowych (rak piersi MDA-MB-231 oraz rak jelita grubego HCT-116) pokazały, że nowo otrzymane związki zachowują się bardzo podobnie jak ich fluorescencyjne analogi, tj. są selektywne i z łatwością wiążą się do enzymów w żywych komórkach. Nadrzędnym celem badań było jednak oznaczenie aktywności poszczególnych enzymów na poziomie pojedynczych komórek. Jako model badawczy wybraliśmy monojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. PBMCs). W tym celu równolegle wykorzystaliśmy:

- (1) przeciwciała dla antygenów różnicowania komórkowego skoniugowane z metalami: anti-CD20(147Sm), anti-CD45(154Sm), anti-CD14(160Gd), anti-CD16(165Ho), anti-CD3(170Er), anti-CD4(174Yb), anti-CD8(168Er).
- (2) przeciwciała dla enzymów proteolitycznych skoniugowane z metalami: anti-katepsyna-B(144Nd), anti-katepsyna-L (164Dy), anti-legumaina (172Yb).

- (3) sondy TOF dla enzymów proteolitycznych: sonda TOF dla katepsyny B (159Tb), sonda TOF dla katepsyny L (175Lu) oraz sonda TOF dla legumainy (158Gd).



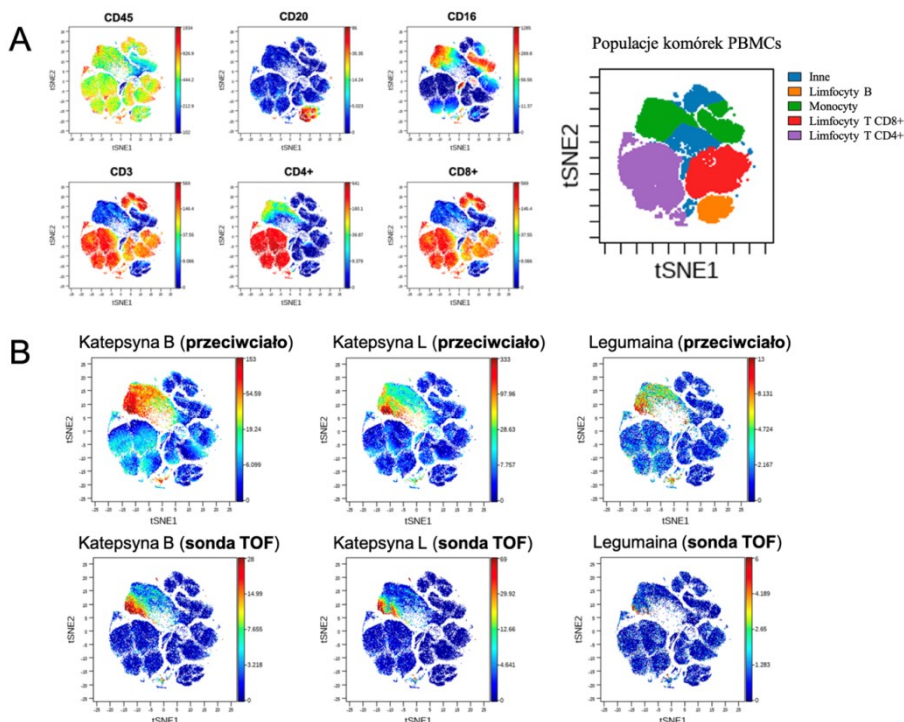
Rysunek 6. Porównanie pierwszej oraz drugiej generacji sond TOF. W pierwszej generacji zastosowano linker w postaci kwasu 6-aminoheksanowego (6-Ahx) oraz ugrupowanie DOTA posiadające sześć miejsc koordynacji jonu metalu. Aby polepszyć właściwości fizykochemiczne opracowanych związków stworzono sondy TOF drugiej generacji, które posiadały dłuższy oraz bardziej hydrofilowy linker (PEG) oraz ugrupowanie DOTA z większą liczbą miejsc koordynacji. Struktury związków przedstawiono na przykładzie sondy TOF dla katepsyny B o selektywnej sekwencji aminokwasowej: Cha-Leu-Glu(Bzl)-Arg, gdzie Cha to cykloheksyloalanina, a Glu(Bzl) to ester benzylovowy kwasu glutaminowego. Jako elektrofilową grupę wiążącą się (nieodwracalnie) z centrum aktywnym enzymu wybrano 2,6-dimetylobenzoyloxymetyloketon (AOMK)

Figure 6. Comparison of the first and second generation TOF probes. In the first generation, a linker in the form of 6-aminohexanoic acid (6-Ahx) and the DOTA group with six metal ion coordination sites were used. In order to improve the physicochemical properties of the developed compounds, second-generation TOF probes that had a longer and more hydrophilic linker (PEG) and a DOTA moiety with a greater number of coordination sites were created. The structures of the compounds are exemplified by the TOF probe for cathepsin B with the selective amino acid sequence: Cha-Leu-Glu(Bzl)-Arg, where Cha is cyclohexylalanine and Glu(Bzl) is glutamic acid benzyl ester. A 2,6-dimethylbenzoyloxymethyl ketone (AOMK) was chosen as the electrophilic group that binds (irreversibly) to the active site of the enzyme

Dzięki temu możliwe było zbadanie korelacji pomiędzy ekspresją wybranych proteaz, a ich rzeczywistą aktywnością katalityczną (**Rysunek 7**). Wyniki naszych badań pokazały, że przeciwciała znakujące wybrane proteazy cysteinowe wykazały ich obecność głównie w komórkach CD16⁺ oraz CD4⁺, czyli monocytach, makrofagach oraz tzw. „naturalnych zabójcach” (ang. NK, natural killer cells) [26,27]. Jednak co najciekawsze, nasze wyniki pokazały, że tylko część frakcji poszczególnych enzymów jest katalitycznie aktywna, gdyż sygnał od sond TOF nie obejmuje całego sygnału od przeciwciał względem poszczególnych enzymów. Wyniki naszych badań udowodniły więc, że możliwa jest równoległa i wielopara-

metryczna analiza aktywności enzymów proteolitycznych za pomocą sond chemicznych z wykorzystaniem cytometrii masowej. Stwarza to naukowy fundament do wykorzystania tych związków w celu analizy enzymów i białek w bardziej złożonych układach. Opracowana technologia otwiera kompletnie nowe możliwości w równoległej analizie aktywności enzymów. Dzięki zastosowaniu stabilnych izotopów metali w sondach i wykorzystaniu cytometrii masowej możliwa jest teoretycznie równoległa analiza ponad 50 enzymów, ponieważ obecnie tyle izotopów metali jest komercyjnie dostępnych. Co więcej, w naszych badaniach pokazaliśmy, że sondy te można stosować razem ze standardowymi przeciwciałami skoniugowanymi z metalami, dzięki czemu można dokładnie badać aktywność enzymatyczną w poszczególnych populacjach komórek, a więc zbadać opisany wcześniej aktywom. Uważamy, że metoda ta będzie miała bardzo duże zastosowanie np. w enzymatycznym profilowaniu nowotworów, gdzie heterogeniczność próbek jest bardzo dużym ograniczeniem w dokładnym określeniu funkcji poszczególnych enzymów w rozwoju tej choroby.

Wyniki naszych badań udowodniły, że możliwa jest równoległa i wieloparametryczna analiza aktywności enzymów proteolitycznych za pomocą sond chemicznych z wykorzystaniem cytometrii masowej. Stwarza to naukowy fundament do wykorzystania tych związków w celu analizy enzymów i białek w bardziej złożonych układach. Opracowana technologia otwiera kompletnie nowe możliwości w równoległej analizie aktywności enzymów. Do tej pory najczęściej stosowaną metodą w badaniu enzymów sondami chemicznymi była mikroskopia fluorescencyjna, która pozwala na równoległe monitorowanie jedynie 4-5 enzymów. Dzięki zastosowaniu stabilnych izotopów metali w sondach i wykorzystaniu cytometrii masowej możliwa jest teoretycznie równoległa analiza ponad 50 enzymów, ponieważ obecnie tyle izotopów metali jest komercyjnie dostępnych. Co więcej, w naszych badaniach pokazaliśmy, że sondy te można stosować razem ze standardowymi przeciwciałami skoniugowanymi z metalami, dzięki czemu możemy dokładnie badać aktywność enzymatyczną w poszczególnych populacjach komórek, a więc zbadać opisany wcześniej aktywom [26,27]. Uważamy, że metoda ta będzie miała bardzo duże zastosowanie np. w enzymatycznym profilowaniu nowotworów, gdzie heterogeniczność próbek jest dużym ograniczeniem w dokładnym określeniu funkcji poszczególnych enzymów w rozwoju tej choroby.



Rysunek 7. Analiza poziomu ekspresji i aktywności proteaz cysteinowych w poszczególnych populacjach komórek PBMC przy użyciu algorytmu viSNE. Panel A. PBMC zostały podzielone na poszczególne populacje na podstawie obecności antygenów różnicowania komórkowego (CD). Legenda przedstawia położenie poszczególnych typów komórek na diagramie viSNE. Panel B. Analiza ekspresji i aktywności katepsyny B, katepsyny L oraz legumainy w poszczególnych populacjach PBMC. Badane proteazy cysteinowe znajdują się głównie we frakcji monocytów (CD16+). Sygnał od aktywnej formy proteaz koreluje z obecnością przeciwciała

Figure 7. Analysis of the expression level and activity of cysteine proteases in individual populations of PBMCs using the viSNE algorithm. Panel A. PBMCs have been divided into individual populations based on the presence of cell differentiation antigens (CD). The legend shows the location of each cell type on the viSNE diagram. Panel B. Analysis of the expression and activity of cathepsin B, cathepsin L and legumain in individual PBMC populations. The tested cysteine proteases are found mainly in the monocyte fraction (CD16+). The signal from the active form of proteases correlates with the presence of the antibody

UWAGI KOŃCOWE

Sondy chemiczne są obecnie jednymi z najczęściej wykorzystywanych narzędzi do badania aktywności enzymatycznej białek. W ciągu ostatnich lat nastąpił ogromny postęp w rozwoju fluorescencyjnych sond chemicznych w kontekście ich selektywności, czułości i biodostępności. Jednak w dalszym ciągu sondy te mają ograniczone możliwości w multiparametrycznej analizie, co jest spowodowane nakładaniem się widm emisji poszczególnych fluoroforów. W celu rozwiązania tego

problemu, nasza grupa badawcza opracowała nowy typ sond chemicznych, które zamiast fluoroforów znakowane są stabilnymi izotopami metali przejściowych, co umożliwi wykorzystanie ich w formacie cytometrii masowej. W naszych badaniach skupiliśmy się na opracowaniu sond dla enzymów proteolitycznych biorących aktywny udział w chorobach nowotworowych, jednak ta technologia może zostać z powodzeniem wykorzystana również do opracowania sond dla innych enzymów, jak np. kinaz czy fosfataz. Uważamy, że nasza technologia otwiera nowe możliwości w badaniu aktywnemu zróżnicowanych układów biologicznych na poziomie pojedynczych komórek, co może być wykorzystane np. dla celów spersonalizowanej diagnostyki medycznej.

PODZIĘKOWANIA

Publikacja została zrealizowana w ramach grantu badawczego SONATA z Narodowego Centrum Nauki (UMO-2018/31/D/NZ5/02406).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] N.D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, D503.
- [2] M. Drag, G.S. Salvesen, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**, 690.
- [3] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, **5**, 785.
- [4] X.S. Puente, L.M. Sanchez, C.M. Overall, C. Lopez-Otin, *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**, 544.
- [5] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, **27**, 157.
- [6] J. Zhou, S. Li, K.K. Leung, B. O'Donovan, J. Y. Zou, J.L. DeRisi, J. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, **117**, 25464.
- [7] G.P. McStay, G.S. Salvesen, D.R. Green, *Cell Death Differ.*, 2007, **15**, 322.
- [8] Y. Choe, F. Leonetti, D.C. Greenbaum, F. Lecaille, M. Bogyo, D. Bromme, J.A. Ellman, Ch. Craik, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 12824.
- [9] M. Poreba, M. Drag, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 3968.
- [10] B.I. Ratnikov, P. Cieplak, A.G. Remacle, E. Nguyen, J.W. Smith, *PLoS Comput. Biol.*, 2021, **17**, e1008101.
- [11] Poreba, G.S. Salvesen, M. Drag, *Nat. Protoc.*, 2017, **12**, 2189.
- [12] J.S. Bond, *J. Biol. Chem.*, 2019, **294**, 1643.
- [13] J.A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F.Y. Tsai, D. Greenbaum, J. Hager, M. Bogyo, D. Hanahan, *Cancer Cell.*, 2004, **5**, 443.
- [14] L. Akkari, V. Gocheva, M.L. Quick, J.C. Kester, A.K. Spencer, A.L. Garfall, R.L. Bowman, J.A. Joyce, *Genes Dev.*, 2016, **30**, 220.
- [15] N.A. Thornberry, T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman, D.W. Nicholson, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 17907.
- [16] M. Fonovic, M. Bogyo, *Curr. Pharm. Des.*, 2007, **13**, 253.
- [17] M. Fonovic, M. Bogyo, *Exp. Rev. Proteom.*, 2008, **5**, 721.
- [18] J. Harkness, B.W. Roper, J.A. Durant, H. Miller, *Br. Med. J.*, 1960, **1**, 1787.
- [19] C.M. Kam, A.S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J.C. Powers, *Bioconjug. Chem.*, 1993, **4**, 560.
- [20] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B.F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, **101**, 10000.
- [21] Y. Liu, M.P. Patricelli, B.F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 14694.

- [22] L.E. Sanman, M. Bogyo, *Ann. Rev. Biochem.*, 2014, **83**, 249.
- [23] P. Kasperkiewicz, Y. Altman, M. D'Angelo, G. S. Salvesen, M. Drag, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 10115.
- [24] M. Garland, J.J. Yim, M. Bogyo, *Cell Chem. Biol.*, 2016, **23**, 122.
- [25] M. Bogyo, S. Verhelst, V. Bellingard-Dubouchaud, S. Toba, D. Greenbaum, *Chem. Biol.*, 2000, **7**, 27.
- [26] M. Poreba, K. Groborz, W. Rut, M. Pore, S.J. Snipas, M. Vizovisek, B. Turk, P. Kuhn, M. Drag, G.S. Salvesen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 16704.
- [27] K. Groborz, *Rozprawa Doktorska, Politechnika Wroclawska*, 2020, **1**, 1.
- [28] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer J. Clin.*, 2020, **70**, 7.
- [29] I. Pemberton, *Conference Paper: VIII Simpar*, 2016, **3**, 50.
- [30] D.R. Bandura, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, A. Antonov, R. Kinach, X. Lou, S. Pavlov, S. Vorobiev, J.E. Dick, S.D. Tanner, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 6813.
- [31] S.C. Bendall, E.F. Simonds, P. Qiu, A.D. Amir el, P.O. Krutzik, R. Finck, R.V. Bruggner, R. Melamed, A. Trejo, O.I. Ornatsky, R.S. Balderas, S.K. Plevritis, K. Sachs, D. Pe'er, S.D. Tanner, G.P. Nolan, *Science*, 2011, **332**, 687.
- [32] J. Wagner, M.A. Rapsomaniki, S. Chevrier, T. Anzeneder, C. Langwieder, A. Dykgers, M. Rees, A. Ramaswamy, S. Muenst, S.D. Soysal, A. Jacobs, J. Windhager, K. Silina, M. van den Broek, K.J. Dedes, M. Rodriguez Martinez, W.P. Weber, B. Bodenmiller, *Cell*, 2019, **177**, 1330.
- [33] M. Poreba, R. Solberg, W. Rut, N.N. Lunde, P. Kasperkiewicz, S.J. Snipas, M. Mihelic, D. Turk, B. Turk, G.S. Salvesen, M. Drag, *Cell Chem. Biol.*, 2016, **23**, 1023.
- [34] M. Poreba, W. Rut, M. Vizovisek, K. Groborz, P. Kasperkiewicz, D. Finlay, K. Vuori, D. Turk, B. Turk, G.S. Salvesen, M. Drag, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 2113.
- [35] M. Poreba, K. Groborz, M. Vizovisek, M. Maruggi, D. Turk, B. Turk, G. Powis, M. Drag, G.S. Salvesen, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 8461.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 października 2021 r.

