

NARZĘDZIA CHEMICZNE DO BADANIA ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH PRZY UŻYCIU CYTOMETRII MASOWEJ

MASS CYTOMETRY-COMPATIBLE CHEMICAL PROBES FOR THE INVESTIGATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES

Katarzyna Groborz

*Genentech Inc. South San Francisco, USA
e-mail: groborzk@gene.com*

Abstract

Wprowadzenie

1. Cytometria masowa
2. Specyficzność substratowa enzymów proteolitycznych w projektowaniu markerów chemicznych
 - 2.1. Enzymy proteolityczne
 - 2.2. Specyficzność substratowa proteaz
 - 2.3. Markery chemiczne
3. Analiza aktywności enzymów proteolitycznych w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej przy użyciu markerów chemicznych kompatybilnych z cytometrią masową

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 markery 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, 2019), stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (2021). Do tej pory dr Groborz kierowała dwoma grantami badawczymi: PRELUDIUM, finansowanego z Narodowego Centrum Nauki (2018-2021) oraz Diamentowy Grant, finansowanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2015-2017).



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

ABSTRACT

Mass cytometry is one of the newest and most high-throughput technologies that allows for the investigation of complex biological systems at single cell level. It relies on the use of stable metal isotopes as labels of specific cell markers and therefore, allows for simultaneous analysis of more than 40 parameters at single cell level. In order to fully explore the potential of mass cytometry, researchers are trying to develop new experimental setups based on the application of pure metal isotopes in biological studies. The incorporation of antibodies into mass cytometry setups, while extremely selective and well-validated, limits the analysis as it shows the whole protein pool present in the cell. In our group, we developed new technology that allows for the identification of active forms of proteins-the ones that actively participate in cell signaling pathways. Activity-based probes are the most valuable tools for enzyme activity profiling and for years now they have been in the center of the method called Activity-Based Protein Profiling. Classic activity-based probes consist of three parts: a warhead (electrophilic binding group that covalently modifies enzyme active site), linker (specific peptide sequence or non-specific carbon chain) and the fluorescent tag that allows for enzyme detection and localization inside the cell. Spectral properties of commercially available fluorophores allow for the detection of up to dozen different cell parameters, with the use of various techniques such as confocal microscopy or flow cytometry. To increase the number of analyzed parameters, we designed activity-based probes that possess DOTA chelating moiety that is able to trap one metal atom per one probe. The combination of mass cytometry with highly selective activity-based probes allowed for the development of new technology that grants the possibility of multiparametric analysis of complex biological samples such as blood or cancer tissue. The new type of activity-based probes (so-called TOF-probes) incorporate various inhibitor scaffolds designed with HyCoSuL technology (*Hybrid Combinatorial Substrate Libraries*). These compounds possess a variety of unnatural amino acids in their structures, which significantly increases their selectivity toward proteases of interest.

Keywords: activity-based probes, mass cytometry, proteolytic enzymes, cancer, cell death

Słowa kluczowe: markery chemiczne, cytometria masowa, enzymy proteolityczne, nowotwór, śmierć komórki

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Marker chemiczny – małowcząsteczkowy związek chemiczny do badania aktywności enzymatycznej, składający się z trzech głównych części: grupy wiążącej, która tworzy nieodwracalny kompleks z badanym enzymem w stosunku 1:1; linkera, który może być przybrać postać selektywnej sekwencji peptydowej bądź nieselektywnego łańcucha węglowego; grupy reporterowej/znacznika, który umożliwia detekcję i lokalizację markera chemicznego w komórce.

Marker TOF – zaprojektowane i opracowane w niniejszej pracy doktorskiej markery chemiczne, których znacznikiem jest ugrupowanie DOTA ze schelatowanym jonem metalu (lantanowca). Dzięki zastosowaniu takiego znacznika markery TOF są kompatybilne z cytometrią masową typu TOF (ang. Time Of Flight).

Znacznik/Grupa reporterowa – jeden z elementów markera chemicznego-grupa chemiczna, którą można detektować za pomocą poszczególnych technik wizualizacji, np. fluorofory za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej czy metale za pomocą cytometrii masowej.

WPROWADZENIE

1. CYTOMETRIA MASOWA

Precyzyjna identyfikacja poszczególnych rodzajów komórek w złożonych populacjach jest niezwykle istotna w naukach biologicznych, a w większości przypadków wymaga ilościowego oznaczenia kilku biomarkerów jednocześnie [1]. Wieloparametryczna analiza systemów biologicznych jest niezbędna w dziedzinie genomiki oraz proteomiki, w celu zrozumienia interakcji genów, białek oraz innych cząsteczek, których działanie może prowadzić do transformacji zdrowych komórek w komórki zmienione chorobowo. Przez wiele lat najpopularniejszą techniką w tego typu analizach była cytometria przepływową wynaleziona w 1934 roku [2]. Zasada działania cytometrii przepływowej opiera się na wykorzystaniu fluoroforów, które są skoniugowane z odpowiednimi markerami biologicznymi, takimi jak przeciwciała. Cytometria przepływowa umożliwia szybki pomiar rozproszonego światła lub fluorescencji emitowanej przez odpowiednio naświetlone komórki. Stały układ optyczny oraz cyfrowe układy elektroniczne w cytometrze przepływowym umożliwiają jednoczesną detekcję około 10 (w niektórych źródłach mowa jest o 16 [3]) znaczników fluorescencyjnych oraz dwóch parametrów rozpraszania. To z kolei pozwala na jakościową oraz ilościową ocenę właściwości biologicznych oraz fizycznych komórek czy też ich komponentów (jąder, kwasów nukleinowych, mitochondriów). Cytometria przepływowa jest wysoce wydajną techniką umożliwiającą analizę dużej ilości komórek w krótkim czasie. Jak każda metoda analityczna, cytometria przepływowa posiada kilka wad, a najważniejszą z nich jest występowanie niespecyficznego sygnału. Głównym źródłem niespecyficznego sygnału jest nakładanie się widm absorpcji i emisji [4, 5]. W związku z tym niezwykle istotnym jest dokładne zaplanowanie panelu biomarkerów oraz skorygowanie uzyskanych wyników obliczeniowo. To z kolei niesie ze sobą ryzyko błędu oraz wymaga przeprowadzenia dodatkowych operacji matematycznych (tzw. kompensacji sygnałów) w przypadku pomiaru powyżej 5-ciu parametrów. Niemniej jednak cytometria przepływowa umożliwiła ogromny postęp w naukach biologicznych i znalazła zastosowanie w m.in. diagnostyce chorób, badaniu cyklu mitotycznego komórek nowotworowych, szybkim wykrywaniu i wstępnej identyfikacji mikroorganizmów czy też przy określaniu tzw. oporności wielolekowej [6, 7].

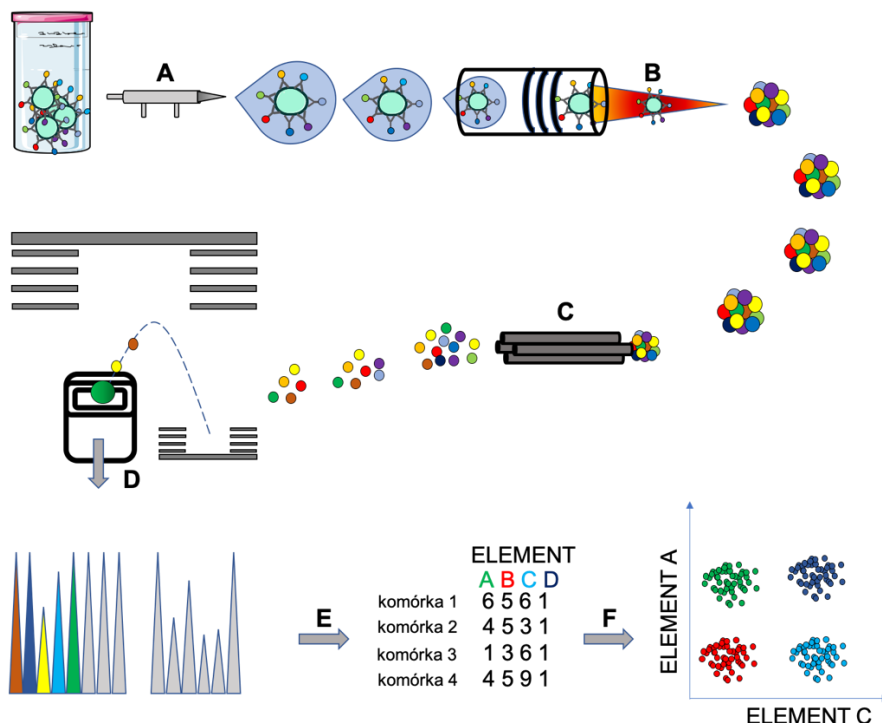
W miarę postępu technologicznego rozpoczęto poszukiwania bardziej wydajnego systemu, który posiadałby zalety cytometrii przepływowej i jednocześnie umożliwił detekcję większej liczby parametrów. Cytometria masowa typu TOF- ang. *time of flight* (technologia CyTOF) jest najnowszą techniką opierającą się na spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie, w której izotopy metali wykorzystywane są jako „znaczniki” poszczególnych indywidualów biologicznych. Pozwala to na dokładny pomiar ponad 40 różnych parametrów (teoretycznie do 130 parametrów) na poziomie pojedynczej komórki. W technice tej wykorzystywane są najczęściej przeciwciała znakowane rzadko występującymi, izotopowo czystymi metalami, które następnie służą

do oznaczania poszczególnych komponentów komórkowych. Stosowane są jedynie metale o dużej masie cząsteczkowej, tak, aby metale występujące naturalnie nie były brane pod uwagę podczas analizy. Technologia znakowania przeciwciał metalami, jak również pierwszy instrument do cytometrii masowej zostały opracowane w 2009 roku na Uniwersytecie w Toronto w grupie prof. Tannera, we współpracy z firmą DVS Sciences, Inc. [8]. Zasada działania cytometru masowego łączy w sobie spektrometrię mas sprzężoną z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) oraz spektrometrię mas z czasem przelotu (MS-TOF) co pozwala na precyzyjne określenie właściwości komórek. W pierwszym etapie komórki znakowane są tzw. markerami (przeciwciała bądź małe cząsteczki chemiczne), które uprzednio zostały skoniugowane z izotopowo czystym metalem. Roztwór specjalnie przygotowanych komórek zostaje następnie rozpylony i wędruje przez plazmę argonową, która powoduje atomizację próbki oraz jonizację metali sprzężonych z markerami komórkowymi. Sygnał pochodzący od metali jest następnie analizowany przez spektrometr masowy z czasem przelotu (MS-TOF). Schemat działania cytometru masowego przedstawiono na **Rysunku 1**.

W cytometrii masowej obserwowane są jedynie nieznaczne ilości niespecyficznego sygnału (ok. 1%), dzięki zastosowaniu metali, które posiadają różne masy. Zanieczyszczenia izotopowe, które nie zostały całkowicie usunięte w trakcie procesu oczyszczania, zazwyczaj generują sygnał w kanale +1, natomiast utlenione elementy generują sygnał w kanale +16 (**Rysunek 2**). Brak niespecyficznego sygnału ułatwia projektowanie multiparametrycznych paneli, które na dzień dzisiejszy zawierają ponad 60 różnych markerów komórkowych.

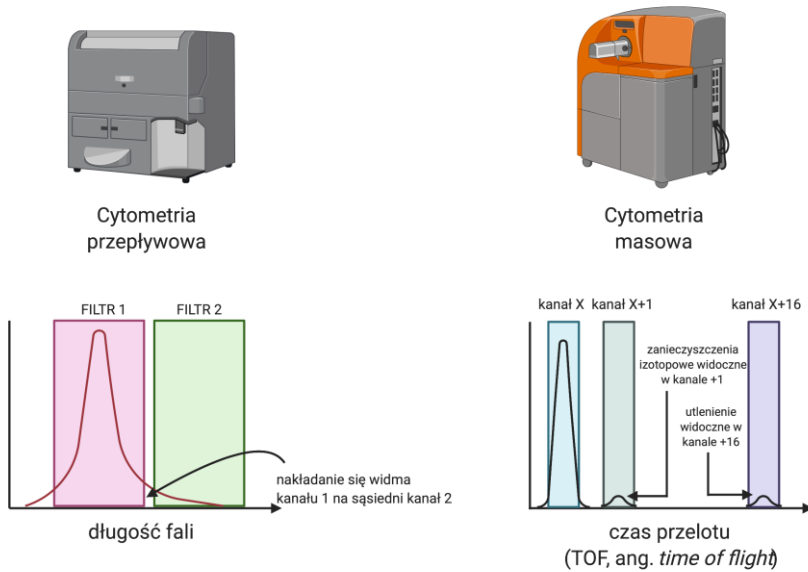
Technologia CyTOF charakteryzuje się wieloma zaletami, które znacząco ułatwiają precyzyjne profilowanie komórek. Wśród najważniejszych zalet często wymienia się (1) przeprowadzanie równoległych testów fenotypowych i funkcjonalnych, które pozwalają na zrozumienie niejednorodności w obrębie różnych populacji komórkowych (2) zastosowanie tzw. „kodowania” (ang. *barcoding*), które umożliwia połączenie i równoczesną analizę kilku- bądź kilkunastu próbek jednocześnie czy (3) możliwość śledzenia wielu szlaków komórkowych jednocześnie w fenotypowo różnych populacjach.

Cytometria masowa umożliwia dokładną charakterystykę fenotypową oraz funkcjonalną w dużych, złożonych próbkach biologicznych. To z kolei może zostać wykorzystane w celu uzyskania szczegółowych informacji dotyczących regulacji procesów komórkowych i ogólnosystemowych, zarówno w stanach normalnych jak i chorobowych.



Rysunek 1. Schemat działania cytometru masowego [9]. Próbkę zawierającą komórki znakowane przeciwciałami skoniugowanymi z izotopami metali ciężkich przechodzi przez nebulizator (A) tworząc kolejno areozol. Tak uformowana zawiesina zawierająca pojedyncze komórki jest kierowana do źródła plazmy wzbudzonej indukcyjnie (B) gdzie próbka podlega atomizacji i jonizacji. Jony o niskiej masie są usuwane (C), a pozostałe jony (w tym jony metali) są kierowane do analizatora masy TOF (ang. *Time Of Flight*- czas przelotu). Poszczególne jony są rozdzielane na podstawie masy i kierowane do detektora (D). Detektor mierzy widmo masowe reprezentujące ilość poszczególnych izotopów metali przypadających na każdą komórkę w próbce; dane zapisywane są w formacie FCS (E) i analizowane (F) przy użyciu dedykowanego oprogramowania. Rysunek zaadaptowany za pozwoleniem z ref. [10]

Figure 1. Mass cytometer allows for single-cell atomic mass spectrometry of heavy elemental reporters [9]. Cells labeled with affinity products (e.g. antibodies or small molecules) are introduced into the Inductively Coupled Plasma (ICP) by droplet nebulization (A, B). Single cells are atomized and ionized. The overly abundant, small molecular weight ions are removed (C), and the elemental composition of remaining heavy elements is determined based off time-of-flight analysis. Ions are separated according to their mass and directed towards the detector (D). Signals corresponding to each elemental tag are then assigned to the respective marker, arranged into FCS (E) files and analyzed via conventional cytometry platforms (F). Adapted with permission from ref. [9]



Rysunek 2. Różnice w powstawaniu niespecyficznego sygnału w cytometrii masowej oraz przepływowej. Powszechnie stosowane fluorofory charakteryzują się szerokimi widmami absorpcji i emisji co powoduje powstawanie silnego, niespecyficznego sygnału w sąsiednich kanałach, okupowanych przez inny fluorofor. W przypadku cytometrii masowej niespecyficzny sygnał zazwyczaj nie przekracza 1% i jest generowany poprzez drobne zanieczyszczenia izotopowe (w kanale +1) oraz w wyniku utleniania metali (kanał +16)

Figure 2. The differences in the nonspecific signal generation in mass and flow cytometry. Commonly utilized fluorophores possess broad emission and absorption spectra which causes strong, unspecific signal generation in neighboring channels occupied by different fluorophore. In case of mass cytometry, unspecific signal usually does not exceed 1% and is generated by minor isotopic impurities (channel +1) or metal oxidation (channel +16)

2. SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH W PROJEKTOWANIU MARKERÓW CHEMICZNYCH

2.1. ENZYMY PROTEOLITYCZNE

Wiązanie peptydowe występuje między aminokwasami peptydów lub białek, łącząc grupę α -aminową jednej reszty aminokwasowej z grupą α -karboksylową kolejnej reszty. Jako iż białka są podstawowymi składnikami naszego ciała, zachodzi potrzeba odzysku substancji, z których są one zbudowane. Dzięki temu, po spełnieniu swojej roli, białka mogą zostać rozłożone na aminokwasy, które zostaną ponownie wykorzystane przez komórkę. Czas półtrwania rozkładu wiązania peptydowego w obecności wody wynosi średnio 500 lat w temperaturze 25°C [10], w związku z czym obecność kataliza-

tora tej reakcji jest niezbędna. Taką rolę pełnią wyspecjalizowane białka zwane proteazami (inaczej peptydazy, enzymy proteolityczne), które łączą się ze swoimi substratami (białka, peptydy) i zmieniają je w odpowiednie produkty (oligopeptydy, dipeptydy czy pojedyncze aminokwasy).

Aby możliwe było utrzymanie procesów życiowych na odpowiednim poziomie, niemal wszystkie procesy metaboliczne w komórce zachodzą z udziałem odpowiednich katalizatorów reakcji chemicznych. Proteazy, które odpowiadają za hydrolizę wiązania peptydowego, biorą udział w wielu niezwykle istotnych szlakach biologicznych, takich jak fibrynoliza, proces programowanej śmierci komórki (apoptoza, pyroptoza, nekroptoza i wiele innych) czy krzepnięcie krwi [11-13]. Jako, iż enzymy proteolityczne kontrolują tak ważne mechanizmy komórkowe, ich zaburzona aktywność może przyczyniać się do powstawania zmian patofizjologicznych, takich jak np. choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory [14, 15].

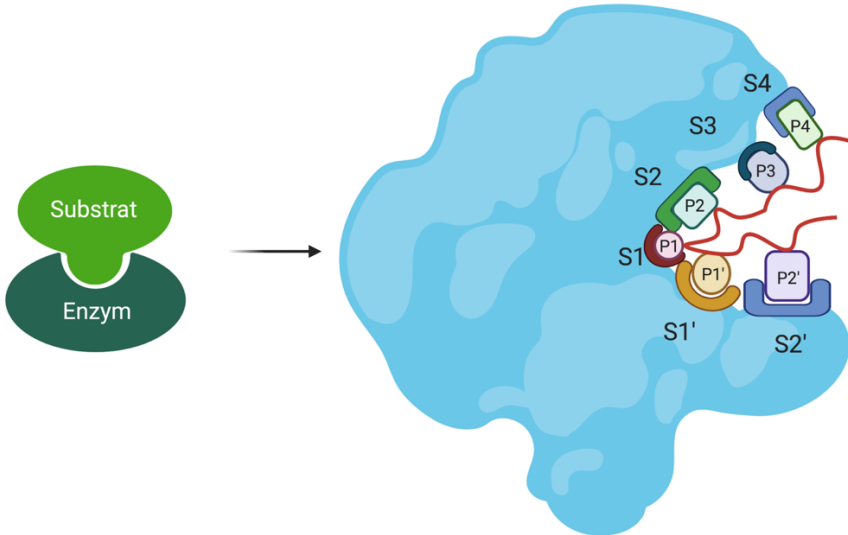
Enzymy proteolityczne stanowią około 2-4% wszystkich białek kodowanych przez ludzki genom, co stanowi imponującą liczbę bliską 700 proteaz [16]. Ludzki degradom natomiast, składa się z przynajmniej 553 proteaz i ich homologów, które można podzielić na sześć klas: proteazy aspartylowe (21), cysteinowe (143), metaloproteazy (186) proteazy serynowe (176), treoninowe (27) oraz proteazy o nieznanym typie katalizy [17]. Poszczególne klasy proteaz wykorzystują inne typy katalizy, co ma ogromne znaczenie przy projektowaniu niskocząsteczkowych związków chemicznych służących do badania tych białek. W ludzkim ciele, proteazy podlegają ścisłej kontroli, tak, aby ich aktywność nie prowadziła do powstawania niebezpiecznych dla życia stanów patofizjologicznych. Istnieje wiele mechanizmów kontroli enzymów proteolitycznych, m.in. oddziaływania z innymi białkami (w tym oddziaływania z inhibitorami proteaz) [18], jonami metali [19] czy modyfikacje posttranslacyjne [20]. Oprócz tego znany jest również jeden z najbardziej rygorystycznych mechanizmów kontroli, który wynika z budowy samej proteazy, a mianowicie tzw. specyficzność substratowa.

2.2. SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA PROTEAZ

Specyficzność substratowa danej proteazy jest cechą określającą, który substrat białkowy będzie hydrolizowany, a który pozostawiony w spokoju. Jest to bezpośrednio związane z architekturą miejsca aktywnego proteazy. W centrum aktywnym, gdzie wiązany jest substrat białkowy, każda proteaza posiada tzw. kieszenie wiążące. Skład reszt aminokwasowych w danej kieszeni decyduje o tym, który substrat białkowy będzie „pasować” do enzymu. W 1967 roku Schechter i Berger wprowadzili jednolity system określania miejsc wiążących w enzymach proteolitycznych i tym samym zdefiniowali pojęcie specyficzności substratowej, które obowiązuje do dziś [21]. Na centrum aktywne składa się tzw. region nie primowany, który wiąże aminokwasy substratu peptydowego od *N*-końca hydrolizowanego wiązania, oraz region primowany, do którego wiązane są reszty aminokwasowe od strony *C*-końca. Kieszenie wiążące proteazy są nazwane odpo-

wiednio kieszeniami: S_n , S_4 , S_3 ... S_1 , S_1' , S_2 ..., a wiązane przez nie reszty aminokwasowe substratu oznaczane są odpowiednimi pozycjami: P_n , P_4 , P_3 ... P_1 , P_1' , P_2'Hydrolyza wiązania peptydowego zachodzi zawsze pomiędzy pozycją P_1 a P_1' substratu (schemat budowy miejsca aktywnego proteaz oraz mechanizm wiązania substratu jest przedstawiony na **Rysunku 3**).

Istnieje wiele proteaz należących do tych samych rodzin, które charakteryzują się niezwykle podobną budową zarówno całego białka jak i samego miejsca aktywnego. Powoduje to, iż jeden enzym może rozpoznawać i hydrolizować te same substraty co członek jego klanu lub rodziny. Takie proteazy charakteryzują się nakładającą się specyficnością substratową, co znacznie utrudnia ich badanie w złożonych systemach biologicznych. Poszukiwanie i opracowywanie metod badania (oraz wykorzystania) specyficności substratowej enzymów proteolitycznych cieszy się ogromnym zainteresowaniem ze strony środowiska naukowego od ponad 20 lat.



Rysunek 3. Schemat miejsca aktywnego proteazy [21]. Odpowiednie kieszenie wiążące enzymu proteolitycznego (S_2' , S_1' , S_1 , S_2 , S_3 ...) łączą reszty aminokwasowe substratu peptydowego (P_2' , P_1' , P_1 , P_2 , P_3 ...). Rysunek powstał przy użyciu programu BioRender (www.biorender.com)

Figure 3. Schematic representation of protease active site [21]. Binding pockets denoted as S_2' , S_1' , S_1 , S_2 , S_3 bind corresponding amino acid residues on the substrate. Figure was created using BioRender (www.biorender.com)

2.3. MARKERY CHEMICZNE

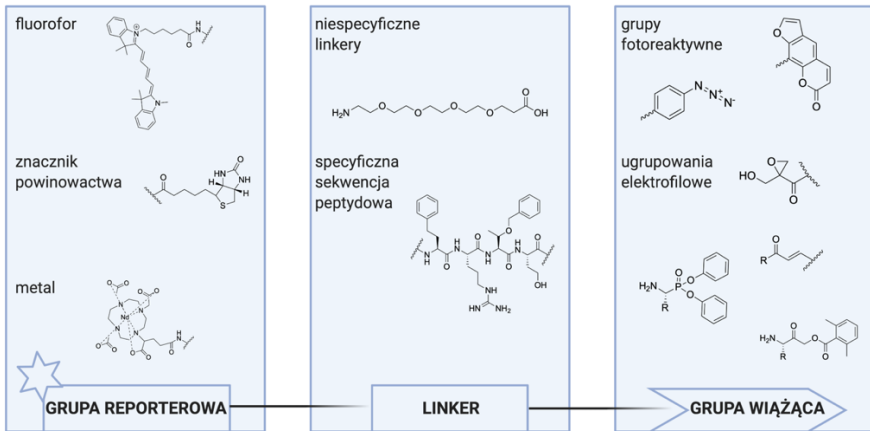
Dziedzina proteomiki zajmująca się analizą aktywności białek i badaniem ich regulacji w złożonych proteomach została nazwana *Activity Based Protein Profiling* (ABPP) i opiera się o wykorzystanie małowcząsteczkowych związków chemicznych (ang. *Activity-Based Probes*) do znakowania i izolowania odrębnych zestawów białek na podstawie ich aktywności enzymatycznej [22, 23]. Jedną z najważniejszych cech takich cząsteczek jest wysoka selektywność w stosunku do celowanego białka, co umożliwia analizę złożonych układów biologicznych, takich jak lizaty komórkowe, tkanki czy nawet całe organizmy.

Idealne markery chemiczne powinny być ukierunkowane na dużą i jednocześnie łatwą do analizy liczbę enzymów (od dziesiątek do setek), w celu zapewnienia globalnego obrazu funkcjonalnego badanego proteomu. Docelowy poziom detekcji musi być zrównoważony poprzez ograniczoną reaktywność krzyżową z innymi białkami. Większość markerów chemicznych zawdzięcza taką równowagę kombinacji grup reaktywnych oraz elementów wiążących (linkerów) w swojej strukturze.

Małowcząsteczkowe markery chemiczne do badania aktywności enzymów, wg ogólnie przyjętej konwencji, składają się z trzech elementów [23]. Pierwszym elementem jest reaktywna grupa kowalencyjnie wiążąca miejsce aktywne enzymu. Grupy takie można dalej podzielić na dwie klasy: (1) ugrupowania elektrofilowe modyfikujące resztę nukleofilową w miejscu aktywnym enzymu oraz (2) grupy fotoreaktywne, które pod wpływem promieniowania UV znakują reszty aminokwasowe w centrum aktywnym enzymu. Oprócz tego, markery chemiczne posiadają w swojej strukturze jeszcze dwa elementy, a mianowicie grupę reporterową umożliwiającą detekcję oraz wcześniej wspomniany linker. Schematyczny rysunek budowy małowcząsteczkowych markerów chemicznych został przedstawiony na **Rysunku 4**.

Małowcząsteczkowe narzędzia chemiczne do badania enzymów proteolitycznych są niezbędne w określaniu złożoności komórkowych szlaków biochemicznych oraz pozwalają na rozróżnienie funkcji poszczególnych proteaz. Do tej pory opisano wiele metod poszukiwania i kolejno projektowania takich związków, niemniej jednak posiadają one szereg ograniczeń wynikających nie tylko z ich właściwości (budowa uniemożliwiająca penetrację błon komórkowych, nakładanie się widm fluorescencyjnych, brak selektywności wobec celowanej proteazy), ale również ze złożoności procesów zachodzących w komórkach. Ogromne znaczenie biologiczne przypisywane enzymom proteolitycznym sprawia, iż poszukiwanie specyficznych oraz selektywnych narzędzi, które umożliwiłyby wieloparametrową analizę w układach *in vitro* oraz *in vivo* jest niezwykle obiecującym i atrakcyjnym polem do prowadzenia badań. W swoich badaniach zaprojektowałam, zsyntetyzowałam oraz przeprowadziłam walidację zupełnie nowego typu markerów chemicznych, które są kompatybilne z cytometrią masową. Dzięki temu możliwe było opracowanie nowej technologii, która w przyszłości pozwoli na zwiększenie naszej wiedzy na temat złożonych procesów biologicznych, w których centralną rolę odgrywają proteazy. Enzymy proteolityczne,

które były przedmiotem moich badań są zaangażowane w szereg niezwykle istotnych procesów biochemicznych, zachodzących zarówno w stanach normalnych jak i patologicznych.



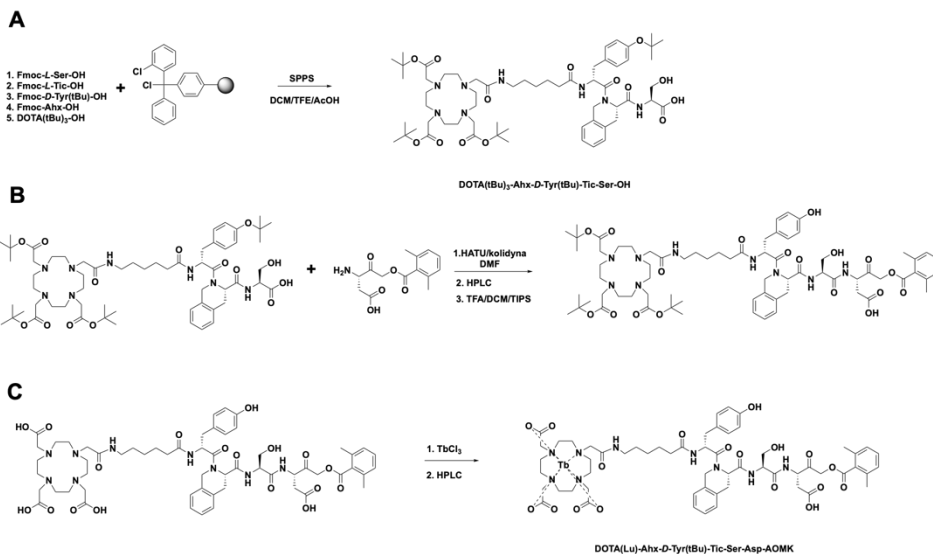
Rysunek 4. Schemat budowy małowiązanych markerów chemicznych. Markery składają się z trzech części: grupy reporterowej umożliwiającej detekcję, linkera (specyficzna sekwencja peptydowa bądź niespecyficzne linkery) oraz grupy wiążącej (elektrofilowe ugrupowanie kowalencyjnie łączące się z enzymem)

Figure 4. Schematic representation of activity-based probe structure. Small molecule ABPs consist of three elements: reporter group that facilitates protein detection, linker (specific peptide sequence or non-specific linker) and binding moiety (electrophilic warhead that covalently modifies enzyme active site)

3. ANALIZA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH W KOMÓRKACH KRWI PRZY UŻYCIU MARKERÓW CHEMICZNYCH KOMPATYBILNYCH Z CYTOMETRIĄ MASOWĄ

Projektowanie selektywnych markerów chemicznych do badania proteaz jest procesem wieloetapowym, który rozpoczyna się od badań przesiewowych bibliotek substratów wobec celowanego enzymu, w celu określenia jego preferencji katalitycznych. Następnie, na podstawie uzyskanych wyników, syntetyzowane są optymalne i aktywne substraty, które kolejno poddawane są analizie kinetycznej. Otrzymane związki chemiczne charakteryzujące się największą aktywnością i wysokim stopniem selektywności są przekształcane w inhibitory. Kolejno, po zbadaniu aktywności inhibitorów wobec wybranych enzymów, dobierane są odpowiednie ugrupowania chemiczne (np. znaczniki cyjaninowe, biotyna, izotopy metali) mające na celu zapewnić detekcję wybranej proteazy związanej z inhibitorem.

W swoich badaniach skupiłam się na analizie proteaz cysteinowych w złożonym układzie biologicznym jakim są jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs). W celu zbadania aktywności wybranych proteaz zaprojektowałam oraz zsyntetyzowałam markery chemiczne znakowane odpowiednimi atomami metali (**Rysunek 5**) i kolejno poddałam je dokładnej analizie biochemicznej.



Rysunek 5. Schemat syntezy markerów TOF na przykładzie związku dla legumainy. **A.** Synteza fragmentu peptydowego z ugrupowaniem DOTA(tBu)₃ na *N*-końcu. Peptydy zostały zhydrolizowane z żywicy chloro-2'-chlorotrytylowej przy użyciu mieszaniny TFE/DCM/TIPS aby uniknąć hydrolizy grup blokujących. **B.** Połączenie fragmentu peptydowego z elektrofilową grupą wiążącą przeprowadzono przy użyciu odczynników sprzęgających- HATU oraz 2,4,6-kolidyny w DMF. Kolejno otrzymany związek oczyszczono przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Do produktu dodano kolejno mieszaninę TFA/DCM/TIPS w celu hydrolizy grup ochronnych. **C.** Odblokowany produkt rozpuszczono w buforze zawierającym octan amonu (0.1M, pH 5.0, temp. 55°C) i dodano chlorek odpowiedniego lantanowca (MeCl₃). Reakcję prowadzono 30 minut na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie produkt oczyszczono na HPLC

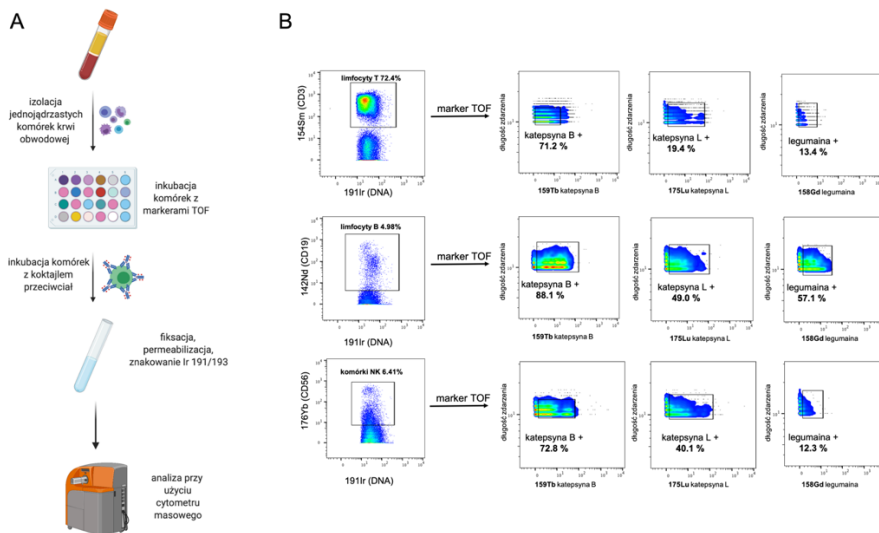
Figure 5. Schematic representation of TOF-probe synthesis (legumain TOF-probe). **A.** Solid-phase peptide synthesis of *N*-terminal DOTA(tBu)₃ peptide. Peptides were cleaved off the resin with the use of TFE/DCM/TIPS mixture to avoid the hydrolysis of protecting groups. **B.** Synthesized peptide fragments were attached to the electrophilic warhead using HATU and 2,4,6-collidine in DMF. Obtained compounds were purified with high-performance liquid chromatography (HPLC) and protecting groups were removed with TFA/DCM/TIPS mixture. **C.** Deprotected product was dissolved in ammonium acetate (0.1M, pH 5.0, temp. 55°C) followed by the addition of an appropriate lanthanide chloride. The reaction was carried out for 30 minutes. TOF-probes were purified with HPLC

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej są bardzo często wykorzystywane przez naukowców prowadzących badania w dziedzinie immunologii, w kontekście zaburzeń autoimmunologicznych, chorób zakaźnych czy nowotworów. Ponadto uważa się, że stanowią one kluczowy punkt w procesie opracowywania szczepionek. Po etapie walidacji otrzymanych markerów chemicznych typu TOF przeprowadziłam eksperymenty z użyciem ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, aby potwierdzić użyteczność otrzymanych narzędzi w określaniu aktywności proteaz w różnych typach komórek krwi.

Przy użyciu odczynnika Lymphoprep z krwi zdrowego dawcy wyizolowałam jednojądrzaste komórki krwi obwodowej. Następnie, pozyskane komórki inkubowałam z panelem markerów TOF w stężeniu 2 μM oraz z przeciwciałami specyficznymi dla limfocytów T, limfocytów B oraz komórek NK. Komórki zostały utrwalone, a ich DNA oznakowane irydem (Ir191/193) (**Rysunek 6, Panel A**). Uzyskane wyniki ukazały równą zawartość aktywnych form katepsyny B oraz L w poszczególnych typach komórek. Co ciekawe, zauważyłam znaczne ilości aktywnej formy legumainy w limfocytach B, w przeciwieństwie do innych komórek, gdzie jej ilości były znikome (**Rysunek 6, Panel B**). Dane były spójne w różnych próbkach pochodzących od tego samego dawcy krwi, jak również nie zależały od metalu zastosowanego w strukturze markera TOF. Wszystkie próbki przygotowywałam i analizowałam w trzech powtórzeniach.

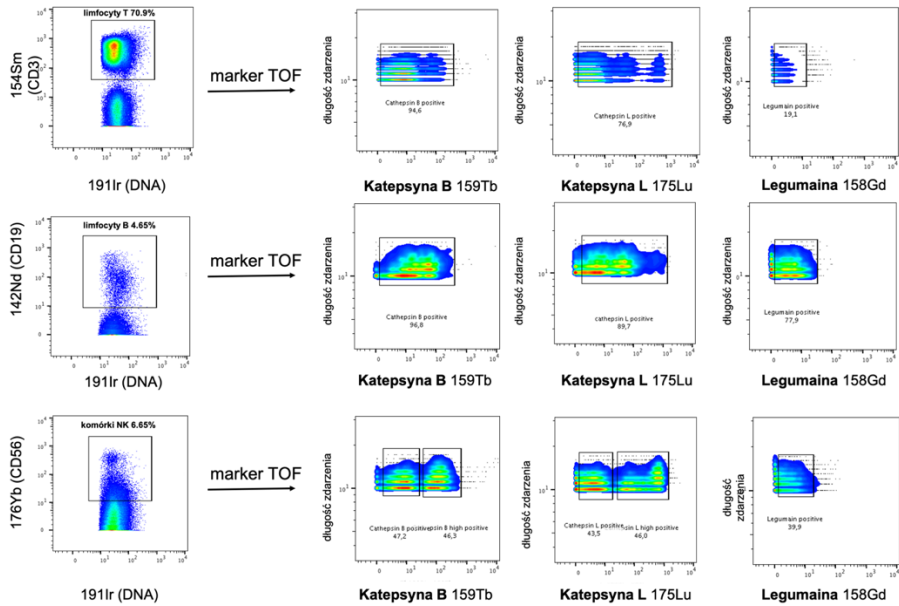
Aby zweryfikować możliwość akumulacji niespecyficznego sygnału pochodzącego od markerów TOF przeprowadziłam również eksperyment, w którym zwiększyłam stężenie markerów pięciokrotnie (**Rysunek 7**). Chociaż zarówno liczba jak i sygnał pochodzący od komórek oznakowanych markerami TOF dla katepsyny B oraz L wzrosła, poziom limfocytów T zawierających aktywną formę legumainy pozostał na tym samym poziomie ($\pm 5.4\%$). Wyraźnie wskazuje to, iż sygnał pochodzący z limfocytów B jest wysoce specyficzny, a opracowana przeze mnie metoda przygotowywania próbek do analizy jest wystarczająca w celu odmycia nadmiaru niezwiązanych markerów TOF. Ponadto dzięki zastosowaniu wyższego stężenia markerów zauważyłam obecność dwóch lub więcej populacji w obrębie jednego typu komórek, które różniły się zawartością aktywnych form proteaz cysteinowych. Wysoka zawartość aktywnej formy legumainy w limfocytach B dawcy krwi jest niezwykle interesującym zjawiskiem, gdyż istnieje niewiele przesłanek literaturowych odnoszących się do poziomu aktywności tej proteazy u osób zdrowych. Wysoki poziom ekspresji i aktywność tej proteazy są dodatnio korelowane z występowaniem nowotworów i innych chorób [24]. Niemniej jednak, aby ocenić czy uzyskane informacje mają znaczenie biologiczne i czy otrzymane związki chemiczne mogą stać się nowymi markerami chorób, konieczne będzie

przeprowadzenie dodatkowych eksperymentów z zaangażowaniem większej grupy osób.



Rysunek 6. Analiza jednojądrzastych komórek krwi obwodowej z użyciem cytometru masowego. **A.** Schemat przygotowania próbek do analizy. Po izolacji komórki są inkubowane z panelem markerów TOF, znakowane przeciwciałami wykrywającymi antygeny różnicowania komórkowego (CD), a następnie utrwalone, zpermeabilizowane i znakowane irydem (Ir191/193). **B.** Wyniki analizy trzech populacji komórek PBMC. Dzięki zastosowaniu przeciwciał specyficznych dla limfocytów T, B oraz komórek NK określono aktywność proteaz cysteinowych w każdej z tych populacji. Kathepsyna B wykazuje największą aktywność we wszystkich typach komórek, kathepsyna L nieco niższą, natomiast aktywność legumainy, w przypadku tego dawcy, była ograniczona do limfocytów B. Próbki były przygotowywane i analizowane w trzech powtórzeniach

Figure 6. Mass cytometry analysis of PBMCs. **A.** Sample preparation. After PBMCs isolation, cells were incubated with the panel of TOF-probes, stained with appropriate metal-tagged antibodies, fixed, permeabilized and stained with iridium (DNA intercalator). **B.** The analysis of three PBMCs populations. Metal-tagged antibodies allowed to distinguish three cell populations (T cells, B cells and NK cells) and within each of the population, protease activities were assessed. Cathepsin B is the most active enzyme within all analyzed cell types, cathepsin L is slightly less active and legumain activity (in case of this particular blood donor) was limited to B cell subset. All experiments were performed in triplicate



Rysunek 7. Wyniki analizy PBMC znakowanych markerami TOF dla proteaz cysteinowych. W celu weryfikacji poprawności wyników uzyskanych we wcześniejszych eksperymentach, świeżo wyizolowane komórki inkubowano z markerami TOF o stężeniu $10\mu\text{M}$. Analiza wykazała, iż poziom aktywnej legumainy w limfocytach T pozostał taki sam, pomimo pięciokrotnego zwiększenia stężenia markera TOF, co jednoznacznie wskazuje na specyficznosc stosowanych związków chemicznych oraz świadczy o prawidłowym protokole odmywania nadmiaru niezwiązanych markerów TOF. Poziom legumainy w limfocytach B, w obrębie jednej próbki, jest znacząco wyższy niż w pozostałych typach komórek krwi

Figure 7. The analysis of PBMCs labeled with selective TOF-probes for active proteases. Freshly isolated PBMCs were incubated with $10\mu\text{M}$ TOF-probes. The analysis revealed low legumain level in T lymphocytes that remained unchanged even with the 5-fold increase of TOF-probe concentration, which shows their superior specificity in complex biological systems. B cells possess high level of active form of legumain

UWAGI KOŃCOWE

W badaniach przeprowadzonych w ramach realizacji rozprawy doktorskiej przedstawiłam projektowanie i syntezę nowych, selektywnych narzędzi chemicznych (markery TOF) do badania aktywności medycznie ważnych enzymów z grupy proteaz cysteinowych i serynowych z zastosowaniem cytometrii masowej. Badania te miały na celu opracowanie i walidację nowej metody wieloparametrowej analizy enzymów proteolitycznych przy użyciu najnowszych technik badawczych. Opracowane narzędzia posłużyły do analizy zawartości aktywnych form proteaz w różnorodnych próbkach biologicznych, takich jak m.in. jednojądrzaste komórki krwi obwodowej.

Do tej pory opisanych zostało wiele małowzrostekowych związków chemicznych służących do analizy proteaz cysteinowych, niemniej jednak większość z nich posiada liczne niedoskonałości, uniemożliwiające precyzyjną ewaluację procesów biologicznych. Składają się na nie m.in. brak selektywności wobec celowanego białka, słaba przepuszczalność przez błony czy wysoka toksyczność. Ponadto, syntetyczne markery chemiczne najczęściej zawierają w swojej strukturze fluorofory, które nie tylko wykazują szerokie widma absorpcji i emisji, ale również bardzo często niespecyficzenie łączą się zarówno z błoną jak i innymi komponentami komórkowymi. W swojej pracy przedstawiłam rozwiązanie, które umożliwi nie tylko pokonanie wyżej wymienionych wad, ale również pozwala na wieloparametrową analizę aktywności proteaz w złożonych systemach biologicznych. Dzięki połączeniu optymalnych inhibitorów proteaz z chelatorem jonów metali uzyskałam nowy rodzaj niezwykle selektywnych związków chemicznych kompatybilnych z cytometrią masową. Przedstawiona technologia oraz badania za nią idące, są pierwszymi tego rodzaju.

PODZIĘKOWANIE

Publikacja powstała na bazie rozprawy doktorskiej dr inż. Katarzyny Groborz.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Roederer, S. De Rosa, R. Gerstein, M. Anderson, M. Bigos, R. Stovel, T. Nozaki, D. Parks, L. Herzenberg, L. Herzenberg, *Cytometry*, 1997, **29**, 328.
- [2] A. Moldavan, *Science*, 1934, **80**, 188.
- [3] A. C. Belkina, J.E. Snyder-Cappione, *Cytometry A*, 2017, **91**, 175.
- [4] S.P. Peretto, P.K. Chattopadhyay, M. Roederer, *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, **4**, 648.
- [5] A. Cossarizza et al., *Eur. J. Immunol.*, 2019, **49**, 1457.
- [6] F. H. Labeed, H. M. Coley, H. Thomas, M. P. Hughes, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 2028.
- [7] N. Feller, C. M. Kupier, J. Lankelma, J.K. Ruhdal, R. J. Scheper, H. M. Pinedo, H. J. Broxterman, *Br. J. Cancer*, 1995, **72**, 543.
- [8] 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.
- [9] M. H. Spitzer, G.P. Nolan, *Mass Cytometry: Single Cells, Many Features*, *Cell*, 2016, **165**, 780.
- [10] K. Groborz, M. Poręba, *Wiadomości Chemiczne*, 2021, **75**, 1171.
- [11] A. Radzicka, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6105.
- [12] P. N. Walsh, S.S. Ahmad, *Essays Biochem*, 2002, **38**, 95.
- [13] A. G. Porter, R.U. Janicke, *Cell Death Differ.*, 1999, **6**, 99.
- [14] M. B. Boffa, R. Bell, W. K. Stevens, M. E. Nesheim, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 12868.
- [15] L. M. Coussens, B. Fingleton, L.M. Matrisian, *Science*, 2002, **295**, 2387.
- [16] J. A. Joyce, D. Hanahan, *Cell Cycle*, 2004, **3**, 1516.
- [17] X. S. Puente, L. M. Sanchez, A. Gurtierrez-Fernandez, G. Velasco, C. Lopez-Otin, *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, **33**, 331.
- [18] X. S. Puente, L. M. Sanchez, C. Overall, C. Lopez-Otin, *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**, 544.
- [19] Q. L. Deveraux, J.C. Reed, *Genes. Dev.*, 1999, **13**, 239.
- [20] S.C. Chai, Q.Z. Ye, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 6862.

- [21] W. C. Earnshaw, L.M. Martins, S.H. Kaufmann, *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, **68**, 383.
- [22] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, **27**, 157.
- [23] A. B. Berger, P.M. Vitorino, M. Bogyo, *Am. J. Pharmacogenomics*, 2004, **4**, 371.
- [24] B. F. Cravatt, A.T. Wright, J.W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 383.
- [25] L. Shen, H. Li, Y. Shi, D. Wang, J. Gong, J. Xun, S. Zhou, R. Xiang, X. Tan, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 30347.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 sierpnia 2022 r.