

PEPTYDY Z WĘZŁEM CYSTEINOWYM JAKO INHIBITORY KALLIKREINY 13

INHIBITORY CYSTEINE PEPTIDES AS KALLIKREIN 13 INHIBITORS

**Dżesika Jankowska, Wiktoria Rejmak,
Adam Lesner, Natalia Gruba***

*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
Ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk*

**e-mail: natalia.gruba@ug.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Inhibitorowe węzły cysteinowe
 - 1.1. Cyklotydy
 - 1.2. Peptydy z motywem węzła cysteinowego
 - 1.3. Zastosowania peptydów z motywem węzła cysteinowego
2. Kallikreiny
 - 2.1. Kallikreina 13
3. Analogi EETI-II
4. Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Dżesika Jankowska, w 2022 roku ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Badania prowadzone w ramach pracy magisterskiej dotyczyły projektowania, syntezy i badań biologicznych potencjalnych inhibitorów ludzkiej kallikreiny 13 będących pochodnymi najsilniejszego inhibitora trypsyny EETI-II.

Mgr Wiktorija Rejmak, w 2020 roku ukończyła studia magisterskie na kierunku Chemia na Uniwersytecie Gdańskim. Obecnie doktorantka Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Gdańskiego o specjalizacji Chemia. W ramach rozprawy doktorskiej zajmuje się syntezą nowych analogów ludzkiej katelicydiny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną w ramach projektu PRELUDIUM BIS 1.



 <https://orcid.org/0000-0002-2551-6869>

Prof. dr hab. Adam Lesner, kierownik Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jego zainteresowania naukowe obejmują badania nad Tworzeniem nowych narzędzi do monitorowania aktywności proteaz, ze szczególnym uwzględnieniem chorób cywilizacyjnych, jak nowotwory czy cukrzyca. Bierze również udział w projektach dotyczących opracowywania nowych immunomodulatorów, związków antymikrobiotycznych oraz penetrujących błonę komórkową.



 <https://orcid.org/0000-0001-8335-3431>

Dr Natalia Gruba, jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, uzyskując kolejno tytuł zawodowy magistra w 2012 roku oraz doktora nauk chemicznych w 2016 roku. Od 2013 r. zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, aktualnie na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Środowiska. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań nad profilowaniem aktywności enzymów proteolitycznych oraz określaniem ich specyficzności substratowej. Badania naukowe skupiają się głównie na poszukiwaniu nowych metod diagnostycznych dla chorób cywilizacyjnych, jak nowotwory i cukrzyca.



 <https://orcid.org/0000-0003-3281-9945>

ABSTRACT

Inhibitor cysteine knots (ICK) also known as "knottins," are cysteine-rich peptides typically composed of approximately 30 amino acids. These peptides exhibit a characteristic robust structure featuring three antiparallel β -sheets that are "knotted" together by three disulfide bonds. This structural motif confers stability to the protein, rendering it resistant to thermal denaturation and proteolysis. Consequently, inhibitor cysteine knots hold great promise as scaffolds for developing new peptide drugs.

In this study, we present the synthesis and evaluation of six potential inhibitors targeting KLK13, utilizing the *Ecballium elaterium trypsin II* inhibitor (EETI-II) as the leading structure. The peptides were synthesized in solid-phase peptide synthesis with an automated peptide synthesizer. Subsequently, they were oxidized using iodine and then quenched with an anion exchange resin. Both linear and oxidized compounds were obtained and subjected to kinetic studies.

The inhibitory activity against KLK13 was observed exclusively in the oxidized analogues of the synthesized compounds. Linear peptides exhibited lower affinity towards KLK13, highlighting the critical role of the disulfide bridge in the structure of the EETI-II analogues for inhibiting the enzyme activity.

Keywords: EETI-II analogs, competitive inhibition, kallikrein 13

Słowa kluczowe: analogi EETI-II, inhibicja kompetycyjna, kallikreina 13

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABZ	- kwas 2-aminobenzoowy (ang. <i>2-aminobenzoic acid</i>)
CaCO-2	- nieśmiertelna linia komórkowa ludzkich komórek gruczolakoraka jelita grubego (ang. <i>human colon adenocarcinoma cel line</i>)
CIC	- przewlekłe idiopatyczne zaparcie (ang. <i>chronic idiopathic constipation</i>)
CTLA-4	- cytotoksyczny antygen 4 związany z limfocytami T (ang. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>)
DIC	- <i>N,N</i> -diizopropylkarbodiimid (ang. <i>N,N-diizopropylcarbodiimide</i>)
DMF	- dimetyloformamid (ang. <i>dimethylformamide</i>)
EDTA	- kwas wersenowy (ang. <i>edetate acid</i>)
EETI-II	- inhibitor trypsyny z <i>Ecballium elaterium II</i> (ang. <i>trypsin inhibitor Ecballium elaterium II</i>)
ESCC	- płaskonabłonkowy rak przełyku (ang. <i>esophageal squamous cell carcinoma</i>)
Fmoc	- osłona 9-fluorenylometoksykarbonylowa (ang. <i>9-fluorenylmethoxycarbonyl</i>)
G1 – G3	- stopnie złośliwości histologicznej nowotworu od 1 do 3 (ang. <i>grades of histological malignancy of the tumor from 1 to 3</i>)
HKU1	- ludzki koronawirus (ang. <i>human coronavirus</i>)
HIV	- ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IC ₅₀	- połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. <i>half of the maximum inhibitory concentration</i>)
ICK	- inhibitorowe węzły cysteinowe (ang. <i>inhibitor cysteine knot</i>)
K _{ass}	- stała asocjacji (ang. <i>association constant</i>)
KLK	- kallikreina (ang. <i>kallikrein</i>)
KLK3	- kallikreina 3 (ang. <i>kallikrein 3</i>)
KLK13	- kallikreina 13 (ang. <i>kallikrein 13</i>)
MALDI-TOF	- spektrometria mas z czasem przelotu (ang. <i>matrix-assisted laser desorption – time of flight</i>)
MCF-7	- linia komórkowa raka piersi (ang. <i>breast cancer cell line</i>)
MCoTI	- cyklotyd w izolacji z <i>Momordica cochinchinensis</i> (ang. <i>cyclotide isolated from Momordica cochinchinensis</i>)
NSCLC	- niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. <i>non-small cell lung cancer</i>)
OSCC	- rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (ang. <i>oral squamous cell carcinoma</i>)
PET	- pozytonowa tomografia emisyjna (ang. <i>positron emission tomography</i>)
PCI	- inhibitor karboksypeptydazy w ekstrakcie z bulw z ziemniaka (ang. <i>potato carboxypeptidase inhibitor</i>)
SPECT	- tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (ang. <i>single emission tomography</i>)
SPPS	- synteza peptydów w fazie stałej (ang. <i>solid phase peptide synthesis</i>)

TFA	- kwas trifluorooctowy (ang. <i>trifluoroacetic acid</i>)
Tyr(3-NO ₂)	- 3-nitro-L-tyrozyna (ang. <i>3-nitro-L-tyrosine</i>)
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

WPROWADZENIE

Inhibitorowe węzły cysteinowe (ang. *Inhibitor Cysteine Knot*, ICK) są zwykle zbudowane z około 30 aminokwasów. Te peptydowe inhibitory wykazują charakterystyczną strukturę zawierającą 3 przeciwrównoległe β -kartki „powiązane” przez 3 wiązania disulfidowe między 6 resztami cysteiny. Taki motyw struktury sprawia, że peptyd jest stabilny i oporny na denaturację termiczną i proteolizę, dzięki czemu inhibitorowe węzły cysteinowe są obiecującymi rusztowaniami dla nowych leków peptydowych [1].

ICK są łatwe do otrzymania zarówno w procesie produkcji rekombinacyjnej, jak i na drodze syntezy w fazie stałej (ang. *solid phase peptide synthesis*, SPPS) [2]. ICK syntetyzowane w fazie stałej są powszechnie stosowane do otrzymywania peptydów bogatych w cysteinę. Związki zawierające ponad 30 reszt aminokwasowych można pozyskiwać z dobrą wydajnością i czystością enancjomeryczną. W procesie syntezy największe problemy wiążą się z cyklizacją szkieletu. Kluczowy krok, regioselektywne tworzenie 3 wiązań disulfidowych, może być skutecznie kontrolowany przy użyciu zoptymalizowanych warunków utleniania [3,4], co stanowi duży walor zaproponowanego rozwiązania.

Niniejszy artykuł przedstawia charakterystykę potencjalnych inhibitorów KLK13, których wiodącą strukturą jest inhibitor trypsyny wyizolowany z tryskawca sprężystego - *Ecballium elaterium II* (EETI-II). W porównaniu z pierwotną strukturą EETI-II uproszczono budowę związków syntetyzowanych *de novo* zachowując jedynie jeden z trzech pierwotnych mostków disulfidowych. Do sekwencji wprowadzono również sekwencję VRFR rozpoznawaną przez kallikreinę 13 (KLK13). Wyniki naszych poprzednich badań pozwalają zoptymalizować specyficzność substratową KLK13 w miejscach nieprimowanych i primowanych (w odniesieniu do nazewnictwa miejsca aktywnego enzymów zaproponowanego przez Schechtera i Bergera [5]), uzyskując wyjątkowo wrażliwy substrat ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ pomocny w oznaczaniu aktywności enzymu [6].

Ekspresję KLK13 wykryto na powierzchni różnych ludzkich tkanek i stwierdzono, że ten enzym występuje w komórkach nowotworowo zmienionych. Na przykład, w guzach pęcherza moczowego zauważono zwiększoną ekspresję enzymu w porównaniu do sąsiednich zdrowych tkanek [7].

Rak urotelialny pęcherza moczowego jest chorobą trudną do rozpoznania. Jego pierwsze objawy mogą być często ignorowane i błędnie diagnozowane jako zakażenie dróg moczowych [8]. Dostępne obecnie terapie przeciwnowotworowe, nie zawsze są skuteczne jako samodzielne leczenie, a stosowane chemioterapeutyki nierzadko są toksyczne dla chorego [9]. Pewną perspektywą w znalezieniu antidotum mogą być peptydy hamujące aktywność, czy też regulujące aktywność określonych

enzymów proteolitycznych, które w danej jednostce chorobowej prowadzą do zaburzenia homeostazy i progresji nowotworu. Takie związki celowane, w tym ICK, rozpoznają określone struktury komórek nowotworowych, nieobecnych w zdrowych organizmach. Te białka hamujące mogą zatem być potencjalnymi środkami terapeutycznymi, a nawet elementem szczepionek przeciwnowotworowych. Rozpoznając krótkie fragmenty antygenów nowotworowych mogą bowiem wpasować się w kompleksy MHC i być prezentowane limfocytom. Wykorzystanie ich jako środki terapeutyczne m.in. w immunoterapii do blokowania punktów kontrolnych układu odpornościowego (ang. *immune checkpoints*), czyli cząsteczki o aktywności supresyjnej, nie może budzić wątpliwości.

1. Inhibitorowe węzły cysteinowe

Inhibitory z węzłami cysteinowymi to są peptydy (zwykle < 6 kD) o bogatych właściwościach biologicznych. Charakteryzują się obecnością stabilnej struktury trzeciorzędowej, tworzonej i stabilizowanej przez charakterystyczny układ wiązań disulfidowych [10,11]. Struktura jest zdefiniowana przez co najmniej trzy mostki disulfidowe tworzące węzeł wewnątrzcząsteczkowy i nadające jej strukturalną i funkcjonalną oporność na denaturację termiczną, degradację enzymatyczną, ekstremalne pH i naprężenia mechaniczne [12]. Należy łączyć te cechy z usztywnieniem konformacyjnym w cząsteczce powstałym przez kowalencyjne wiązania disulfidowe [13,14]. Taka konstrukcja została po raz pierwszy odkryta w 1982 roku w PCI, inhibitorze karboksypeptydazy obecnym w ekstrakcie z bulw ziemniaka [15].

Inhibitory z węzłem cysteiny zwykle zbudowane są z 30 do 50 reszt aminokwasowych [16]. ICK pochodzą z różnych filogenetycznie źródeł i występują w wielu różnych organizmach, od zwierząt po rośliny, a kilka z tych peptydów wykryto również w wirusach [17]. Struktura molekularna ICK obejmuje formy cykliczne, znane jako cyklotydy, albo peptydy niecykliczne [18].

1.1. Cyklotydy

Cyklotydy to peptydy o długości około 30 reszt aminokwasowych, które są wykrywane w kilku rodzinach roślin [19]. Naturalne cyklotydy charakteryzuje zdolność do inhibicji proteaz, działanie przeciwdrobnoustrojowe, w tym przeciwwirusowe (HIV), owadobójcze, cytotoksyczne czy działanie podobne do funkcji hormonów roślinnych [20]. Wykazano, że cyklotydy mogą działać niszcząco na różne stadia rozwojowe owadów np. na słonecznicę orzęźwjkę (*Helicoverpa armigera*), głównego szkodnika bawełny czy na robaki pasożytnicze np. nicienie z rodzaju *Trichostrongylus* i na mięczaki np. ślimaki błotne - szkodniki ryżu [23,24].

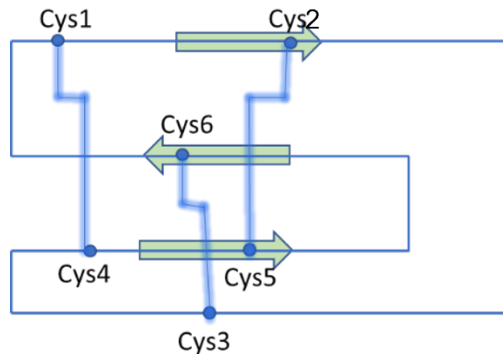
W budowie cyklotydydów wyróżnia się charakterystyczny szkielet o cyklizacji typu głowa – ogon, oraz motyw węzła cysteinowego (Rysunek 1). Podobnie do pozostałych ICK, cyklotydy są stabilnymi cząsteczkami opornymi na denaturację termiczną i chemiczną oraz degradację enzymatyczną. Za przykład może posłużyć cyklotydyd - kalata B1, który pozostaje niezmienny strukturalnie i biologicznie aktywny nawet w temp. 100 ° C (napar leczniczej herbaty ziołowej np. z grochu motylkowego) [21]. Większość liniowych peptydów i białek traktowanych w ten sam sposób (temp) nie zachowuje swojej natywnej struktury tracąc aktywność biologiczną.

Oprócz konserwatywnego motywu węzła cysteinowego, cyklotydy są znacząco zmienne, zarówno co do składu aminokwasowego, jak i co do wielkości pętli szkieletowych. Węzeł cysteinowy zajmuje rdzeń struktury, podczas gdy większość innych aminokwasów jest odsłonięta na powierzchni pętli szkieletowych, odpowiedzialnych za specyficzne oddziaływania cząsteczki z innymi strukturami np. enzymami.

Cyklotydy są syntetyzowane jako białka prekursorowe. Obróbka prekursora polega na fałdowaniu oksydacyjnym w celu utworzenia trzech wiązań disulfidowych, wycięciu dojrzałej sekwencji i cyklizacji typu „głowa-ogon” [22].

Większość cyklotydydów znaleziono w rodzinach fiołkowatych (*Violaceae*) i marzanowatych (*Rubiaceae*), ale przedstawiciele tej klasy związków również wykryto w rodzinach motylkowatych (*Fabaceae*), dyniowatych (*Cucurbitaceae*) i psiankowatych (*Solanaceae*) [22].

W obrębie poszczególnych gatunków roślin są obecne różne cyklotydy, jak również duża zmienność sekwencji aminokwasowych w tych cyklotydydach sugeruje, że mogą być aktywne w szerokim zakresie.



Rysunek 1 Drugorzędowa struktura cyklotydydów z zaznaczonymi wiązaniami disulfidowymi i przeciwrównoległymi β -karkkami

Figure 1. Secondary structure of cyclotides with disulfide linkages included and anti-parallel β -sheets

Aktywność biologiczna cyklotydydów wynika głównie z charakteru interakcji z błonami komórkowymi zakłócającymi ich naturalne funkcje. Przykładem tego typu działania jest uszkodzenie błony jelita środkowego po spożyciu przez owady cyklotydydów – gatunki łuskostrzydłe (*Lepidoptera*) [23,24]. Molekularny mechanizm niszczenia błon komórkowych przez cyklotydy jest obiektem badań. W przypadku związku kalata B1, udało się ustalić, że pierwszy etap reakcji obejmuje specyficzne wiązanie cyklotydy z fosfolipidami fosfatydyloetanolaminy [25]. Wiązanie następuje po internalizacji cyklotydy z błoną naruszającym jej integralność fizyczną i wyzwolenie tworzenia się porów i/lub wyciek zawartości wnętrza komórki [26]. Jednak nie wszystkie związki wykazują opisane właściwości. Przykładowo, cyklotydy MCoTI są zdolne do przenikania przez błony ludzkich makrofagów, komórek linii raka piersi i jajnika różnymi szlakami endocytarnymi, ale bez trwałego wiązania się z błoną komórkową [27].

Aktywność cyklotydydów wobec HIV jest jedną z najszerzej badanych do tej pory. Gustafson i współpracownicy jako pierwsi donieśli o cyklotydydach rozwijających aktywność przeciwwirusową - przeciwko HIV [28]. Chociaż mechanizm działania nie jest jeszcze w pełni poznany, to można zakładać, uwzględniając niezdolność cyklotydydów do hamowania aktywności odwrotnej transkryptazy HIV, że działanie przeciwwirusowe ujawnia się przed wejściem HIV do komórki gospodarza. Jak wspomniano wcześniej, cyklotydy mogą wiązać fosfolipidy obecne w błonie komórkowej, co wskazuje na prawdopodobny sposób działania przeciwko HIV, czyli zaburzenie wiązania i/lub fuzji wirusa z błoną komórkową [29].

W porównaniu do zdrowych komórek cyklotydy wykazują cytotoksyczność jedynie wobec komórek zmienionych nowotworowo. Badania wykazały, że trzy cyklotydy wyizolowane z języka teściowej (*Hedyotis diffusa*) - chińskiej rośliny leczniczej z rodziny marzanowatych (*Rubiaceae*), indukują apoptozę oraz hamują proliferację i migrację kilku różnych linii komórkowych raka prostaty [30]. Podobne działanie cytotoksyczne cyklotydydów wyizolowanych z rośliny *Palicourea rigida* - naturalnie występujących na obszarze obu Ameryk [31], można zaobserwować w warunkach *in vitro* wobec komórek MCF-7 (rak piersi) i Caco-2 (gruczolakorak jelita grubego).

1.2. Peptydy z motywem wężła cysteinowego

Peptydy z motywem wężła cysteinowego w porównaniu do cyklotydydów różni brak cyklizacji typu „głowa-ogon”. Większość z nich ma zdolność inhibicji aktywności egzo- i endoproteaz, a dokładniej pełnią rolę inhibitorów metalokarboksypeptydaz i proteaz serynowych. Przykładem peptydu z motywem wężła cysteinowego jest właśnie inhibitor karboksypeptydazy ziemniaczanej (PCI)

[15]. Peptydy tego typu odkryto nie tylko w ziemniaku (*Solanum tuberosum*), ale i w pomidorze (*Solanum lycopersicum*) oraz w przedstawicielach innych gatunków psiankowatych [32].

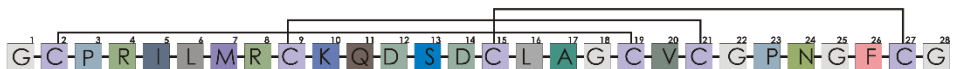
Aktywność biologiczna peptydów z motywem węzła cysteinowego obejmuje przede wszystkim działanie przeciwdrobnoustrojowe i/lub owadobójcze. Związki o wspomnianych właściwościach zidentyfikowano w kilku roślinach, w tym w żeńszelenu i topoli [33], a ich obecność w korzeniach, nasionach, liściach czy kwiatach może wskazywać na siłę naturalnej obrony roślin przed mikroorganizmami i szkodnikami.

Poznano również peptydy powszechnie występujące w nasionach dyniowatych (*Cucurbitaceae*), a szczególnie w rodzaju przepęklki (*Momordica*). Peptydy zawarte są również w takich roślinach jak szpinak (*Spinacia oleracea*) i *Mirabilis jalapa* [26]. Inną grupę polipeptydów stanowią inhibitory α -amylazy, zidentyfikowane w roślinach leczniczych np. w szarłacie leczniczym (*Amaranthus hypochondriacus*), czy allamandzie przeczyszczającej (*Allamanda cathartica*) i jaśminie wodnym (*Wrightia religiosa*) [34,35].

Do peptydów z motywem węzła cysteinowego należy ten obecny w tryskawcu sprężystym pochodzącym z rodziny dyniowatych (*Ecballium elaterium II* - EETI-II). Jest to najsilniejszy dotąd znany inhibitor trypsyny. Związek ten wykazuje typową budowę peptydu ICK z funkcjonalną pętlą zawierającą sześć aminokwasów zlokalizowanych między Cys2 i Cys9 (Rysunek 2) [14]. W 1999 roku Christmann ze współpracownikami zasugerował, że konformacja EETI-II jest rzeczywiście wystarczająco sztywna, aby mogła zostać wykorzystana jako rusztowanie molekularne do prezentacji kombinatorycznych bibliotek peptydów [36]. Takie biblioteki mogą być użyteczne w projektowaniu m.in. struktur wiodących leków.

EETI-II składa się z 28 aminokwasów z tworzącymi trzy pętle ograniczone mostkami disulfidowymi, gdzie pętla 1 wiążąca trypsynę zawiera się między resztami 3–8, kolejna pętla 2 znajduje się między resztami 10–14, a trzecia między resztami [37]. Pętle są potencjalnymi regionami możliwymi do substytucji aminokwasów lub randomizacji struktury. Co więcej, EETI-II fałduje się samoistnie w warunkach *in vitro* z prawidłowym tworzeniem wiązań cysteinowych [38], co jest walorem w pracach laboratoryjnych.

EETI-II



Rysunek 2. Sekwencja aminokwasowa EETI-II z uwzględnionymi wiązaniami disulfidowymi. Cyframi zaznaczono kolejne reszty aminokwasowe

Figure 2. EETI-II amino acid sequence with disulfide linkages included. The consecutive amino acid residues are marked with numbers

Hilpert i współpracownicy [39] przeprowadzili modyfikację inhibitora EETI-II w ten sposób, że peptyd hamujący (PMTLEYR) pochodzący z trzeciej domeny inhibitora owomukoidu indyczki został zoptymalizowany strukturalnie pod kątem specyficznego hamowania elastazy trzustkowej świni (zmiana funkcjonalna). Wprowadzili peptyd hamujący PMTLEYR do sekwencji EETI-II w celu zwiększenia stabilności proteolitycznej konstruktu. Otrzymana hybryda wykazuje specyficzność i powinowactwo do elastazy trzustkowej świni, podobne do peptydu hamującego, ale ze znacznie wyższą stabilnością proteolityczną.

1.3. Zastosowania peptydów z motywem węzła cysteinowego

W toku ewolucji peptydy z motywem węzła cysteinowego uzyskały wiele funkcji poprzez modyfikacje w poszczególnych pętłach. Rośliny wykształciły inhibitory proteaz w celu ochrony nasion przed zoonozami, wiele gatunków rozwinęło peptydy przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwplazmialne, aby zapobiegać infekcjom, a jadowite zwierzęta zaczęły wytwarzać inhibitory przeciwdziałające tworzeniu się w błonie komórkowej porów, aby z jednej strony chronić siebie przed atakiem toksycznie działających cząsteczek, a z drugiej mieć ułatwienia w polowaniu na zdobycz [1]. Przykłady głównych źródeł i typów peptydów zawierających węzły cysteinowe przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Przykłady peptydów zawierających węzły cysteinowe [10,20,24,40]

Table 1. The examples of peptides with cysteine knots [10,20,24,40]

Źródło	Typ	Przykład	Aktywność biologiczna
Dyniowate (<i>Cucurbitaceae</i>)	kanoniczne inhibitory proteiny serynowej	Inhibitor trypsyny z <i>Ecballium elaterium</i> II (EETI-II)	Hamowanie aktywności proteolitycznej
Fiolkowe (<i>Violaceae</i>)	cyklotydy	Kalata B1	Cytotoksyczne, owadobójcze
Ślimaki stożkowe (<i>Conidae</i>)	konotoksyny	X-konotoksyna	Blokowanie powstawania porów, neurotoksyczny
Gorzka tykwa (<i>Momordica cochinchinensis</i>)	cyklotydy	MCoTI-II	Przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, hamowanie aktywności proteolitycznej
Fiolkowe (<i>Violaceae</i>)	cyklotydy	Cycloviolacin H4	Hemoliza
Śmiercionośny Skorpion (<i>Leiurus quinquestriatus</i>)	insektotoksyna	Chlorotoksyna	Blokowanie powstawania porów, neurotoksyczny

Projektowanie leków

Peptydy są potencjalnie idealnymi strukturami wiodącymi do projektowania leków, ale ich zastosowanie jako środki terapeutyczne jest często nieskuteczne ze względu na niską biodostępność po podaniu doustnym i niestabilność w warunkach *in vivo*. Wprowadzenie aktywnych sekwencji peptydowych do szkieletu ICK może osłabić wskazane ograniczenia [41]. Przykładowo, modyfikowane cykliczne inhibitory trypsyny wykazują zdolność do penetracji komórek, a tym samym interakcji z celem wewnątrzkomórkowym. Tego typu strategia została wykorzystana w celu opracowania sond molekularnych do diagnozowania i terapii chorób [20,42]. ICK zostały wykorzystane jako rusztowania do stworzenia nowych związków, które mogą być ligandami integryn i innych receptorów. Peptyd będący inhibitorem trypsyny, wyizolowany z przepękli indochińskiej (*Momordica cochinchinensis*), został zmodyfikowany tak, aby wiązał się z cytotoksycznym antygenem 4 związanym z limfocytami T (CTLA-4), strukturą docelową w terapii przerzutowego czerniaka [43].

Niektóre z preparatów farmaceutycznych dostępnych komercyjnie powstały na bazie ICK. Linzess (Linaclotide, Allergan/Ironwood Pharmaceuticals) stosuje się jako wsparcie w leczeniu choroby jelita drażliwego lub stanów przewlekłego idiopatycznego zaparcia (CIC), z kolei Prialt (Ziconotide, Azur Pharma) jest wykorzystywany w zwalczaniu przewlekłego bólu, w przypadkach uzasadnionego leczenia dooponowego, również w przypadkach leczenia bólu, któremu towarzyszy nietolerowanie lub opór na inne środki działające ogólnoustrojowo, a także wówczas gdy jest nieskuteczne działanie morfiny wprowadzanej dokanałowo [44].

Obrazowanie / sondy molekularne

Ostatnio zainteresowaniem cieszą się badania nad nowymi sondami molekularnymi do nieinwazyjnego obrazowania. Małe cząsteczki, peptydy, białka i nanocząstki mogą stanowić narzędzia diagnostyczne do wykrywania nowotworów i diagnozowania patologii. Tego typu związki działają jako ligandy receptorów adhezyjnych - integryn, ulegających ekspresji w różnych komórkach nowotworowych [45]. Peptydy pochodzenia roślinnego, w szczególności peptyd kalata B1 z rodzaju *Oldenlandia* i inhibitory trypsyny z *Ecballium elaterium* zostały zaprojektowane tak, aby zwiększyć ich powinowactwo i specyficzność wobec integryn. Zwykle poprzez wprowadzenie sekwencji peptydowej, która umożliwia efektywną interakcję z cząsteczką docelową. Tego typu modyfikowane związki są zazwyczaj używane jako sondy znakowane izotopem do nieinwazyjnego obrazowania nowotworów metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) oraz tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (SPECT) [46].

Do celów diagnostycznych opracowano także nieradioaktywne pochodne ICK. Przykładem jest białko EETI skoniugowane z barwnikiem do obrazowania w bliskiej podczerwieni. Związek specyficznie wiąże receptor integryny ulegający ekspresji w nowotworach mózgu. Można w ten sposób wykryć i określić miejsce wiązania barwnika [47].

Pochodzenia roślinnego peptyd węzła cysteinowego połączony z otoczką lipidową mikropęcherzyków wypełnionych perfluorowęglowodorami został zaprojektowany i przetestowany jako sonda do ultrasonograficznego obrazowania angiogenezy w guzie ze wzmocnieniem kontrastowym wiązania integryny [48].

Działanie przeciwnowotworowe

Cytotoksyczne właściwości ICK są przedmiotem intensywnych badań. Grover i współpracownicy [49] wskazują, że około 74% cyklotydów działa toksycznie na komórki już przy stosunkowo niskim stężeniu (7 μM), co potwierdzają wyniki badań z użyciem linii komórek zmienionych nowotworowo (*in vitro*).

Cyklotydy (Psyle A, C i E) wyizolowane z gatunku *Psychotria leptothyrsa* (jest nielegalna w Polsce na mocy ustawy przeciwdziałaniu narkomanii) zbadano pod kątem ich cytotoksyczności i stwierdzono, że są skuteczne przeciwko komórkom raka piersi [50]. Dodatkowo okazało się, że związki te mogą tworzyć pory w komórkach nowotworowych raka lekoopornego, co ułatwia wchłanianie np. doksorubicyny, leku o działaniu chemioterapeutycznym. Efekt synergistyczny tej kombinacji wymaga dalszych badań w celu określenia stopnia toksyczności i skuteczności, w kierunku ustalenia nowej monoterapii lub terapii skojarzonej z istniejącym środkiem chemioterapeutycznym.

Potencjalnymi lekami przeciwnowotworowymi mogą być również inhibitory angiogenezy. Obiecujący co do przyszłego wykorzystanie czynnik antyangiogeny uzyskano przez wprowadzenie do związku kalata B1 sekwencji 6-resztowej bogatej w argininę RRRRRR. Okazuje się, że ten obfity w argininę peptyd jest antagonistą interakcji z czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i jego receptora. Tego typu peptydy wykazały aktywność biologiczną w teście antagonizmu VEGF-a już przy niskim stężeniu mikromolarnym [51].

2. Kallikreiny

Termin kallikreina (KLK) wywodzi się z greckiego słowa *kallikreas* oznaczającego trzustkę, czyli narząd, w którym po raz pierwszy w XX wieku wykryto obecność enzymów. Uznano wtedy, że wytwarzane są one w trzustce oraz krążą we krwi, a na koniec są wydalane z organizmu wraz z moczem [52,53]. Jednak z czasem twierdzenie to okazało się nieprawdziwe, gdyż odkryto, że kallikreiny są również

produkowane w innych narządach, a także wyizolowano ich dwie izoformy, znacznie różniące się między sobą.

Kallikreiny są grupą enzymów, które więc możemy znaleźć w komórkach i płynach ustrojowych organizmów żywych. Mają one działanie katalityczne w różnych reakcjach chemicznych jak np. w reakcji syntezy i rozpadu, zachowując znaczną specyficzność substratową. Oznacza to, że pojedynczy enzym bierze udział tylko w jednej, określonej reakcji chemicznej lub w przypadku niecałkowitej specyficzności łączy się z kilkoma podobnymi substratami.

Kallikreiny zostały również zdefiniowane jako enzymy proteolityczne, pochodzenia zwierzęcego zdolne do uwalniania kininy z kininogenu. Wspomniana kinina jest glikoproteina, która jest hydrolizowana przez kallikreiny osocza lub tkankową, co prowadzi do generowania bradykininy. Kininogeny występują m.in. w osoczu krwi i pozakomórkowej przestrzeni zewnątrznarządowej. Działają również jako inhibitory proteaz cysteinowych [54].

Dysfunkcje w tkankowo-specyficznej regulacji aktywności KLKs zostały powiązane ze stanami patologicznymi, np. z chorobami układu oddechowego, chorobami neurodegeneracyjnymi, lękami, schizofrenią, dysfunkcją bariery skórnej, patologicznym stanem zapalnym czy nowotworami. Endogenna aktywność KLKs jest kontrolowana na wielu poziomach przez różne mechanizmy i czynniki, w tym kaskady aktywacji zymogenu, endogenne inhibitory KLKs (serpiny, makroglobuliny i tkankowe inhibitory proteazy serynowej z rodziny inhibitorów związanych z limfoblastonkiem typu Kazala) oraz z odczynem mikrośrodowiska czy też przez pojedyncze jony metali jako inhibitory KLKs (takie jak Zn^{2+}) [53]. Syntetyczne inhibitory KLKs to przede wszystkim związki oparte na białkach/peptydach. Jako przykład można podać proleki aktywowane przez KLK3, które weszły do badań klinicznych fazy I i fazy II jako potencjalne terapeutyki guza prostaty. Z kolei szczepionka PROSTVAC oparta na KLK3 jest w III fazie badań klinicznych [54]. Wszystko to wskazuje, że specyficzne inhibitory KLKs ujawniające odpowiednie właściwościach farmakokinetyczne i farmakodynamiczne mają potencjał terapeutyczny.

2.1. Kallikreina 13

Obecna w ciele człowieka KLK13 ulega ekspresji w przelyku, gruczołach ślinowych i tkankach zależnych od układu hormonalnego tj. jądrach, prostatie, piersiach, jajnikach i szyjce macicy [55]. Stwierdzono także, że jej rozregulowana ekspresja we wspomnianych tkankach może być powiązana z powstawaniem nowotworów złośliwych. Zauważono także, że ten enzym odgrywa pewną rolę w chorobach skóry tj. łuszczycy i atopowe zapalenie skóry.

Pomimo licznych badań próbujących scharakteryzować KLK13 to nadal pozostają nieznane jej fizjologiczne funkcje. W związku z tym szczególnie interesujące jest wykrycie i zrozumienie szlaków biologicznych, w których KLK13 bierze udział.

W 2013 roku Ishige i współpracownicy [56] donieśli, że gen kallikreiny 13 jest regulowany w liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (ang. *oral squamous cell carcinoma*, OSCC). KLK13 potrafi regulować migrację i inwazyjność komórek, co sprawia, że enzym może być potencjalnym biomarkerem, w przypadku OSCC, do wczesnego wykrywania przerzutów do węzłów chłonnych. Dwa lata później Gueugnon i współpracownicy [57] stwierdzili, że wysokie stężenie mRNA KLK13 w niedrobnonabłonkowym raku płuc (ang. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) jest związane z korzystnym rokowaniem zdrowienia pacjentów z NSCLC, a poziom mRNA może być nowym niezależnym biomarkerem tkankowym do przewidywania wyniku zastosowanej terapii. Dodatkowo jego ilościowa ocena w tkankach nowotworowych może wesprzeć decyzje w zakresie leczenia. W 2018 roku Nohara ze współpracownikami [58] przeprowadzili analizę różnicową transkryptomu tkanek płaskonabłonkowego raka przełyku (ang. *esophageal squamous cell carcinoma*, ESCC) z tkankami zdrowymi, która wykazała nieprawidłową ekspresję KLK13 w guzach. Odkryli również, że stosunkowo wysoki poziom ekspresji enzymu w raku płaskonabłonkowym przełyku jest związany z proliferacją komórek i skorelowany z progresją nowotworu, zaawansowanym stadium raka i niestety złym rokowaniem.

W 2016 roku Tokas i jego współpracownicy [7] po raz pierwszy w badaniu klinicznym potwierdzili znaczenie KLK13 w rokowaniu, a nawet w wynikach leczenia raka urotelialnego pęcherza moczowego. Obserwuje się zwiększoną ekspresję KLK13 w guzach pęcherza moczowego w porównaniu do niezajętych nowotworem, zdrowych tkanek. Naukowcy wskazali na rozregulowaną ekspresję KLK13 w tkankach pęcherza moczowego zmienionych nowotworowo w porównaniu z sąsiednimi, zdrowymi tkankami narządu. Dodatkowo porównanie tkanek pęcherza moczowego pobranych od pacjentów z różnym stadium rozwoju choroby nowotworowej, wykazano niskie poziomy ekspresji KLK13 w bardziej agresywnych stadiach raka pęcherza moczowego. Te informacje wyraźnie wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań określających rolę i drogi regulacji KLK13 w trakcie procesu nowotworowego.

Wreszcie, doniesienia literaturowe [59] wskazują, że KLK13 jest zaangażowany w proces zakażenia ludzkiego nabłonka dróg oddechowych i pośredniczy w wejściu koronawirusa (ang. *human coronavirus*, HKU1) do komórek. Dodatkowo dystrybucja i specyficzność proteazy determinują specyficzność tkankową i komór-

kową wirusa, a także mogą regulować transfer międzygatunkowy. Wykazano, że KLK13 jest kluczowym wyznacznikiem tropizmu HKU1 [41].

1. Analogi EETI-II

Materiały i metody

Synteza peptydów

Liniowe peptydy 1-6 (przed utworzeniem mostka disulfidowego) zsyntetyzowano na nośniku stałym przy użyciu automatycznego syntezyatora peptydów (Liberty Blue™, CEM Corporation, USA) zgodnie ze standardową procedurą Fmoc (osłona 9-fluorenylometoksykarbonylowa). Użyto żywicy H-Gly-2-chlorotritylowej (Iris Biotech, Niemcy) z obsadzeniem o zawartości 0,63 mmol/g. Syntezę przeprowadzono przez powtórzenie etapów deprotekcji i acylowania. Do usunięcia grupy Fmoc użyto 30% piperydyny w DMF (dimetyloformamidzie), a do reakcji sprzęgania użyto oksymy / diizopropylkarbodiimidu (DIC). Po zakończeniu syntezy usunięto *N*-końcową grupę Fmoc i peptydy odszczepiono od żywicy z jednoczesnym usunięciem bocznych grup zabezpieczających. W tym celu wykorzystano mieszaninę: TFA/fenol/triizopropylsolan/H₂O (88:5:2:5, v/v) [42]. Utlenianie peptydów (utworzenie mostka disulfidowego) przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w innym miejscu [43].

Zsyntetyzowane analogi poddano analizie fizykochemicznej. Związki analizowano za pomocą HPLC Jasco LC System (Jasco, Japonia) na kolumnie RP C8 (BIO Wide Pore C8, 250 mm × 4.6 mm, Supelco, USA) z liniowym gradientem 10% -90% fazy B (80% acetonitrylu, 19,9% woda 0,1% TFA) w fazie A (0,1% TFA w wodzie) przez 40 min przy szybkości przepływu 1 mL/min. Otrzymane peptydy oczyszczono na półpreparatywnej kolumnie Luna C18 (Aeris Peptide C18, 250 mm x 10 mm, Phenomenex, USA). Analizę jonów masowych przeprowadzono na spektrometrze masowym Autoflex maX MALDI TOF (Bruker, Niemcy).

Badanie aktywności analogów EETI-II względem KLK13

Testy hamowania aktywności KLK13 przeprowadzono w buforze o następującym składzie: 50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA i 0,5 μM heparyny (pH 7,5). Najpierw do każdej pozycji pomiarowej 96-dołkowej płytki do pomiaru fluorescencji, zawierającej buforowany roztwór KLK13 dodano po 10 μl analogów EETI-II, o końcowym stężeniu $1,00 \times 10^{-5}$ M w studzience pomiarowej. Następnie po 30 minutach inkubacji w 37°C dodano po 20 μl substratu ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂, o końcowym stężeniu $6,15 \times 10^{-6}$ M w studzience pomiarowej. Wzrost fluorescencji uwolnionego ABZ mierzono z użyciem czytnika mikroplatek CLARIOStar (BMG Labtech, Niemcy), przy fali wzbudzenia 320 nm

i emisji 450 nm. Pomiaru aktywności poszczególnych analogów przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Określenie parametrów inhibicji

Parametry kinetyczne inhibicji określono stosując model nieodwracalnego hamowania, jak opisano wcześniej [44,45]. Eksperymenty wykonano z użyciem 96-dółkowej płytki do pomiaru fluorescencji. Przygotowano serie rozcieńczeń (50 - 1.56 μM) otrzymanych peptydów 1-6, a następnie połączono je z substratem ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂, końcowe stężenie 10 μM . Po dodaniu KLK13, końcowe stężenie 10 nM, fluorescencję uwolnionego ABZ ze zhydrolizowanego substratu monitorowano przy długości fali wzbudzenia 320 nm i emisji 450 nm. Oddziaływania enzym – inhibitor oznaczano w 200 μl końcowej objętości buforu: 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) zawierającego 1 mM EDTA i 0,5 μM heparyny; całość inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę, a odczyt przeprowadzono z użyciem czytnika CLARIOStar (BMG Labtech, Niemcy). Wprowadzono system kontrolny bez inhibitora z zachowaniem obecności analogów. K_{ass} obliczono przez wykreślenie odwrotności aktywności KLK13, w każdym punkcie w funkcji czasu. Wartości IC₅₀ określono metodą regresji liniowej do początkowego fragmentu aktywności KLK13 w funkcji stężenia danego analogu.

Badanie aktywności analogów EETI-II wobec próbek moczu

Obecność KLK13 w moczu pacjentów z rozpoznaniem raka pęcherza została potwierdzona we wcześniejszym badaniu [62]. W niniejszej pracy obecność enzymu w próbkach biologicznych kontrolowano przez inkubację moczu z wybranymi analogami EETI-II. W testach wykorzystano peptydy oznaczone od 4 do 6. Warunki reakcji zachowano, jak powyżej. Pomiar aktywności proteolitycznej badanego moczu pobranego od pacjentów polegały na procedurze, w której 80 μl każdej próbki dodano do studzienki i zmieszano z 100 μl buforu testowego. Następnie wprowadzono inhibitor, a po 30 minutach inkubacji całość uzupełniono 20 μl substratu. Pomiar fluorescencji w czasie przeprowadzono z użyciem CLARIOStar (BMG Labtech, Niemcy). Każdy z testów przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Aktywność enzymatyczną mierzono przez 30 minut w temperaturze 37°C przez odczyt intensywności fluorescencji uwolnionego fragmentu peptydu zawierającego ABZ (długość fali wzbudzenia i emisji jak wyżej).

Pobieranie i przygotowanie próbek moczu

W eksperymencie wykorzystano próbki moczu pobrane od pacjentów z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego w różnych stadiach rozwoju nowotworu. Guz potwierdzono wcześniej badaniem histopatologicznym. Probki moczu pobrane od pacjentów przechowywano w temperaturze -20°C do czasu badania. Zamrożone próbki rozmrażano w temperaturze pokojowej. Proces pobierania próbek oraz sam eksperyment przeprowadzono zgodnie z zasadami określonymi w wytycznych De-

klaracji Helsińskiej. Próbkę pobrano za pośrednictwem Centrum Transferu Technologii Uniwersytetu Gdańskiego we współpracy ze Szpitalem Miejskim Wincentego a Paulo w Gdyni (umowa nr JN/777/R720/08.11.17). Każdy uczestnik podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu.

Wyniki i dyskusja

W prezentowanych badaniach zaprojektowano i zsyntetyzowano skutecznie potencjalne inhibitory KLK13 oparte na strukturze EETI-II, zawierające jeden mostek disulfidowy. W przypadku sekwencji natywnej powstało sześć analogów z cysteiną zastąpioną (i) resztami seryny i (ii) resztami alaniny (Rysunek 3). Jak wspomniano wcześniej, EETI-II jest jednym z najsilniejszych inhibitorów trypsyny [13]. Ponieważ KLK13 wykazuje specyficzność wobec trypsyny, zdecydowano wstawić do sekwencji region P₄-P₁, rozpoznawany przez enzym. Wstawienie sekwencji specyficznej dla enzymu miało na celu zwiększenie powinowactwa inhibitora do enzymu. Specyficzny substrat KLK13 ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ został wcześniej opracowany przez autorów tej publikacji [6]. Sekwencja Val-Arg-Phe-Arg została wstawiona w pętlę wiążącą trypsynę w różnych pozycjach natywnego EETI-II.

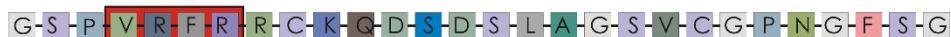
Dodatkowo wprowadzono wyżej wymienione modyfikacje mostków disulfidowych, aby stworzyć związki różniące się hydrofilowością (Tabela 2). Zamianę cysteiny na serynę, która jest izosteryczna z cysteiną, wybrano w celu zwiększenia hydrofilowości analogów. Celem modyfikacji było sprawdzenie czy peptydy bardziej hydrofilowe będą wykazywać inną aktywność biologiczną niż te już znane. Wiadomo, że wprowadzenie reszt hydrofilowych może poprawić rozpuszczalność związków, ale nieuchronnie to wpływa na ich oddziaływanie z białkami. Z tego powodu postanowiono ustalić zależność między wprowadzonymi modyfikacjami a działaniem peptydów. Zastąpienie reszt cysteiny alaniną również spowodowało zwiększenie hydrofilowości w porównaniu do natywnego EETI-II. Średnią wartość hydrofilowości obliczono za pomocą programu ProtParam [60] jako sumę hydrofilowości wszystkich aminokwasów, podzieloną przez liczbę reszt w sekwencji. Względna objętość zajmowana przez alifatyczne łańcuchy boczne (alanina, walina, izoleucyna i leucyna) jest określana jako indeks alifatyczny białka [61].

Liniowe analogi EETI-II

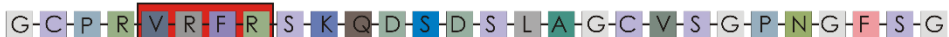
Peptyd 1: [Ser^{2,9,19,21}]EETI-II



Peptyd 2: [Ser^{2,15,19,27}]EETI-II



Peptyd 3: [Ser^{9,15,21,27}]EETI-II



Peptyd 4: [Ala^{2,9,19,21}]EETI-II



Peptyd 5: [Ala^{2,15,19,27}]EETI-II



Peptyd 6: [Ala^{9,15,21,27}]EETI-II

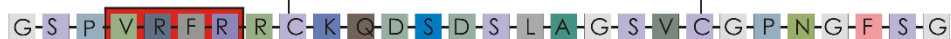


Ułtenione analogi EETI-II

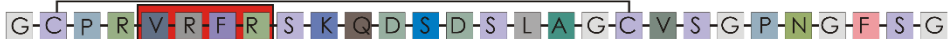
Peptyd 1: [Ser^{2,9,19,21}]EETI-II



Peptyd 2: [Ser^{2,15,19,27}]EETI-II



Peptyd 3: [Ser^{9,15,21,27}]EETI-II



Peptyd 4: [Ala^{2,9,19,21}]EETI-II



Peptyd 5: [Ala^{2,15,19,27}]EETI-II



Peptyd 6: [Ala^{9,15,21,27}]EETI-II



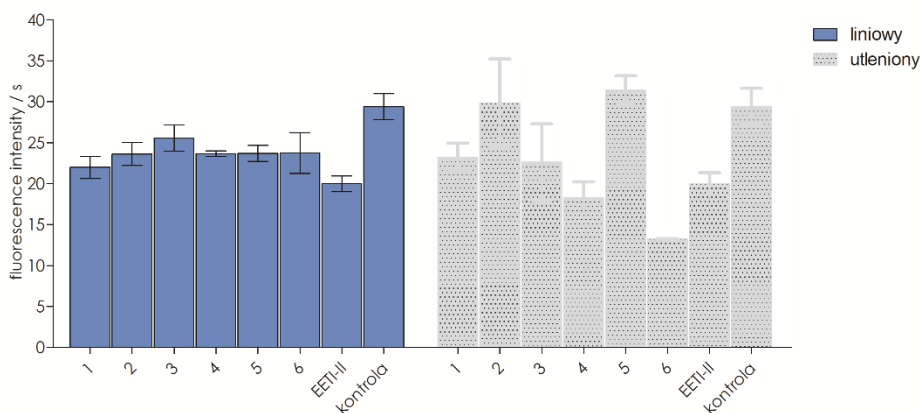
Rysunek 3. Sekwencja aminokwasowa analogów EETI-II z zaznaczonymi mostkami disulfidowymi. Zastosowane nazewnictwo odnosi się do wprowadzonych reszt aminokwasowych w odniesieniu do struktury natywnej. W czerwonej ramce zaznaczono sekwencję rozpoznawaną przez KLK13

Figure 3. Amino acid sequence of EETI-II analogs with with disulfide linkages included. The nomenclature used refers to the introduced amino acid residues with respect to the native structure. The sequence recognized by KLK13 is marked in the red box

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne analogów EETI-II
Table 2. Physicochemical properties of EETI-II analogues

Lp.	Analog EETI-II	M _w obliczona /uzyskana w analizie MS	T _{ret} [min]	Średnia wartość hydrofilowości	Indeks alifatyczny	IC ₅₀ [μM]	K _{ass} [M ⁻¹]
1	[Ser ^{2,9,19,21}]EETI-II	2917,3 / 2917,5	10,0	- 0,45	38,2	4.2	1554 ± 1
2	[Ser ^{9,15,21,27}]EETI-II	2883,5 / 2883,3	17,7	- 0,57	38,2	6.7	869 ± 9
3	[Ser ^{2,15,19,27}]EETI-II	2883,2 / 2883,9	21,0	- 0,57	38,2	3.5	1756 ± 2
4	[Ala ^{2,9,19,21}]EETI-II	2853,3 / 2854,3	19,0	- 0,07	52,5	3.1	1853 ± 2
5	[Ala ^{9,15,21,27}]EETI-II	2819,2 / 2819,5	19,5	- 0,20	52,5	7.3	1096 ± 3
6	[Ala ^{2,15,19,27}]EETI-II	2819,2 / 2820,1	19,9	- 0,20	52,5	2.5	2807 ± 6

Następnie oceniono zdolność otrzymanych związków do hamowania KLK13, zarówno dla analogów liniowych, jak i cyklicznych (Rysunek 4). Okazało się, że liniowe peptydy tylko nieznacznie (~10-15%) hamują aktywność KLK13. Natomiast większy stopień hamowania enzymu zaobserwowano w przypadku utlenionych związków. Najbardziej obiecujące okazały się peptyd 4 - [Ala^{2,9,19,21}]EETI-II i peptyd 6 - [Ala^{9,15,21,27}]EETI-II, które hamowały aktywność enzymu odpowiednio o około 30% i 50%. Przeprowadzone testy oraz otrzymane wyniki skłoniły do skupienia się w dalszych pracach wyłącznie na utlenionych analogach.

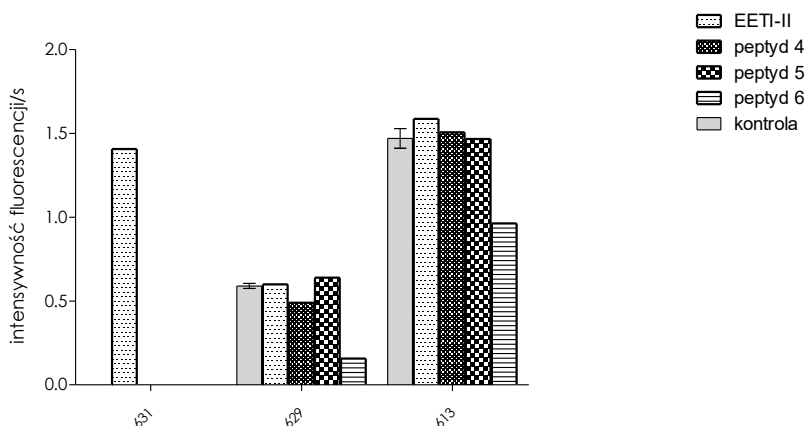


Rysunek 4. Hydroliza substratu ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ inkubowanego z KLK13 oraz analogami EETI-II

Figure 4. Proteolysis rate for ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ substrate incubated with KLK13 and EETI-II analogues

W kolejnym kroku zdecydowano się na wyznaczenie parametrów inhibicji generowanej przez utlenioną formę otrzymanych analogów. Określono stałe asocjacji nowych peptydów i KLK13 (Tabela 2). Zaobserwowano, że pochodna [Ala^{2,15,19,27}]EETI-II charakteryzuje się najwyższą aktywnością hamującą, w porównaniu z innymi badanymi peptydami, ponieważ wykazuje najwyższą wartość stałej asocjacji ($K_{\text{ass}} = 2807 \pm 6 \text{ M}^{-1}$) i najniższą wartość IC_{50} (2,483 μM). Dodatkowo porównując analogi z wprowadzoną resztą seryny z analogami z alaniną widać, że te z alaniną cechuje większa aktywność hamującą.

Na tej podstawie postanowiono określić, w jaki sposób związki potrafią hamować aktywność enzymu w próbkach biologicznych. W tym celu wykorzystano próbki moczu pobrane od pacjentów z rozpoznaniem raka pęcherza moczowego w różnych stadiach rozwoju (G1-G3). Przeprowadzono testy z analogami alaniny – peptydy 4, 5, 6 (Rysunek 5). Użycie peptydu 6 powoduje spadek aktywności KLK13 odpowiednio o 80% i 30%. Okazuje się więc, że jest możliwa obserwacja zniesienia aktywności enzymatycznej KLK13 w reakcji próbki moczu ze specyficznym substratem dla tego enzymu. Dalsze badania są jednak niezbędne do określenia w moczu (osoba zdrowa, chory) stopnia wykrywalności minimalnego stężenia KLK13 w oraz ilości substratu, aby uzyskać odpowiednio wyniki dodatni/ujemny, w warunkach *in vitro*. Ta standaryzacja przybliży opracowanie nowego narzędzia diagnostycznego. W przypadku wstępnej oceny moczu brak w nim enzymu jest spójny z poprzednimi wynikami [44]. Uzyskane wyniki są jedynie sygnałem o możliwości zastosowania peptydu 6 jako wiodącej struktury w poszukiwaniu nowych związków przeciwnowotworowych.



Rysunek 5. Szybkość proteolizy substratu ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ inkubowanego z próbkami moczu raka pęcherza moczowego o różnym stopniu złośliwości (G1 – próbka 631; G2 – próbka 629; G3 – próbka 613) i analogami EETI-II

Figure 5. Proteolysis rate of substrate ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂ incubated with bladder cancer urine samples at different grades (G1 grade – 631 sample; G2 grade – 629 sample; G3 grade – 613 sample) and EETI-II analogues

4. PODSUMOWANIE

Podsumowując, uproszczone analogi EETI-II zawierające jeden mostek disulfidowy mogą zachować silne działania hamujące wobec KLK13. W świetle przeglądu aktualnego piśmiennictwa jest to pierwsze doniesienie o możliwości zastosowania takich związków jako inhibitorów KLK13. Uzyskane wyniki zachęcają do dalszych badań nad inhibitorami proteaz opartymi na ICK, w których sekwencji możnaby dodatkowo wykorzystać aminokwasy szeregu D. Analogi KLK13 mogą mieć silniejsze właściwości hamujące niż KLK13 i mogą być użyte do zbadania możliwości ich potencjalnego zastosowania w diagnostyce procesów nowotworowych. Rola jaką pełni KLK13 w powstawaniu i rozwoju raka urotelialnego pęcherza moczowego nie jest jeszcze w pełni poznana, dlatego uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszej oceny szlaku KLK13 nie tylko na poziomie zdrowej i nowotworowo zmienionej komórki, ale głównie oddziaływania KLK13 na zdrowie człowieka.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Kikuchi, M. Sugiura, T. Kimura, *Int J Pept.* 2015, **2015**:537508.
- [2] M. Reiwarth, D. Nasu, H. Kolmar, O. Avrutina, *Molecules*, 2012, **17**:12533.
- [3] M. Reinwarth, B. Glotzbach, M. Tomaszowski, S. Fabritz, O. Avrutina, H. Kolmar, *Chembiochem*, 2012, **14**, 137.
- [4] S. Kwon, F. Bosmans, Q. Kaas, O. Cheneval, A.C. Conibear, K.J. Rosengren, C.K. Wang, C.I. Schroeder, D.J. Craik, *Biotechnol Bioen*, 2016, **113**:2202.
- [5] I. Schechter, A. Berger, *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, **27**:157.
- [6] N. Gruba, E. Bielecka, M. Wysocka, A. Wojtysiak, M. Brzezińska-Bodal, K. Sychowska, M. Kalińska, M. Magoch, A. Pęczak, K. Falkowski, M. Wiśniewska, L. Sąsiadek, K. Płaza, E. Kroll, A. Pejkovska, M. Rehders, K. Brix, G. Dubin, T. Kantyka, J. Potempa, J., A. Lesner, *Int J Mol Sci.*, 2019, **20**:1557.
- [7] T. Tokas, M. Avgeris, C. Alamanis, A. Scorilas, K.G. Stravodimos, C.A. Constantinides, *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, **143**:521.
- [8] K. Saginala, A. Barsouk, J.S. Aluru, P. Rawla, S.A. Padala, A. Barsouk, *Med Sci (Basel)*, 2020, **8**:15.
- [9] L. Falzone, S. Salomone, M. Libra, *Front Pharmacol*, 2018, **9**:1300.
- [10] H. Kolmar H, *FEBS J*, 2008, **275**:2684.
- [11] C.P. Sommerhoff, O. Avrutina, H.U. Schmoldt, D. Gabrijelcic-Geiger, U. Diederichsen, H. Kolmar, *J Mol Biol*, 2010, **395**:167.
- [12] V. Herzig, G.F. King, *Toxins*, 2015, **7**:4366.
- [13] M.L. Colgrave, D.J. Craik, *Biochemistry*, 2004, **43**:5965.
- [14] R. Krätzner, J.E. Debreczeni, T. Pape, T.R. Schneider, A. Wentzel, H. Kolmar, G.M. Sheldrick, I. Uson, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, **61**:1255.
- [15] D.C.Rees, W.N. Lipscomb, W. N. *J Mol Biol*, 1982, **160**:475.
- [16] D.J. Craik, N.L. Daly, C. Waine, *Toxicon*, 2001, **39**:43.
- [17] S. Zhu, H. Darbon, K. Dyason, F. Verdonck, J.A.N. Tytgat, *FASEB J*, 2003, **17**:1765.
- [18] B. Molesini, D. Treggiari, A. Dalbeni, P. Minuz, T. Pandolfini, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017, **83**:63.
- [19] J.R. Kintzing, J.R. Cochran, *Cur Op Chem Biol*, 2016, **34**:143.
- [20] A. Gould, Y. Ji, T.L. Aboye, J.A. Camarero. *Curr Pharm Des.* 2011, **17**:4294.
- [21] L. Gran, *Lloydia.* 1973, **36**:174.

- [22] C.W. Gruber, A.G. Elliott, D.C. Ireland, P.G. Delprete, S. Dessein, U. Goransson, M. Trabi, C.K. Wang, A.B. Kinghorn, E. Robbrecht, D.J. Craik, *Plant Cell*. 2008, **20**: 2471.
- [23] D.J. Craik, *Toxins*, 2012, **4**:139.
- [24] B.L. Barbet, A.T. Marshall, A.D. Gillon, D.J. Craik, M.A. Anderson. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, **105**:1221.
- [25] S. Troeira Henriques, Y.H. Huang, S. Chaousis, C.K. Wang, D.J. Craik. *Chembiochem*. 2014, **15**:1956.
- [26] B. Molesini, D. Treggiari, A. Dalbeni, P. Minuz, T. Pandolfini, *Br J Clin Pharmacol*. 2017, **83**:63.
- [27] Y.H. Huang, M.L. Colgrave, N.L. Daly, A. Keleshian, B. Martinac, D.J. Craik. *J Biol Chem*. 2009, **284**:20699.
- [28] K.R. Gustafson, L.K. Walton, R.C. Jr Sowder, D.G. Johnson, L..K. Pannell, J.H. Jr. Cardellina M.R. Boyd, *J Nat Prod*. 2000, **63**:176.
- [29] A. Gould, J.A. Camarero, *Chembiochem*. 2017, **18**:1350.
- [30] E. Hu, D. Wang, J. Chen, X. Tao, *Int J Clin Exp Med*. 2015, **8**:4059.
- [31] M.F. Pinto, O.N. Silva, J.C. Viana, W.F. Porto, L. Migliolo, Bdcn, N. Jr. Gomes, I.C. Fensterseifer, M.L. Colgrave, D.J. Craik, S.C. Dias, O.L. Franco. *J Nat Prod*. 2016, **79**:2767.
- [32] D.C. Rees, W.N. Lipscomb, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, **77**: 277.
- [33] J. Gracy, D. Le-Nguyen, J.C. Gelly, Q. Kaas, A. Heitz, L. Chiche, *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**: D314.
- [34] P.Q. Nguyen, S. Wang, A. Kumar, L.J. Yap, T.T. Luu, J. Lescar, J.P. Tam, *FEBS J*, 2014, **281**: 4351.
- [35] P.Q. Nguyen, T.T. Luu, Y. Bai, G.K. Nguyen, K. Pervushin, J.P. Tam, *J Nat Prod*, 2015, **78**: 695.
- [36] A. Christmann, K. Walter, A. Wentzel, R. Krätzner, H. Kolmar, *Protein Eng*, 1999, **12**:797.
- [37] J.L. Lahti, A.P. Silverman, J.R. Cochran, *PLoS Comput Biol*, 1999, **5**:e1000499.
- [38] A. Wentzel, A. Christmann, R. Krätzner, H. Kolmar, *J Biol Chem*, 1999, **274**:21037.
- [39] K. Hilpert, H. Wessner, J. Schneider-Mergener, K. Welfle, R. Misselwitz, H. Welfle, A.C. Hocke, S. Hippenstiel, W. Hohne, *J Biol Chem*, 2003, **278**:24986.
- [40] F.A. Attah, B.A. Lawal, A.B. Yusuf, O.J. Adedeji, J.T. Folahan, K.O. Akhigbe, T. Roy, A.A. Lawal, N.B. Ogah, O.E. Olorundare, J.C. Chamcheu, *Plants*, 2022, **11**:3271.
- [41] L.Y. Chan, S. Gunasekera, S.T. Henriques, N.F. Worth, S.J. Le, R.J. Clark, J.H. Campbell, D.J. Craik, N.L. Daly, *Blood*, 2011, **118**:6709–17
- [42] A.G. Poth, L.Y. Chan, D.J. Craik, *Biopolymers*, 2013, **100**:480.
- [43] F. Maaß, J. Wüsthube-Lausch, S. Dickgießer, B. Valldorf, M. Reinwarth, H.U. Schmoldt, M. Daneschdar, O. Avrutina, U. Sahin, H. Kolmar, *J Pept Sci*, 2015, **21**:651.
- [44] J.K. Willmann, R.H. Kimura, N. Deshpande, A.M. Lutz, J.R. Cochran, S.S. Gambhir, *J Nucl Med*, 2010, **51**:433.
- [45] R.H. Kimura, A.M. Levin, F.V. Cochran, J.R. Cochran, *Proteins*, 2009, **77**, 359.
- [46] B. Glotzbach, M. Reinwarth, N. Weber, S. Fabritz, M. Tomaszowski, H. Fittler, A. Christmann, O. Avrutina, H. Kolmar, *PloS one*, 2013, **8**:e76956.
- [47] S.J. Moore, M.G. Hayden Gephart, J.M. Bergen, Y.S. Su, H. Rayburn, M.P. Scott, J.R. Cochran, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**:14598.
- [48] S. Reiss, M. Sieber, V. Oberle, A. Wentzel, P. Spangenberg, R. Claus, H. Kolmar, W. Lösche, *Platelets*, 2006, **17**:153.
- [49] T. Grover, R. Mishra, Bushra, P. Gulati, A. Mohanty, *Peptides*, 2020, **135**:170430.
- [50] S.L. Gerlach, P.K. Chandra, U. Roy, S. Gunasekera, U. Göransson, W.C. Wimley, S.E. Braun, D. Mondal, *Medicines*, 2019, **6**:33.
- [51] S. Gunasekera, F.M. Foley, R.J. Clark, L. Sando, L.J. Fabri, D.J. Craik, N.L. Daly, *J Med Chem*, 2008, **51**:7697.
- [52] M. Debela, N. Beafort, V. Magdalen, N.M. Schechter, C.S. Craik, M. Schmitt, W. Bode, P. Goettig, *Biol. Chem.*, 2008, **389**:623.
- [53] M. Kalinska, U. Meyer-Hoffert, T. Kantyka, J. Potempa, *Biochimie*, 2016, **122**:270.
- [54] K. Mavridis, M. Avgeris, A. Scorilas, *Expert Opin Ther Targets*, 2014, **18**:365.
- [55] M.R. Darling, L. Jacson-Boeters, T.D. Daley, E.P. Diamandis, *Int. J. Biol. Markers*, 2006, **21**:106.

- [56] S. Ishige, A. Kasamatsu, K. Ogoshi, Y. Saito, K. Usukura, H. Yokoe, Y. Kouzu, H. Koike, Y. Sakamoto, K. Ogawara, M. Shiiba, H. Tanzawa, K. Uzawa, *Mol. Carcinog*, 2014, **53**:557.
- [57] F. Gueugnon, A. Barascu, K. Mavridis, K. et al. *Tumor Biol*, 2015, **36**:4979.
- [58] K. Nohara, K. Yamada, L. Yamada, *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, **66**:351.
- [59] K. Milewska, K. Falkowski, M. Kalinska, E. Bielecka, A. Naskalska, P. Mak, A. Lesner A, A. Ochman, M. Urlik, J. Potempa, T. Kantyka, K. Pyrc. *Sci Signal*, 2020, **13**:eba9902.
- [60] J. Kyte, R.F. Doolittle, *J Mol Biol*, 1982, **157**:105.
- [61] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D.F. Hochstrasser, *Methods Mol Biol*, 1999, **112**:531.
- [62] N. Gruba, P. Rachubik, A. Piwkowska, A. Lesner, *Biomarkers*, 2021, **26**:770.

Praca wpłynęła do Redakcji 21 marca 2023 r.