WROCŁAW, LIPIEC 2022

AUTOREFERAT

Badania nad aktywnością proteaz sygnałowych układu odpornościowego za pomocą narzędzi chemicznych

DR INŻ. PAULINA KASPERKIEWICZ-WASILEWSKA

KATEDRA CHEMII BIOLOGICZNEJ I BIOOBRAZOWANIA
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA

Spis treści

I. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej. 3

II. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych. 3

Zatrudnienie w krajowych jednostkach: 3

Zatrudnienie w zagranicznych jednostkach naukowych (więcej szczegółów znajduje się w załączniku nr 5, część II, punkt 11). 4

III. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnieć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągniecie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej. 4

A. Publikacje, w których jestem pierwszym autorem (kolejność chronologiczna): 5

B. Publikacje, w których jestem kierownikiem projektu (kolejność chronologiczna): 5

C. Publikacje uzupełniające 6

D. Finansowanie badań 6

E. Inne granty otrzymane po uzyskaniu stopnia doktora 7

F. Parametry prezentowanego osiągnięcia naukowego: 7

G. Opis osiągnięcia naukowego zaprezentowanego w serii powiązanych ze sobą projektów (H1-H8) 8

Wstęp teoretyczny 8

Układ immunologiczny 8

Enzymy proteolityczne układu odpornościowego 12

Badania nad proteazami systemu immunologicznego 16

Substraty proteaz układu odpornościowego 18

Sondy chemiczne do badań aktywności proteaz – rodzaje i zastosowanie 21

Opis osiągnięcia naukowego 26

Wstęp 26

Opis szczegółowy 27

Część 1: Wybrane neutrofilowe serynowe proteazy 27

Część 2: Wybrane proteazy komórek NK, -B oraz -T 40

Część 3: Inne proteazy układu odpornościowego.....53

Część IV: Opis prac przeglądowych 58

Podsumowanie.....59

IV. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. 60

V. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę. 61

Doświadczenie dydaktyczne 61

Doświadczenie w popularyzacji nauki: 62

Doświadczenie organizacyjne: 62

VI. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej. 63

Nagrody i wyróżnienia 63

VII. Literatura.....63

I. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2010 - 2014, Doktor Nauk Chemicznych, dyscyplina Chemia (z wyróżnieniem)

Tytuł: Kombinatoryczna synteza bibliotek fluorogenicznych substratów zawierających nienaturalne aminokwasy dla proteaz serynowych na przykładzie ludzkiej neutrofilowej elastazy

Podmiot nadający stopień: Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Grupa Chemii Bioorganicznej, Wrocław, Polska

Promotor: prof. dr hab. Marcin Drąg (Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska)

Recenzenci: prof. dr hab. Jan Potempa (Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska) oraz prof. dr hab. Krzysztof Jóźwik (Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin, Polska)

2005 - 2010, Magister inżynier Biotechnologii, Biotechnologia Farmaceutyczna

Tytuł: Synteza inhibitorów ludzkiej neutrofilowej elastazy o strukturze ogólnej *R*-N(H)-Ala^{P}(OAr)$_2$

Podmiot nadający stopień: Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Grupa Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Wrocław, Polska

Promotor: dr hab. inż. Marcin Sieńczyk (Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska)

Recenzent: prof. dr hab. Józef Oleksyszyn (Politechnika Wrocławska, Wrocław, Polska)

II. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

Zatrudnienie w krajowych jednostkach:

2020 - trwające, **Adiunkt naukowo-dydaktyczny**
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wrocław, Polska

2017 - 2020, Adiunkt naukowo-dydaktyczny
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Grupa Chemii Bioorganicznej, Wrocław, Polska

2015 - 2017, Asystent naukowo-dydaktyczny
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, Grupa Chemii Bioorganicznej, Wrocław, Polska

Zatrudnienie w zagranicznych jednostkach naukowych (więcej szczegółów znajduje się w załączniku nr 5, część II, punkt 11).

2016 - 2017, Staż podoktorski w Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, Kalifornia, USA, *laboratorium prof. Guy Salvesena*

02.2015 - 07.2015, Staż podoktorski w Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, USA, *laboratorium prof. Guy Salvesena.* Staż realizowany w ramach projektu SKILLS współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, którego byłam laureatką w ramach otwartego konkursu.

03. 2014, Staż na Uniwersytecie w Cambridge, Cambridge, Anglia, *laboratorium prof. Jamesa Huntingtona*

III. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnieć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągniecie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

W niniejszym punkcie przedstawiam moje osiągnięcie naukowe zatytułowane "*Badania nad aktywnością proteaz sygnałowych układu odpornościowego za pomocą narzędzi chemicznych*". Proteazy układu immunologicznego są nie tylko kluczowymi mediatorami w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego, ale także są zaangażowane w rozwój i progresję wielu chorób, zwłaszcza o podłożu immunologicznym. Dlatego też na przestrzeni ostatnich lat można zaobserwować znaczny wzrost zainteresowania tymi enzymami. W prezentowanej serii powiązanych badań skupiłam się na badaniu siedmiu proteaz: NE, CatG, PR3, NSP4, GrA i GrB należących do rodziny proteaz serynowych oraz MALT1 z grupy proteaz cysteinowych.

Na przedstawione osiągnięcie naukowe składa się seria powiązanych ze sobą projektów, których wyniki zostały opublikowane w czasopismach z bazy Journal Citation Reports (JCR). Należą do nich:

A. Publikacje, w których jestem pierwszym autorem (kolejność chronologiczna):

***H1**: Kasperkiewicz P, Poręba M, Snipas SJ, Lin SJ, Kirchhofer D, Salvesen GS, Drąg M✉ Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4, PLoS One 2015, 10, 1.*

(IF 3.057; punkty MNiSW: 100 (nr na liście: 16237*); cytowania: 41)*

***H2**: Kasperkiewicz P✉, Altman Y, D'Angelo M, Salvesen GS✉, Drąg M✉, A toolbox of fluorescent probes for parallel imaging reveals uneven location of serine proteases in neutrophils, Journal of the American Chemical Society 2017, 139, 10115.*

(IF 14.357; punkty MNiSW: 200 (nr na liście: 12814); cytowania: 53)

***H3:** Kasperkiewicz P✉, Poręba M, Groborz K, Drąg M✉, Emerging challenges in the design of selective protease substrates, inhibitors and activity-based probes for indistinguishable proteases, FEBS Journal 2017, 284, 1518.*

(IF 4.530; punkty MNiSW: 100 (nr na liście: 6528*); cytowania: 35)*

***H4:** Kasperkiewicz P✉, Kołt S, Janiszewski T, Groborz K, Poręba M, Snipas SJ, Salvesen GS, Drąg M✉, Determination of extended substrate specificity of the MALT1 as a strategy for the design of potent substrates and activity-based probes, Scientific Reports 2018, 8, 15998.*

(IF 4.011; punkty MNiSW: 140 (nr na liście: 18277); cytowania: 9)

***H5:** Kasperkiewicz P✉, Hempel A, Janiszewski T, Kołt S, Snipas SJ, Drąg M, Salvesen GS✉, NETosis Occurs Independently of Neutrophil Serine Proteases, Journal of Biological Chemistry 2020, 1.*

(IF 4.238; punkty MNiSW: 100 (nr na liście: 10303); cytowania: 8)

B. Publikacje, w których jestem kierownikiem projektu (kolejność chronologiczna):

***H6:** Kasperkiewicz P✉, Peptidyl Activity-Based Probes for Imaging Serine Proteases, Frontiers in Chemistry 2021.*

(IF 3.994; punkty MNiSW: 100 (nr na liście: 6833); cytowania: 2)

***H7:** Janiszewski T, Kołt S, Kaiserman D, Snipas SJ, Li S, Kulbacka J, Saczko J, Bovenschen N, Salvesen GS, Drąg M, Bird P, Kasperkiewicz P✉, Noninvasive optical detection of granzyme B from natural killer cells with enzyme-activated fluorogenic probes, Journal of Biological Chemistry 2020, 1.*

(IF 4.238; punkty MNiSW: 100 (nr na liście: 10303); cytowania: 10)

H8: *Kołt S, Janiszewski T, Kaiserman D, Modrzycka S, Snipas SJ, Salvesen GS, Drąg M, Bird PI, Kasperkiewicz P✉, Detection of Active Granzyme A in NK92 Cells with Fluorescent Activity-Based Probe, Journal of Medicinal Chemistry 2020.*

(IF 7.446; punkty MNiSW: 200 (nr na liście: 11838); cytowania: 5)

C. Publikacje uzupełniające

S1-S6 Warto zauważyć, że jestem również współautorką innych publikacji naukowych z bazy JCR, których tematyka jest związana z tematyką osiągnięcia naukowego prezentowanego w niniejszej rozprawie habilitacyjnej, jednakże z uwagi na mój znacznie mniejszy udział, stanowią one jedynie uzupełnienie do niniejszej rozprawy, a ich wykaz znajduje się w załączniku *„Wykaz osiągnięć naukowych lub artystycznych, stanowiący znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”* i są to manuskrypty S1-S6.

* IF podano zgodnie z rokiem wydania.
** Punkty MNiSW podano według najnowszego wykazu MNiSW z dnia 1 grudnia 2021 r.
*** Cytowania na podstawie bazy Scopus z dnia 01 czerwca 2022 r.
✉ Autor korespondencyjny

D. Finansowanie badań

Badania po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora były finansowane z funduszy wymienionych poniżej, uzyskanych na drodze otwartych konkursów:

Grant Preludium, Narodowe Centrum Nauki: *“Optymalizacja struktury inhibitora parakaspazy MALT1”,* 2014-2016. Rola w projekcie: Kierownik Projektu. Finansowanie wsparło badania prezentowane w publikacjach H3 oraz H4.

Grant Homing, Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej: *“Nowe metody obrazowania proteaz serynowych zaangażowanych w indukowaną śmierć komórki*” 2017-2019. Rola w projekcie: Kierownik Projektu. Finansowanie wsparło badania prezentowane w publikacjach H7 oraz H8.

Grant TEAM-NET, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej: *„Wyleczymy neutropenię (FIX-NET): wykorzystanie identyfikacji zaburzeń funkcji proteaz granulocytów obojętnochłonnych jako nowych możliwości diagnostycznych i terapeutycznych”,* 2019 – 2023. Kierownicy projektu: prof. dr hab. Wojciech Młynarski (Uniwersytet Medyczny w Łodzi), prof. dr hab. Marcin Drąg (Politechnika Wrocławska, Wrocław) oraz prof. dr hab. Jan Potempa (Uniwersytet Jagielloński, Kraków). Rola w projekcie: Młodszy lider zespołu. Finansowanie wsparło badania prezentowane w publikacji H6.

Grant RO1, NIH, Kierownik projektu: prof. Guy Salvesen. Byłam zaangażowana w projekt w okresie 01.2016-06.2017, bez wynagrodzenia. Rola w projekcie: wykonawca. Finansowanie wsparło badania prezentowane w publikacjach H2 (GM099040) oraz H5 (GM99040 oraz P30CA30199).

Grant Harmonia 6, Narodowe Centrum Nauki: *"Badania nad selektywnymi markerami do obrazowania aktywnych proteaz serynowych w neutrofilach"*; 2015-2018. Kierownik projektu: prof. dr hab. Marcin Drąg. Rola w projekcie: wykonawca. Finansowanie wsparło badania prezentowane w publikacjach H1, H2, H3 oraz H5.

SKILLS, projekt SKILLS współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Priorytet IV, Szkolnictwo wyższe i nauka, Działanie 4.2. Rozwój kwalifikacji kadr sfery B+R i wzrost świadomości znaczenia nauki dla wzrostu gospodarczego). Rola w projekcie: kierownik projektu. Finansowanie wsparło badania prezentowane w publikacji H1.

E. Inne granty otrzymane po uzyskaniu stopnia doktora

Sonata, Narodowe Centrum Nauki: "*Wygaszony marker chemiczny jako narzędzie do obrazowania aktywnej osteoklastycznej katepsyny K"*, 2016-2019.

Grant Opus 20, Narodowe Centrum Nauki: "Badanie funkcji granzymu A w neutrofilach z wykorzystaniem indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych", 2021-2023.

Grant Sonata-Bis, Narodowe Centrum Nauki, "Heterogeniczność neutrofili zależna od proteaz serynowych", 2020-2025.

F. Parametry prezentowanego osiągnięcia naukowego:

	*Impact Factor**	*Punkty MNiSW***	*Cytowania ****	*Bez autocytowań*
Prace H1-H8	42,814	900	163	138
Prace S1-S19	136,705	2430	453	389
Razem po uzyskaniu stopnia doktora	179,519	3330	616	527
Razem przed uzyskaniem stopnia doktora (D1-D7)	31,06	650	286	247
ŁĄCZNIE	**210,259**	**3980**	**910**	**774**

* IF podano zgodnie z rokiem wydania. ** Punkty MNiSW podano według najnowszego wykazu MNiSW z dnia 1 grudnia 2021 r. *** Cytowania na podstawie bazy Scopus z dnia 01 czerwca 2022 r.

Indeks Hirscha 17

G. *Opis osiągnięcia naukowego zaprezentowanego w serii powiązanych ze sobą projektów (H1-H8)*

Wstęp teoretyczny

Układ immunologiczny

Nieustannie jesteśmy narażeni na ekspozycję i kontakt z patogenami, takimi jak wirusy, bakterie i pasożyty. W laboratorium rosną one i namnażają się niezwykle szybko, podczas gdy w naszym organizmie mają one utrudnione zadanie, ze względu na obecność dwóch głównych linii obrony zwanych wrodzonym i nabytym układem odpornościowym. Po rozpoznaniu charakterystycznych cząsteczek obcych układ odpornościowy przystępuje do ich neutralizacji lub eliminacji[1].

Układ immunologiczny, występujący u większości organizmów żywych, to bardzo złożony system składający się z różnych cząsteczek i komórek. Do najważniejszych cząsteczek układu odpornościowego zalicza się receptory, immunoglobuliny i cytokiny, a wśród komórek pełniących najbardziej istotne funkcje wyróżnia się limofocyty B, lifocyty T, komórki fagocytujace oraz komórki, które prezentują antygen limfocytom T. Komórki układu odpornościowego posiadają zdolność syntezy licznych przeciwciał i receptorów komórek T (TCR), wśród których do najważniejszych i najlepiej zbadanych zalicza się *toll*-podobne receptory (TLRs) (ang. *Toll-like receptors*), których u ludzi zidentyfikowano ponad dziesięć, a także receptory wiążące wzorce (ang. *pattern recognition receptors*, PRR), uruchamiające sygnał poprzez inicjację reakcji odpornościowej. PRR wiążą charakterystyczne cząsteczki, zwane wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (ang. *pathogen associated molecular patterns* - PAMP), występującymi wyłącznie w patogenach, dlatego łatwo są one rozpoznawane i wiązane przez komórki układu odpornościowego zainfekowanego organizmu.

Do obrony gospodarza układ odpornościowy wykorzystuje szeroką gamę leukocytów, których w naszym organizmie jest około 1×10^{12}. Komórki te stosują różne techniki eliminacji drobnoustrojów, wśród których wyróżnić można obecność lub produkcję cytotoksycznych molekuł takich jak reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), toksyczne peptydy czy enzymy np. proteazy (**Rys.1**). Do leukocytów wrodzonego układu odpornościowego należą komórki żerne (fagocyty), głównie makrofagi, neutrofile (ang. *polymorphonuclear leukocytes*, PMNs)) i komórki dendrytyczne (DCs), które służą jako pierwsza linia obrony przeciwko patogenom. Komórki żerne eliminują patogeny na drodze fagocytozy, w czasie której patogeny są wchłaniane do wnętrza komórki tworząc tzw. fagosom. Następnie fagosom łączy się z lizosomem, tworząc fagolizosom (**Rys. 1**). Lizosomy są bogate w aktywne proteolitycznie enzymy, przykładowo neutrofilowe serynowe proteazy (NSPs) są przechowywane w ziarnistościach azurofilnych neutrofilów[2]ulatwiajace destrukcję patogenów. Eliminacja patogenów nie jest trywialna i często wymaga zastosowania kilku strategii jednocześnie np. aktywności enzymów proteolitycznych oraz produkcji ROS.

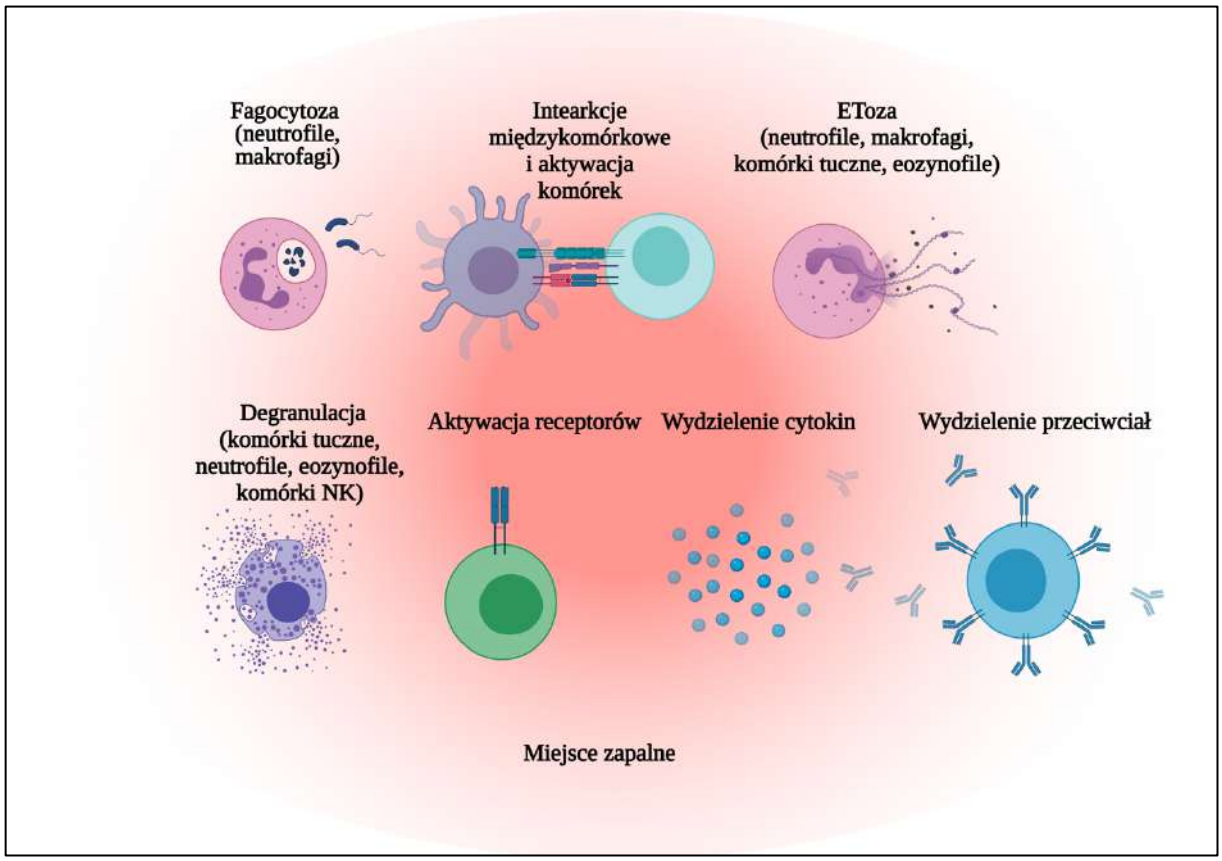
Ze względu na to, że jedną z bardziej istotnych i zaawansowanych strategii eliminacji patogenów jest wykorzystanie proteaz, są one przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy habilitacyjnej (**Rys. 1**), w której najwięcej uwagi poświęciłam na badania oraz opis proteaz znajdujących się w wybranych

komórkach żernych: neutrofilach, makrofagach, komórkach NK (naturalni zabójcy, ang. *natural killer*) i komórkach CLT (cytotoksyczne limfocyty T, ang. *cytotoxic T lymphocyte*).

Neutrofile to tzw. granulocyty obojętnochłonne, które stanowią ponad połowę białych krwinek, krążących w krwiobiegu m.in. w poszukiwaniu patogenów. Charakterystyczną cechą tych komórek jest ich wielopłatowe, posegmentowane jądro, dlatego też często nazywane są one leukocytami wielojądrzastymi. PMNs różnicują się z progenitora promielocytów i są komórkami terminalnymi, co oznacza, że nie mają zdolności do namnażania się, a po osiągnięciu dojrzałej formy obumierają w ciągu kilkunastu godzin. Podczas infekcji PMNs ulegają wynaczynieniu (diapedezie), czyli migrują z naczyń krwionośnych do środowiska zapalnego pod wpływem czynników wabiących, tzw. chemoatraktantów. Neutrofile są jednymi z pierwszych komórek, które docierają do ognisk zapalnych, dlatego stanowią jeden z najbardziej istotnych elementów wrodzonego układu odpornościowego. W celu obrony organizmu, nie tylko usuwają one patogeny w procesie fagocytozy, ale także w procesie degranulacji, w czasie którego uwalniają/wyrzucają toksyczne dla patogenów składniki takie jak ROS, serynowe proteazy (NSPs), defensyny i wiele innych[3, 4]. Bardzo ciekawą i złożoną formą obrony organizmu przed patogenami stosowaną przez PMNs jest tzw. NEToza, odkryta w 2004, charakteryzująca się tworzeniem tzw. pułapek zewnątrzkomórkowych, utworzonych z łańcuchów jądrowego lub mitochondrialnego DNA (ang. *neutrophil extracellular traps* - NETs)[5] (**Rys. 1**). NETs maja za zadanie łapanie i zatrzymywanie bakterii w celu ich neutralizacji. Co ciekawe ostanie doniesienia wykazują, że NETs mogą służyć jako platformy do aktywacji cytokin[6]. Zjawisko netozy zostało opisane jako charakterystyczne dla neutrofili, jednak wykazano, że również inne komórki (komórki tuczne, eozynofile, komórki NK) są zdolne do wydzielania komórkowego DNA i tworzenia zewnątrzkomórkowej sieci, jednak jak dotąd nie zostało to jeszcze do końca wyjaśnione[7]. Neutrofile, które uległy netozie tracą swoją funkcjonalność, dlatego proces ten jest jednocześnie uważany za śmierć komórki[5, 8]. Oprócz pozytywnych funkcji jakie pełnią PMNs, są one infiltrowane do mikrośrodowiska nowotworowego, gdzie poprzez wydzielanie chemokin i cytokin mogą promować wzrost guzów. Co więcej, PMNs rekrutują inne komórki do mikrośrodowiska guza, promują angiogenezę, a także biorą udział w supresji immunologicznej[3, 4, 9, 10].

Innymi komórkami fagocytującymi układu immunologicznego są makrofagi, które w przeciwieństwie do neutrofili obecnych głównie we krwi obwodowej, występują przede wszystkim w tkankach. Podstawową funkcją makrofagów jest fagocytoza patogenów, komórek nowotworowych, a także resztek komórkowych tzw. gruzu komórkowego oraz ich neutralizacja. Makrofagi rozpoznają patogeny dzięki systemowi receptorów rozpoznawczych, w tym TLRs, wiążących się specyficznie z określonymi czynnikami chorobotwórczymi. Są to komórki wszechstronne, wywodzące się z monocytów krwi, wykazujące nie tylko odmienne cechy fenotypowe (morfologiczne) w obrębie różnych tkanek, ale również wykazujące heterogenność funkcjonalną w zależności od ich lokalizacji. Pod względem specjalizacji, makrofagi rozpoznają różnorodne patogeny, produkują różne ilości cytokin, takich jak interleukina-6 (IL-6), IL-1, oraz wytwarzają ROS[11-15] **(Rys. 1)**. Doskonałym przykładem są makrofagi rezydujące w wątrobie, nazywane komórkami Kupfera oraz rezydujące w kościach, nazywane osteoklastami[11]. Oba typy mają wyraźnie odmienną morfologię, ponieważ osteoklasty są olbrzymimi, wielojądrowymi komórkami, charakteryzującymi się pofałdowaną granicą, podczas gdy komórki Kupffera mają kształt ameboidalny i zawierają mikrowypustki, pseudopodia i lamellipodia. Różnią się one także funkcją, gdyż komórki Kupffera inicjują odpowiedź immunologiczną, ale także biorą udział w przebudowie tkanki wątrobowej, a osteoklasty są zaangażowane w przebudowę tkanki kostnej[11]. Makrofagi odgrywają ważną rolę we wrodzonym układzie odpornościowym, gdyż pełnią

rolę w prezentacji antygenów komórkom T i uwalnianiu cytokin, co prowadzi do aktywacji innych komórek, w tym komórek adaptacyjnego układu odpornościowego[12, 14].



Rysunek 1. Strategie wykorzystywane przez komórki układu odpornościowego do obrony gospodarza obejmują fagocytozę, interakcję między komórkami, ETozę, degranulację, aktywację receptorów, uwalnianie cytokin i przeciwciał. Stworzono przy pomocy programu Biorender.

Głównymi komórkami adaptacyjnego układu odpornościowego są limfocyty B i T, które reagują na patogeny i pełnią funkcje efektorowe. Wszystkie one wywodzą się z tej samej co neutrofile i makrofagi komórki progenitorowej w szpiku kostnym zwanej wielopotencjalną krwiotwórczą komórką macierzystą[19]. Główną funkcją limfocytów B jest rozpoznawanie antygenów i produkcja przeciwciał (immunoglobulin), które są prezentowane na powierzchni limfocytów B (w formie związanej z komórką) jako receptory wiążące antygeny (receptory limfocytów B, BCR – *ang. B cell receptors*) oraz w postaci niezwiązanej w płynach ustrojowych. Zarówno immunoglobuliny związane jak i wolne wiążą się swoiście z antygenem prowadząc do tzw. odpowiedzi typu humoralnego. Warto wspomnieć, że odpowiedź swoista jest bardzo precyzyjna, jednak aby do niej doszło potrzeba dużo więcej czasu niż w przypadku odpowiedzi nieswoistej (m.in. komórki żerne, układ dopełniacza), w której komórki są nieselektywnie, ale za to szybko eliminują patogeny.

Limfocyty T stanowią niejednorodną populację, wśród której można wyróżnić cytotoksyczne limfocyty (CTL lub Tc ang. *cytotoxic lymphocyte T*), limfocyty T pomocnicze (Th) i limfocyty T regulatorowe/supresorowe (Treg). Funkcją komórek Th jest interakcja z komórkami B i ich aktywacja, podczas gdy komórki CLT poszukują peptydów związanych z MHC i niszczą komórki prezentujące obce

peptydy, co bezpośrednio prowadzi do zniszczenia patogenu poprzez uwolnienie ziarnistości cytotoksycznych i aktywację TNF[20]. Większość limfocytów T odpowiada na antygeny związane z cząsteczkami MHC. Przykładowo komórki B prezentują MHC II (na swojej powierzchni), aby umożliwić wiązanie się z pomocniczymi komórkami T, dzięki czemu mogą one uwalniać limfokiny[21]. Zapoczątkowuje to mitozę i jest sygnałem dla limfocytów B, które jednocześnie różnicują się w komórki plazmatyczne i wytwarzają przeciwciała specyficzne dla prezentowanego antygenu.

Ostatnimi komórkami układu immunologicznego, opisanymi w tej pracy są komórki dendrytyczne (DCs), które nazwano tak z powodu ich długich wypustek przypominających drzewo. Podobnie jak makrofagi, z którymi DCs dzielą wiele funkcji, należą one do komórek żernych. Tak jak wiele innych komórek układu odpornościowego, DCs są komórkami mieloidalnymi i pochodzą ze szpiku kostnego, ale też może dojść do ich różnicowania z monocytów, w obecności IL-4 i czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (GM-CSF). Ze szpiku kostnego komórki DC są przenoszone do niemalże wszystkich tkanek większości narządów. Co istotne, w odpowiedzi na odpowiednie chemokiny, komórki DC przedostają się do miejsc zaatakowanych przez patogeny. DCs odgrywają kluczową rolę w adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej i są bardzo ważnymi komórkami prezentującymi antygen, pełniącymi rolę tzw. „policjantów". Po wychwyceniu antygenu, komórki DC pokonują trasę naczyniami limfatycznymi do węzłów limfatycznych, gdzie prezentują antygen limfocytom T. Komórki te, podobnie jak makrofagi, stanowią heterogenną populację różniącą się funkcjami. Odróżnić można głównie komórki dendrytyczne plazmocytoidalne (niekonwencjonalne) i komórki mieloidalne (konwencjonalne), które różnią się wydzielanymi składnikami. Pierwsze z nich egzocytują duże ilości interferonów typu I (INF- α, -β), podczas gdy drugie dużą ilość IL-12, a co więcej pełnią funkcje aktywatorów limfocytów Th1[22]. Ponadto, wszystkie DC hydrolizują białka do peptydów, które są prezentowane w MHC, a następnie rozpoznawane przez limfocyty Th, ale m.in. lokalizacja, szlaki migracyjne, odpowiedź na infekcje są różne dla poszczególnych DCs[23].

Pomimo pozornego podziału układu immunologicznego na wrodzony i adaptacyjny, są one ze sobą ściśle powiązane. Na przykład, liczba neutrofili produkowanych w szpiku kostnym jest kontrolowana przez stężenie IL-23. Produkcja IL-23 jest pod samokontrolą makrofagów i zależy od ilości zneutralizowanych neutrofili apoptotycznych. IL-23 stymuluje regulatorowe limfocyty T do produkcji IL-17A, która z kolei wpływa na produkcję czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), odpowiedzialnego za uwalnianie neutrofili[24]. Innym przykładem powiązania między tymi dwoma układami odpornościowymi są DCs, które posiadają dużą powierzchnię dzięki swojemu dendrytycznemu kształtowi i umożliwiają kontakt z wieloma otaczającymi je komórkami, w tym NK, neutrofilami, limfocytami T itd., ale głównie prezentują antygeny dla limfocytów T[23, 25, 26].

Zarówno wrodzony jak i nabyty układ odpornościowy, łączy wspólny cel: ochrona gospodarza przed patogenami czy komórkami nowotworowymi, ale także usunięcie resztek komórek i starych komórek. Układy te są bardzo złożone i wymagają prawidłowego szlaku przekazywania sygnałów, zależnego od wielu zdarzeń a ich nieprawidłowe funkcjonowanie skutkuje chorobami zapalnymi lub autoimmunologicznymi[27, 28]. Ostatnie badania nad wzajemnym oddziaływaniem między nowotworami a układem odpornościowym wykazały, że układ immunologiczny jest zaangażowany nie tylko w progresję nowotworu, ale także w jego rozwój[29]. Ponadto nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu odpornościowego stwierdzono w wielu innych chorobach, w tym w neutropenii i AIDS, a w chorobach autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca i zapalenie tarczycy Hashimoto, wykazano nadaktywność układu odpornościowego[27, 28]. Co ciekawe, z tymi chorobami była

również związana aktywność enzymów proteolitycznych jako efektorów w komórkach układu odpornościowego wskazując na duże znaczenie tych enzymów. Ponadto, proteazy odgrywają wiele funkcji regulacyjnych w układzie odpornościowym, co widać na przykładzie udziału NSPs w uwalnianiu cytokin[10].

Enzymy proteolityczne układu odpornościowego

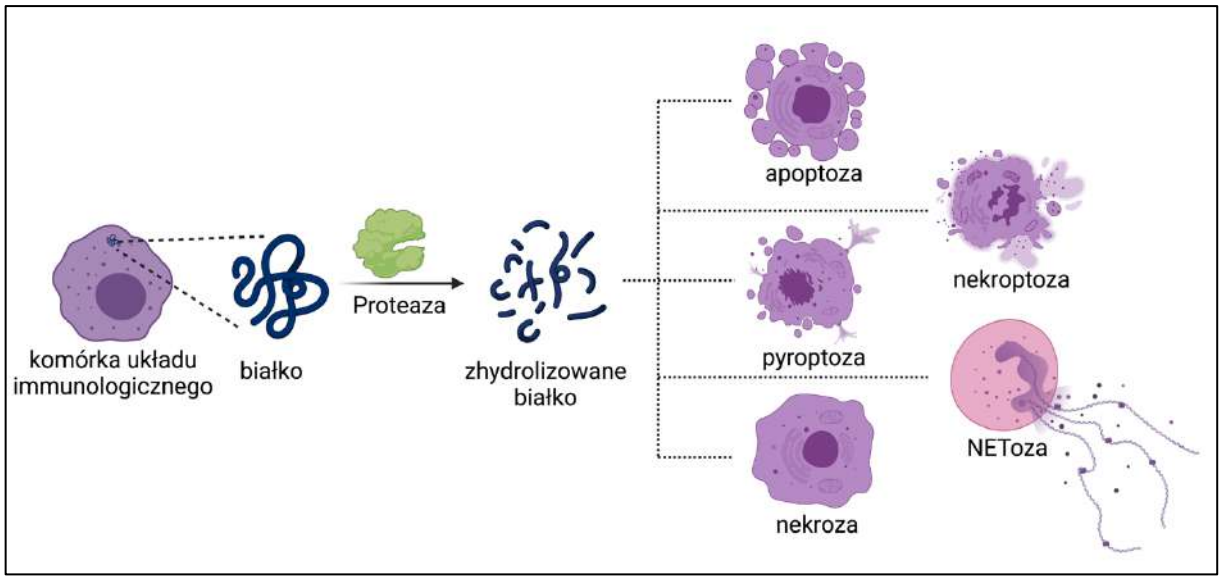
Enzymy proteolityczne (proteazy, proteinazy) pełnią liczne funkcje we wrodzonym i adaptacyjnym układzie odpornościowym, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych, dlatego też uważane są za kluczowe czynniki podczas badań nad układem immunologicznym. Pierwsze proteazy układu odpornościowego zostały opisane kilka dekad temu, a jedną z nich jest odkryta w 1968 roku przez Janoffa i Scherera elastaza ludzkich neutrofilów[30]. Wykazano, że około 3% ludzkiego genomu kodującego białka składa się z genów kodujących 700 pojedynczych proteaz[31]. W zależności od ich specyficzności, enzymy te katalizują reakcję rozkładu substratów białkowych i peptydowych na mniejsze fragmenty poprzez hydrolizę jednego lub wielu wiązań amidowych białka i tworzenie krótszych peptydów lub pojedynczych aminokwasów, które zwykle pełnią funkcje efektorowe w układzie odpornościowym. Proteazy są bardzo różnorodne i mogą funkcjonować w szerokim zakresie warunków, w tym w niskim i wysokim pH, w szerokim zakresie temperatur, w środowisku redukującym lub utleniającym. Są one klasyfikowane w prosty sposób zazwyczaj na podstawie miejsca hydrolizy: egzopeptydazy hydrolizują wiązanie peptydowe na N-końcu (aminopeptydazy) lub C-końcu (karboksypeptydazy) peptydu, podczas gdy endopeptydazy hydrolizują wiązania amidowe wewnątrz struktury peptydu[31]. Zazwyczaj aminopeptydazy hydrolizują jeden lub dwa aminokwasy, podczas gdy karboksypeptydazy prowadzą do odłączenia dłuższych peptydów. W układzie odpornościowym egzopeptydazy są często proteazami sygnałowymi, które aktywują inne enzymy, zwłaszcza endoproteazy, a doskonałym przykładem jest katepsyna C (CatC), która aktywuje NSPs[2, 31].

W innym powszechnie stosowanym podziale proteazy są rozróżnione na podstawie ich mechanizmu katalitycznego i katalitycznej reszty aminokwasowej znajdującej się w miejscu aktywnym enzymu proteolitycznego lub na podstawie ich zapotrzebowania na jon metalu w procesie katalizy dzieląc proteazy na asparaginowe, cysteinowe, serynowe i treoninowe - metaloproteazy[31].

Proteazy odgrywają ważną rolę nie tylko w odpowiedzi immunologicznej i obronie gospodarza przed patogenami, ale także w śmierci i proliferacji komórek, replikacji DNA i przebudowie tkanek. Co ciekawe, jedno białko może być przetwarzane przez wiele proteaz, prowadząc do innych efektów, jak to ma miejsce w przypadku Gasderminy D (GSDMD). Hydroliza GSDMD prowadzi do powstania krótszego peptydu z nowym N-końcem (N-GSDMD). W zależności od miejsca hydrolizy GSDMD, powstały lityczny N-GSDMD może prowadzić do apoptozy lub pyroptozy[32]. Co więcej, hydroliza GSDMD okazała się także kluczowa w indukcji NETozy, strategii eliminacji patogenów i formy śmierci komórkowej neutrofili. Wykazano, że ta subtelna zmiana funkcji N-GSDMD zależy od miejsca hydrolizy proteaz, a to z kolei jest zależne od indukcji komórek posiadających te proteazy. Hydroliza GSDMD to jeden z wielu przykładów tego, jak rozszczepienie jednego białka w innych miejscach prowadzi do różnych odpowiedzi komórkowych i do śmierci z wykorzystaniem kilku mechanizmów: apoptozy, pyroptozy, nekrozy i NETozy[32, 33] **(Rys. 2)**.

Większość proteaz w układzie odpornościowym charakteryzuje się szybkim działaniem i dużą aktywnością w przeprowadzaniu nieodwracalnej proteolizy, dlatego ich stężenie i aktywność jest ściśle

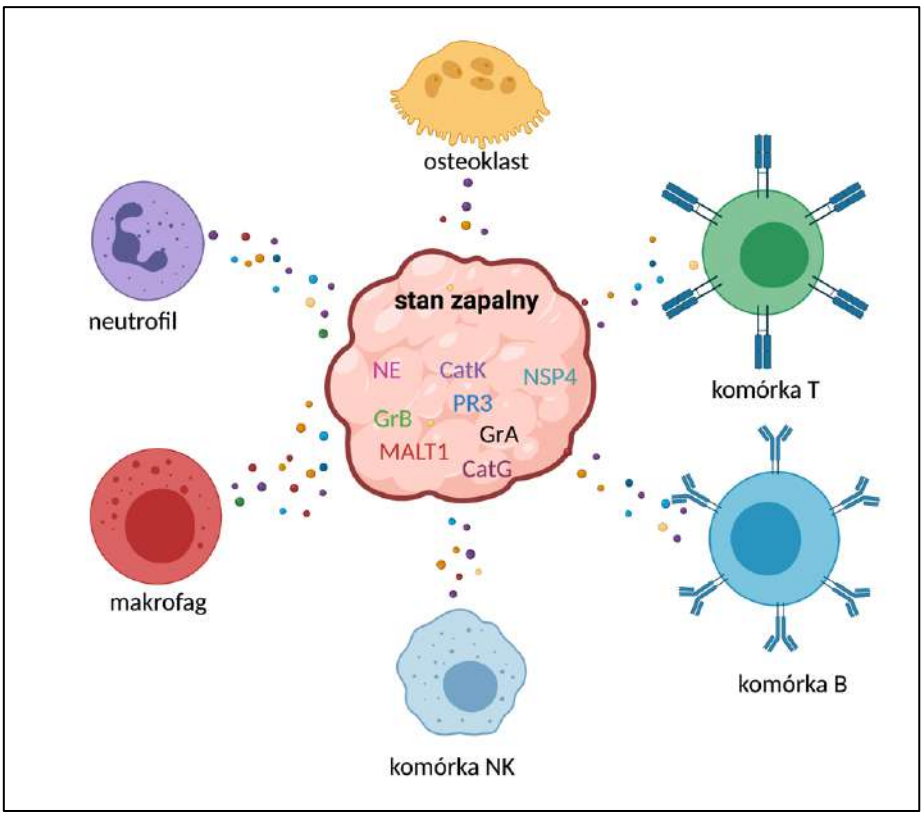
regulowana na kilku poziomach. Po pierwsze, proteazy są regulowane już na etapie transkrypcji i translacji genów. Na przykład, w warunkach fizjologicznych obserwujemy inny poziom ekspresji neutrofilowej elastazy (NE) i neutrofilowej serynowej proteinazy 4 (NSP4). Ponadto, wiele proteaz jest syntetyzowanych jako nieaktywne zymogeny i są one aktywowane, zwykle przez hydrolizę N-końcowego fragmentu, jak w przypadku NSPs, które są aktywowane przez usunięcie dłuższego N-końcowego propeptydu, a następnie hydrolizę prodipeptydu przez katepsynę C. Gdy powyższe systemy zawodzą, nadmiernej aktywności proteaz zapobiegają endogenne inhibitory. Klasycznym przykładem takich inhibitorów są serpiny (inhibitory proteaz serynowych), takie jak antytrombina, która hamuje aktywność proteaz serynowych lub regulatory allosteryczne takie jak czynnik VIIa, który odgrywa rolę kofaktora.



Rysunek 2. Komórki układu odpornościowego umierają na różne sposoby w kaskadach reakcji, w które zaangażowane są proteazy. Na schemacie przedstawiono rodzaje śmierci komórek układu odpornościowego indukowane przez serynowe lub cysteinowe proteazy. Rysunek utworzony przy użyciu Biorender.com.

Głównymi enzymami znajdującymi się w neutrofilach są proteazy serynowe z grupy NSPs, wśród których wyróżnia się NE, katepsynę G (CatG), proteinazę 3 (PR3) i NSP4, ale także granzymy A i B (GrA i GrB), które pełnią kluczowe funkcje efektorowe w tych komórkach[2, 34]. Enzymy te hydrolizują liczne substraty, co prowadzi do destrukcji patogenów, aktywacji receptorów[2, 35, 36], a także immunosupresji[37-39]. Na przykład stwierdzono, że NE jest zaangażowana w proces tworzenia pułapek neutrofilowych (NETs, *ang.* ***N****eutrophil* ***E****xtracellular* ***T****raps*), czyli uwalnianiu DNA i tworzeniu struktury przypominającej pajęczynę, która zatrzymuje bakterie, ograniczając ich rozprzestrzenianie. Inne funkcje poszczególnych NSP w układzie odpornościowym to regulacja aktywności cytokin (TNF-α, IL-1β)[40], chemokin (IL-8)[41], receptorów komórkowych i czynników wzrostu (progranulina)[3, 9, 10, 42]. Badania przeprowadzone przez Fu i współpracowników wykazały, że 90% badanych chemokin i cytokin jest hydrolizowanych przez NSPs, w tym NE, CatG i PR3[43]. Hydroliza interleukin prowadzi do wzmocnienia lub zniesienia ich funkcji jako mediatorów[44]. Co więcej, niedawno aktywność dwóch NSPs: NE i CatG została powiązana z pyroptozą, zapalną śmiercią komórek, poprzez hydrolizę GSDMD [33, 45]. Ponadto poprzez proteolizę białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a także hydrolizę cząsteczek adhezyjnych niezbędnych do transmigracji, NSPs pełnią rolę w migracji neutrofilów przez komórki śródbłonka[4]. Rola NE w migracji neutrofilów polega na

hydrolizie molekuły adhezyjnej C z grupy JAM (ang. *junctional adhesion molecule C*, JAM-C)[46, 47]. Ponadto NSPs wykazują aktywność proteolityczną wobec receptorów sprzężonych z białkami G, co pozwala na wykrycie gradientów chemokin lub innych chemoatraktantów powstających w wyniku uszkodzenia tkanek lub obecności patogennych mediatorów migracji neutrofili. Co ważne, NSPs biorą udział w eliminacji nadmiaru neutrofilów w procesie zwanym efferocytozą[46].



Rysunek 3. Wybrane komórki układu odpornościowego posiadające niektóre proteazy z rodziny proteaz serynowych (NE, CatG, PR3, NSP4, GrA i GrB) i cysteinowych (MALT1), których badania zostały opisane w niniejszej rozprawie habilitacyjnej. Rysunek utworzony za pomocą programu BioRender.com.

Granzymy stanowią bardzo ciekawą grupę proteaz systemu immunologicznego. Są one ważnymi enzymami ekspresjonowanymi i funkcjonującymi w komórkach odporności wrodzonej, w tym PMNs i NKs. Ponadto ich aktywność wykazano również w komórkach adaptacyjnego układu odpornościowego, w tym CTLs i limfocytach B. W odpowiedzi na stymulację, na przykład patogenem, komórki NK lub T uwalniają granulki cytotoksyczne zawierające m.in. GrB. Mechanizm dostarczania GrB do komórek docelowych nie jest do końca poznany, ale najprawdopodobniej enzym ten jest dostarczany przez pory. Pory te są tworzone przez perforyny, które są glikoproteinami obecnymi w ziarnistościach cytotoksycznych NK i CTL (głównie $CD8^+$, ale także $CD4^+$)[48]. Rozpoznanie patogenu prowadzi do polaryzacji i degranulacji komórek efektorowych. Uwolnione perforyny polimeryzują w obecności jonów Ca^{2+} i tworzą pory błonowe o średnicy 10-14 nm, umożliwiające transport czynników cytotoksycznych[49, 50].

Po pokonaniu przez GrB bariery błony komórkowej komórki docelowej enzym ten jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w apoptozie atakowanej komórki, zarówno na drodze zależnej od kaspaz, poprzez aktywację kaspazy-3 (casp-3), jak i na drodze niezależnej od kaspaz poprzez hydrolizę laminy B lub substratów casp-3, w tym ICAM i Bid[51-53] **(Tab. 1)**.

W przeciwieństwie do GrB, GrA pełni rolę w indukowaniu apoptozy jedynie w sposób niezależny od kaspaz. Po translokacji GrA do jądra komórkowego kompleks SET ulega hydrolizie, co prowadzi do fragmentacji DNA w wyniku kaskady reakcji. Kaskada ta obejmuje trawienie inhibitora endonukleazy NM23-H1, hydrolizę białka HMGB2 (*ang. high mobility group protein B2*), endonukleazy apurynowej-1 (Ape1), Ku70 i polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1)[54, 55]. GrA wyzwala nie tylko apoptozę, ale również pyroptozę poprzez hydrolizę gazderminy B (GSDMB)[56, 57]. Podczas zapalenia GrA nasila odpowiedź immunologiczną poprzez hydrolizę propeptydu IL-1β i aktywację makrofagów do wydzielania cytokin IL-1β, IL-6, IL-8 i TNF-α[58] oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak fibronektyna, fibrynogen czy proteoglikany. GrA wpływa również na migrację aktywowanych CTL i komórek NK do ognisk zapalnych, gdzie stymulują one reakcje zapalne[59].

Tabela 1. Wybrane proteazy układu immunologicznego i ich główne funkcje.

Proteaza	Funkcja
Neutrofilowa elastaza	promuje adhezję makrofagów i produkcję cytokin poprzez szlak kinaza Src-integryny[60] pobudza wydzielanie IL-1β[61] reguluje aktywność cytokin z rodziny IL-1[62]
Proteinaza 3	hydroliza chemokin i cytokin[63]
Katepsyna G	hydroliza chemokin i cytokin[63]
Granzym A	aktywacja kompleksu SET (apoptoza) [54] hydroliza GSDMB (pyroptoza) [56] wzmacnia odpowiedź immunologiczną poprzez hydrolizę propeptydu IL-1β[59] aktywacja makrofagów do wydzielania cytokin[58] wpływa na migrację aktywowanych CTL i komórek NK
Granzym B	aktywacja kaspazy-3[64] hydroliza substratów kaspazy-3 (ICAM oraz Bid)[64] hydroliza laminy B[51-53]
MALT1	wzrost produkcji IL-2[65] wpływa na cytokiny IL-10 i TNF-α[65] aktywuje proliferację komórek T $CD4^+$ i $CD8^+$ [65]

Hydroliza prowadzona przez proteazy układu odpornościowego jest nieodwracalną reakcją, która prowadzi zarówno do ochrony organizmu przed patogenami, jak i może powodować wiele niepożądanych skutków. Gdy aktywność proteaz jest nadmierna i niekontrolowana, powoduje szkody w organizmie poprzez zmiany w szlakach sygnałowych. Dlatego układ odpornościowy wypracował własne mechanizmy regulacji proteaz, np. nadmierna liczba neutrofili o wysokim stężeniu NSPs jest usuwana z krążenia na drodze efferocytozy[47]. Ponadto, neutrofile są zaopatrzone w zestaw endogennych inhibitorów, w tym serpin, które hamując aktywność katalityczną proteaz, zapobiegają nadmiernej hydrolizie. Mimo że wieloetapowa regulacja układu odpornościowego jest bardzo złożona, niewielkie defekty regulacyjne mogą prowadzić do rozwoju różnych zaburzeń, w tym chorób autoimmunologicznych i niedoborów odporności. Z tego powodu proteazy są uważane za ważne

biologiczne markery diagnostyczne lub cele terapeutyczne przede wszystkim w immunologii. Jednak ze względu na ograniczenia technologiczne dokładna analiza ich aktywności zarówno w próbkach biologicznych, jak i w żywych organizmach jest często ograniczona.

Badania nad proteazami systemu immunologicznego

Enzymy proteolityczne układu odpornościowego, aby spełniać swoje role są rozprzestrzenione w całym organizmie. Pomimo wielu lat badań nad tymi enzymami i licznych bardzo istotnych odkryć, nadal brakuje dokładnej analizy większości funkcji znacznej ilości proteaz.

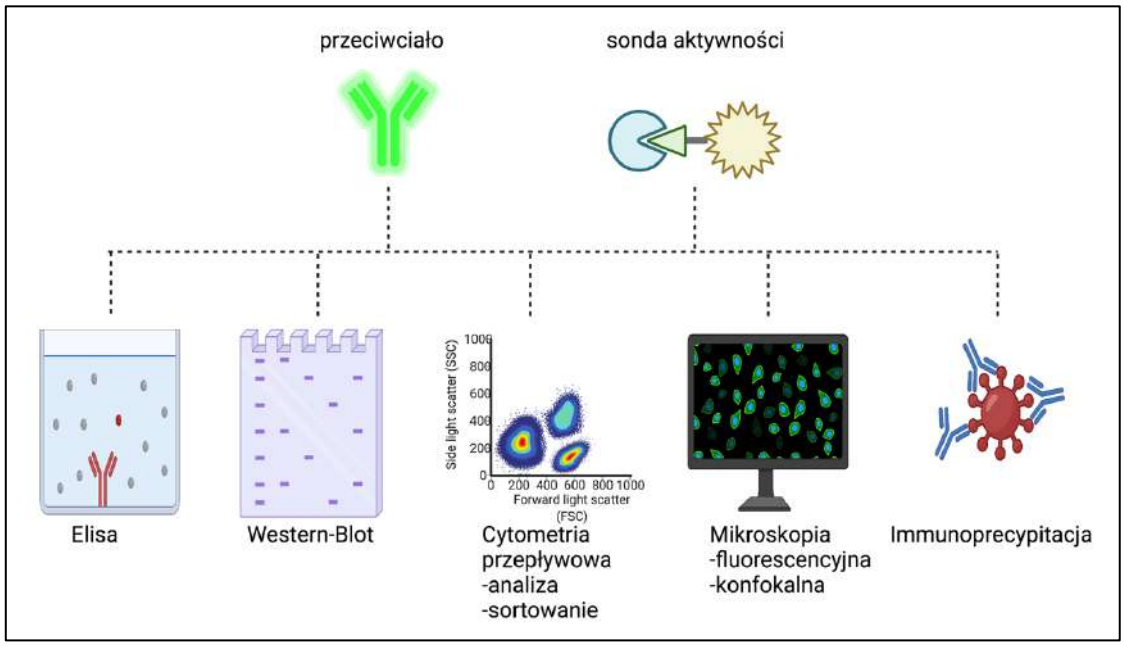
Zazwyczaj w celu badań wykonywanych nad rolą danej proteazy, doprowadza się do wyciszenia lub całkowitej delecji jej genów albo do modyfikacji jej struktury w badanych komórkach. Wszelkie zmiany, zwłaszcza w strukturze enzymów, wskazujące na różnice w funkcjonowaniu komórek i ich odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, świadczą o roli badanych proteaz tych w komórkach. Tego rodzaju analizy przeprowadza się również na zwierzętach laboratoryjnych. Na przykład, po modyfikacji genetycznej docelowego enzymu, takiego jak elastaza, analizuje się reakcję zwierząt na czynniki zewnętrzne, patogeny lub nowotwory, analizuje się inne białka, a także stopień ich hydrolizy[66]. Badania na zwierzętach w znacznym stopniu przyczyniły się do zrozumienia licznych procesów immunologicznych i nadal są jedną z najczęściej stosowanych metod. W szczególności są one ważne w badaniach nad komórkami szpiku kostnego, ponieważ trudno jest uzyskać ten materiał biologiczny do analiz od zdrowych dawców. Mimo że badania te są niezwykle czasochłonne, umożliwiły opracowanie wielu immunoterapii. Niestety, ze względu na różnice w budowie enzymów między poszczególnymi gatunkami, np. ludzki i mysi GrM mają różną specyficzność substratową[67], często badania na modelach zwierzęcych muszą być rozszerzone o próbki ludzkie (np. krew, mocz), ale ze względów etycznych nie zawsze są one dostępne.

Obecnie do analizy proteaz w próbkach uzyskanych z linii komórkowych, od zwierząt lub ludzi stosuje się kilka technik, które wykorzystują głównie przeciwciała (**Rys. 4**). Wśród nich najczęściej stosowana jest metoda Western-Blot, która polega na analizie białek w próbce na podstawie ich masy cząsteczkowej. W tej metodzie, dzięki znakowaniu immunologicznemu (znakowanie białek przy pomocy przeciwciał) i jeśli to konieczne zastosowaniu przeciwciał drugorzędowych znakowanych fluorescencyjnie, można monitorować hydrolizę białek przez proteazy, jak na przykład tworzenie N-końcowego GSDMD z GSDMD w procesie pyroptozy[32]. Ponadto, metodą tą można także analizować białka poddane immunoprecypitacji. Inną techniką badania proteaz jest cytometria przepływowa, w której badane komórki są znakowane, głównie fluorescencyjnymi przeciwciałami, a obecność i ilość badanych czynników jest analizowana jako intensywność sygnału zazwyczaj w postaci diagramu punktowego. Najnowsze cytometry dają możliwość dokładnej analizy lokalizacji sygnału w komórce, choć jest to nadal rzadko stosowana metoda ze względu na wysoki koszt aparatury. Zaletą cytometrii przepływowej jest to, że umożliwia analizę kilku czynników jednocześnie, a jedynym ograniczeniem jest dobre zaprojektowanie eksperymentu i wybór odpowiednich fluoroforów. Ponadto niektóre aparaty umożliwiają również sortowanie komórek na wybrane grupy np. w zależności od ilości czynników. Kolejną metodą analizy proteaz jest ELISA, która ułatwia wykrywanie białek docelowych w próbce przy użyciu przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych sprzężonych z odpowiednim enzymem. Ostatnią z najczęściej stosowanych metod analizy proteaz w układzie odpornościowym jest wykorzystanie

mikroskopii, głównie fluorescencyjnej lub konfokalnej, do lokalizacji białek znajdujących się w komórkach lub tkankach.

Warto zauważyć, że większość z powyższych metod wykorzystuje fluorescencję do wykrywania białek. Zasada działania fluorescencji opiera się na budowie cząsteczek chemicznych, zwanych cząsteczkami fluorescencyjnymi, zawierających elektrony, które mogą absorbować foton światła lub inne promieniowanie elektromagnetyczne powodując wzbudzenie elektronu i przejście do stanu o wyższej energii, w którym pozostają jedynie przez krótką chwilę[68]. Następnie wzbudzona cząsteczka traci energię w sposób niepromienisty lub poprzez emisję fotonu o niższej energii[68]. Taką emisję światła przez substancję można monitorować za pomocą specjalnego sprzętu laboratoryjnego.

Maksima długości fali wzbudzenia i emisji fluorescencji związków różnią się od siebie ze względu na zmiany energii, a różnica ta zwana jest przesunięciem Stokesa. Przesunięcie Stokesa, fotowybielanie, wydajność kwantowa, współczynnik wzbudzenia, jak również czas pomiędzy wzbudzeniem i emisją fotonu, zwany czasem życia fluorescencji, są najważniejszymi cechami analizowanymi podczas projektowania eksperymentów z użyciem fluoroforów w badaniach z zakresu nauk przyrodniczych[68]. Na przykład, im większe przesunięcie Stokesa, tym lepsza możliwość rozdzielenia sygnału pochodzącego ze źródła wzbudzającego fluorofor od emitowanego światła i mniejsza liczba wyników fałszywie dodatnich. Wykorzystując narzędzia fluorescencyjne w immunologii, możemy znakować DNA, RNA, enzymy, w tym kinazy, fosfatazy, proteazy, lipidy, a nawet organelle. Metodami fluorescencyjnymi w immunologii można monitorować nie tylko obecność, stężenie i lokalizację, ale także kontakt dwóch białek, zmiany ich aktywacji i inne właściwości.



Rysunek 4. Technologie wykorzystywane do badania proteaz w układzie odpornościowym w oparciu o metody immunochemiczne. Techniki te można również z łatwością zastosować w profilowaniu proteaz za pomocą sond chemicznych opartych na aktywności. Stworzono za pomocą programu BioRender.com.

Chociaż metody te są szeroko stosowane i dostarczają ogromnej ilości ważnych informacji na temat funkcjonowania układu odpornościowego, zwykle nie pozwalają odróżnić katalitycznie aktywnej od katalitycznie nieaktywnej formy enzymu proteolitycznego. Dlatego w niniejszej pracy skupiłam się na

opracowaniu metod, które umożliwiają takie rozróżnienie. Ponadto, ponieważ metody fluorescencyjne są powszechnie stosowane i charakteryzują się wysoką czułością, a większość laboratoriów ma dostęp do niezbędnego sprzętu umożliwiającego analizę fluorescencji, skupiłam się na cząsteczkach zwanymi sondami aktywności, które mogą być wykrywane metodami fluorescencyjnymi (Rys. 4).

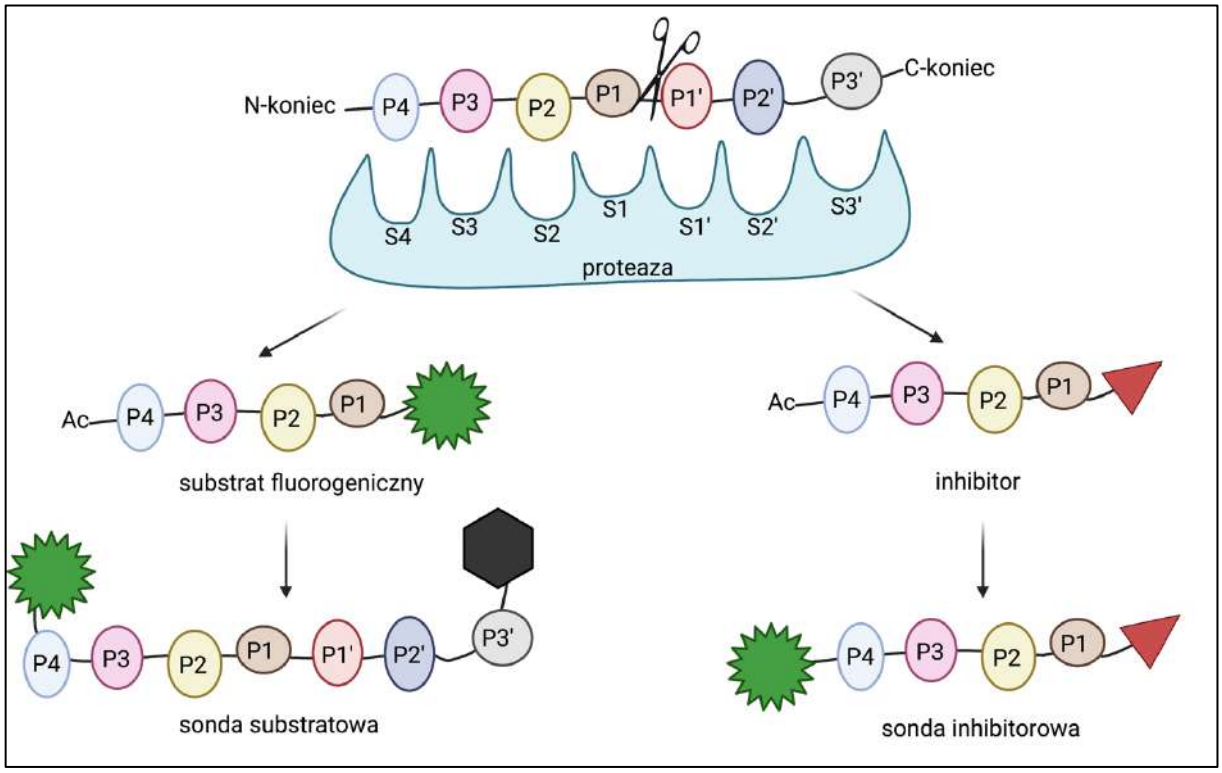
Substraty proteaz układu odpornościowego

Procesy w komórkach układu odpornościowego zachodzące przy udziale proteaz, takie jak kaskady aktywacji i transdukcja sygnału, są procesami specyficznymi. Oznacza to, że enzymy proteolityczne układu odpornościowego hydrolizują wybrane substraty peptydowe, co prowadzi do aktywacji lub zahamowania poszczególnych szlaków. Na przykład, NSPs mogą pozytywnie lub negatywnie regulować aktywację układu odpornościowego. Enzymy te z niezwykłą precyzją wpływają na aktywność cytokin, w tym IL-1α, IL-1β, IL-33, IL-36α, IL-36β oraz IL-36γ, które są mediatorami stanu zapalnego[62].

Specyficzność substratowa proteaz zależy od ich trójwymiarowej struktury, a dokładniej od właściwości aminokwasów oddalonych od siebie w pierwszorzędowej strukturze enzymu, które w strukturze trzeciorzędowej tworzą wgłębienia lub platformy, zwane kieszeniami, otaczającymi miejsce aktywne. Kieszenie wiążące enzymu zgodnie z nomenklaturą Schechtera i Bergera[69] są oznaczane literami Sx-S1...S1'-Sx', gdzie Sx oznacza kieszeń wiążącą zlokalizowaną na N-końcu, a Sx' - na C-końcu hydrolizowanego wiązania amidowego (peptydowego). Odpowiadające im reszty aminokwasowe w peptydzie zwane są odpowiednio Px-P1...P1'-Px' (Rys. 5).

Kieszenie wiążące enzymu mają indywidualny charakter chemiczny, który zależy od obecności i właściwości reszt aminokwasowych skierowanych do wnętrza tych struktur. Na przykład, dostęp do kieszeni wiążącej S1 w NE jest ograniczony obecnością 2 reszt waliny (Val), dlatego enzym ten hydrolizuje wiązania peptydowe tylko po małych aminokwasach alifatycznych, takich jak alanina (Ala) lub Val, podczas gdy na dnie kieszeni wiążącej S1 w NSP4 znajduje się ujemnie naładowana reszta aminokwasowa umożliwiająca wiązanie reszt zasadowych, takich jak arginina (Arg) [34, 70].

Proteazy mogą mieć wąskie lub szerokie preferencje katalityczne, np. kaspazy hydrolizują wyłącznie po resztach kwasu asparaginowego (Asp), a proteasom rozpoznaje więcej aminokwasów i hydrolizuje po resztach treonina (Thr), Asp i fenyloalanina (Phe)[71]. Dlatego specyficzność substratową proteaz określa się mianem ich odcisku palca i jest ona jedną z najważniejszych cech tych enzymów. Jest to kluczowy czynnik nie tylko w biologii proteaz, ale także w projektowaniu cząsteczek chemicznych oddziałujących z tymi enzymami, w tym leków i markerów chemicznych.



Rysunek 5. Schemat kieszeni wiążących enzymu, według nomenklatury Schechtera i Bergera[69], oznaczonych jako S4-S3' i reszt aminokwasowych substratu oznaczonych jako P4-P3'. Określenie specyficzności substratu jest kluczowe do opracowania substratów, inhibitorów i sond aktywności proteaz. Stworzono za pomocą programu BioRender.com.

Biorąc pod uwagę, że niektóre proteazy układu odpornościowego rozpoznają i przetwarzają te same substraty (np. GSDMD), to w zależności od czynnika indukującego, np. patogenu, mogą one aktywować ten sam (jeśli hydroliza następuje w tym samym miejscu) lub inny (jeśli hydroliza następuje w innym miejscu) szlak sygnałowy[32, 33], dlatego też badania nad preferencjami katalitycznymi proteaz stanowią bardzo duże wyzwanie. W związku ze znaczącą rolą jaką odgrywają proteazy, w ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci intensywnie zajmowano się określaniem ich specyficzności substratowej. Prowadzone badania miały/mają na celu rozwiązanie czterech głównych problemów: (1) zrozumienie roli poszczególnych proteaz w szlakach sygnałowych, (2) znalezienie naturalnych substratów proteaz, (3) opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych do lokalizacji proteaz oraz (4) dostarczenie wiodących sekwencji do opracowywania leków[71]. Obecnie dostępnych jest wiele różnych strategii do badania substratów proteaz i pozwalają one na dogłębną analizę kieszeni wiążących substraty, a wybór metody zależy od celu jaki chemy osiągnąć. Wśród najczęściej stosowanych technik określania specyficzności wyróżnia się m.in. strategie oparte o metody proteomiki lub chemii[72].

Proteomika ułatwia poszukiwania naturalnych substratów białkowych hydrolizowanych przez docelowy enzym, a tym samym wskazuje na ich potencjalną rolę w przekazywaniu sygnału i funkcjonowaniu komórki. Wyróżniamy dwa typy proteomiki poznawczą i ukierunkowaną. Ta pierwsza to zazwyczaj badania typu „shotgun", w których nie jest konieczne oddzielanie białek w próbce przed trawieniem, co pozwala zbadać fizjologiczną hydrolizę substratów oraz otrzymać profile specyficzności, podczas gdy proteomika ukierunkowana jest stosowana zazwyczaj w badaniach nad biomarkerami. Jednak w tych strategiach stosuje się wyłącznie produkty naturalne, dlatego określenie dokładnej

specyficzności substratowej badanego enzymu i uzyskanie specyficznych sekwencji wiodących są ograniczone. PICS (ang. *proteomic identification of protease cleavage sites*) to jedna z często stosowanych metod proteomicznych i pozwala na określenie miejsc hydrolizy w peptydach/białkach, jednak wykorzystanie enzymów proteolitycznych do generowania bibliotek peptydowych może dodatkowo dostarczać niewłaściwych wyników, które trzeba uważnie analizować. Dlatego też metody proteomiczne często stanowią jedynie punkt wyjścia do dalszych badań nad substratami badanych proteaz[71]. Z tego powodu do badania specyficzności substratowej proteaz częściej stosuje się metody chemiczne, które są skuteczne w optymalizacji struktury wiodącej cząsteczek do badań proteaz. Niemniej jednak nie dostarczają one informacji o substratach fizjologicznych, a skorelowanie uzyskanych wyników ze zdarzeniami fizjologicznymi jest bardzo trudne. Pomimo tego, techniki chemiczne pozwalają na natychmiastowe przekształcenie sekwencji peptydowej w inne cząsteczki chemiczne takie jak inhibitory i sondy, które są z powodzeniem stosowane w badaniach nad lokalizacją peptydaz, ich rolą fizjologiczną i funkcjami jakie pełnią w chorobach. W niniejszej rozprawie skupiłam się przede wszystkim na metodach chemicznych do badań specyficzności substratowej peptydaz, a zwłaszcza na strategiach opartych na niewielkich cząsteczkach, gdyż właśnie takie były wykorzystywane w badaniach składających się na tę pracę.

Pierwsze próby badania specyficzności substratowej proteaz metodami chemicznymi podjęto już kilkadziesiąt lat temu, wymieniając poszczególne aminokwasy w peptydowych substratach badanego enzymu[73]. Strategia taka może być stosowana w poszukiwaniu narzędzi chemicznych dla proteaz, ale jest ona czasochłonna i kosztowna, gdyż wszystkie uzyskane związki są indywidualnie syntetyzowane i oczyszczane. Efektem tego było wprowadzenie chemii kombinatorycznej do poszukiwania sekwencji wiodących cząsteczek chemicznych dla badanych enzymów. Chemia kombinatoryczna ułatwia równoległą syntezę, a następnie analizę strukturalnie powiązanych cząsteczek chemicznych i dostarcza wiarygodnych wyników przy znacznej oszczędności czasu oraz odczynników[74]. Wśród wielu technik można wyróżnić dwie główne strategie kombinatoryczne. Pierwsza z nich to strategia "dziel i mieszaj", w której łańcuchy peptydowe są wydłużane wybranymi aminokwasami, a uzyskane związki są mieszane i dzielone na równe porcje, w których peptydy są ponownie wydłużane, mieszane i dzielone, a cały proces jest powtarzany aż do uzyskania produktu końcowego o pożądanej długości. W celu zidentyfikowania selektywnych sekwencji biblioteka takich peptydów jest poddawana reakcji z badanym enzymem, a także innymi enzymami. Takie podejście zastosowano w poszukiwaniu sekwencji selektywnych dla niektórych proteaz serynowych układu odpornościowego, w tym PR3, NE i CatG, a także dla kilku metaloproteaz[72].

Inne podejście chemiczne do badania specyficzności substratowej polega na zastosowaniu mieszanin izokinetycznych w celu uzyskania równomolowej mieszaniny aminokwasów w danej pozycji Px w bibliotekach peptydowych[75, 76]. Ze względu na właściwości chemiczne poszczególnych aminokwasów, tworzą one wiązania peptydowe z różnym powinowactwem, dlatego w takiej mieszaninie ilość każdego aminokwasu jest zróżnicowana i dostosowana tak, aby uzyskać równą liczność każdego aminokwasu po przyłączeniu do peptydu[75, 76]. Takie podejście jest wykorzystywane w metodzie PS-SCL (skanowanie pozycyjne kombinatorycznych bibliotek substratów, ang. *Positional Scanning Synthetic Combinatorial Library*), w której sekwencja peptydowa jest znakowana na C-końcu cząsteczką fluorogeniczną[77], a także w bibliotekach substratowych IQF (substraty z wewnętrznie wygaszoną fluorescencją, ang. *Internally Quenched Fluorescence*), w których peptydy zawierają donor i akceptor fluorescencji[78]. Metoda PS-SCL została po raz pierwszy zastosowana przez grupę Thornberry do określenia specyficzności substratowej kaspaz i granzymów i od tego czasu była wielokrotnie

wykorzystywana do badania specyficzności substratowej proteaz serynowych i cysteinowych[74]. Metoda PS-SCL może być stosowana do badania peptydów o różnej długości, ale najczęściej analizowane są związki tetrapeptydowe. Aby zbadać sekwencje tetrapeptydowe, klasyczna sekwencja wiodąca jest tworzona z dwóch mieszanin izokinetycznych, jednego określonego, identycznego w całej bibliotece aminokwasu w pozycji P1, zależnie od preferencji enzymu docelowego (na przykład Asp dla kaspaz i granzymu B; Arg dla trypsyny, GrA i NSP4) i jednego określonego aminokwasu w badanej pozycji zmiennego dla każdej podbiblioteki[74]. Sekwencja peptydowa jest zakończona związkiem fluorogenicznym [zwykle 7-amino-4-karbamoilometylokumaryną (ACC) lub 7-amino-4-metylokumaryną (AMC)], który po hydrolizie substratu przez docelową proteazę umożliwia badanie proteolizy jako przyrostu fluorescencji wykrywanego spektrofluorymetrycznie. Największy stopień hydrolizy odpowiada najwyższemu przyrostowi fluorescencji w czasie. Podobnie jest w bibliotekach substratów FRET/IQF, w których sekwencja peptydowa jest otoczona parą donora i akceptora fluorescencji, a szybkość proteolizy jest proporcjonalna do szybkości przyrostu fluorescencji w czasie[79].

Dzięki bibliotekom PS-SCL znaleziono selektywne sekwencje dla kilku peptydaz, jednak strategia ta okazała się niewystarczająca dla enzymów o szerokiej specyficzności substratowej lub proteaz o podobnych preferencjach katalitycznych, jak to miało miejsce w przypadku NE i PR3. Dlatego w zespole prof. Marcina Drąga wraz z dr Marcinem Poręba wzbogaciliśmy biblioteki PS-SCL o szeroką gamę nienaturalnych aminokwasów, a technologię nazwaliśmy hybrydową kombinatoryczną biblioteką substratów (HyCoSuL). Nieograniczona ilość zastosowanych modyfikacji aminokwasów pozwala na lepsze dopasowanie sekwencji peptydowej do kieszeni wiążących enzymu, co prowadzi do uzyskania bardziej selektywnych substratów[80]. Jednym z głównych mankamentów PS-SCL i HyCoSuL jest to, że umożliwiają one badania nieprimowanych kieszeni docelowej proteazy, podczas gdy biblioteki FRET/IQF pozwalają na badanie zarówno pozycji primowanych, jak i nieprimowanych. Dlatego podczas mojej pracy podoktorskiej, poszukując czułych sond substratowych dla proteaz układu odpornościowego, rozszerzyłam swoje badania o biblioteki IQF wykorzystując szeroką gamę nienaturalnych aminokwasów.

Po starannym projektowaniu, walidacji i określeniu specyficznej sekwencji peptydowej, można ją przekształcić w (1) sondę opartą na aktywności substratu poprzez wymianę fluoroforu lub zastosowanie pary fluorescencyjnej donor-akceptor lub (2) w sondę opartą na aktywności inhibitora poprzez dołączenie fragmentu reaktywnego, wiążącego się w centrum aktywnym proteazy (ang. *warhead*) i znacznika fluorescencyjnego (Rys. 5), co zostało opisane w niniejszej pracy habilitacyjnej (H1-H8).

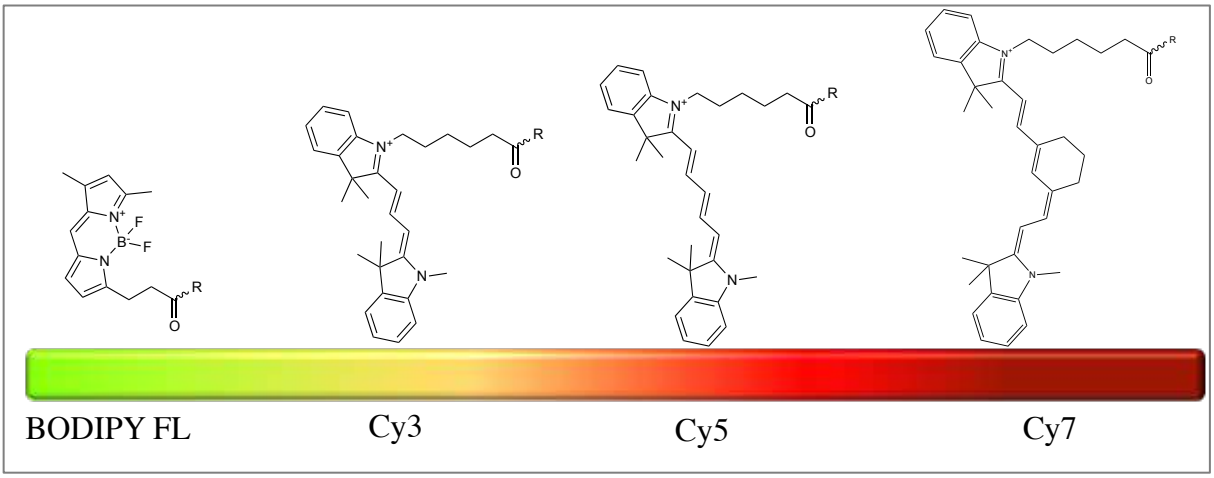
Sondy chemiczne do badań aktywności proteaz – rodzaje i zastosowanie

Mając na uwadze znaczenie proteaz w układzie odpornościowym oraz obecne ograniczenia w ich analizie, w ramach niniejszej pracy habilitacyjnej postawiłam sobie za cel opracowanie narzędzi do badań aktywności wybranych proteaz układu immunologicznego. Enzymy proteolityczne uczestniczą w wielu kaskadach reakcji uruchamiając złożone procesy, a dokładne wyjaśnienie ich roli jest wielkim wyzwaniem[31, 71]. Proteazy układzie immunologicznym pełnią kluczowe funkcje, gdy są w formie aktywnej, podczas gdy zymogeny zwykle nie odgrywają znaczącej roli, dlatego krytyczne jest oznaczanie aktywności enzymów, a nie poziomu ich ekspresji.

W niniejszej rozprawie skupiłam się na badaniach proteaz układu immunologicznego za pomocą nowych, celowanych i selektywnych metod wykorzystujących zmiany fluorescencji spowodowane aktywnością enzymatyczną do badania aktywnych proteaz. Fluorescencja jest niezwykłą właściwością niektórych cząsteczek chemicznych, w tym sond chemicznych, pozwalającą na nieinwazyjne monitorowanie białek/enzymów w złożonych systemach biologicznych, co sprawia, że narzędzia te znajdują zastosowanie w wielu badaniach naukowych. Dlatego też opracowanie nowych strategii do badań aktywności proteolitycznej enzymów w układach biologicznych opierających się o fluorofory lub wykorzystujących do analizowany techniki fluorescencyjne, jest jedną z najważniejszych gałęzi chemii biologicznej.

Ilość strategii do badania proteaz opartych na fluorescencji rośnie z każdym dniem i są one wykorzystywane do analiz obecności i lokalizacji proteaz w komórkach, jak i w całych organizmach. Zdecydowana większość z tych metod bazuje na immunochemii, gdzie do znakowania proteaz wykorzystuje się przeciwciała, które mogą być od razu połączone z fluoroforem lub takie, które wymagają zastosowania drugorzędowego, fluorescencyjnie wyznakowanego przeciwciała, umożliwiającego odczyt fluorescencji, wskazując na obecność badanego białka. Obie te metody są stosowane od dziesięcioleci i zapewniają nieocenione narzędzia w biologii komórki. Zdecydowana większość technik opierających się o przeciwciała jest bardzo selektywna i pozwala na wykorzystanie szerokiej gamy komercyjnie dostępnych znaczników fluorescencyjnych i dostarcza wartościowych informacji o wielu białkach. Jednakże immunochemia koncentruje się na badaniu całkowitej ilości białek bez rozróżnienia zymogenów, zahamowanych białek oraz katalitycznie aktywnych form i dlatego metody te nie są polecane do bezpośredniego monitorowania aktywności enzymów.

Pierwsze próby poszukiwania struktur chemicznych do badania aktywności proteaz serynowych podjęto trzy dekady temu. Pierwsza generacja sond aktywności (ABPs) zbudowana była z trzech głównych fragmentów, w tym (1) z elektrofila, czyli grupy reagującej, zwanej również z języka angielskiego warhead, która wiąże się kowalencyjnie w miejscu aktywnym proteazy, (2) z sekwencji peptydowej, umożliwiającej specyficzne wiązanie z docelowym enzymem oraz (3) ze znacznika powinowactwa, którym była biotyna[81]. Warto zauważyć, że grupa reagującą może służyć jako dodatkowy czynnik zwiększający specyficzność poprzez wiązanie jedynie z określoną rodziną proteaz. Przykładowo, grupy reaktywne takie jak 4-chloroizokumaryna, fluorofosfoniany, difenylofosfoniany lub alkilo-arylofosfoniany selektywnie wiążą się z proteazami serynowymi, a acyloksymetyloketony (AOMK) selektywnie wiążą się z resztami cysteiny w miejscu aktywnym proteaz cysteinowych[82]. Sondy pierwszej generacji znakowane biotyną były stosowane do badań proteaz w lizatach komórkowych oraz do izolacji i oczyszczania proteaz, ale nie były używane do obrazowania ich lokalizacji. Jako znaczniki w ABPs, zamiast biotyny można stosować radioizotopy. Na przykład w prostej reakcji jodowania, ^{125}I może być przyłączony do N-końca inhibitora. Kompleks enzymu z sondą wyznakowaną radioizotopem może być analizowany za pomocą elektroforezy i wykrywany za pomocą audioradiografii. Ze względu na niską stabilność takich związków znakowanie radioizotopami zostało zastąpione innymi strategiami[83]. I tak w późniejszym okresie biotynę lub radioizotopy zastąpiono wygodniejszymi w użyciu i łatwiejszymi w detekcji cząsteczkami fluorescencyjnymi, umożliwiającymi bezpośrednie wykrywanie docelowego enzymu, skracając czas przygotowania i analizy próbek. Spośród szerokiej gamy fluoroforów, najczęściej stosowane są pochodne cyjaniny, TAMRA i BODIPY FL oraz ich pochodne[83] (Rys. 6).



Rysunek 6. Wybrane znaczniki fluorescencyjne stosowane w markerach chemicznych do badań proteaz. Częściowo zaadaptowano z publikacji H6.

Nieustannie rośnie ilość proponowanych nowych metod do badania aktywności katalitycznej proteaz, wśród których można wyróżnić dwie główne strategie, które są obecnie najczęściej stosowane i dostarczają najbardziej wiarygodnych wyników. Zalicza się do nich wykorzystanie sond chemicznych, których struktura oparta jest na peptydowych inhibitorach (sondy inhibitorowe, ABPs) lub substratach (sondy substratowe, sABPs) (**Rys. 7**). Ze względu na wiązanie kowalencyjne w miejscu aktywnym proteazy, klasyczne fluorescencyjne lub biotynylowane ABPs charakteryzują się niskim ryzykiem dyfuzji, dlatego mogą być z powodzeniem stosowane do detekcji enzymów w próbkach przy pomocy większości znanych już analiz wykorzystywanych w immunologii takich jak Western-Blot, cytometria przepływowa, czy mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna. Poprzez wiązanie kowalencyjne, intensywność sygnału jest proporcjonalna do ilości zablokowanych miejsc aktywnych enzymu, dlatego ABP mogą być z powodzeniem stosowane do ilościowego oznaczania enzymów jak i do monitorowania nawet niewielkich zmian ich aktywności. Z drugiej strony, nieodwracalne wiązanie i zahamowanie aktywności proteaz może prowadzić do zaburzenia normalnego funkcjonowania komórek. Ponadto, jeśli użyte stężenie sondy jest wyższe od stężenia aktywnego enzymu i jej nadmiar nie zostanie usunięty, to może to prowadzić do fałszywie pozytywnego odczytu podczas niektórych analiz takich jak cytometria przepływowa czy analizy mikroskopowe, dlatego wyniki uzyskane przy użyciu tych sond zawsze muszą być zwalidowane. Nie stanowi to jednak problemu w przypadku analiz kinetycznych lub Western-Blot, ponieważ nadmiar sondy nie zmienia parametrów kinetycznych, a niezwiązana sonda inaczej migruje podczas SDS-Page.

Aby rozwiązać ten problem, w badaniach proteaz cysteinowych grupa Bogyo zaprojektowała inhibitorową sondę aktywności z wygaszoną fluorescencją (qABP)[84]. Podobnie jak w klasycznym ABP, sonda ta składa się z elektrofilowego fragmentu wiążącego (*ang. warhead*), z peptydowej sekwencji wiążącej się w kieszeniach enzymu, z fluoroforu oraz z tzw. wygaszacza fluorescencji, dołączonego do „warheada" (AOMK). W takim podejściu, fluorescencja niezwiązanej sondy jest wygaszana przez cząsteczkę akceptora w wyniku transferu energii, a po związaniu sondy w miejscu aktywnym enzymu fluorescencja jest uwalniana (**Rys. 7 B**), podczas gdy akceptorem fluorescencji może być albo inny związek fluorescencyjny albo tzw. ciemny wygaszacz. W przypadku dwóch fluoroforów, dzięki rezonansowemu przeniesieniu energii Förstera (FRET), następuje transfer energii między cząsteczkami donora i akceptora fluorescencja może być wydetektowana i po hydrolizie peptydu następuje zmiana długości fali fluorescencji, podczas gdy po zastosowaniu czarnych wygaszaczy fluorescencja jest

niewykrywalna aż do momentu hydrolizy. To interesujące podejście zostało z powodzeniem zastosowane w badaniach proteaz cysteinowych przy użyciu Western-Blot i mikroskopii fluorescencyjnej lub konfokalnej, dostarczając informacji o lokalizacji i aktywności badanych proteaz[84, 85].

Tabela 2. Wady i zalety różnych typów sond do badania aktywności proteaz. Zaadaptowano z H6[83].

Typ sondy / Cecha lub zastosowanie	ABP		qABP	sABP
	Biotynylowana sonda inhibitorowa	Fluorescencyjna sonda inhibitorowa	Sonda inhibitorowa z wygaszoną fluorescencją	Sonda substratowa
Wiązanie kowalencyjne	TAK	TAK	TAK	NIE
Badania ilościowe	TAK	TAK	TAK	NIE
Do obrazowania utrwalonych próbek	TAK	TAK	TAK	TAK
Do badań przyżyciowych	NIE	TAK */NIE	TAK	TAK
Do bezpośredniej detekcji w żelu	NIE	TAK	TAK	NIE
Do Western-Blot	TAK	TAK	TAK	NIE
Do cytometrii przepływowej	TAK	TAK	TAK	TAK
Do mikroskopii fluorescencyjnej	TAK	TAK	TAK	TAK
Do izolacji enzymów	TAK	NIE	NIE	NIE
Małe ryzyko dyfuzji	TAK	TAK	TAK	NIE
Do badań in vitro	TAK	TAK	TAK	TAK
Do badań in vivo	NIE	TAK	NT**	TAK
Wpływ na funkcjonowanie komórki	TAK	TAK	TAK	NIE

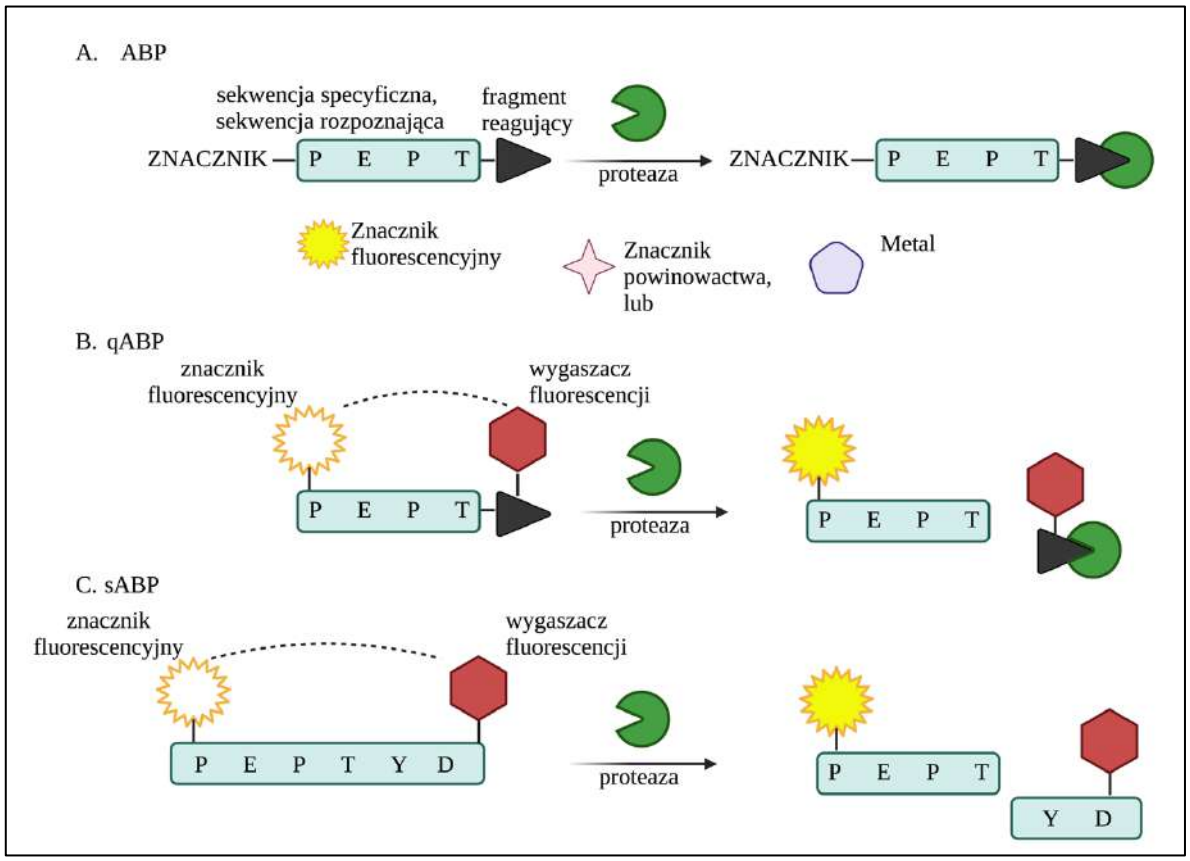
* W pewnych warunkach

** NT – nie testowane

Pomimo niezliczonych zalet qABP i ABP, posiadają one właściwości inhibicyjne i mogą zaburzać normalne funkcjonowanie komórek, a więc ich zastosowanie jest ograniczone jedynie do pewnych analiz. Dlatego też zaproponowano nową strategię wykorzystującą sABP **(Fig. 7C)**. Sondy sABP zbudowane są z sekwencji specyficznej, która umożliwia selektywną hydrolizę, otoczonej parą donora-akceptora fluorescencji, podobnie jak w przypadku qABP, ale sABP nie jest zaopatrzona w elektrofilowy fragment wiążący się w centrum katalitycznym enzymu. Zamiast tego sekwencja peptydowa jest wydłużona o reszty po primowanej stronie od miejsca hydrolizy lub o linker, taki jak PEG lub Ahx. Dzięki temu, że takie sondy nie hamują aktywności enzymu, są one stale hydrolizowane proporcjonalnie do liczby obrotów enzymu, co wzmacnia sygnał i ułatwia wykrywanie hydrolizy. Dlatego sondy te mogą być wykorzystywane do obrazowania enzymów w komórkach, a także w całym organizmie oraz w badaniach przyżyciowych, umożliwiając monitorowanie zmian aktywności badanej proteazy[83]. Wadą tego typu sond jest to, że źle zaprojektowane mogą ulegać dyfuzji z miejsca hydrolizy, a nawet z całej komórki. Aby

obejść to ograniczenie, do sABP przyłącza się fragment lipidowy lub dołącza dodatkowe zasadowe aminokwasy[83, 86]. Czasami wystarczy jednak umieszczenie fluorofora na C-końcu sondy, gdyż po hydrolizie nowo utworzony N-koniec, obdarzony ładunkiem dodatnim, ogranicza dyfuzję[87]. Największą wadą sABP jest ich niska selektywność. Biorąc pod uwagę, że grupa reagująca ABP może selektywnie wiązać się do jednej z grup, np. do proteaz serynowych lub do cysteinowych, jej obecność zmniejsza możliwość niespecyficznej hydrolizy w porównaniu do sABP. Dlatego staranny wybór fragmentu specyficznego, wiążącego się w kieszeniach enzymów, jest jednym z najważniejszych czynników podczas projektowania sABP. Wszystkie wady i zalety dostępnych sond chemicznych, jak również zasady ich projektowania zostały opisane w mojej pracy przeglądowej zatytułowanej: *„Peptidyl Activity-Based Probes for Imaging Serine Proteases”* [83] (Tabela 2).

Większość dostępnych sond chemicznych do badania aktywności proteaz charakteryzuje się niską selektywnością. Kiedy rozpoczynałam staż podoktorski, sondy do badania aktywności kluczowych proteaz układu odpornościowego były niedostępne, dlatego zdecydowałam się na podjęcie tematu i zaproponowałam kilka rozwiązań opisanych w następnym rozdziale tej habilitacji.



*Rysunek 7. Sondy chemiczne do badania aktywności proteaz. A) fluorescencyjna, biotynylowana lub znakowana metalem sonda **ABP** i B) inhibitorowa sonda z wygaszoną fluorescencją, wiążą się kowalencyjnie z miejscem aktywnym enzymu. Kompleks fluorescencyjnej sondy z enzymem można wykryć po wzbudzeniu próbki przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub za pomocą cytometrii przepływowej, natomiast kompleks biotynylowana sonda-enzym można wykryć za pomocą białka wiążącego biotynę (streptawidyna lub awidyna) sprzężonego ze znacznikiem fluorescencyjnym. Kompleks sonda znakowana metalem-enzym jest wykrywany za pomocą radiografii. C. Fluorescencja substratowa sondy może być odczytana jedynie po proteolizie. Stworzono za pomocą programu BioRender.com.*

Opis osiągnięcia naukowego

Wstęp

Podczas mojego stażu podoktorskiego koncentrowałam się na badaniu aktywności proteaz układu odpornościowego przy użyciu sond chemicznych. W tym czasie byłam zaangażowana w kilka powiązanych tematycznie projektów, koncentrujących się na opracowaniu chemicznych metod do badania aktywności wybranych proteaz znajdujących się w komórkach układu odpornościowego, w tym neutrofilowych proteaz serynowych: elastazy (NE), katepsyny G (CatG), proteinazy 3 (PR3) i neutrofilowej serynowej proteinazy 4 (NSP4); proteaz komórek NK, -T i -B: granzymu A oraz granzymu B (GrA i GrB); proteazy makrofagów: MALT1. Habilitacja ta jest efektem interdyscyplinarnych badań i połączenia wiedzy z zakresu chemii peptydów, którą zdobyłam w trakcie studiów doktoranckich, podczas których skupiałam się na poszukiwaniu specyficznych substratów dla proteaz oraz wiedzy z zakresu biologii komórki, zwłaszcza komórek układu odpornościowego, którą zdobyłam w trakcie stażu podoktorskiego w laboratorium biologicznym.

Podczas moich studiów doktoranckich, wspólnie z dr Marcinem Porębą, pod kierunkiem prof. hab. Marcina Drąga, opracowaliśmy strategię HyCoSuL, którą po raz pierwszy opisaliśmy w 2014 roku[80, 88]. Strategia ta stanowiła przełom w poszukiwaniu specyficznych substratów dla proteaz, dlatego postanowiłam zastosować ją w moich późniejszych badaniach opisanych w tej pracy w poszukiwaniu specyficznych sond chemicznych, które zastosowałam do badań enzymów w układach biologicznych. Podczas moich badań podoktorskich strategia HyCoSuL została wykorzystana jako medium w poszukiwaniu sond chemicznych do wykrywania i monitorowania aktywności proteaz układu odpornościowego w komórkach, a nawet w całych organizmach.

Moim nadrzędnym celem było opracowanie uniwersalnych technologii, które umożliwią selektywne badanie aktywności proteolitycznej wybranych proteaz za pomocą ogólnodostępnego sprzętu w niemal każdym laboratorium biologicznym, opierających się o detekcję fluorescencji. Techniki fluorescencyjne mają wiele zalet, które czynią je niezwykle pożądanymi w badaniach z zakresu nauk przyrodniczych. Po pierwsze, istnieje ogromny wybór dobrze zwalidowanych fluoroforów, które pozwalają na elastyczność i dopasowanie do prawie wszystkich urządzeń, które mogą wykrywać fluorescencję. Fluorescencja może być wykorzystywana do wykrywania pojedynczych białek w próbce, ale także w komórkach i całych organizmach przy użyciu spektrometrów, mikroskopów, skanerów do obrazowania analiz Western-Blot i cytometrów przepływowych. W cytometrii przepływowej można jednocześnie monitorować do 19 różnych czynników, podczas gdy w mikroskopii konfokalnej można wyodrębnić około pięciu fluoroforów w tej samej próbce.

W ramach tej habilitacji przedstawiam nie tylko szczegółowe opracowanie sond chemicznych do badania aktywnych enzymów proteolitycznych układu odpornościowego, ale także ich zastosowanie w „podglądaniu" proteaz. Cząsteczki te zostały z powodzeniem zastosowane w badanych wybranych komórek układu odpornościowego i umożliwiły m.in. (1) odkrycie nierównomiernej lokalizacji aktywnych proteaz serynowych w ziarnistościach neutrofili oraz (2) wykazanie, że powstawanie NETs jest niezależne od NSPs.

Opis szczegółowy

Część 1: Wybrane neutrofilowe serynowe proteazy

Neutrofile zawierają wiele proteaz, z których szczególną rolę w ich funkcjonowaniu odgrywają proteazy serynowe (NE, CatG, PR3 i NSP4)[2, 34], a także tzw. enzymy sieroce należące do grupy granzymów[89]. Granzymy występują jednak w większych ilościach w innych komórkach układu odpornościowego i dlatego zostały opisane w *Części 3 Opisu szczegółowego*.

H1: Kasperkiewicz P, Poręba M, Snipas SJ, Lin SJ, Kirchhofer D, Salvesen GS, Drąg M✉, Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4, PLoS One 2015, 10, 1. (IF 3.057, MNiSW: 100 punktów (numer na liście: 16237), Cytowania: 41)

Badania przedstawione w tym manuskrypcie są pierwszymi z serii powiązanych ze sobą projektów opisanych w tej rozprawie i dotyczą opracowania markera chemicznego dla NSP4. Realizacja projektu odbywała w dwóch ośrodkach naukowych. Chemiczna część badań została wykonana na Politechnice Wrocławskiej (WUST), a badania biochemiczne zostały wykonane podczas mojego pierwszego stażu podoktorskiego, w laboratorium prof. Salvesena w SBP Medical Discovery Institute, USA, finansowanego przez *Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach projektu SKILLS finansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Priorytet IV, Szkolnictwo wyższe i nauka, Działanie 4.2. Rozwój kwalifikacji kadr badawczo-rozwojowych i wzrost świadomości roli nauki we wzroście gospodarczym).* Finansowanie stażu uzyskałam samodzielnie, w otwartym konkursie.

Neutrofilowe serynowe proteazy (NSPs), takie jak NE, CatG oraz PR3, zostały odkryte kilkadziesiąt lat temu i są enzymami proteolitycznymi znajdującymi się w ziarnistościach neutrofilii. Ludzka neutrofilowa serynowa proteinaza 4 (NSP4), znana również jako PRSS57, jest niedawno odkrytym enzymem należącym także do grupy NSPs[34, 90]. NSPs są zaangażowane w odpowiedź immunologiczną, a we wrodzonym układzie odpornościowym działają jako czynniki pierwszej linii obrony przed patogenami, będąc jednymi z najbardziej rozprzestrzenionych i występujących w wysokich stężeniach enzymów w organizmie[3]. Podczas gdy NE, CatG i PR3 były wielokrotnie zbadane, podczas gdy informacje o NSP4 są nieliczne. Wiadomo, że ewolucyjnie NSP4 pojawiło się przed pozostałymi NSPs, co sugeruje, że enzym ten może odgrywać podobną do nich rolę[34, 90, 91]. Pod względem preferencji katalitycznych NE, PR3 i CatG posiadają raczej szeroką specyficzność w kieszeni S1, hydrolizując po małych aminokwasach alifatycznych (NE, PR3) lub dużych resztach hydrofobowych (CatG), podczas gdy NSP4 posiada wyraźną preferencję do Arg w tej kieszeni[2, 34]. Preferencje NSP4 w S1 są zaskakujące, gdyż pod względem strukturalnym otoczenie miejsca aktywnego NSP4 sugeruje specyficzność elastazopodobną, podczas gdy NSP4 posiada specyficzność trypsynową. Wyjaśnieniem tego fenomenu może być struktura krystaliczna 3D NSP4, w której widać, że kieszeń S1 jest przesłonięta, a substrat zawierający w P1-Arg przyjmuje niekanoniczną konformację[92]. Substrat zawierający w P1-Arg, posiada dodatnio naładowaną grupę guanidynową łańcucha bocznego Arg, która jest stabilizowana w kieszeni S1 przez sieć wiązań wodorowych. Specyficzność substratowa NSP4 w pozostałych kieszeniach została

częściowo zbadana przy użyciu substratów IQFs, jednak ze względu na ograniczoną liczbę zastosowanych aminokwasów niewiele wiadomo na temat preferencji NSP4. Dlatego też, wspólnie z prof. Marcinem Drągiem, postanowiliśmy dokładnie to zbadać, aby uzyskać selektywne narzędzie do monitorowania NSP4.

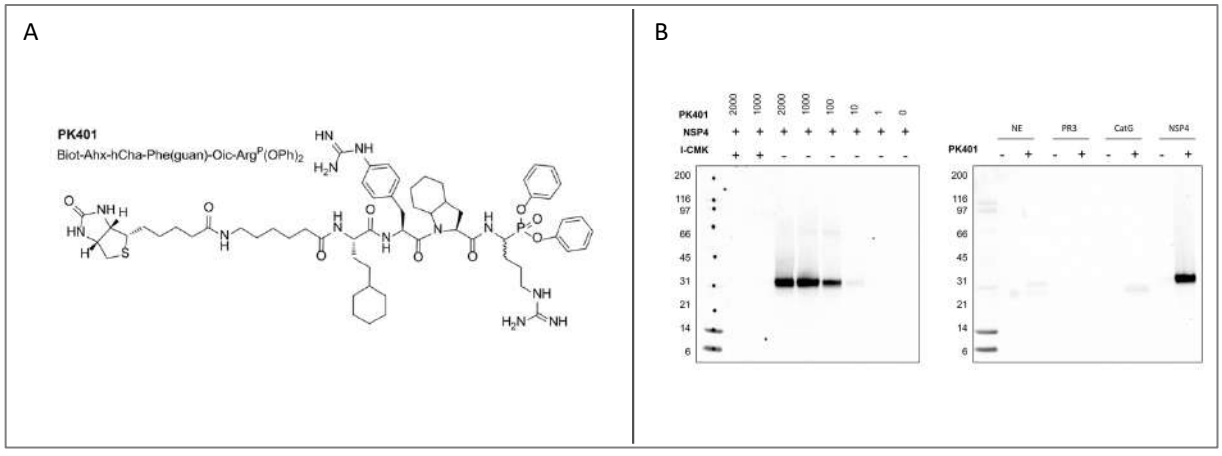
Do badań nad NSP4 istnieje tylko jedno komercyjnie dostępne przeciwciało i jeden nieselektywny substrat[33]. Biorąc pod uwagę fakt, że NSP4 w neutrofilach stanowi tylko 5% wszystkich NSPs, jej badanie przy użyciu dostępnych narzędzi stanowiło wyzwanie[33], dlatego poszukiwanie specyficznego i silnie wiążącego się markera dla NSP4 było w pełni uzasadnione.

W celu określenia sekwencji struktury wiodącej dla markera NSP4 zastosowano opracowaną wcześniej w naszym zespole technologię określania specyficzności substratowej HyCoSuL. W pierwszym etapie badań, wraz z moim kolegą z laboratorium dr Marcinem Porębą, zsyntetyzowaliśmy bibliotekę P1-Arg HyCoSuL, która składała się z 3 podbibliotek Ac-P4-X-X-Arg-ACC, Ac-X-P3-X-Arg-ACC i Ac-X-X-P2-Arg-ACC, gdzie X to równomolowa mieszanina naturalnych aminokwasów (z wyłączeniem Cys i Met, uzupełniona o norleucynę (Nle)), a Px - to zdefiniowana reszta aminokwasowa. Do uzyskania biblioteki użyto szerokiej gamy 101 nienaturalnych aminokwasów zawierających wiele modyfikacji strukturalnych i mających różny charakter chemiczny, w tym pochodne Pro, duże i małe reszty alifatyczne lub reszty obdarzone ładunkiem, aby zwiększyć ilość potencjalnych oddziaływań w kieszeniach S4-S2 enzymu. Tego typu analiza została wykonana po raz pierwszy dla NSP4, dlatego wszystkie warunki wymagały optymalizacji. W pierwszym etapie dobrałam warunki do analiz kinetycznych, w tym stężenie enzymu i substratów oraz dokonałam wyboru buforu. Następnie samodzielnie przeprowadziłam badania przesiewowe biblioteki i przeanalizowałam dane. Badania te wykazały, że kieszeń S4 NSP4 jest stereospecyficzna, ponieważ rozpoznaje tylko L-aminokwasy. Co więcej, wykazałam, że jeden z nienaturalnych aminokwasów, homocykloheksyloalanina (hCha) jest najlepiej rozpoznawana w tej pozycji przez NSP4, w porównaniu do najlepszej naturalnej reszty aminokwasowej, Arg. Na tej podstawie wywnioskowałam, że kieszeń S4 jest obszerna i może pomieścić duże hydrofobowe reszty aminokwasowe. Co ciekawe, kieszeń S3 rozpoznaje wiele różnych reszt aminokwasowych jednak z preferencją do Phe(guan), co jest wspólną cechą członków rodziny proteaz trypsynopodobnych, w których aminokwasy budujące kieszeń S3 są eksponowane na działanie rozpuszczalnika. Natomiast kieszeń S2 wykazuje szeroką specyficzność substratową, z preferencjami zarówno do naturalnych i nienaturalnych reszt, w tym proliny (Pro), waliny (Val), alaniny (Ala), leucyny (Leu), cykloheksyloalaniny (Cha), homofenyloalaniny (hPhe), fenyloglicyny (Phg) i kwasu oktahydroindolokarboksylowego (Oic). Zastosowanie szerokiej gamy nienaturalnych aminokwasów w bibliotece pozwoliło na określenie rozszerzonej specyficzności substratowej NSP4 i wybór najbardziej preferowanych reszt w badanych pozycjach.

Zsyntetyzowany przeze mnie substrat znajduje zastosowanie do badań biochemicznych NSP4, natomiast do bardziej zaawansowanych badań na komórkach lub żywych organizmach nie jest najlepszym rozwiązaniem. Dlatego w kolejnym kroku skupiłam się na zaprojektowaniu sondy do monitorowania NSP4 do badań biologicznych. W pierwszym kroku, bazując na uzyskanych wynikach badań przesiewowych HyCoSuL, zaprojektowałam sekwencję peptydową ABP tak, aby sonda ta była selektywna. W kolejnym kroku sprawdziłam potencjalną reaktywność krzyżową najlepszego substratu Ac-hCha-Phe(guan)-Oic-Arg-ACC z innymi proteazami serynowymi znajdującymi się w ziarnistościach neutrofilii. Okazało się, że wybrana sekwencja jest selektywna dla NSP4, a wartość k_{cat}/K_M wynosi 32 000 $M^{-1}s^{-1}$, dlatego też sekwencja ta została wybrana do uzyskania selektywnego ABP. Specyficzny substrat

został przekształcony w ABP poprzez zastąpienie znacznika fluorogenicznego ACC elektrofilową grupą reagującą (difenylofosfonian), która wiąże się nieodwracalnie w miejscu aktywnym enzymu. Dodatkową zaletą wybranego fragmentu reagującego jest to, że wiąże się wyłącznie z proteazami serynowymi, a więc działa również jako czynnik zwiększający selektywność[93]. Aby umożliwić monitorowanie enzymu, fragment acetylowy substratu został zastąpiony biotyną dołączoną do N-końca peptydu za pomocą linkera. W opisywanej pracy przedstawiłam szczegółową ścieżkę syntezy markera chemicznego. W skrócie, synteza została podzielona na dwie części obejmujące (1) syntezę biotynylowanego peptydu (Biot-Ahx-P4-P2) na żywicy chlorotritylowej oraz (2) wieloetapową syntezę fragmentu reagującego H_2N-$Arg^P(OPh)_2$. Następnie oba fragmenty (1) i (2) sprzęgnięto w roztworze, otrzymując Biot-Ahx-hCha-Phe(guan)-Oic-$Arg^P(OPh)_2$ (PK401) (**Rys. 8A**).

Po zakończeniu tej części badań przeniosłam się do Sanford-Burnham Medical Discovery Institute w Ja Jolla, w Kalifornii, USA, aby przeprowadzić bardziej szczegółowe analizy biochemiczne NSP4. Ponieważ dobre narzędzie do badań enzymów musi wiązać się jedynie z enzymem docelowym w naturalnym środowisku, dlatego w kolejnym kroku sprawdziłam selektywność PK401 używając innych enzymów, które można znaleźć w neutrofilach. Ze względu na to, że wybrany fragment reagujący wiąże się tylko z proteazami serynowymi, potencjalną reaktywność krzyżową testowano tylko względem neutrofilowych proteaz serynowych, w tym NE, PR3 i CatG. Wykazano duże parametry kinetyczne PK401 względem NSP4 (k_{obs}/I wynosi $3{,}8 \times 10^6$ $M^{-1}s^{-1}$), a także jego wysoką selektywność. Wyniki te zostały potwierdzone przez inne analizy biochemiczne sondy PK401 z NSP4 i opisane ze szczegółami w tym manuskrypcie. W skrócie, po inkubacji enzymu z PK401 i analizach SDS-PAGE, a następnie Western-Blot wykazano, że nie dochodzi do wiązania PK401 z NSP4 w obecności kowalencyjnego inhibitora tego enzymu, co potwierdza, że sonda wiąże się w miejscu aktywnym NSP4 (**Rys. 8B**). Co więcej, stosując tak niskie stężenie markera jak 10 nM wykryto aktywność NSP4, co świadczy o tym, że marker ten może być stosowany do badań enzymów o niewielkim stężeniu w środowisku naturalnym, jak jest w przypadku NSP4. Kluczową cechą sondy PK401 jest jej selektywność, która została potwierdzona analizą Western-Blot w obecności wszystkich NSPs, a w połączeniu z wysokimi parametrami kinetycznymi wiązania sondy z NSP4, wywnioskowano, że jest to bardzo dobre narzędzie do badania NSP4 (**Rys. 8B**).



Rysunek 8. Detekcja NSP4 za pomocą PK401. A. Struktura PK401. B. Lewy panel: NSP4 inkubowano z PK401 (od 1 do 2000nM) i analizowano metodą Western-Blot, wykazując użyteczność PK401 w wykrywaniu NSP4 i wiązanie sondy w miejscu aktywnym enzymu. Prawy panel: NSPs inkubowano z lub bez PK401 i analizowano metodą Western-Blot, wykazując specyficzne wiązanie PK401 z NSP4. Rysunek zaadaptowany z Rysunku 3 i Rysunku 4 z [88].

PODSUMOWANIE:

- *Zsyntetyzowano i scharakteryzowano pierwszy selektywny substrat oraz niskocząsteczkowy marker chemiczny dla NSP4,*
- *PK401 wiąże się selektywnie z aktywną NSP4,*
- *PK401 może być wykorzystany do badań funkcji NSP4 w komórkach.*

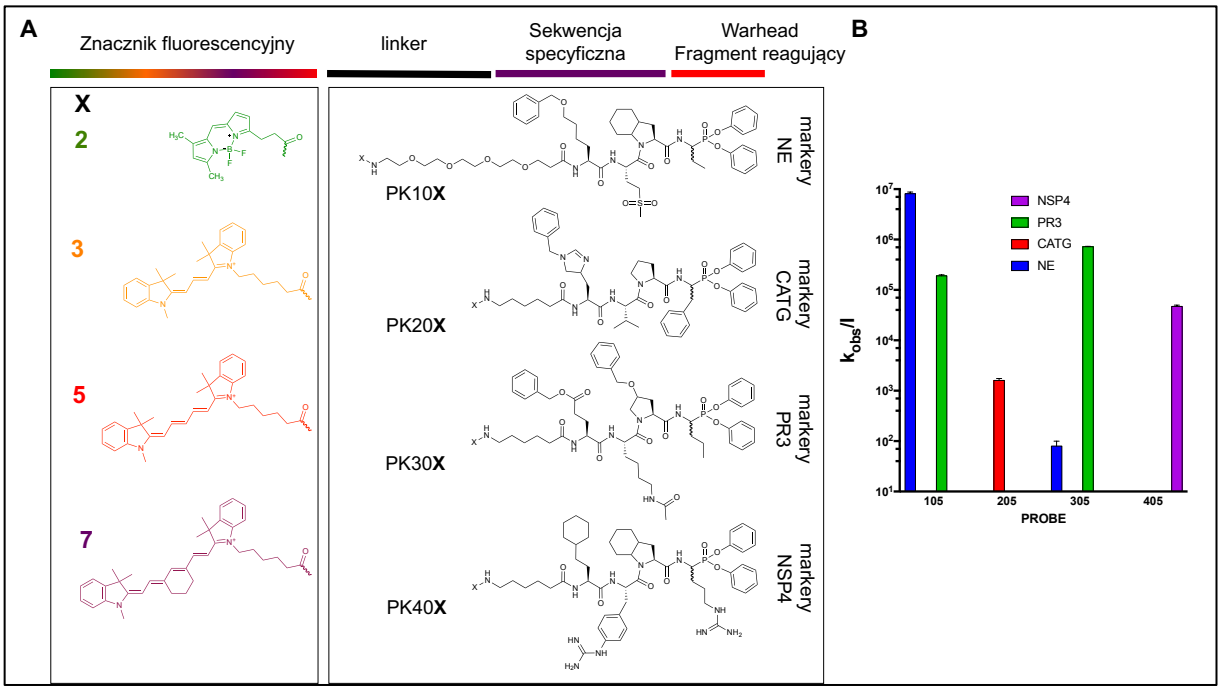
H2: Kasperkiewicz P✉, Altman Y, D'Angelo M, Salvesen GS✉, Drąg M✉, A toolbox of fluorescent probes for parallel imaging reveals uneven location of serine proteases in neutrophils, Journal of the American Chemical Society 2017, 139, 10115. (IF 14.357; MNiSW 200 punktów (numer na liście: 12811); Cytowania 53)

Wyniki badań zaprezentowane w publikacji **H1** wykonane podczas mojego pierwszego stażu naukowego w laboratorium prof. Salvesena w SBP Medical Discovery Institute, USA zachęciły mnie do kontynuowania badań nad aktywnymi enzymami układu odpornościowego, a w szczególności nad neutrofilowymi serynowymi proteazami. Enzymy te są badane od kilku dekad, jednak wszystkie badania koncentrowały się na poziomie ich ekspresji, a nie aktywności, ze względu na brak precyzyjnych narzędzi. W niniejszej pracy nie tylko uzyskałam selektywne narzędzia dla NSPs, ale także wykazałam nierównomierną lokalizację NSPs w ziarnistościach neutrofili, co zmienia dotychczasowy paradygmat o równomiernie wypełnionych ziarnistościach azurofili i wpływa na sposób postrzegania biologii neutrofilii.

Wszystkie syntezy chemiczne na potrzeby tego projektu przeprowadziłam w WUST. Następnie rozpoczęłam drugi staż podoktorski w SBP Medical Discovery Institute w USA w laboratorium prof. Salvesena, gdzie wspólnie projektowaliśmy i analizowaliśmy eksperymenty biologiczne i biochemiczne, które samodzielnie wykonywałam. Publikacja ta jest jedną z najważniejszych w mojej dotychczasowej pracy naukowej, a także w tej habilitacji i z całą pewnością stanowi kamień milowy w mojej karierze naukowej.

Rola neutrofilowych serynowych proteaz, takich jak NE, CatG i PR3 w układzie odpornościowym była badana od dziesięcioleci, ale ich dokładna aktywność i rola pozostawały niejasne. Dotychczas stosowane metody badania aktywności NSPs były nieselektywne, na przykład najlepsza cząsteczka do badania NE zawierała niespecyficzną sekwencję Ala-Ala-Pro-Val, która jest także rozpoznawana przez PR3[2]. Biorąc pod uwagę kluczowe funkcje NSPs w aktywacji, ale także w hamowaniu odpowiedzi układu odpornościowego, uznałam, że istotne jest dostarczenie rozwiązania do badania aktywnej formy tych enzymów. W tym celu zaprojektowałam strukturę markerów chemicznych, posiadających następujące cechy: (1) będą wiązały się kowalencyjne w miejscu aktywnym proteaz serynowych, (2) będą selektywne i silnie wiążące się z docelowym enzymem oraz (3) umożliwią łatwą detekcję (fluorescencja) i równoległe obrazowania NSPs w neutrofilach. Dlatego też, sondy NSPs zostały zaopatrzone w (1) reagującą grupę elektrofilową jaką jest difenylofosfonian, specyficzny dla proteaz serynowych, (2) selektywną peptydową sekwencję dla NE, PR3, CatG lub NSP4 oraz (3) jeden z czterech fluoroforów BODIPY FL, Cy3, Cy5 lub Cy7, charakteryzujących się minimalnym stopniem nałożenia widm emisji i wzbudzenia fluorescencji.

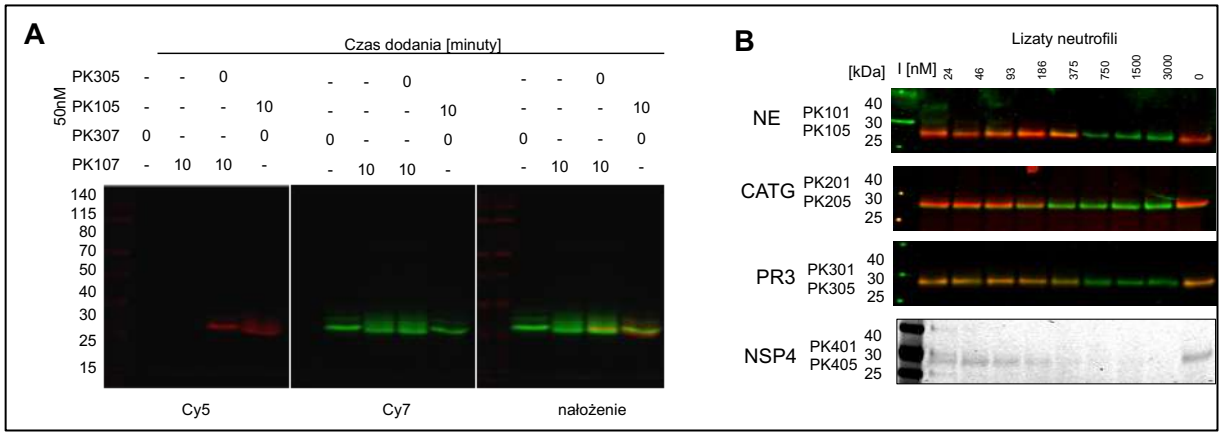
We wcześniejszych badaniach opisanych w publikacji **H1** wykazaliśmy, że zastosowanie strategii HyCoSuL, zawierającej nienaturalne aminokwasy, w poszukiwaniu specyficznej i wysoce aktywnej sondy dla NSP4 zakończyło się sukcesem, dlatego wdrożyliśmy tę strategię do profilowania wszystkich NSPs aby znaleźć wiodącą sekwencję dla ich sond chemicznych (zwanych markerami chemicznymi). Specyficzność substratowa NE została przeze mnie określona w trakcie moich studiów doktoranckich, a następnie opisana i opublikowana w 2014 roku w PNAS[94], dlatego w tej pracy (**H2**) skupiłam się przede wszystkim na specyficzności PR3 i CatG. Ze względu na nakładające się preferencje katalityczne NE i PR3, do profilowania PR3 wykorzystałam bibliotekę dedykowaną dla NE, natomiast dla CatG wspólnie z dr Marcinem Porębą zsyntetyzowałam bibliotekę HyCoSuL z Phe w P1. Dzięki temu uzyskałam profile specyficzności substratowej czterech NSPs i zaprojektowałam i zsyntetyzowałam fluorogeniczne substraty tak, aby ich sekwencja była optymalna pod względem aktywności oraz selektywności. Projektując markery chemiczne, skupiłam się nie tylko na selektywności sekwencji wiodących, ale także na ich sile oddziaływania z enzymem. Są to kluczowe czynniki w badaniach biologicznych, ponieważ niektóre enzymy są aktywne tylko przez krótki czas, po czym ulegają inaktywacji. Aby znaleźć optymalne sekwencje, zsyntetyzowałam serię substratów i wybrałam struktury wiodące. Jako elektrofil wybrałam estry difenylofosfonianowe z różnymi podstawnikami, zgodnymi z preferencjami katalitycznymi poszczególnych enzymów. Difenylofosfoniany mimikują naturalne aminokwasy, wiążą się kowalencyjnie w miejscu aktywnym proteaz serynowych i charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w osoczu. Przy wyborze fluoroforów kierowałam się ich dostępnością, wydajnością, fotostabilnością, przepuszczalnością przez błony komórkowe i minimalnym nakładaniem się widm emisji oraz wzbudzenia. Zsyntetyzowałam szesnaście sond (**Rys. 9A**), stosując strategię obejmującą zarówno syntezę peptydów na podłożu stałym, jak i sprzęganie peptydów w roztworze.



Rysunek 9. A. Struktury otrzymanych ABP. Zaprojektowałam i zsyntetyzowałam 16 sond fluorescencyjnych, które są zakodowane w oparciu o N-końcowy znacznik fluorescencyjny (X) i sekwencję specyficzną dla poszczególnych NSPs, jak wskazano w prawym panelu. B. Stałe szybkości inhibicji drugiego rzędu dla sond NSPs. Słupki błędów S.D. z powtórzeń biologicznych mieściły się w granicach 10% średniej. Rysunek częściowo zaadaptowano z H2.

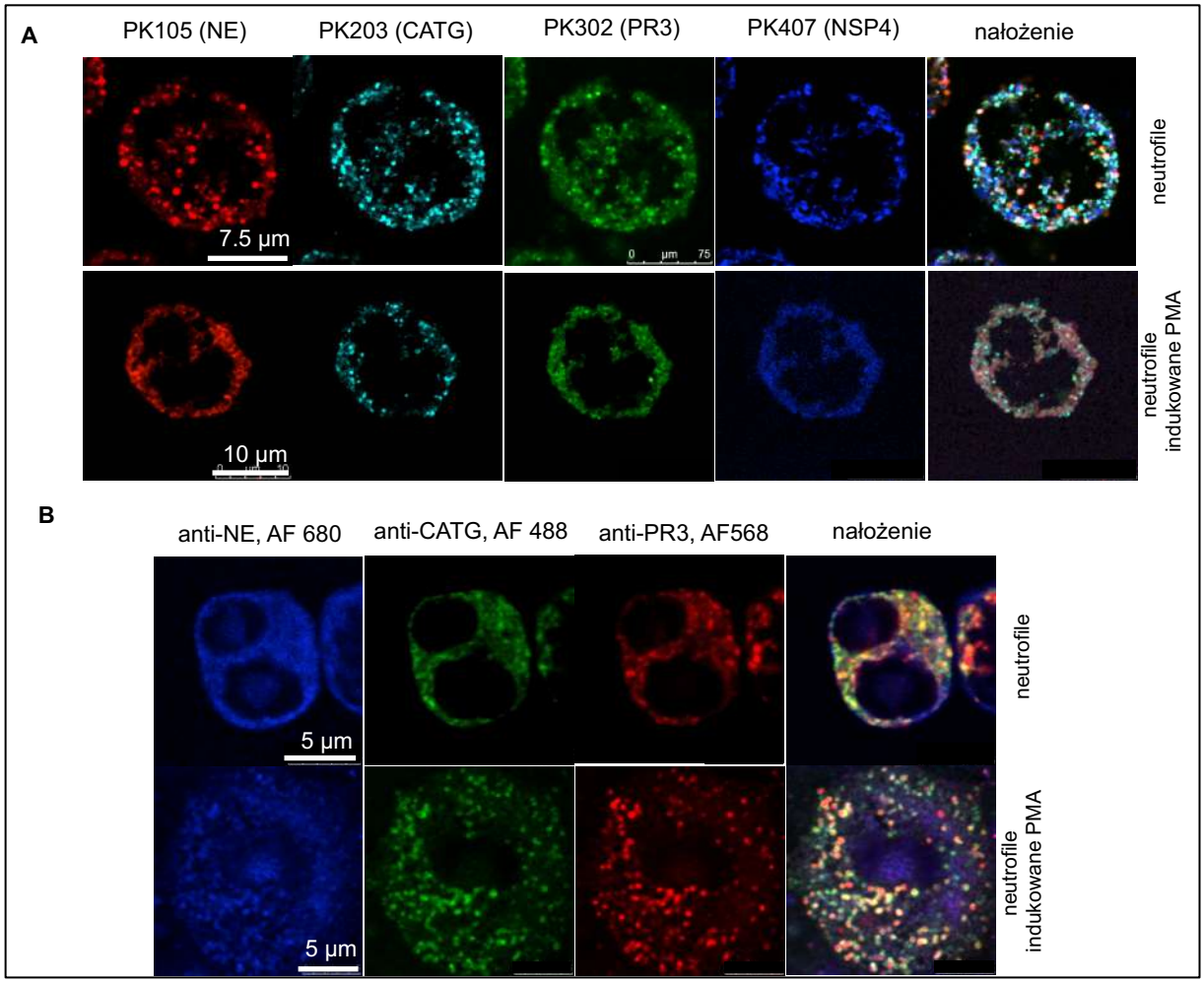
Po syntezie sond w WUST pozostałe badania przeprowadziłam w laboratorium prof. Salvesena w USA. Badania zaczęłam od sprawdzenia, czy moje wcześniejsze założenia dotyczące selektywności i siły działania markerów były prawidłowe. W tym celu przetestowałam wszystkie sondy NSPs (w sumie 16) względem wszystkich czterech NSPs i zgodnie z oczekiwaniami wykazywały one wysoką siłę działania (2,3-7,6 × 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ dla NE, 1,4-4,3 × 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ dla CatG, 1,4-7,8 × 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ dla PR3 oraz 3,8 × 10^6 – 4,0 × 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ dla NSP4) i selektywność wobec docelowych NSPs, z wyjątkiem sondy dla NE, która również wiązała się z PR3. Ze względu na to, że w badaniach komórowych nawet minimalna reaktywność krzyżowa może stanowić problem, aby sprawdzić, czy sonda NE może być stosowana w badaniach biologicznych, zbadałam selektywność sond znakowanych Cy5 na mieszaninie NSPs, mimikując warunki naturalne. W tym badaniu potwierdziłam całkowitą selektywność sond dla PR3, CatG i NSP4 oraz wykazałam, że w przypadku braku NE, sonda jej dedykowana oddziaływała również z PR3. Wyniki te zostały potwierdzone inna analizą, wykorzystując immunoprecypitację. Dlatego też zaproponowałam inne rozwiązanie, aby selektywnie wyznakować NE i najpierw wyznakowałam PR3 specyficzną sondą, a po inhibicji PR3 znakowałam próbki NE (Rys. 10A). Strategia ta została następnie przetestowana na lizatach neutrofili i wykazałam, że wstępne znakowanie PR3 pozwala na skuteczną i specyficzną detekcję innych NSPs, w tym NE. Co więcej, wykazałam, że w obecności NE sondy z serii PK10X wiążą się preferencyjnie z tym enzymem, a nie z PR3 (Rys. 10A).

Na tamtą chwilę nie dokonano ilościowej analizy aktywnych NSPs, ze względu na brak specyficznych odczynników do tego typu badań. Dlatego też w kolejnym kroku zaproponowałam zmierzenie stężenia aktywnych NSPs w lizatach neutrofili wykorzystując nasze sondy fluorescencyjne w analizie Western-Blot (Rys. 10B). Po raz pierwszy oszacowałam stężenie aktywnych NSPs w lizatach neutrofili, potwierdzając niezwykle niskie stężenie NSP4. Wiedza ta jest kluczowa do projektowania przyszłych eksperymentów biologicznych i badań neutrofilowych enzymów, w których pożądane jest całkowite zahamowanie enzymu.



Rysunek 10. Specyficzność markerów NSPs oraz ich zastosowanie w badaniach komórkowych.
A) Reaktywność sond PK105 i PK107 w ekstraktach neutrofilii. Sondy PK307 i PK305 dodawano w czasie = 0 (linie 1, 3, 4), a następnie po 10 minutach inkubacji dodawano sondy PK105 lub PK107 (linie 2, 3, 4). Próbki inkubowano przez dodatkowe 10 minut i analizowano za pomocą SDS-PAGE. Wykazano, że seria PK10X wiąże się preferencyjnie z NE w próbkach biologicznych. B) Miareczkowanie lizatów neutrofilii. Lizaty traktowano serią PKX01 (ABPs znakowane biotyną) jako inhibitorami (I, zielony) w różnych stężeniach przez 45 minut, a następnie dodawano sondy fluorescencyjne (czerwony) i przeprowadzano dodatkową inkubację. Dla NE, CATG i PR3 wykonano dodatkową analizę przy użyciu przeciwciał. Rysunek przygotowano na podstawie Rysunku 3 w pracy H2.

Co więcej, nowe cząsteczki pokonują barierę błony komórkowej, gdzie znakują one docelowe NSPs co potwierdzono immunochemicznie przy użyciu przeciwciał. Ponadto, zastosowanie selektywnych inhibitorów spowodowało brak wiązania się sond zarówno z docelowymi enzymami, jak i innymi białkami, potwierdzając wiązanie w miejscu aktywnym oraz sugerując użyteczność sond w badaniach komórkowych. Analizy te prowadziły do wniosku, że uzyskane markery mogą być odpowiednie do obrazowania aktywnych NSPs w środowisku komórkowym.

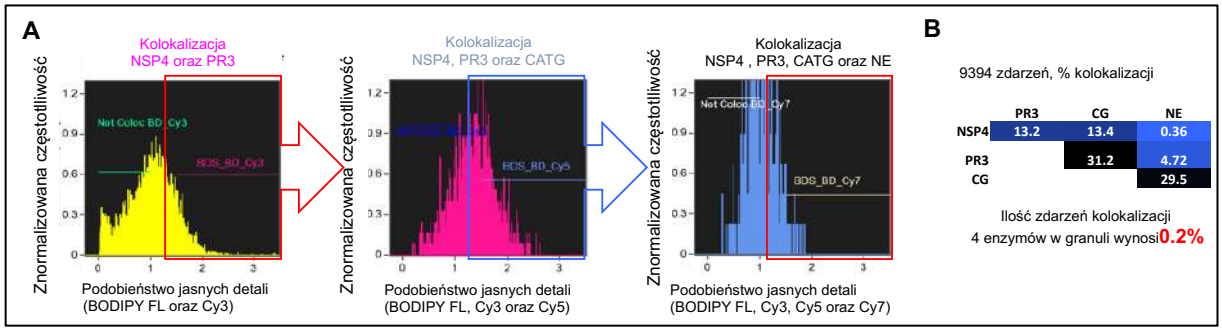


Rysunek 11. Nierównomierne rozmieszczenie aktywnych NSPs w ziarnistościach neutrofilów. A) Świeżo wyizolowane neutrofile inkubowano z lub bez PMA i ze wskazanymi sondami, podczas gdy zaprezentowane w panelu B, indukowane lub nie neutrofile znakowano przeciwciałami dla trzech poszczególnych NSPs, w tym anty-NE, anty-PR3 i anty-CatG, a następnie przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fluoroforami. Próbki z części A i B zostały zobrazowane przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Obrazy reprezentują wyniki z próbek od 3 dawców. Zaadaptowano z pracy H2.

Ówczesny stan wiedzy wskazywał na obecność NSPs w ziarnistościach azurofilii, ale nie skupiano się na ich lokalizacji, a jedynie zakładano ich kolokalizację. Ponadto nie badano lokalizacji wszystkich NSPs w aktywnej formie w neutrofilach. Dlatego w następnym kroku, dysponując specyficznymi, przepuszczalnymi przez błonę komórkową i bardzo szybkimi narzędziami chemicznymi dla NSPs, zbadałam dokładne zależności lokalizacji aktywnych NSPs w neutrofilach. W tym celu zastosowałam cztery ABPs dedykowane poszczególnym enzymom, znakowane różnymi fluoroforami o nienakładających się widmach emisji i wzbudzenia. Aby ograniczyć możliwość niespecyficznego

wiązania się sondy NE, zaproponowałam zastosowanie wcześniej już przeze mnie opracowanego i sprawdzonego sekwencyjnego znakowania przy jednoczesnym zastosowaniu niskiego stężenia sond, które nie przekraczało ilości aktywnego enzymu w komórce. Po wyizolowaniu neutrofili z krwi obwodowej, potraktowałam je sondami, przemyłam, utrwaliłam i zabezpieczyłam przed fotowybielaniem. Tak przygotowane próbki przeanalizowałam za pomocą mikroskopu konfokalnego i wykazałam, że NSPs są nierównomiernie rozmieszczone zarówno w granulach jak i pomiędzy poszczególnymi neutrofilami z tego samego preparatu (**Rys. 11A**). Odkrycie to było nieoczekiwane i sprzeczne z dotychczasowymi hipotezami o lokalizacji NSPs w ziarnistościach, dlatego jako dodatkową kontrolę wykonałam immunoznakowanie uzyskując analogiczne wyniki (**Rys. 11B**). Co więcej, podobnej obserwacji dokonałam w neutrofilach z indukowaną NETozą (z PMA) (**Rys. 11A, dolny panel**). Celem walidacji wyników, przygotowałam próbki do analizy metodą cytometrii przepływowej, która pozwoliła na ilościową ocenę kolokalizacji NSPs w ziarnistościach neutrofilów. Wykorzystując analizę podobieństwa jasnych szczegółów wykazaliśmy, że tylko 0,2% całkowitej liczby ziarnistości zawiera wszystkie NSPs, podczas gdy większość ziarnistości posiada pojedyncze enzymy (**Rys. 12**).

Odkrycie to jest istotne w kontekście poszukiwania roli poszczególnych proteaz w neutrofilach, ponieważ wszystkie dotychczasowe badania skupiały się na kolokalizacji wszystkich NSPs w granulkach. Nierównomierna dystrybucja NSPs może mieć kluczowe znaczenie w stanach patofizjologicznych z udziałem NSPs i może wskazywać na potencjalne cele medyczne. Przykładowo obecnie testuję przydatność tego zestawu narzędzi w monitorowaniu NSPs we krwi obwodowej pacjentów z neutropenią, w ramach projektu TEAM-Net, w którym jestem liderem zespołu. Ponadto, te zaskakujące wyniki dały solidną podstawę do postawienia hipotezy badawczej, że nierównomiernie upakowane neutrofile pełnią różne funkcje w organizmie. Dlatego badania te są kontynuowane w ramach projektu Sonata-Bis, którego jestem kierownikiem i na którego realizację pozyskałam środki w ramach otwartego konkursu.



Rysunek 12. Ilościowa ocena stopnia kolokalizacji sond dla NSPs w ziarnistościach neutrofilów za pomocą cytometrii przepływowej. *Neutrofile znakowano PK107, PK205, PK303 i PK402, a następnie analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Przed analizą kolokalizacji NSPs, pojedyncze neutrofile przechodzące przez wiązkę światła były analizowane w oprogramowaniu IDEAS według współczynnika proporcji FSC (rozproszenie zgodne z kierunkiem wiązki laserowej) do SSC (rozproszenie pod kątem 90°C) za pomocą funkcji „Bright Gradient RMS". Podobieństwo jasnych szczegółów/detali (BDS) obliczono dla każdej pary enzymów na podstawie intensywności fluorescencji. Enzymy uznawano za kolokalizujące dla danej pary sond, jeśli BDS ≥ 1,5. B) Ilościowa ocena kolokalizacji zdarzeń BDS - kolokalizacja wszystkich czterech NSPs wynosi 0,2%. Rysunek zaadaptowano z publikacji H2.*

PODSUMOWANIE:

- *Opracowano specyficzne niskocząsteczkowe sondy chemiczne (ABP) do badania poszczególnych NSPs,*
- *ABPs charakteryzują się silnym oddziaływaniem z enzymem, dużą rozpuszczalnością i przepuszczalnością przez błonę komórkową,*
- *Wykazano nierównomierną lokalizację aktywnych NSPs w ziarnistościach neutrofili,*
- *Po raz pierwszy oznaczono stężenie poszczególnych NSPs w neutrofilach,*
- *ABPs mogą być stosowane w badaniach aktywności NSPs w neutrofilach.*

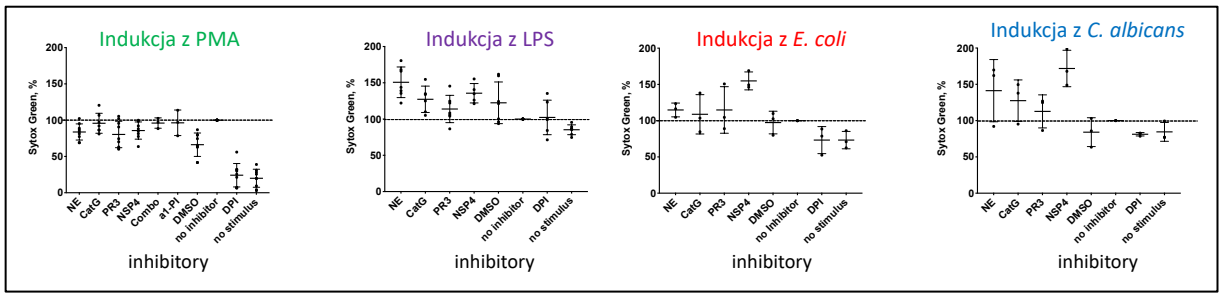
H5: Kasperkiewicz P✉, Hempel A, Janiszewski T, Kolt S, Snipas SJ, Drag M, Salvesen GS✉, NETosis Occurs Independently of Neutrophil Serine Proteases, Journal of Biological Chemistry 2020, 1. (IF 4.238; MNiSW 100 punktów (numer na liście: 10303); Cytowania 8)

W niniejszej pracy opisuję wyniki, które uzyskałam wyłącznie w laboratorium prof. Salvesena w SBP Medical Discovery Institute, USA, podczas mojego stażu podoktorskiego. Warto również wspomnieć, że wszystkie eksperymenty projektowałam i analizowałam samodzielnie pod nadzorem prof. Guy Salvesena i co ważne, wykonałam zdecydowaną większość zadań badawczych. Niniejsza praca przedstawia biologiczne funkcje aktywności proteaz w neutrofilach, które zostały wykazane przy użyciu sond chemicznych i skupia się wyłącznie na biologii neutrofilów.

Jak już wspomniano, neutrofile stanowią pierwszą linie obrony przeciwko patogenom i do ich eliminacji stosują kilka strategii, w tym fagocytozę, degranulację (uwalnianie przeciwdrobnoustrojowych peptydów i białek) oraz wybuch tlenowy[95]. Prawie dwie dekady temu grupa Brinkmanna zaobserwowała, że neutrofile, jako dodatkową formę obrony, wyrzucają zdekondensowaną chromatynę z jądra komórkowego[5] lub z mitrochondriów jak zaobserwowała grupa Yousefi[96], tworząc strukturę siatki, zwaną NETs (ang. *Neutrophil Extracellular Traps*). Proces ten został nazwany NETozą i jest uważany za formę śmierci komórki[5, 97]. Do DNA w NETs przyczepione są przeciwdrobnoustrojowe czynniki, które są wydzielane wraz z DNA z komórki, dlatego też NETs posiadają właściwości np. bakteriobójcze. Co ciekawe, NETs służą także jako platformy dla przetwarzania i aktywacji cytokin[6]. Pomimo licznych pozytywnych funkcji jakie pełnią NETs w obronie organizmu przeciwko patogenom chrobotwórczym, stanowią też one podłoże licznych chorób immunologicznych.

Mechanizm uwalniania NETs wymaga udziału oksydazy NADPH, mieloperoksydazy (MPO), reaktywnych form tlenu (ROS) i enzymu deiminazy peptydyloargininowej 4 (PAD4), który pośredniczy w cytrulinacji histonów[98]. Co ciekawe, NE była uważana za kluczowego mediatora w NETozie[99-101]. Wykazano, że podczas NETozy NE ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie może hydrolizować histony, ale także, że wydzielone łańcuchy DNA zawierają NE i dlatego spekulowano, że proteaza ta jest kluczowa w tworzeniu NETs[100-102]. Jednak we wszystkich badaniach stosowano metody immunochemiczne i dlatego trudno było ocenić wpływ aktywności NE na powstawanie NETs, a nie tylko jej obecności. Co więcej, enzym ten znajduje się w aktywnej formie w ziarnistościach neutrofilów razem z pozostałymi NSPs. W związku z tym rola wszystkich NSPs w netozie pozostawała kwestią sporną, ze względu na brak badań nad aktywnością tych enzymów. Ze względu na fakt, że neutrofile są

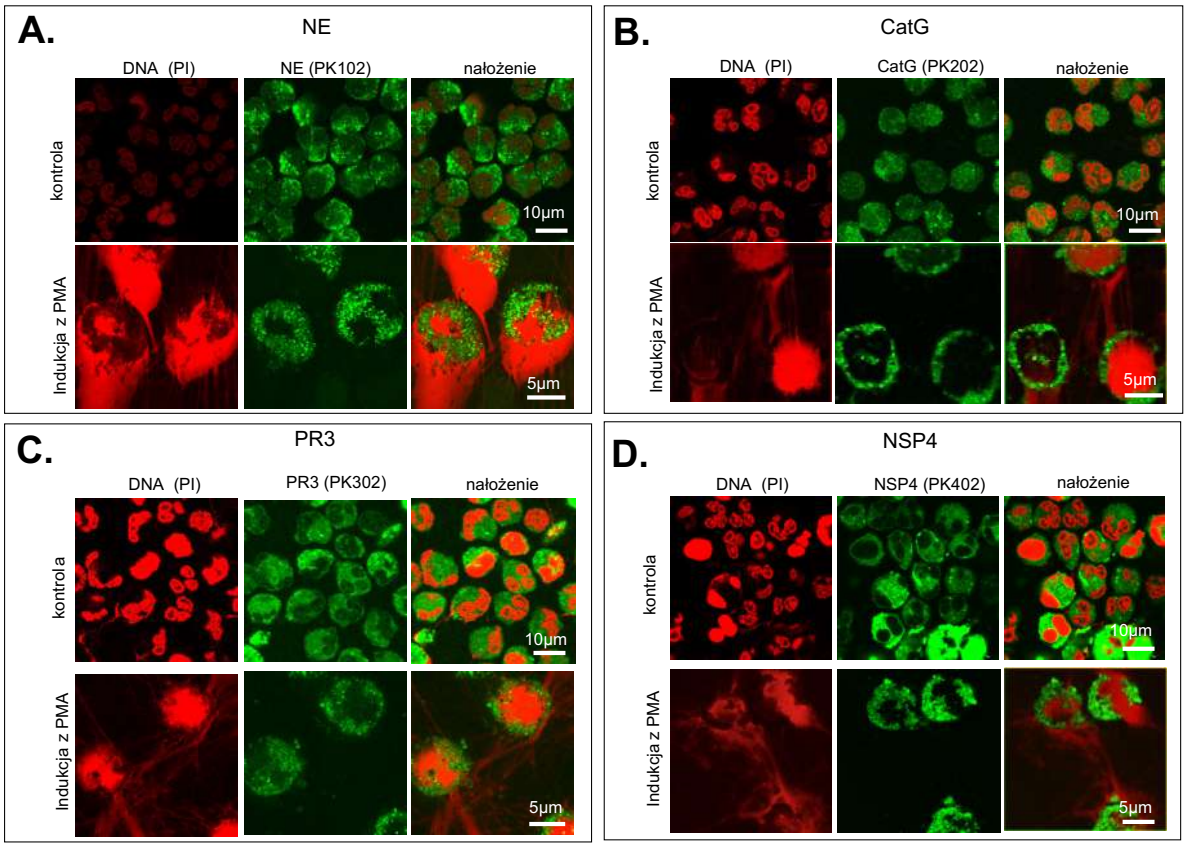
komórkami terminalnymi, niezdolnymi do dalszych podziałów i o krótkim czasie życia we krwi obwodowej i jeszcze krótszym w probówce, wykonanie modyfikacji genetycznych w tych komórkach. Dokładne badania nad netozą stanowią duże wyzwanie, a głównym celem tego projektu było zbadanie czy aktywność NSPs prowadzi do netozy. Byliśmy jedyną grupą badawczą na świecie posiadającą sondy chemiczne do selektywnego badania aktywnych NSPs, dlatego zdecydowaliśmy się zastosować je w badaniach nad NETozą (ich powstanie jest opisane w pracy H2). Wysnuliśmy hipotezę badawczą, że skoro neutrofile zawierają cztery proteazy serynowe, to mogą one wzajemnie się kompensować, jeśli aktywność jednej z nich zostanie zneutralizowana i postanowiliśmy to zbadać.



Rysunek 13. Hamowanie procesu netozy na modelu neutrofili indukowanych PMA, LPS, E. coli lub C. albicans. Świeżo wyizolowane neutrofile były potraktowane zestawem inhibitorów, a następnie indukowane. Uwalnianie DNA mierzono jako zmiana fluorescencji. Wartość dla komórek bez inhibitorów określano jako 100%, a pozostałe odpowiednio przeliczano. Wyniki wskazują na minimalną rolę NSPs w NETozie. Zaadaptowano z publikacji H5.

Najczęściej wykorzystywany model do badań netozy opiera się o neutrofile izolowane z krwi obwodowej, stymulowane forbolem 12-mirystynian-13-octanu (PMA) lub IL-1β[5, 103]. Inne czynniki stymulujące, takie jak LPS, IL-8 czy bakterie były także przedmiotem intensywnych badań, jednak indukują one netozę z dużo mniejszą wydajnością[103], ale w przeciwieństwie do PMA mogą być wykorzystane w badaniach *in vivo*. W badaniach NETozy stosuje się zmienny czas indukcji, jednak typowy czas uwalniania NETs wynosi około 3 godziny[5]. Dlatego w pierwszym etapie badań zaproponowałam przetestowanie różnych czynników indukujących i wybranie najlepszego, który umożliwiłby uzyskanie wydajnego wyrzutu DNA z neutrofili. W tym celu zastosowałam PMA, TNF-α, IL-1β, *C. albicans*, *E. coli* (szczep JM109), LPS oraz IFNγ, a uzyskane wyniki porównałam z nieindukowanymi komórkami. Najpierw zaproponowałam badanie, w którym przyrost fluorescencji (SytoxGreen®) był badany w sposób ciągły i zaobserwowałam, że neutrofile spontanicznie umierały w obecności tego odczynnika w miarę upływu czasu. Mając to na uwadze, opracowałam test z zastosowaniem płytek wielodołkowych, w którym również użyłam SytoxGreen® ze względu na jego wysoką intensywność fluorescencji po związaniu z DNA, ale zamiast ciągłego monitorowania fluorescencji w obecności wskaźnika, był on dodawany do indukowanych komórek w różnych punktach czasowych, tuż przed odczytem. Odczytów dokonywano we wskazanych punktach czasowych przez 6 godzin, każdy na oddzielnej płytce. Opracowanie tego testu było moim pomysłem, a jego zastosowanie dostarczyło wiarygodne wyniki, ze zredukowanym fałszywie pozytywnym sygnałem od komórek umierających w wyniku ekspozycji na SytoxGreen®. Spodziewaliśmy się intensywnego sygnału w próbkach komórek poddanych działaniu zarówno PMA jak i LPS i co zaskakujące, zaobserwowaliśmy, że o ile PMA prowadzi do szybkiego wyrzutu DNA, inne czynniki, takie jak *C. albicans, E.coli*, LPS, TNF-α i IL-1β w niewielkim stopniu aktywują neutrofile (mniej niż 30% efekty PMA), a neutrofile indukowane INFγ wydzielają podobną ilość DNA co kontrola bez indukcji (Rys. 1A w H5). Jako dodatkową kontrolę, zobrazowałam neutrofile indukowane PMA, LPS i N-formyl-Met-

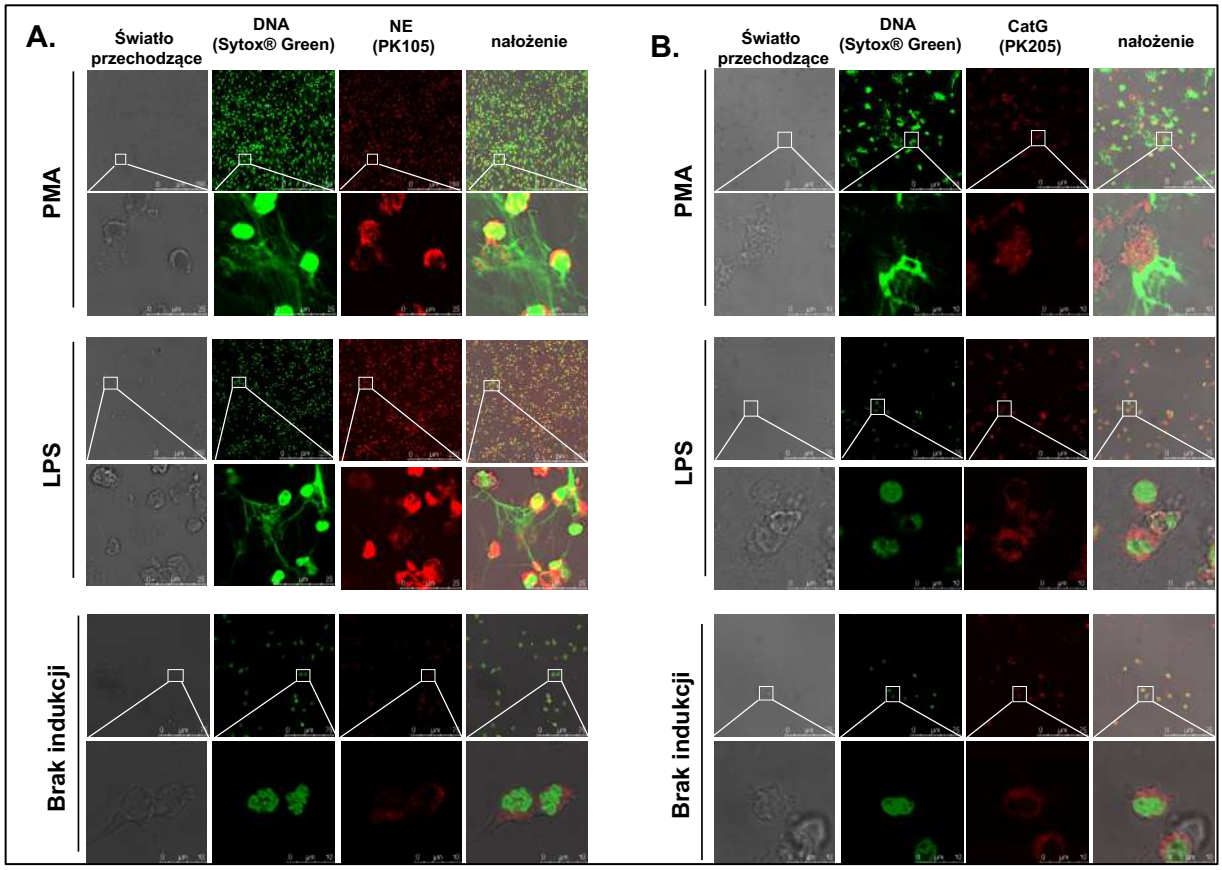
Leu-Phe (fMLP) i zaobserwowałam silną indukcję za pomocą PMA, podczas gdy nieznaczna ilość DNA (znakowanego SytoxGreen®) została wydzielona po stymulowaniu z LPS, podobnie jak przy braku indukcji. Wyniki te są zgodne z naszymi analizami z użyciem czytnika płytek i wcześniejszymi wynikami[104].



Rysunek 14. NE, CatG, PR3 oraz NSP4 są nieaktywne w DNA w netozie. Neutrofile krwi obwodowej były stymulowane PMA (lub nie, jako kontrola) w celu wywołania netozy i inkubowane z sondami selektywnymi dla wybranych NSPs. DNA barwiono jodkiem propidyny (PI). Obrazowanie przeprowadzono za pomocą mikroskopu konfokalnego. Zaobserwowano kolokalizację łańcuchów DNA z przeciwciałami poszczególnych NSPs i brak kolokalizacji z sondami NSPs w NETs, co wskazuje, że enzymy te są nieaktywne w NETs. Zaadaptowano z publikacji H5.

Po zoptymalizowaniu warunków indukcji NETozy, sprawdziłam zaangażowanie poszczególnych NSPs w ten proces. Pamiętając o tym, że w terminalnych neutrofilach nie są możliwe modyfikacje genetyczne, postanowiłam wykorzystać specyficzne cząsteczki chemiczne opracowane w pracy **H2**. Cząsteczki te pokonują barierę błony komórkowej neutrofili i łączą się kowalencyjnie z poszczególnymi NSPs, co sugeruje, że ich zastosowanie zahamuje NSPs w neutrofilach. Dlatego neutrofile wyizolowane z ludzkiej krwi obwodowej poddałam działaniu specyficznych inhibitorów o ogólnej strukturze: Biotyna-PEG(4)-Nle(O-Bzl)-Met(O)$_2$-Oic-Abu(PO$_3$Ph$_2$) (PK101 dla NE), Biotyna-Ahx-His(Bzl)-Val-Pro-Phe(PO$_3$Ph$_2$) (PK201 dla CatG), Biotyna-Ahx-Glu(O-Bzl)-Lys(Ac)-Hyp(Bzl)-Nva(PO$_3$Ph$_2$) (PK301 dla PR3) i Biotyna-hCha-Phe(guan)-Oic-Arg(PO$_3$Ph$_2$) (PK401 dla NSP4), oraz zestawem komercyjnie dostępnych inhibitorów, a następnie indukowałam NETozę za pomocą PMA. Tworzenie NETs jest zależne od wybuchu tlenowego oraz NADPH i w związku z tym było blokowane przez inhibitor NADPH - chlorek difenyloodoniowy (DPI), podczas gdy inhibitory NSPs miały minimalny wpływ na ilość uwalnianego DNA, porównywalny z komórkami nieinhibitowanymi (**Rys. 13**). Aby sprawdzić czy NSPs mają wzajemny wpływ na NETozę

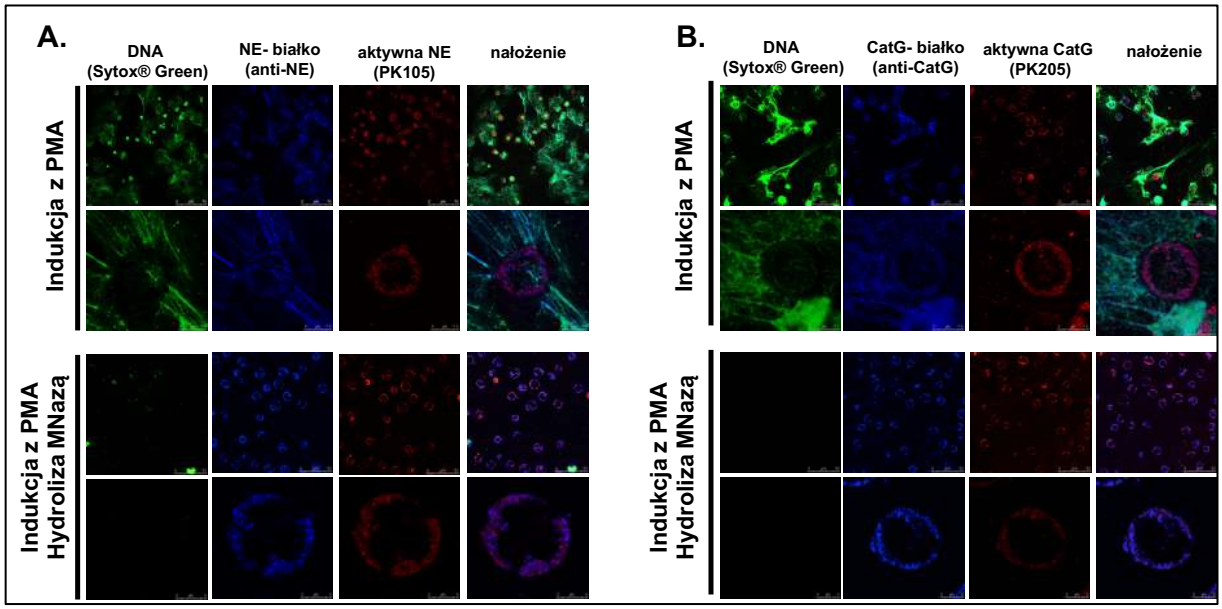
zahamowano jednocześnie wszystkie cztery NSPs i ponownie nie zaobserwowano różnicy wydzielaniu DNA. Analizę tę przeprowadzono nie tylko indukując neutrofile przy użyciu PMA, ale także używając innych czynników w tym LPS, *E. coli (J109)* i *C. albicans*, uzyskując analogiczne wyniki wskazujące na rolę NADPH, ale nie NSPs w NETozie **(Rys. 13)**. Wyniki te doprowadziły nas do wniosku, że NSPs odgrywają minimalną rolę, jeśli w ogóle jakąkolwiek, w indukowaniu NETozy, niezależnie od zastosowanej metody indukcji.



Rysunek 15. Lokalizacja aktywnych NSPs w neutrofilach indukowanych PMA i LPS. Neutrofile krwi obwodowej indukowano (lub nie, jako kontrolę) za pomocą PMA lub LPS i znakowano PK105 (A) lub PK205 (B). DNA barwiono przy użyciu SytoxGreen® i obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. DNA jest związane z nieaktywną formą NSPs. Rysunek zaadaptowano z pracy H5.

We wcześniejszych badaniach przy użyciu immunochemii stwierdzono obecność NE w NETs[100], dlatego celem mojego kolejnego testu było sprawdzenie czy związane z DNA NSPs są aktywne. W tym celu, neutrofile były indukowane za pomocą PMA i znakowane sondami dla NSPs, a następnie znakowane przeciwciałami. Próbki przygotowałam i analizowałam na mikroskopie konfokalnym samodzielnie dzięki uprzejmości dra Maxa D'Angelo (współautora publikacji). Co zaskakujące, sondy były całkowicie nieobecne w NETs, ale wykazano ich punktową obecność wewnątrz komórek (**Rys. 14**). W związku z tym w kolejnym etapie, aby zwalidować uzyskane wyniki i ocenić czy potencjalny sygnał mogący pochodzić od kompleksu sonda-enzym związanych z DNA nie został przypadkowo ominięty, wykonaliśmy obrazowanie przyżyciowe neutrofili podczas NETozy. Ponownie nie zaobserwowaliśmy asocjacji sond z DNA. Wyniki te potwierdziły naszą hipotezę, że NSPs mogą wiązać się z wydzielonym DNA, ale są w formie nieaktywnej.

Uzyskane wyniki były dla nas zaskakujące i dlatego też wykonałam podobne analizy, ale dodatkowo indukując neutrofile z LPS i zamieniając barwienie DNA przy użyciu PI na SytoxGreen®. Podobnie jak poprzednio, sondy nie wiązały się z zewnątrzkomórkowym DNA i pozostawały wewnątrz neutrofili (Rys. 15), co przebadano na przykładzie NE i CatG. Wyniki te ponownie sugerują brak aktywnego enzymu w NETs. Równocześnie sprawdziłam czy hydroliza NETs za pomocą nukleazy mikrokokowej (MNase) jest w stanie przywrócić aktywność NSPs. W tym celu indukowałam neutrofile za pomocą PMA i wybarwiłam je sondami NSPs, a następnie przeciwciałami dla poszczególnych enzymów i wyznakowałam jądra komórkowe. Drugi zestaw próbek przygotowałam w ten sam sposób, ale dodatkowo poddałam je trawieniu MNazą. Uzyskane wyniki potwierdziły nieobecność sond w DNA i wiązanie przeciwciał do DNA. Co ciekawe, MNaza nie miała wpływu na sygnał pochodzący od sond, co ponownie sugeruje, że NSPs są nieaktywne w NETs. Rezultaty tych badań nasuwają pytanie czy NSPs pełnią jakakolwiek rolę w NETs, gdyż występują tam jedynie w nieaktywnej formie (Rys. 16).



Rysunek 16. Nieaktywne NSPs wiążą się z NETs. Neutrofile krwi obwodowej indukowano za pomocą PMA i inkubowano z sondami, później z przeciwciałami i SytoxGreen®, a następnie preparaty obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Sygnał od sond został wydetektowany jako punkty w komórkach, podczas gdy nie zaobserwowano jego obecności w DNA. Natomiast przeciwciała znakują i wykazują obecność NSPs w pułapkach neutrofilowych wskazując, że NSPs są nieaktywne w NETs. Zaadaptowano z pracy H5.

PODSUMOWANIE:

- *Sondy NSPs są cennymi narzędziami w badaniach NETozy,*
- *NSPs odgrywają minimalną, jeśli w ogóle jakąkolwiek rolę w tworzeniu NETs,*
- *NSPs, które znajdują się NETs, są w nieaktywnej formie i dlatego nie mogą uczestniczyć w dalszych procesach związanych z obroną organizmu przeciw patogenom.*

Część 2: Wybrane proteazy komórek NK, -B oraz -T

W tej części habilitacji skupiłam się na opracowaniu technik do badań proteaz należących do rodziny granzymów, występujących w komórkach wrodzonego i nabytego układu odpornościowego, w tym w komórkach NK, limfocytach B i limfocytach T. Rodzina ludzkich granzymów składa się z pięciu członków, spośród których przebadałam GrA i GrB.

H8: Kołt S, Janiszewski T, Kaiserman D, Modrzycka S, Snipas SJ, Salvesen G, Drąg M, Bird PI, Kasperkiewicz P✉, Detection of Active Granzyme A in NK92 Cells with Fluorescent Activity-Based Probe, Journal of Medicinal Chemistry 2020. (IF 7.446; MNiSW 200 punktów (numer na liście: 11838); Cytowania: 5)

W tej pracy skupiłam się na badaniu aktywności „trudniejszych" proteaz zwanych granzymami należących do rodziny proteaz serynowych. Badania te były finansowane w ramach programu Homing Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Podczas stażu podoktorskiego w laboratorium prof. Salvesena w SBP Medical Discovery Institute w USA zdobyłam wiedzę z zakresu biologii komórki, dzięki czemu mogłam samodzielnie zaprojektować i wykonać wszystkie te eksperymenty. Program Homing pozwolił mi na założenie podstawowego laboratorium biologicznego w WUST, które po trzech latach, dzięki finansowaniu z FNP i NCN, jest w pełni wyposażone i ułatwia mi prowadzenie niezależnych badań biologicznych. Fundusze te dały mi również możliwość zaangażowania doktorantów do projektu (Soni Kołt i Tomasza Janiszewskiego). Warto zaznaczyć, że jest to pierwsza publikacja, w której występuję w roli kierownika projektu. W tej pracy, wraz z pierwszą współautorką Sonią Kołt, zaprojektowałam i wykonałam badania i analizy. Praca ta dała mi również możliwość rozwinięcia moich umiejętności mentorskich i bycia promotorem pomocniczym w dwóch doktoratach. Warto wspomnieć, że Sonia Kołt obroniła z wyróżnieniem pracę doktorską, której częścią jest niniejsze opracowanie.

Jednymi z komórek efektorowych wrodzonego układu odpornościowego są komórki NK, które są limfocytami odgrywającymi ważną rolę w odpowiedzi na zakażenia drobnoustrojami, a także na komórki nowotworowe. W celu destrukcji patogenu NK są aktywowane poprzez utratę MHC I[105], co prowadzi do kaskady reakcji, których celem jest neutralizacja zainfekowanych komórek. Aktywacja komórek NK jest regulowana obecnością MHC I w zdrowych komórkach lub jego brakiem w zakażonych komórkach. Po aktywacji, komórki NK wydzielają cytokiny TNF-α i INF-γ i pobudzają układ odpornościowy. Najbardziej istotne czynniki w komórkach NK i CLT biorące udział w układzie immunologicznym są zlokalizowane w ich ziarnistościach cytotoksycznych. Do czynników tych należą między innymi proteazy serynowe, zwane granzymami (ang. ***Gra****nule associated e****nzymes****, Grs*). Rodzina ludzkich granzymów składa się z pięciu różnych enzymów (GrA/B/H/K/M), wśród których najliczniejsze są granzymy A i B[106, 107]. GrB jest intensywnie badany od dziesięcioleci, natomiast GrM, GrA, GrH i GrK są tzw. enzymami sierocymi i badania nad nimi są prowadzone sporadycznie[108], dlatego ich funkcjonalność i lokalizacja pozostają nie do końca poznane[109].

Rosnące zainteresowanie terapiami opartymi na NKs i CTLs stosowanymi w leczeniu chorób immunologicznych i nowotworów u ludzi sprawia, że coraz bardziej pożądane są specyficzne narzędzia chemiczne do pomiaru odpowiedzi immunologicznej, prowadzącej do śmierci komórek. GrA aktywuje

charakterystyczny, niezależny od kaspaz szlak śmierci komórkowej, jak opisano we wstępie teoretycznym. Przez ostatnie lata rola GrA w śmierci komórki była niedoceniana, podczas gdy GrB wraz z kaspazami uważano za najważniejsze enzymy w tym procesie. W wyniku nadekspresji antyapoptotycznych białek z rodziny bcl-2 lub zastosowania inhibitorów GrB, komórki stają się oporne na śmierć komórkową zależną od kaspaz i GrB, ale wciąż umierają, ale na ścieżce zależnej od GrA. Wskazuje to na znaczenie tego enzymu w śmierci komórkowej oraz w pełnieniu funkcji przez cytotoksyczne komórki[110]. GrA posiada szeroką specyficzność substratową i może hydrolizować wiele fizjologicznych substratów, w tym Ape1, HMG2, histon H1, laminy jądrowe, PARP-1, kompleks SET związany z retikulum endoplazmatycznym oraz egzonukleazę 1 (TREX1). GrA charakteryzuje się niską liczbą obrotów substratu, tak jak pozostałe Grs, dlatego enzymy te nazywane są "leniwymi". To sprawia, że badania nad naturalnymi substratami, lokalizacją i funkcjami Grs stanowią bardzo duże wyzwanie.

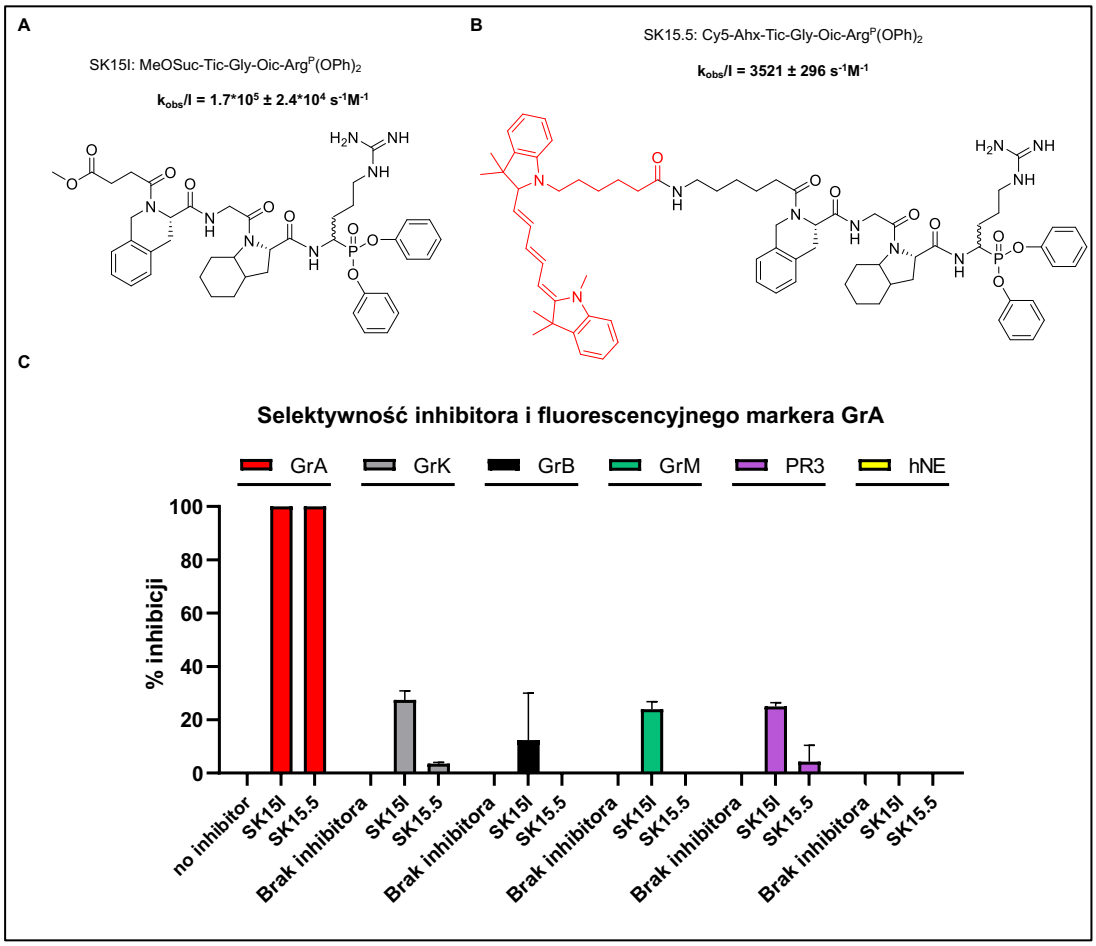
W tym projekcie skupiłam się na poszukiwaniu narzędzi chemicznych do badania aktywności GrA, a nie jedynie jego całkowitej ilości, ponieważ to właśnie aktywność enzymów jest kluczowa dla określenia ich funkcji w stanach patofizjologicznych. W tamtym czasie tylko jedna grupa badawcza opracowała związek chemiczny do badania GrA, jednak o ograniczonej selektywności i niskich parametrach kinetycznych co znacznie ograniczało jego detekcję[111-115]. W celu usunięcia tych przeszkód zaprojektowaliśmy selektywną sondę GrA i w tej pracy opisaliśmy proces jej otrzymywania, a także jej zastosowanie.

W czasie podejmowania tematu w literaturze nie zostały opisane żadne fluorescencyjne narzędzia do bezpośredniego wykrywania GrA. Klasyczny inhibitorowy ABP otoczony fluoroforem umożliwia wykrywanie aktywnego enzymu w próbkach biologicznych, w tym w lizatach komórkowych, próbkach tkanek lub ekstraktach, w prostej analizie SDS-PAGE bez konieczności przenoszenia próbki na membranę nitrocelulozową (Western-Blot). Dążąc do uzyskania takiej sondy, zaprojektowaliśmy cząsteczkę składającą się z czterech głównych fragmentów. Pierwszym z nich była grupa reaktywna - difenylofosfonian Arg, który mimikuje strukturę peptydu i miał reagować z seryną w miejscu aktywnym proteazy, tworząc kompleks kowalencyjny. Drugim fragmentem była sekwencja peptydowa, gwarantująca selektywność, a kończąca ją reszta Ahx oddalała fluorofor od sekwencji peptydowej. Jako fluorofor wybraliśmy pochodną cyjaniny Cy5, która umożliwia bezpośrednią detekcję w zakresie podczerwieni.

W początkowej fazie badań zoptymalizowana została sekwencja peptydowa ABP. W tym celu zbadaliśmy specyficzność substratową GrA przy użyciu biblioteki Arg-HyCoSuL zawierającej zarówno naturalne jak i nienaturalne aminokwasy (wcześniej zsyntetyzowanej[88]). Ponadto, w oparciu o istniejące dane literaturowe, zaprojektowaliśmy bibliotekę peptydów do badania kieszeni S1 GrA, składającą się ze wspólnego motywu P4-P2 i różniącą się jedynie resztą aminokwasową P1 wybraną z szerokiego wachlarza naturalnych i nienaturalnych aminokwasów. Jako znacznik fluorogeniczny zastosowano ACC. Po syntezie i oczyszczeniu związków zbadano aktywność GrA wobec składników biblioteki. Badania wykazały, że GrA oddziałuje w kieszeni S1 prawie wyłącznie z aminokwasami zasadowymi, takimi jak Arg i Phe(guan), co jest podyktowane charakterem tej kieszeni. Kieszeń S2 posiada szeroką specyficzność substratową, ale z preferencjami do Pro i jej pochodnej Oic. Oic jest pochodną Pro posiadającą dodatkowy pierścień cykloheksylowy, który może zmieniać konformację, co pozwala na lepsze dopasowanie się do wnęki miejsca aktywnego. Natomiast, kieszenie S3-S4 charakteryzują się szeroką specyficznością substratową, ale z preferencjami do glicyny (Gly) w pozycji P3 i kwasu 1,2,3,4-tetrahydroizochinolino-3-karboksylowego (Tic) w pozycji P4. W celu lepszej optymalizacji markera

chemicznego, najpierw zsyntetyzowaliśmy i przetestowaliśmy kilka sekwencji peptydowych pod względem aktywności i selektywności GrA, a także sprawdziliśmy ich oddziaływania z GrB, GrM, HNE i PR3. Na podstawie uzyskanych wyników wybraliśmy sekwencję wiodącą Tic-Gly-Oic-Arg.

Następnie w oparciu o uzyskane wyniki zaprojektowaliśmy inhibitor, ABP, a także opracowaliśmy strategię syntezy, która składała się z dwóch części. Pierwsza część obejmowała syntezę fragmentu reagującego $^{+}H_3N$-Arg$^{P}(OPh)_2$ z wykorzystaniem wieloetapowej procedury opisanej przez grupę Oleksyszyna[93] i zmodyfikowanej przez nas. Równolegle prowadziliśmy syntezę fragmentu peptydowego metodą syntezy w na podłożu stałym. Następnie do N-końca peptydu dołączono linker, a po nim fluorofor, otrzymując Cy5-Ahx-Tic-Gly-Oic-COOH. W tym przypadku, ze względu na obecność dodatnio naładowanej reszty aminokwasowej w sekwencji „warheada", przyłączenie fluoroforu do fragmentu peptydowego na żywicy było lepszym wyborem niż jego przyłączenie w roztworze. W ostatnim etapie sprzęgneliśmy fragment peptydowy z „warheadem", uzyskując marker chemiczny SK15.5 Cy5-Ahx-Tic-Gly-Oic-Arg$^{P}(OPh)_2$ (**Rys. 17B**).

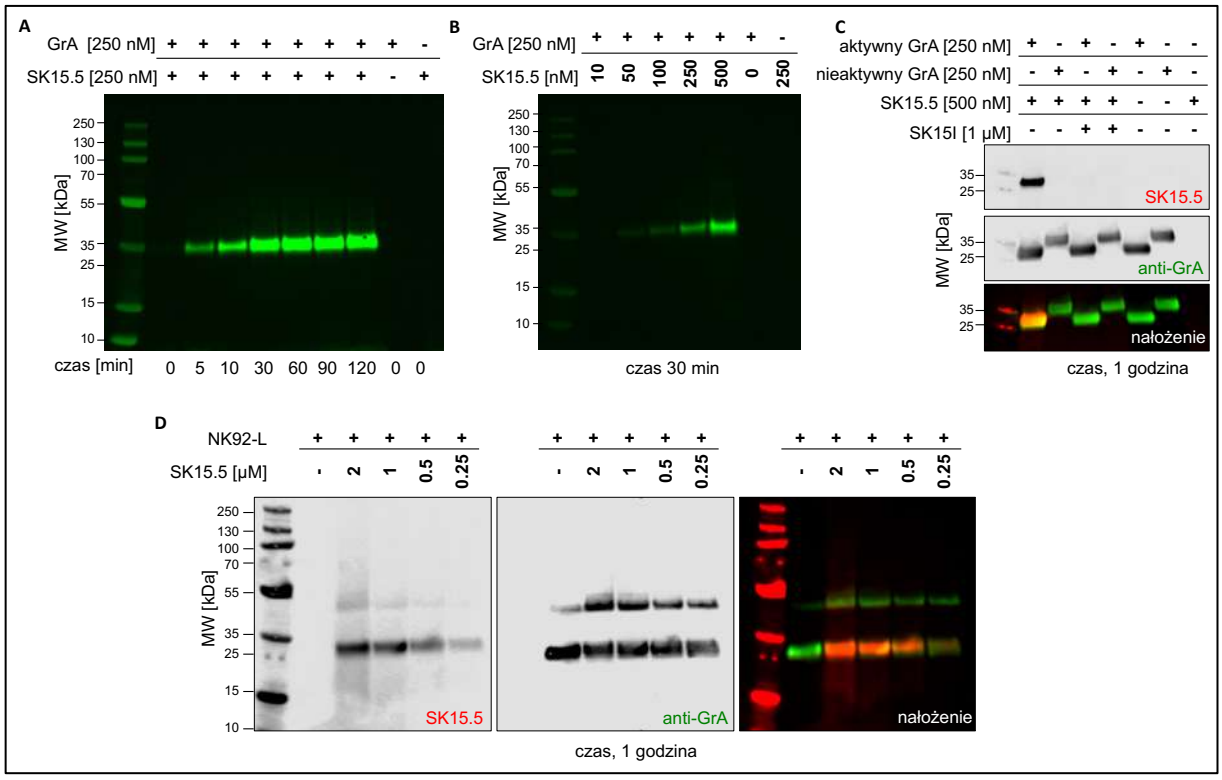


Rysunek 17. A i B. Struktury SK15I (inhibitor) i SK15.5 (sonda) oraz ich parametry kinetyczne względem GrA - stałe szybkości inhibicji drugiego rzędu. C. Selektywność SK15I i SK15.5 względem GrA mierzona wobec GrK, GrB, GrM, PR3 i NE. Rysunek częściowo zaadaptowany z H8.

Granzymy są strukturalnie podobnymi enzymami, z których zarówno GrA, jak i GrK hydrolizują po zasadowych resztach aminokwasowych, podczas gdy GrB jest najbardziej aktywny, dlatego specyficzność naszej nowej sondy była testowana w stosunku do ludzkich granzymów A, B, M i K. Jako dodatkową kontrolę sprawdziliśmy wiązanie SK15.5 z jednymi z najbardziej aktywnych proteaz

serynowych, które wraz z GrA znajdują się w neutrofilach: NE i PR3. Aktywność resztkową wybranych enzymów, poddanych działaniu naszej sondy, badano przy użyciu substratów fluorogenicznych dedykowanych każdemu enzymowi z osobna, przy użyciu czytnika płytek w celu pomiaru wzrostu fluorescencji. Zaobserwowaliśmy 100% inhibicję GrA i prawie całkowity brak efektu hamującego SK15.5 na którykolwiek z badanych enzymów (z wyjątkiem minimalnej 3% inhibicji GrK), a wyznaczone k_{obs}/I dla GrA wynosi 3520 $M^{-1}s^{-1}$ (**Rys. 17A-C**).

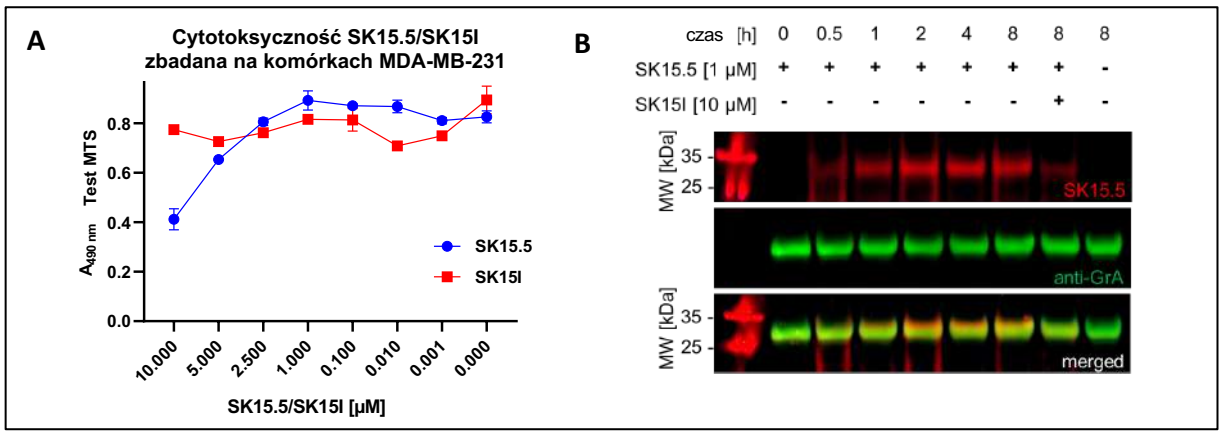
Wyniki te były bardzo obiecujące, więc w następnym kroku sprawdziliśmy, czy sonda ta może być wykorzystana do wykrywania GrA przy użyciu SDS-PAGE. Chociaż SK15.5 jest jedną z najsilniejszych wśród cząsteczek chemicznych oddziałujących z GrA, wartość inhibicji k_{obs}/I jest niska w porównaniu z takimi parametrami dla innych proteaz i ich syntetycznych inhibitorów. Z tego względu kluczowe znaczenie miała optymalizacja warunków do stosowania sondy. Aby sprawdzić możliwość wykorzystania SK15.5 w przyszłych badaniach biologicznych, w pierwszej kolejności zoptymalizowaliśmy czas inkubacji sondy z badaną próbką biologiczną, jak również stężenie SK15.5 przy użyciu SDS-PAGE oraz transferze białka na membranę nitrocelulozową. Wykazaliśmy, że SK15.5 może być z powodzeniem stosowana do wykrywania GrA metodą SDS-PAGE, a co więcej, jej wykrycie jest możliwe już po 5 minutach inkubacji z nanomolarnymi ilościami sondy (50 nM) (**Rys. 18 A i B**).



Rysunek 18. Wykrywanie GrA za pomocą SK15.5 przy użyciu rekombinowanego enzymu i lizatów linii komórkowej NK92. A i B. Optymalizacja czasu inkubacji SK15.5 z enzymem (A) lub stężenia SK15.5 (B). GrA inkubowano z SK15.5 (o wskazanym stężeniu) przez określony czas, a następnie redukowano za pomocą buforu 3 x SDS. C. SK15.5 wiąże się wyłącznie z aktywnym GrA. Wiązanie sondy testowano zarówno na aktywnej formie enzymu, jak i na proenzymie. Inhibitor miejsca aktywnego GrA, jak również obecność pro-dipeptydu wykluczyły wiązanie sondy. D. Wykrywanie GrA w żelu poliakrylamidowym w lizatach linii komórkowej NK92. Komórki NK92 w logarytmicznej fazie wzrostu zlizowano i inkubowano z SK15.5 we wskazanym stężeniu. Sonda wiąże się selektywnie GrA. Zaadaptowano z pracy H8.

Co ciekawe, GrA jest jedynym homodimerem z rodziny Grs, tworzonym przez stabilne podjednostki połączone mostkiem disiarczkowym. Enzym ten jest syntetyzowany jako zymogen i aktywowany po hydrolizie N-końcowego pro-peptydu (peptydu sygnałowego), po czym prodipeptyd jest usuwany. Dlatego sprawdziliśmy, czy SK15.5 wiąże się jedynie w miejscu aktywnym enzymu i czy może tworzyć interakcje z enzymem poza centrum aktywnym. W tym celu inkubowaliśmy aktywny enzym lub zymogen z sondą i analizowaliśmy próbki metodą Western-Blot. Jako kontrolę zastosowano anty-GrA i okazało się, że sonda wiązała się jedynie z aktywną (procesowaną) formą GrA i nie zaobserwowano sygnału od zymogenu. Zgodnie z oczekiwaniami, specyficzny inhibitor GrA SK15I (zaprojektowany i opisany w tym manuskrypcie) uniemożliwił wiązanie sondy (Rys. 17A i 18C) potwierdzając, że wiąże się ona w miejscu aktywnym GrA.

Aby sprawdzić możliwość stosowania sondy SK15.5 do selektywnego wykrywania GrA w złożonych próbkach biologicznych, zbadaliśmy jej specyficzność na lizatach komórek NK92, w których Grs występują w dużych ilościach. Sonda SK15.5 była inkubowana z lizatami komórek NK92 aby wykryć potencjalne wiązania niespecyficzne. Próbki analizowano metodą Western-Blot, po czym dokonywano znakowania anty-GrA jako kontroli zarówno wiązania sondy z GrA jak i kontroli ilości białek w poszczególnych dołkach. Zaobserwowano silny sygnał pochodzący od kompleksu SK15.5-GrA nawet przy nanomolarnym stężeniu sondy, podczas gdy w lizatach bez sondy nie wykryto żadnego sygnału. Ponadto, zastosowanie wysokiego stężenia sondy (2 µM) nie spowodowało pojawienia się niespecyficznego sygnału. Co więcej, sygnał pochodzący od SK15.5 nakładał się na pasma pochodzące od przeciwciała GrA, potwierdzając wiązanie sondy z GrA. Po oznaczeniu przeciwciałami zaobserwowaliśmy dodatkowy sygnał odpowiadający dimerycznej formie GrA, przy minimalnym wiązaniu sondy (Rys. 18D). Wyniki te wskazują, że SK15.5 jest skutecznym narzędziem do wykrywania GrA w lizatach komórkowych.



Rysunek 19. Walidacja sondy SK15.5 do badań na żywych komórkach. A. Cytotoksyczność sondy SK15.5 badano na komórkach MDA-MB-231, które traktowano różnymi stężeniami sondy SK15.5, a żywotność komórek sprawdzano za pomocą testu MTS. Jak wskazano sonda jest cytotoksyczna tylko w bardzo wysokich stężeniach. Dane przedstawiają średnią z powtórzeń biologicznych z odchyleniem standardowym. B. Przepuszczalność błony komórkowej dla sondy SK15.5. Komórki NK92 w mediach hodowlanych poddano działaniu SK15.5 przez wskazany czas, a następnie próbki przemyto, zlizowano i wykonano Western-Blot. SK15.5 wnikała do komórki w ciągu 30 minut, a SK15I uniemożliwiał wiązanie sondy w miejscu aktywnym GrA. Zaadaptowano z H7.

Podczas projektowania tej sondy naszym celem była możliwość jej aplikacji bezpośrednio na komórki, a uzyskane przez nas wyniki sugerują, że sonda ta rzeczywiście może być zastosowana do badania GrA w testach komórkowych. Wiedząc, że przed użyciem jakiejkolwiek cząsteczki chemicznej do badań na żywych komórkach należy ocenić jej cytotoksyczność, zbadaliśmy wpływ sondy SK15.5 na żywotność komórek MDA-MB231 przy użyciu klasycznego testu MTS i wykazaliśmy, że sonda ta nie jest cytotoksyczna w przypadku zastosowania stężenia poniżej 2,5 µM nawet po 24 godzinach inkubacji, a zatem może być stosowana w badaniach komórkowych (**Rys. 19A**). Niemniej jednak brakowało informacji czy sonda pokona barierę błony komórkowej. Dlatego sprawdziliśmy, to, inkubując żywe komórki NK92 (linii komórkowej typu NK zawierającej duże stężenie GrA) z SK15.5 i po lizie komórek przeanalizowaliśmy próbki przy użyciu Western-Blot i znakowania przeciwciałem GrA. Zauważyliśmy prążek o intensywnym sygnale już po 30 minutach inkubacji, a intensywność sygnału wzrastała do 2 godzin (**Rys. 19B**). Na tej podstawie wywnioskowaliśmy, że po pierwsze, sonda SK15.5 pokonuje barierę błony komórkowej, a po drugie, że optymalny czas do zaobserwowania zmian w aktywności GrA w komórkach NK92 wynosi od 0,5 do 2 godzin. Znakowanie przeciwciałem potwierdziło selektywne wiązanie sondy z GrA. Wyniki te sugerują, że sonda GrA, SK15.5, jest silnym i selektywnym markerem chemicznym do wykrywania GrA w ekstraktach komórkowych, lizatach, a także komórkach układu odpornościowego.

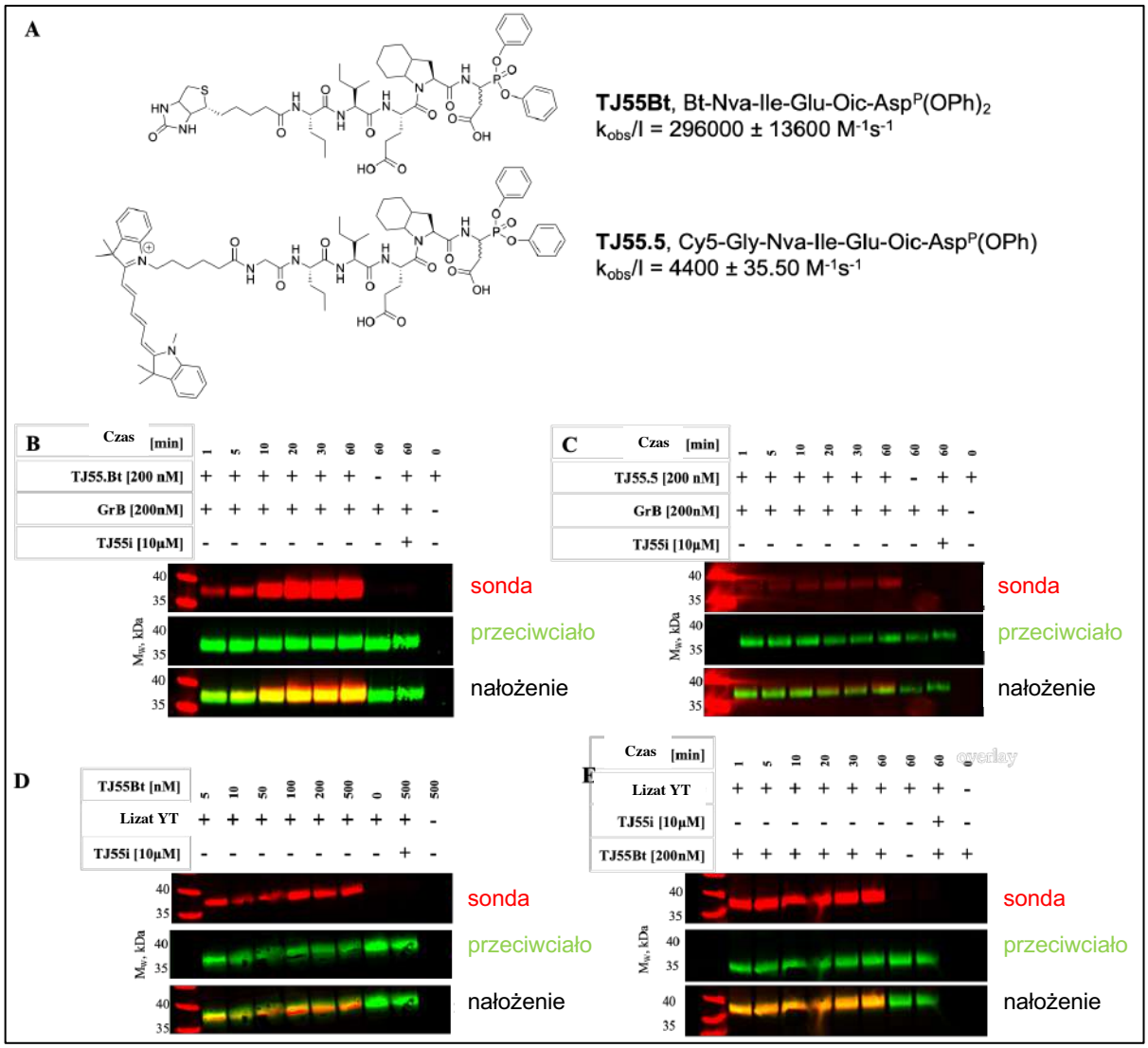
PODSUMOWANIE:

- *Opracowaliśmy pierwszą fluorescencyjną sondę chemiczną do wykrywania aktywności GrA (SK15.5),*
- *SK15.5 wiąże się selektywnie z dużą wydajnością katalityczną wyłącznie w miejscu aktywnym GrA,*
- *SK15.5 może być z powodzeniem stosowana do wykrywania aktywnego GrA w lizatach komórkowych,*
- *SK15.5 charakteryzuje się niską cytotoksycznością i wysoką przepuszczalnością przez błonę komórkową,*
- *SK15.5 może być w przyszłości stosowana do monitorowania aktywności GrA w żywych komórkach.*

H7: Janiszewski T, Kołt S, Kaiserman D, Snipas SJ, Li S, Kulbacka J, Saczko J, Bovenschen N, Salvesen G, Drąg M, Bird P, Kasperkiewicz P✉, Noninvasive optical detection of granzyme B from natural killer cells with enzyme-activated fluorogenic probes, Journal of Biological Chemistry 2020, 1. (IF 4.238; MNiSW 100 punktów (numer na liście: 10303); cytowania 10)

W niniejszej pracy przedstawiam badania nad opracowaniem odczynników chemicznych do badań aktywności GrB. Praca ta jest przełomowa, ponieważ obejmuje projektowanie, syntezę i opis zastosowania zarówno sond opartych na substratach, jak i inhibitorach, a przyżyciowe testy aktywności GrB w żywych komórkach nie były uwzględnione w moich poprzednich badaniach. Podobnie jak poprzedni projekt i ten był finansowany w ramach programu Homing (FNP). W ramach tych badań, wraz z pierwszym współautorem Tomaszem Janiszewskim, zaprojektowałam i wykonałam testy i analizy. Również dzięki tej pracy poszerzyłam moje umiejętności jako mentora i w roli promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej Tomasza Janiszewskiego, obronionej w 2021 roku.

Granzym B jest proteazą znajdującą się w komórkach NK oraz CLT, która wraz z innymi proteazami serynowymi odgrywa kluczową rolę w układzie odpornościowym. Enzym ten prowadzi do apoptozy zarówno na drodze zależnej, jak i niezależnej od kaspaz. W procesie przedostawania się GrB do komórek docelowych biorą udział perforyny, które w dużym uproszczeniu, tworzą pory w błonie komórek docelowych, umożliwiając GrB przedostanie się do ich wnętrza[51, 116, 117]. W komórce docelowej GrB ulega translokacji/przeniesieniu do jądra komórkowego, gdzie może zainicjować trzy niezależne szlaki prowadzące do śmierci komórki. Pierwszym z nich jest aktywacja kaspazy-3, prowadząca do apoptozy, drugim - hydroliza substratów kaspazy-3, takich jak ICAM i Bid, a trzecim - hydroliza laminy B[51-53]. Oprócz pozytywnych funkcji, jakie pełni GrB, jego niepożądaną aktywność zaobserwowano w raku piersi oraz w chondrocytach chrząstki stawowej[118].



Rysunek 20. Detekcja Granzymu B i optymalizacja warunków analiz na rekombinowanym enzymie i w lizatach linii komórkowych. A. Struktury TJ55Bt i TJ55.5 oraz ich badania kinetyczne B, C. Optymalizacja czasu inkubacji rekombinowanego enzymu z ABP (TJ55Bt (B) lub TJ55.5 (C)). GrB inkubowano z ABP przez wskazany czas i analizowano próbki metodą Western-Blot wykorzystując fluorescencyjny koniugat streptawidyny i znakowanie przeciwciałami. D, E. Lizaty komórek YT poddawano działaniu TJ55.Bt przez wskazany czas (E) lub inkubowano próbki z różnymi stężeniami ABP (D), a następnie analizowano próbki metodą Western-Blot i immunoblottingu z użyciem anty-GrB. Wyniki wskazują, że ABPs wiążą się selektywnie z GrB i wyłącznie w jego miejscu aktywnym. Na podstawie H7.

W czasie, gdy rozpoczynałam ten projekt, badania nad GrB były znacznie ograniczone lub wręcz zaniedbane z powodu braku specyficznych narzędzi do jego oznaczania. Znakowanie immunologiczne było niespecyficzne, ponieważ przeciwciała dla GrB mogły również znakować GrA i GrH[106], co stanowiło dużą przeszkodę w badaniach nad GrB. Dlatego dobrym rozwiązaniem wydawały się nowe technologie wykorzystujące cząsteczki chemiczne. Jednak niskie stężenie GrB w komórkach i jego stosunkowo niska wydajność kinetyczna stanowiły barierę, której pokonanie było prawie niemożliwe. Ponadto, ze względu na podobieństwa strukturalne, substraty GrB były również hydrolizowane przez kaspazy (syntetyczne: tetrapeptyd IEPD lub naturalne: PARP-1, Lamina B, NuMa) [74, 119]. Kaspazy mają większą wydajność kinetyczną niż GrB, co znacznie utrudnia prowadzenie badań przy użyciu niespecyficznych narzędzi chemicznych. Pomimo kilku prób stworzenia cząsteczek do badania GrB, głównym problemem była ich selektywność i niskie parametry kinetyczne[74, 111]. Dlatego też poszukiwano bardziej niezawodnej metody wykrywania GrB. Aby rozwiązać te problemy, postanowiłam zoptymalizować optymalną strategię do ukierunkowanego badania aktywności GrB.

W prezentowanej pracy zaprojektowałam i scharakteryzowałam zestaw selektywnych sond chemicznych dla GrB. Pierwsza z nich to klasyczna inhibitorowa sonda typu ABP, zastosowana do wykrywania GrB w kilku liniach komórkowych, a druga to substratowa sonda sABP, zastosowana do obrazowania GrB w żywych komórkach, z zachowaniem ich funkcji.

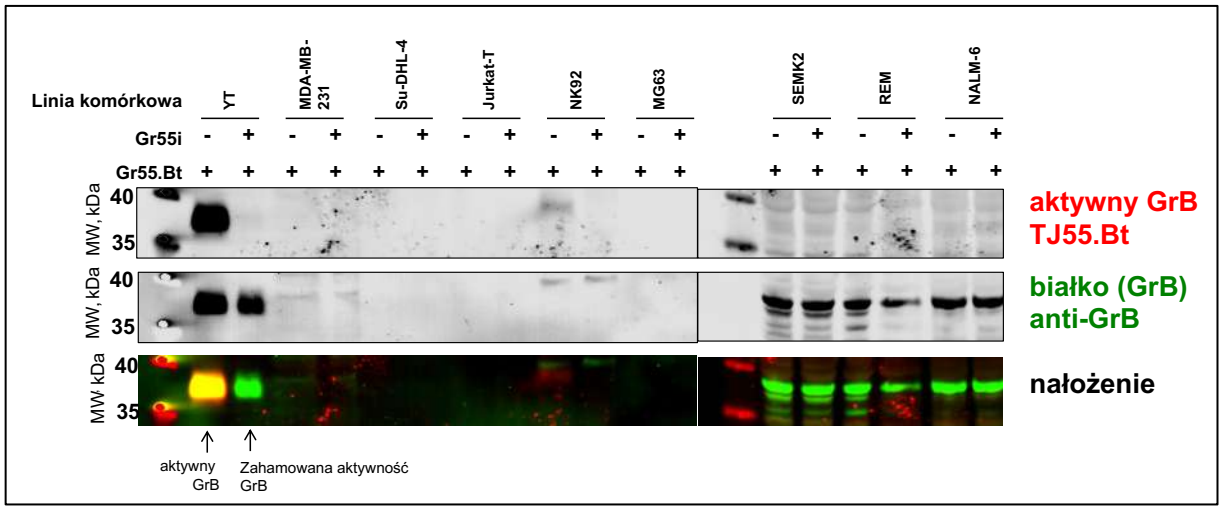
Ze względu na swoją budowę i specyficzność substratową GrB hydrolizuje substraty po kwasie asparaginowym podobnie jak kaspazy. Jednakże, w przeciwieństwie do nich, jest to proteaza serynowa, dlatego jako elektrofil w ABP zastosowaliśmy selektywną dla proteaz serynowych difenylofosfonianową pochodną kwasu asparaginowego. Takie podejście ogranicza możliwość wiązania z proteazami cysteinowymi, głównie kaspazami.

Aby wybrać sekwencję wiodącą sondy GrB, najpierw przeprowadziliśmy badania przesiewowe przy użyciu biblioteki HyCoSuL-Asp oraz opisanej w H8 biblioteki P1 zawierającej naturalne i nienaturalne aminokwasy. Wykazaliśmy, że enzym ten najlepiej rozpoznaje ujemnie naładowane reszty aminokwasowe w pozycjach P1 i P3, odpowiednio Asp i Glu (odpowiednio). Co ciekawe, GrB hydrolizuje substraty z pochodnymi Pro w pozycji P2, w szczególności Oic, podczas gdy reszty alifatyczne, takie jak izoleucyna (Ile) i norwalina (Nva) są wiązane w kieszeni S4. Ponieważ GrB charakteryzuje się niską liczbą obrotów substratu, dlatego postanowiłam zbadać wpływ długości łańcucha peptydowego na aktywność tego enzymu i okazało się, że pentapeptydy są przez niego efektywniej hydrolizowane niż klasycznie stosowane tetrapeptydy. Dlatego też zaprojektowałam kolejną bibliotekę peptydów do badania pozycji P5 granzymów. Biblioteka ta składała się ze wspólnej sekwencji P1-P4 i różniła się w pozycji P5, w której przyłaczono zestaw naturalnych i nienaturalnych aminokwasów. Po badaniach przesiewowych biblioteki wykazaliśmy, że GrB posiada bardzo szerokie preferencje w kieszeni S5. W oparciu o te wyniki zsyntetyzowaliśmy kilka substratów i po ocenie kinetycznej wybraliśmy najlepszą sekwencję Nva-Ile-Glu-Oic-Asp, którą następnie zastosowaliśmy do stworzenia markerów chemicznych dla GrB (Rys. 20A).

Aby uzyskać zestaw narzędzi chemicznych do kompleksowego badania GrB, zaprojektowaliśmy dwa inhibitorowe sensory, jeden biotynylowany (TJ55Bt), a drugi zawierający pochodną cyjaniny Cy5 (TJ55.5) (Rys. 20A). Inhibitory były syntetyzowane w taki sam sposób, jak SK15.5. W pierwszym etapie sekwencja wiodąca peptydu była syntetyzowana na żywicy, a następnie do N-końca peptydu dołączono znacznik fluorescencyjny Cy5 lub biotynę. Równolegle zsyntetyzowano elektrofilowy fragment

H_2N-Asp$^P(OPh)_2$ w wieloetapowej reakcji, opisanej ze szczegółami w publikacji. Następnie te dwa fragmenty, peptydowy oraz fragment reagujący, zostały sprzęgnięte w roztworze. TJ55Bt i TJ55.5 były przeznaczone do badania GrB w lizatach komórkowych, dlatego najpierw określiliśmy powinowactwo wiązania i obliczyliśmy stałe szybkości inhibicji k_{obs}/I, które były zaskakująco wysokie w porównaniu z innymi dostępnymi inhibitorami GrB (296 000 $M^{-1}s^{-1}$ dla TJ55Bt i 4400 $M^{-1}s^{-1}$ dla TJ55.5). Ta cecha jest niezwykle pożądana w narzędziach do monitorowania aktywności proteaz, ponieważ wskazuje, że sonda silnie wiąże się z docelowym enzymem, zmniejszając niespecyficzne oddziaływania.

Wyniki te sugerują wysoki potencjał aplikacyjny tych cząsteczek, dlatego konieczne było zbadanie ich przydatności i optymalizacja warunków do wykrywania GrB w próbkach komórkowych przy użyciu Western-Blot. W tym celu najpierw inkubowano enzym z sondą (TJ55Bt lub TJ55.5) w różnym czasie. Następnie próbki były analizowane przy użyciu SDS-PAGE i przenoszone na membranę nitrocelulozową i znakowane immunologicznie anty-GrB. Wykazaliśmy, że obie sondy wiążą się z GrB nawet po bardzo krótkim czasie inkubacji, wynoszącym 1 minutę. Co więcej, marker biotynylowany wiązał się szybciej, co potwierdza nasze analizy kinetyczne. Dodatkowo, preinkubacja z kowalencyjnym inhibitorem GrB zapobiegła wiązaniu sondy, co sugeruje, że wiąże się ona w miejscu aktywnym, a nakładający się sygnał ABP z anty-GrB potwierdza, że znakowanie docelowego enzymu (Rys. 20 A, C).



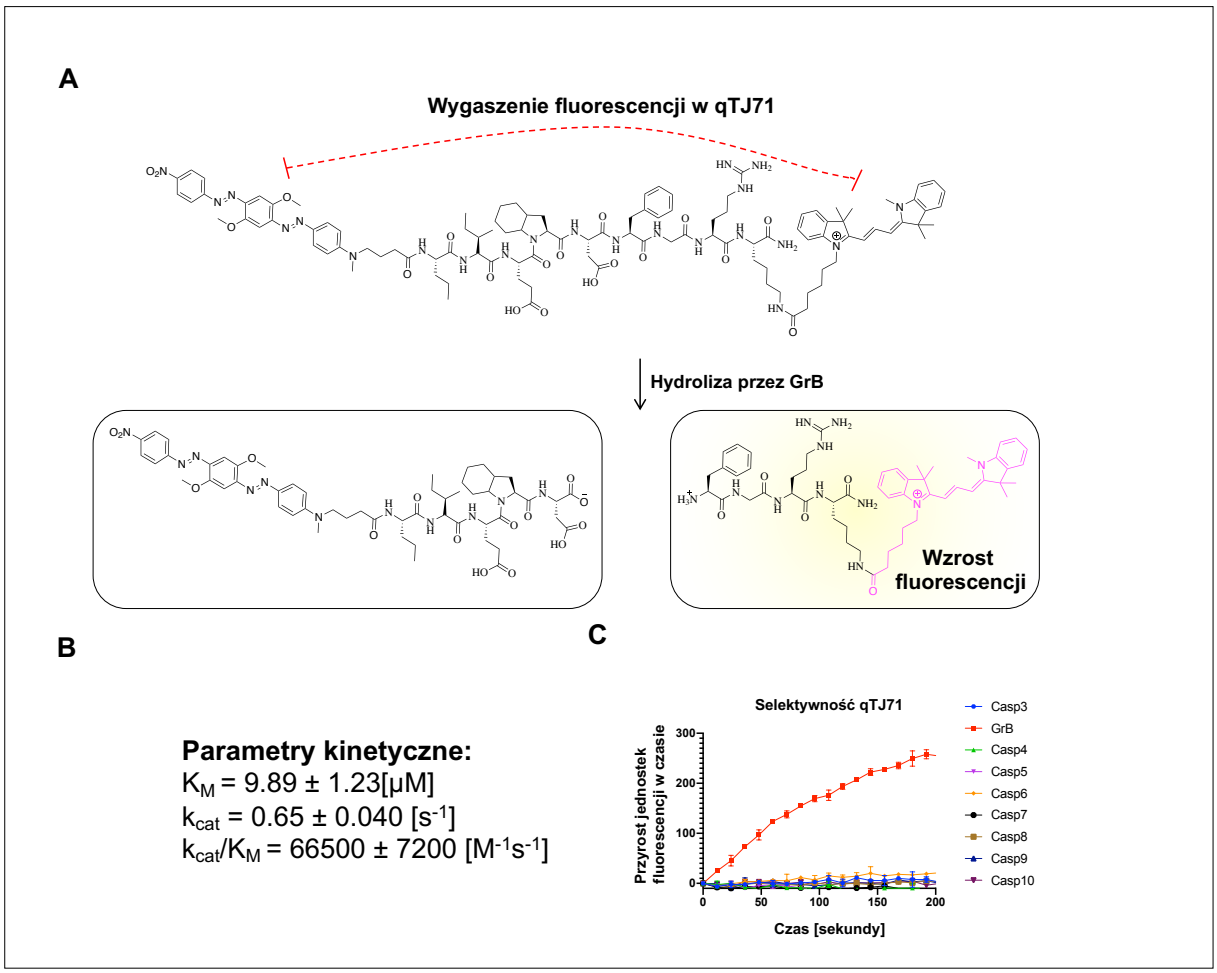
Rysunek 21. Wykrywanie GrB w różnych liniach komórkowych. A) Lizaty komórkowe z różnych linii komórkowych poddano działaniu identycznego stężenia TJ55.Bt, a następnie wykonano Western-Blot. Dane wskazują na obecność aktywnego GrB (czerwony) w komórkach YT i minimalne stężenie w komórkach NK92. Zaadaptowano z H7.

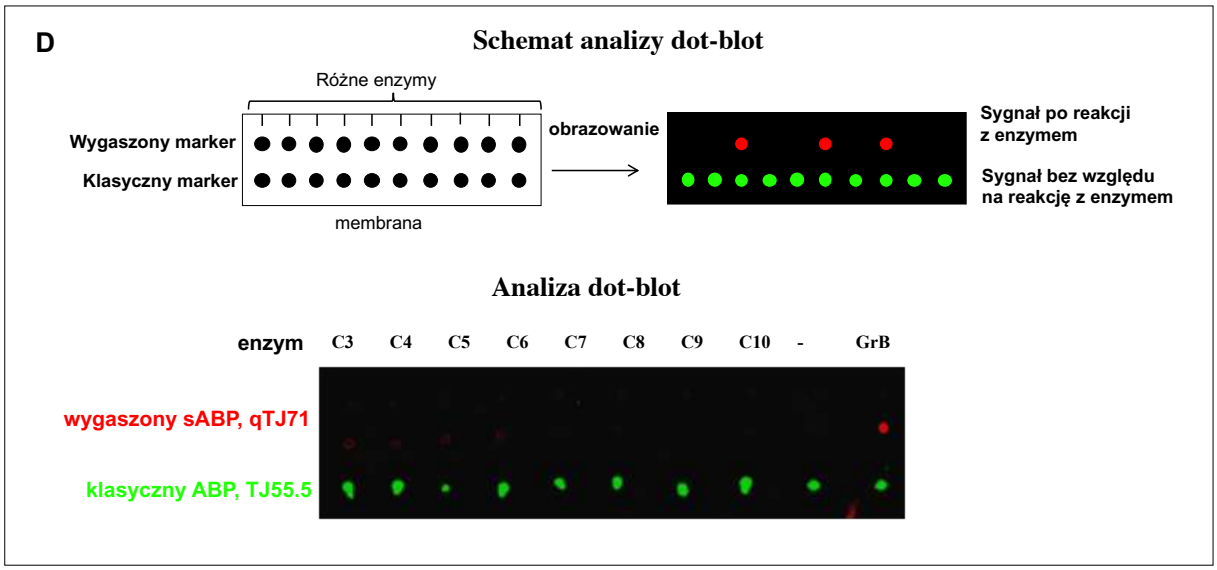
W kolejnym etapie przetestowaliśmy selektywność naszego markera w złożonej mieszaninie białek występujących w lizatach komórkowych linii YT, gdyż dane literaturowe wskazują na wysokie stężenie GrB w tej linii komórkowej. Po inkubacji sondy z lizatami w czasie i przy różnych jej stężeniach wykazano, że nawet niskie nanomolarne stężenie sondy (5nM) i krótki czas inkubacji są wystarczające do wykrycia tego enzymu w lizatach YT (Rys. 20 D, E). Co więcej, markery te wiążą się selektywnie z GrB i nie wykryto żadnych innych prążków, co zostało potwierdzone przy użyciu przeciwciała anty-GrB. Zachęcona tymi wynikami, zaproponowałam zbadanie aktywności GrB w lizatach innych linii komórkowych. Wybraliśmy 9 różnych linii komórkowych, w szczególności linie nowotworowe MDA-MB-231, Su-DHL-4, Jurkat-T, NK92, MG63, SEMK2, REM, NALM-6 oraz YT (jako kontrolną linię komórkową) i używając naszego markera wykazaliśmy, że GrB jest aktywny w komórkach YT, podczas gdy

w pozostałych jego aktywność była minimalna, jeśli w ogóle występowała (**Rys. 21**). Co ciekawe, w liniach SEMK2, REM, NALM-6 udało nam się oznaczyć enzym tylko w formie nieaktywnej za pomocą przeciwciała, podczas gdy nie zarejestrowaliśmy aktywnego GrB za pomocą sondy. Dzięki tym badaniom, opracowaliśmy pierwszy selektywny i silnie wiążący się marker do wykrywania aktywnego GrB w lizatach linii komórkowych. Tego rodzaju inhibitorowa sonda może być także wykorzystana do hamowania aktywności enzymu w celu zbadania jego roli, przykładowo w śmierci komórki lub innych szlakach przekazywania sygnału.

Pomimo wielu zalet i niewątpliwej przydatności TJ55.5, ten rodzaj sondy wiąże się kowalencyjnie z enzymem, a zatem może zmieniać funkcjonowanie komórki. Co więcej, cząsteczki fluorescencyjne są wyposażone w „niewygaszony" znacznik fluorescencyjny, który po indukcji emituje fluorescencję, niezależnie od tego, czy sonda jest związana z enzymem, czy nie. Może to prowadzić do fałszywie dodatniego sygnału. Dlatego do obrazowania enzymów lepszym wyborem są sondy oparte na substratach, ponieważ nie blokują one aktywności enzymu i nie zakłócają funkcjonowania komórki. W tym projekcie chciałam stworzyć kompleksowy zestaw do śledzenia aktywności GrB, który zawierałby cząsteczki do wykrywania enzymu, ale także do jego obrazowania. Dlatego w kolejnym etapie skupiliśmy się na uzyskaniu cząsteczki umożliwiającej nieinwazyjne obrazowanie GrB w komórkach. W tym celu, aby zoptymalizować wiodącą sekwencję peptydową takiej cząsteczki, wraz z Tomaszem Janiszewskim zaprojektowaliśmy serię substratów typu IQF, które oprócz zoptymalizowanej wcześniej sekwencji P1-P5 zawierały inne elementy konstrukcyjne, w tym reszty aminokwasowe w pozycjach primowanych, fluorofor, wygaszacz i linker. Wykorzystaliśmy różne warianty sekwencji P1'-P3' (Phe-Gly-Arg, Gly-Gly, PEG(4)) zaprojektowane w oparciu o dane literaturowe oraz dołączyliśmy (lub nie) linker PEG(4) na N-końcu peptydu, aby zwiększyć odległość pomiędzy sekwencją wiążącą w miejscu aktywnym a fluoroforem. Ponadto, PEG(4) zwiększa rozpuszczalność takich cząsteczek. Jako parę donor/akceptor fluorescencji umożliwiającą odczyt proteolizy wybraliśmy ACC/Lys(Dnp). Ponieważ Nle(OBzl) była dobrze rozpoznawana w pozycji S2, prawie tak dobrze jak Oic, zbadaliśmy wpływ zamiany Oic na Nle(O-Bzl) na aktywność i specyficzność enzymu. Ocena kinetyczna tak zaprojektowanych dwunastu indywidualnych substratów pozwoliła nam stwierdzić, że Oic w pozycji P2 jest kluczowy do reakcji z GrB, ponieważ peptydy o sekwencji z Nle(O-Bzl) w P2 nie były hydrolizowane przez ten enzym. Co ciekawe, zaobserwowaliśmy silny wpływ sekwencji P1'-P3' na aktywność enzymu, gdyż tylko substraty z Phe-Gly-Arg reagowały z enzymem. Pomimo umieszczenia linkera w pozycji P6, substraty zawierające Nva-Ile-Glu-Oic-Asp---Phe-Gly-Arg były hydrolizowane przez GrB niezwykle szybko, z k_{cat}/K_M wynoszącym około 1×10^5 $s^{-1}M^{-1}$. Dlatego następnie sprawdziliśmy selektywność tej sekwencji wiodącej dla GrB.

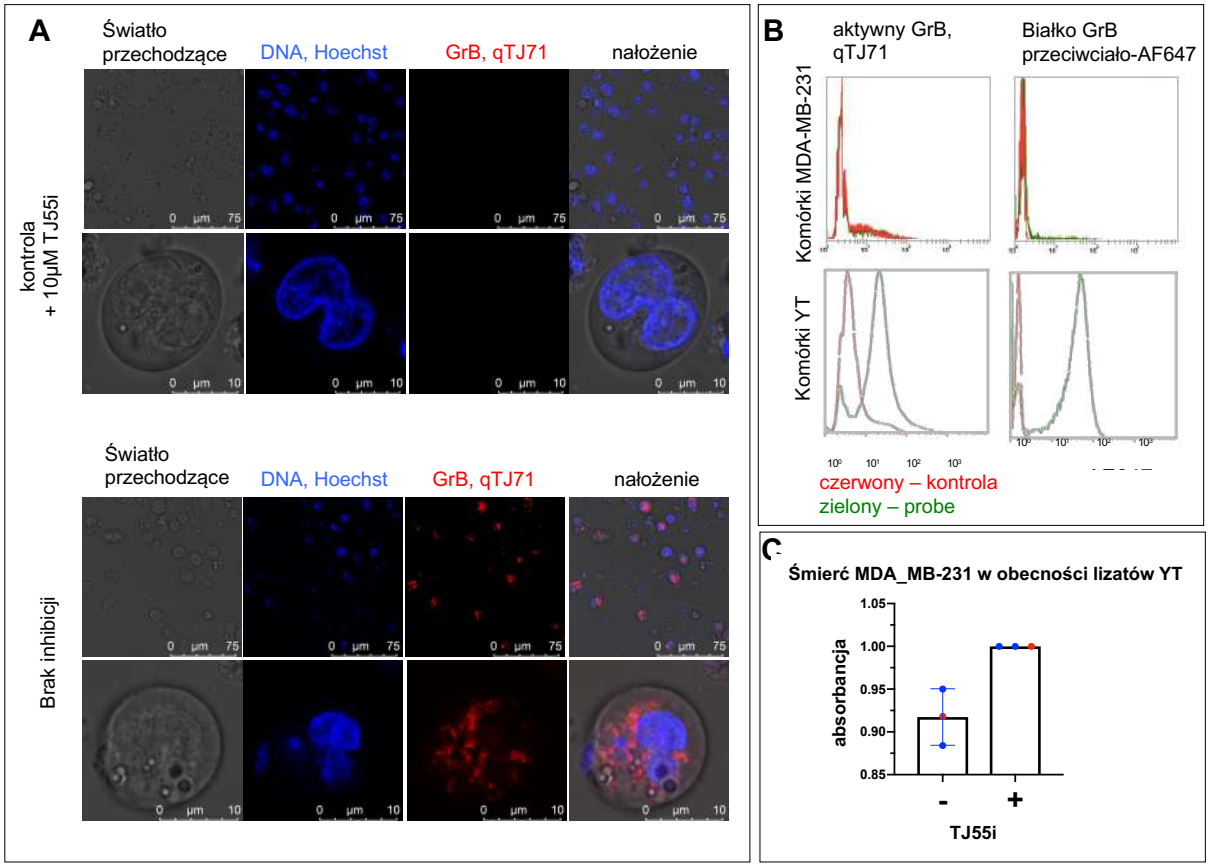
Ponieważ kaspazy, a zwłaszcza kasp-6 i kasp-8, wykazują podobną specyficzność substratową jak GrB, uznaliśmy za konieczne sprawdzenie, czy wybrana przez nas sekwencja jest hydrolizowana przez te enzymy. Wykazaliśmy, że substrat z naszą wiodącą sekwencją był hydrolizowany przez GrB tylko w minimalnym stopniu, w granicach błędu statystycznego, przez kasp-6 i kasp-8. Zachęceni tymi wynikami, w kolejnym etapie wymieniliśmy parę donor-akceptor na bardziej odpowiednią do badań komórkowych, ponieważ emisja fluorescencji ACC jest zbliżona do naturalnej autofluorescencji komórek i związek ten charakteryzuje się słabą wydajnością kwantową w porównaniu z innymi fluoroforami. Postanowiliśmy zastąpić go Cy3, ze względu na jego liczne zalety, takie jak intensywność fluorescencji, wydajność kwantowa, fotostabilność i brak nakładania się z autofluorescencją komórek. Jako wygaszacz fluorescencji zastosowaliśmy tzw. czarny wygaszacz (ang. *black hole quencher*, BHQ2) charakteryzujący się wysoką wydajnością wygaszania fluorecencji Cy3. I tak zaprojektowana została sonda qTJ71 o strukturze BHQ2-Nva-Ile-Glu-Oic-Asp-Phe-Gly-Arg-Cy3 (**Rys. 22A**). Następnie zaprojektowaliśmy drogę





Rysunek 22. Schemat hydrolizy qTJ71 przez GrB (A) i parametry kinetyczne hydrolizy qTJ71 przez GrB (B). k_{cat}/K_M obliczono przy użyciu równania Michaelisa-Menten. C. Selektywność qTJ71. Eksperyment przeprowadzono z użyciem identycznych stężeń GrB i kaspaz. Wzrost fluorescencji mierzono w czasie i analizowano w programie GraphPad Prism. D. Analiza dot-blot sondy z wygaszoną fluorescencją qTJ71 w porównaniu z klasyczną TJ55.5. Wszystkie dane przedstawione są jako średnie z niezależnych eksperymentów z błędem standardowym. Rysunek zmodyfikowany, częściowo zaadaptowany z pracy H7.

syntezy qTJ71, która ze względu na obecność reszt aminokwasowych posiadających dodatni oraz ujemny ładunek nie była trywialna. Wieloetapowa synteza fragmentu peptydowego zakończonego wygaszaczem została przeprowadzona na podłożu stałym, podczas gdy wygaszacz fluorescencji został przyłączony w roztworze. Po syntezie zbadaliśmy selektywność qTJ71 w stosunku do GrB i tak jak się spodziewaliśmy, przede wszystkim wiąże się on z GrB i to z bardzo wysoką wydajnością hydrolizy wynoszącą 66500 $M^{-1}s^{-1}$ (**Rys. 22B**). Dodatkowo, używając metody dot blot, wykazaliśmy minimalne tło sondy substratowej także podczas inkubacji z enzymami z grupy kaspaz, w przeciwieństwie do sondy inhibitorowej, która dawała wysokie tło, co świadczy o tym, że qTJ71 dobrze nadaje się do obrazowania aktywnych enzymów (**Rys. 22C**). Dlatego też postanowiłam zastosować qTJ71 w badaniach komórkowych.



Rysunek 23. Wykrywanie aktywnego GrB w komórkach YT za pomocą qTJ71 przy użyciu mikroskopii konfokalnej. A. Komórki YT potraktowano sondą qTJ71 i Hoechst 33342, a następnie obrazowano przyżyciowo przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Jako kontrolę komórki YT inkubowano z inhibitorem GrB, a następnie dodano sABP. B. Wykrywanie GrB w komórkach YT i brak aktywnego GrB w komórkach MDA-MB-231 znakowanych qTJ71. Komórki YT i MDA-MB-231 barwiono za pomocą qTJ71 i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Jako kontrolę analizowano komórki nieoznakowane i komórki znakowane anty-GrB, potwierdzając selektywne znakowanie GrB za pomocą sABP w komórkach. C) Śmierć komórek MDA-MB-231 po inkubacji z lizatami YT w badaniu cytotoksyczności. Jako kontrolę zastosowano preinkubację z TJ55i. Dane wskazują, że GrB ułatwia zabijanie komórek. Rysunek częściowo zaadaptowany z pracy H7.

Za pomocą cytometrii przepływowej, przy użyciu qTJ71 zbadaliśmy aktywność GrB w komórkach YT wykazujących dużą ekspresję GrB oraz w komórkach MDA-MB-231, w których brak jest GrB (Rys. 23B). W komórkach MDA-MB-231 sygnał fluorescencyjny pochodzący zarówno od sondy, jak i anty-GrB nie był wykrywalny, podczas gdy w komórkach YT sygnał fluorescencyjny był bardzo silny, potwierdzając użyteczność markera qTJ71 do badań na komórkach. Ponadto sonda ta pozwala na monitorowanie wpływu aktywności GrB z YT na komórki nowotworowe na przykładzie MDA-MB-231 (Rys. 23C). Stwierdziliśmy, że GrB ułatwia śmierć komórek MDA-MB-231, przyspieszając ten proces, ale inhibicja GrB nie zapobiega śmierci MDA-MB-231 (Rys. 23C). Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami, których rezultaty wskazują, że komórki pozbawione GrB również ulegają apoptozie, ale wykorzystują inną ścieżkę, która prawdopodobnie jest zależna od GrA. Ponadto zaobserwowaliśmy, że zahamowanie GrB wpływa na chemotaksję, co również potwierdziło kluczową rolę GrB w komórkach efektorowych układu odpornościowego.

Lokalizacja GrB w komórkach jest zwykle sprawdzana przy użyciu przeciwciał, które nie rozróżniają aktywnego i nieaktywnego enzymu. Aby sprawdzić czy nasza sonda może być zastosowana do badania aktywności GrB, najpierw wykonaliśmy test cytotoksyczności qTJ71 i wykazaliśmy, że może być stosowana do badań komórkowych nawet w bardzo wysokich stężeniach. Ponadto qTJ71 w krótkim czasie pokonuje barierę błony komórkowej i można wykryć intensywną fluorescencję niemal natychmiast po dodaniu sondy do komórek. Na podstawie powyższych wyników wywnioskowaliśmy, że qTJ71 jest odpowiedni do przyżyciowych testów aktywności GrB w komórkach i może być z powodzeniem wykorzystany do dalszych badań funkcji GrB (Rys. 23A). Opisane w tej pracy narzędzia chemiczne do badania GrB pozwalają na kompleksowe badanie aktywności GrB i jego lokalizacji, a co za tym idzie mogą być wykorzystane do określenia funkcji tej proteazy i jej transportu do komórek docelowych (zakażonych, nowotworowych etc.) podczas odpowiedzi immunologicznej.

PODSUMOWANIE:

- *Opracowaliśmy wydajny substrat i szybko wiążący się inhibitor do badania aktywności GrB,*
- *Opracowaliśmy sondy: inhibitorową i substratową do badania aktywnego GrB w komórkach typu NK,*
- *Nasze narzędzia wiążą się wydajnie i selektywnie w miejscu aktywnym GrB,*
- *Aktywny GrB może być wykryty w lizatach komórkowych przy użyciu TJ55.5,*
- *Sonda qTJ71 może być zastosowana do przyżyciowego monitorowania aktywności GrB w komórkach,*
- *Aktywny GrB przyspiesza zabijanie komórek nowotworowych. Inhibicja GrB nie zapobiega śmierci komórek docelowych.*

Część 3: Inne proteazy układu odpornościowego

H4: Kasperkiewicz P✉, Kołt S, Janiszewski T, Groborz K, Poręba M, Snipas SJ, Salvesen GS, Drąg M✉ Determination of extended substrate specificity of the MALT1 as a strategy for the design of potent substrates and activity-based probes, Scientific Reports 2018, 8, 15998. (IF 4.011; MNiSW 140 punktów (numer na liście: 18277); Cytowania 9)

W tej pracy skupiłam się na proteazie MALT1 (ang. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*), występującej w komórkach układu odpornościowego[65]. Enzym ten, podobnie jak NSP4, występuje w komórkach w niewielkich ilościach, co komplikuje badania nad jego lokalizacją, aktywnością i funkcjami. Aby rozwiązać ten problem, opracowałam czułą i łatwą w aplikacji sondę chemiczną do badań tego enzymu. Badania te były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w Polsce w ramach projektu Preludium, który zdobyłam w otwartym konkursie. W projekcie tym samodzielnie opracowywałam wszystkie testy i analizowałam wszystkie wyniki. Część syntetyczna projektu została wykonana w WUST, natomiast wszystkie badania kinetyczne i komórkowe zostały przeprowadzone w laboratorium Prof. Salvesena w SBP Medical Discovery Institute w USA, podczas mojego stażu podoktorskiego.

MALT1 jest pierwszą zbadaną przeze mnie proteazą cysteinową opisaną w tej pracy habilitacyjnej. Gen MALT1 został odkryty w 1999 roku przez grupę Dierlamm[120]. Od tego czasu wykazano aktywność MALT1 zarówno we wrodzonej, jak i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej[65], co czyni ten rzadko badany enzym interesującym celem badań nad wzajemnymi relacjami w układzie odpornościowym. Aktywność proteazy MALT1 jest kluczowa dla rozwoju populacji komórek B i dla utrzymania poziomu podstawowych przeciwciał, co zostało wykazane na modelach mysich[65]. Co więcej, MALT1 hydrolizuje NF-ĸB i tym samym blokuje dalszy szlak przekazywania sygnałów podczas zapalenia[121-123]. Z drugiej strony, obecność tego enzymu wykazano w przerzutowaniu, a także chorobach nowotworowych np. w chłoniaku, co czyni ten enzym doskonałym celem terapeutycznym[124].

Brak selektywnych i silnych odczynników do badania proteazy MALT1 spowodował, że rola enzymu MALT1 w aktywacji i hamowaniu szlaków przekazywania sygnałów jest nie do końca poznana. W czasie, gdy podjęłam się realizacji projektu, specyficzność substratowa MALT1 była już zbadana przy użyciu biblioteki PS-SCL zawierającej jedynie naturalne aminokwasy[125]. Podobnie jak w przypadku kaspaz, MALT1 zawiera domenę parakaspazową[126], jednak jej kieszeń S1 wiązała jedynie resztę argininy, podczas gdy kaspazy wymagają kwaśnych reszt (kwasu asparaginowego lub glutaminowego)[79]. Preferencja do Arg w S1 jest cechą charakterystyczną dla wielu enzymów proteolitycznych, w tym cysteinowych katepsyn, trypsyny, czynników krzepnięcia krwi, a także NSP4, co może prowadzić do hydrolizy tych samych substratów. Nakładające się profile specyficzności to jeden z najważniejszych problemów, który napotykamy podczas projektowania odczynników chemicznych dla proteaz. Dlatego też wnikliwa analiza i selekcja struktury wiodącej dla znacznika chemicznego dopasowanej do kieszeni centrum aktywnego była jednym z największych wyzwań przy projektowaniu sondy chemicznej dla MALT1. W związku z tym, aby znaleźć bardziej selektywny i silniejszy marker chemiczny dla tego enzymu, rozszerzyłam wcześniejsze badania nad specyficznością substratową MALT1 o nienaturalne aminokwasy, stosując strategię HyCoSuL. Zaproponowałam również wydłużenie sekwencji wiodącej markera chemicznego z tetra do pentapeptydowej, co było rzadko praktykowane.

Na podstawie wyników badań specyficzności substratowej MALT1 w kieszeniach S2-S5 wykazaliśmy, że enzym ten, szczególnie w kieszeniach S2-S4, ma bardzo szeroką specyficzność substratową i rozpoznaje wiele reszt aminokwasowych, wśród których wyróżnić można kwas 2-aminooktanowy (2-Aoc), hCha i Cha w kieszeni S4, Ile, Val, trifluorooctano-lizynę (Lys(TFA)), cykloheksyloglicynę (Chg), Nle w kieszeni S3 oraz Pro, Ser, Ala w kieszeni S2. W celu realizacji pomysłu zbadania kieszeni S5, zaprojektowałam bibliotekę pentapeptydów, zawierającą (1) stałą sekwencję wiodącą w P1-P4, rozpoznawaną przez MALT1, (2) różne aminokwasy w P5, o odmiennych właściwościach chemicznych, (3) ACC na C-końcu jako fluorofor oraz (4) grupę acetylową na N-końcu (Ac-P5-LVSR-ACC). Analiza kinetyczna biblioteki wykazała, że specyficzność substratowa MALT1 w pozycji P5 jest bardzo szeroka, a enzym rozpoznaje tam wszystkie aminokwasy bez znaczących preferencji. Dlatego najważniejszym wnioskiem płynącym z tej części pracy jest to, że kieszeń P5 MALT1 jest raczej powierzchnią niż wgłębieniem, a wydłużenie sekwencji peptydowej o dodatkowy aminokwas prowadzi do zwiększenia siły wiązania substratu w kieszeniach enzymu.

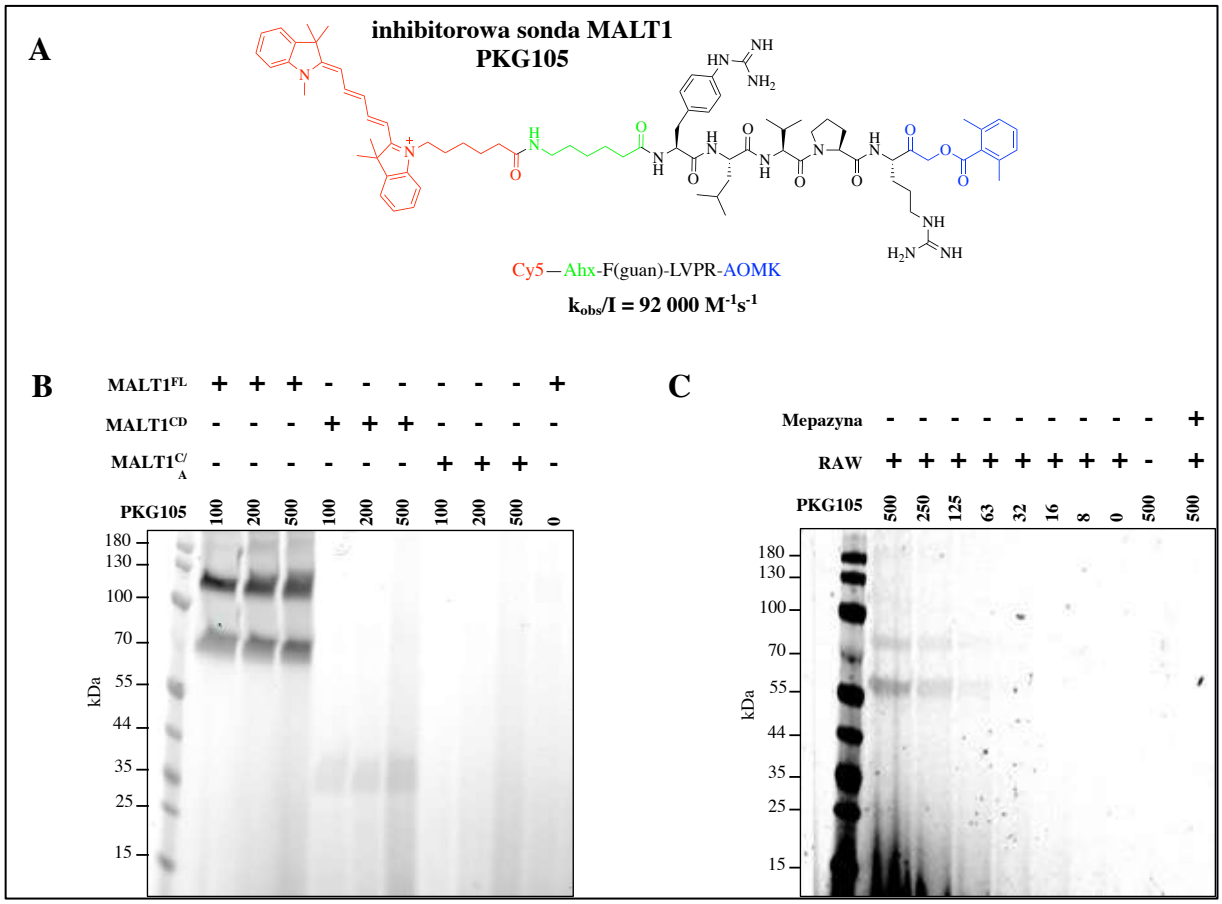
Biorąc pod uwagę niewielką ilość MALT1 w komórkach, sonda o niskich parametrach kinetycznych mogłaby reagować również z innymi, bardziej licznymi proteazami cysteinowymi. Dlatego też, podczas optymalizacji struktury markera chemicznego dla MALT1, głównym celem było uzyskanie cząsteczki, która będzie silnie wiązana przez MALT1, aby zmniejszyć możliwość niespecyficznych oddziaływań. W związku z tym, w oparciu o matryce preferencji katalitycznych MALT1 uzyskaną w wyniku badań przesiewowych biblioteki substratów, zaproponowałam kilka potencjalnych struktur wiodących, z których wybrałam jedną, która wykazała się specyficznością i wysoką siłą działania. Co ciekawe, MALT1 wykazuje wysoką kooperatywność kieszeni wiążących, dlatego analiza preferencji katalitycznych oparta na bibliotekach kombinatorycznych okazała się niewystarczająca, a odpowiednia sekwencja wiodąca została wybrana po walidacji wyników w oparciu o rezultaty badań kinetycznych hydrolizy zsyntetyzowanych substratów przez MALT1.

Do dalszych, bardziej zaawansowanych badań nad MALT1 zaproponowałam syntezę klasycznej inhibitorowej sondy chemicznej. Głównym celem było uzyskanie cząsteczki, która będzie wiązała się kowalencyjnie z MALT1, co jest niezbędne do wykrywania MALT1 w lizatach komórkowych. Ponieważ proteazy cysteinowe wiążą się selektywnie z AOMK, zaproponowałam wykorzystanie tego elektrofila (fragmentu reagującego), który wiąże się nieodwracalnie z resztą cysteiny w miejscu katalitycznym MALT1. Ponadto celem detekcji markera, jako znacznik fluorescencyjny wybrałam pochodną cyjaninową Cy5, ponieważ długość fali emisji jej fluorescencji mieści się w paśmie podczerwieni, co zmniejsza ryzyko odczytu autofluorescencji, a co więcej jest ona uniwersalna, gdyż jej fluorescencję można zmierzyć za pomocą urządzeń znajdujących się w większości laboratoriów biologicznych.

Wspólnie z Katarzyną Groborz opracowałam drogę syntezy tak zaprojektowanej sondy. Synteza została podzielona na 3 części. W pierwszej części zsyntetyzowano fragment reagujący AOMK (synteza w roztworze) i równolegle zsyntetyzowano fragment peptydowy metodą syntezy na podłożu stałym. Następnie fragmenty peptydowy i reagujący sprzęgnięto w roztworze. Po oczyszczeniu, do N-końca dołączono fluorofor, otrzymując Cy5-Ahx-Phe(guan)-LVPR-AOMK (PKG105) (**Rys. 24A**).

Otrzymany ABP wykazał wysokie powinowactwo do enzymu (92 000 $M^{-1}s^{-1}$), około 10-krotnie wyższe niż najlepszy inhibitor MALT1 opisany w literaturze (9 300 $M^{-1}s^{-1}$)[125]. Zachęcona tym wynikiem postanowiłam sprawdzić, czy ABP wiąże się z resztą cysteiny w centrum aktywnym enzymu i w tym celu inkubowałam PKG105 z enzymem pełnej długości (FL), z domeną katalityczną enzymu (CD)

oraz ze zmodyfikowanym genetycznie enzymem, w którym katalityczna reszta cysteinowa została zastąpiona resztą Ala (C/A). Stosując analizę Western-Blot, stwierdziłam, że PKG105 wiązał się z MALT1 FL i MALT1 CD, natomiast nie zaobserwowano sygnału, a tym samy wiązania z MALT1 C/A. Wyniki te wskazują, że nasz ABP wiąże się kowalencyjnie z cysteiną w miejscu katalitycznym MALT1. Co więcej, sonda ta wiązała się silniej z MALT1 FL niż z MALT1 CD, co wskazuje, że w wiązaniu ABP biorą udział dodatkowe wiązania tworzone w miejscu katalitycznym. Co ważne, wykazaliśmy, że nawet małe nanomolarne stężenie naszej sondy wystarcza do wykrycia MALT1 w krótkim czasie (30 min inkubacji) (**Rys. 24B**). Podsumowując tę część badań, pierwszy cel, czyli uzyskanie silnego ABP dla MALT1, został zrealizowany.



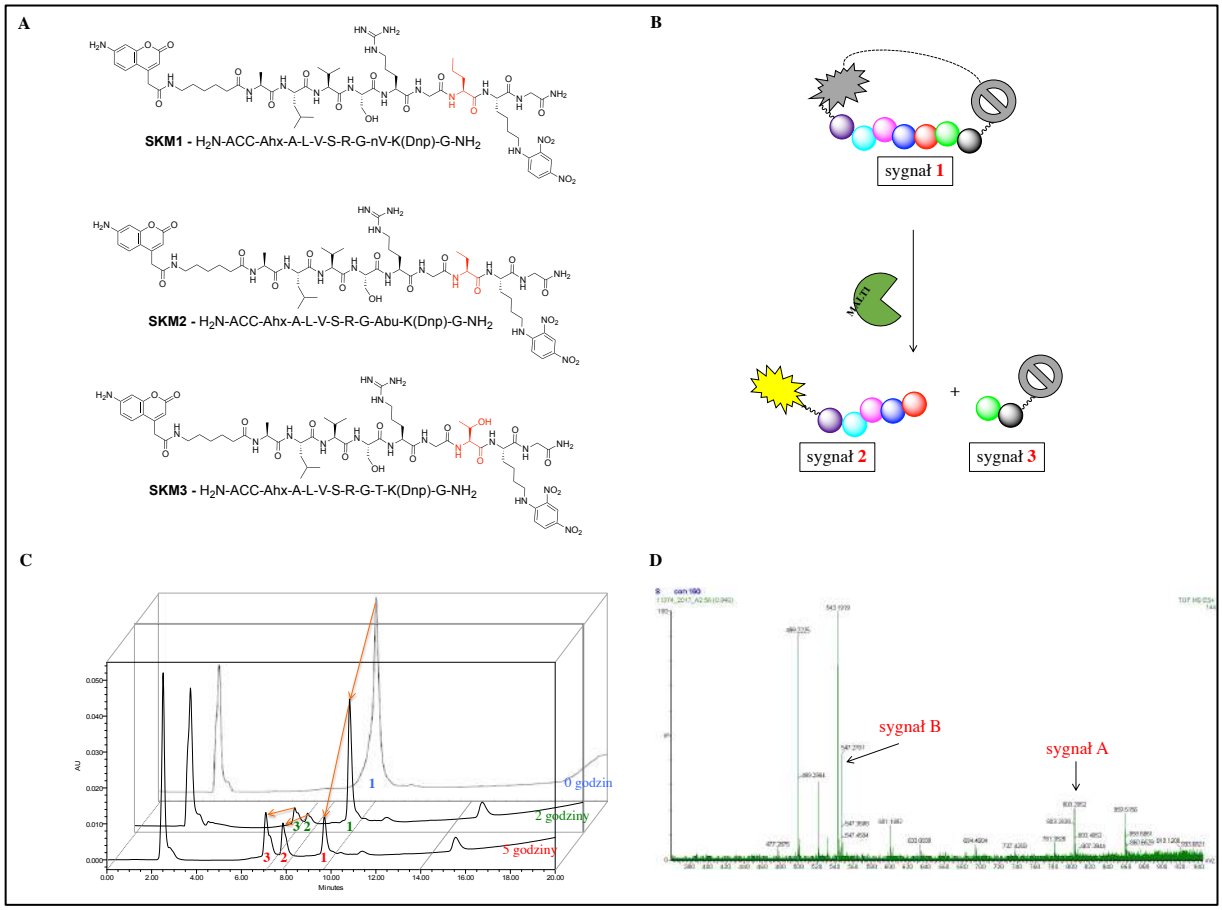
Rysunek 24. A. Struktura PKG105, silnie oddziałującej inhibitorowej sondy MALT1. PKG105 jest zbudowany z następujących elementów budulcowych: (1) fluorofora (Cy5, czerwony), (2) łącznika (Ahx, zielony), (3) specyficznej sekwencji wiodącej (F(guan)-LVPR, czarny) i (4) grupy reagującej (AOMK, niebieski). B. Znakowanie MALT1 CD, MALT1 FL, MALT1 C/A za pomocą PKG105 wskazuje na wiązanie PKG105 w miejscu aktywnym MALT1. C. Znakowanie MALT1 w komórkach RAW297 wykazuje selektywne wiązanie PKG105 do enzymu docelowego. Rysunek zmodyfikowany, częściowo zaadaptowany z pracy H4.

Zainspirowani tymi wynikami poszliśmy o krok dalej i sprawdziliśmy, czy sonda PKG105, oprócz badań na oczyszczonym enzymie, może być dodatkowo wykorzystana do wykrywania enzymu w komórkach, a jeśli tak, to z jaką selektywnością. W tym celu wykorzystaliśmy linię komórkową monocytów mysich, RAW297, aby jednocześnie przetestować selektywność tej sondy i jej użyteczność na komórkach mysich. Lizaty komórek RAW297 inkubowano z sondą w różnych stężeniach przez taki

sam czas (Rys. 24B). Równocześnie, w ramach kontroli, lizaty potraktowano z inhibitorem MALT1, mepazyną, a następnie inkubowano z sondą. Analiza próbek metodą Western-Blot wykazała, że sonda fluorescencyjna dla MALT1 wiąże się specyficznie z MALT1 w lizatach komórkowych. Ponadto, podobnie jak w przypadku oczyszczonych enzymów, sonda wiązała się z komórkowym MALT1 używając niskiego, nanomolarnego stężenia, a zastosowanie komercyjnego inhibitora MALT1 całkowicie uniemożliwiło wiązanie PKG105 z enzymem, potwierdzając jej selektywne wiązanie i przydatność do wykrywania MALT1 w komórkach (Rys. 24B).

Inhibitorowe ABP są doskonałymi narzędziami do badania proteaz, jednak, jak wspomniano w rozdziale *„Sondy chemiczne do badań aktywności proteaz – rodzaje i zastosowanie*", mogą one wpływać na normalne funkcjonowanie komórki poprzez inhibicje enzymów. Dlatego, aby dostarczyć kompleksowy zestaw narzędzi chemicznych do badań MALT1, skoncentrowałam się na drugim celu badań, którym było opracowanie substratowej sondy. Aby to osiągnąć, postanowiłam zoptymalizować strukturę substratu IQF, który łatwo można przekształcić w sondę substratową. Znając preferencje MALT1 w pozycjach P1-P4, wspólnie z Sonią Kołt, zaprojektowałam bibliotekę związków do badania miejsca P1' MALT1. W celu zwiększenia możliwości wiązania peptydów w miejscu aktywnym MALT1, w pozycji P2' zastosowano mieszaninę równomolową (Mix). Sekwencja peptydowa została otoczona parą donora oraz akceptora fluorescencji ACC/Lys(Dnp) ze względu na dobre właściwości fluorescencyjne (ACC) i wygaszające (Lys(Dnp)) oraz niski koszt. Ogólna struktura tej biblioteki to H_2N-ACC-L-V-S-R---P1'-Mix-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH_2. Po syntezie substratów monitorowano szybkość ich hydrolizy przez MALT1 jako przyrost fluorescencji w czasie, a substratowi, który był najsilniej hydrolizowany przez MALT1 przypisano wartość 100%, podczas gdy inne były odpowiednio przeliczane. Po dokonaniu oceny kinetycznej najlepiej dopasowanych reszt, wybrałam optymalny aminokwas, który następnie został wykorzystany w bibliotece do optymalizacji P2'. Sekwencja tej biblioteki była następująca H_2N-ACC-L-V-S-R---Gly-P2'-Gly-Lys(Dnp)-Gly-NH_2, gdzie w P2' wykorzystano całą gamę nienaturalnych aminokwasów. Po przeprowadzeniu oceny kinetycznej wybrano najbardziej obiecujące struktury wiodące, które charakteryzowały się silnym wiązaniem z MALT1 (Rys. 25A). Wyniki badań przesiewowych oraz struktury wykorzystanych aminokwasów zostały szerzej opisane w manuskrypcie.

Markery oparte na substratach mogą być hydrolizowane w wielu miejscach przez docelowy enzym, jeśli są źle zaprojektowane. Ponieważ MALT1 jest specyficzny dla Arg w P1, spodziewaliśmy się tylko jednego miejsca hydrolizy, jednakże, aby to ocenić, określiliśmy miejsce hydrolizy za pomocą analitycznego HPLC i spektrometrii mas (Rys. 25 B-D). Sondę substratową inkubowano z enzymem, a następnie przeanalizowano produkty hydrolizy wykazując, że substrat jest rozszczepiany jedynie na 2 części, zatem ma jedno miejsce hydrolizy, co jest bardzo pożądane w przypadku substratowych sond (Rys. 25C). Metoda działania takiej sondy została zaprezentowana na Rys. 25B. Po hydrolizie wiązania amidowego odległość między donorem, a akceptorem fluorescencji zwiększa się, powodując wzrost intensywności sygnału w czasie. Uzyskana przez nas substratowa sonda dla MALT1 jest wartościowym narzędziem do wykrywania tego enzymu w ekstraktach i lizatach komórkowych. Wykazano, że nasze nowe narzędzie oparte na substracie, po zamianie pary donor-akceptor, może być stosowane w przyszłych badaniach funkcji MALT1 w komórkach, bez zakłócania ich funkcjonowania.



Rycina 25. A. Struktury wydajnych substratów IQF dla MALT1 różniących się pozycją P2'. Do każdego z fragmentu peptydowego została przyłączona para donora-akceptora fluorescencji której przyrost przy 350/460nm można wykryć dopiero po hydrolizie substratu przez docelowy enzym, jak zaznaczono na schemacie B. C. Hydroliza substratu SKM3 (sygnał 1) z MALT1 zachodzi wyłącznie w jednym miejscu, tworząc dwa produkty reakcji (sygnały 2 i 3). D. Analiza produktów hydrolizy wykazała, że zachodziła ona zgodnie z oczekiwaniami, po reszcie Arg.

PODSUMOWANIE:

- *Opracowano pełen profil specyficzności substratowej MALT1 w pozycjach P1-P5,*
- *Po raz pierwszy określono specyficzność substratową MALT1 w pozycjach P1'-P2',*
- *Uzyskano specyficzny ABP dla proteazy MALT1 (PKG105),*
- *Sonda PKG105 może być stosowana do wykrywania docelowego enzymu w lizatach komórkowych oraz do obrazowania MALT1 w komórkach,*
- *Otrzymano wydajny substratowy marker (SKM3) dla MALT1. Może on być w przyszłości stosowany do badania aktywności tego enzymu w ekstraktach i lizatach komórkowych.*

Część IV: Opis prac przeglądowych

H3: Kasperkiewicz P✉, Poręba M, Groborz K, Drąg M, Emerging challenges in the design of selective protease substrates, inhibitors and activity-based probes for indistinguishable proteases, FEBS Journal 2017, 284, 1518. (IF 4.530; MNiSW 100 punktów (numer na liście: 6528); Cytowania 35)

W tej pracy, tak jak sugeruje tytuł, opisaliśmy wyzwania związane z projektowaniem selektywnych substratów, inhibitorów i sond dla enzymów proteolitycznych, w tym proteaz układu immunologicznego. Dokonaliśmy przeglądu dostępnych informacji i podzieliliśmy się naszym doświadczeniem, przedstawiając problemy, z jakimi można się spotkać podczas projektowania i syntezy odczynników chemicznych do badań proteaz. Dokonaliśmy również przeglądu opracowanych sond i dostępnych rozwiązań prowadzących do opracowania lepszych metod, związków charakteryzujących się większą selektywnością, aktywnością i przepuszczalnością przez błonę komórkową. Wspólnie z prof. Marcinem Drągiem opracowałam koncepcję i treść pracy. Dokonałam wyboru literatury i przydzieliłam zadania redakcyjne współautorom. Nadzorowałam ich pracę i zredagowałam ostateczną wersję tekstu. Samodzielnie napisałam ok. 45% pracy i przygotowałam Rysunki 1-5. Autorzy poszczególnych części artykułu przedstawiają się następująco: *Wstęp, Proteazy Serynowe* oraz *Podsumowanie* (Paulina Kasperkiewicz), *Proteazy Cysteinowe* oraz *Jeden Enzym-Dwa Organizmy* (Marcin Poręba), *Metaloproteazy* (Katarzyna Groborz). Wspólnie z wszystkimi autorami napisaliśmy i edytowaliśmy manuskrypt.

H6: Kasperkiewicz P ✉ , Peptidyl Activity-Based Probes for Imaging Serine Proteases, Frontiers in Chemistry 2021. (IF 3.994; MNiSW 100 punktów (Numer na liście: 6833); Cytowania 2)

W niniejszym manuskrypcie dokonałam przeglądu dostępnych technik obrazowania proteaz serynowych, szczególnie proteaz układu immunologicznego. Skupiłam się na chemicznych markerach peptydowych, które są również przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej. Manuskrypt ten jest wynikiem dokładnej analizy 105 cytowań i zawiera 21 stron, 7 rycin i 3 tabele. Publikacja ta stanowi kompleksowe źródło informacji na temat projektowania sond chemicznych dla proteaz, w tym odpowiedniego doboru poszczególnych bloków budulcowych sond chemicznych. Dokonałam również przeglądu istniejących peptydowych markerów chemicznych i krótko opisałam ich zastosowanie w obrazowaniu docelowych enzymów. Ponadto opisałam perspektywy wykorzystania markerów dla proteaz serynowych w przyszłych badaniach. Napisałam i poprawiłam manuskrypt.

Podsumowanie

W prezentowanym osiągnięciu naukowym skoncentrowałam się na badaniu aktywności proteaz układu odpornościowego i ich detekcji oraz obrazowaniu. Proteazy układu odpornościowego m.in. poprzez niszczenie patogenów i aktywację apoptozy odgrywają bardzo ważną funkcję w obronie gospodarza. Jednak ich rola jest często niedoceniana i zaniedbywana w badaniach nad odpowiedzią immunologiczną. W ramach interdyscyplinarnych projektów zaproponowałam nieszablonowe strategie badania aktywnych proteaz układu odpornościowego, wykorzystując dedykowane i selektywne sondy aktywności. Opracowałam unikalne "inteligentne narzędzia" do badań *in vitro* i *in vivo*, które mogą dostarczyć ważnych i dokładnych informacji na temat funkcjonalności, profilu aktywności proteinaz, a także mogą znaleźć zastosowanie w monitorowaniu zmian aktywności i lokalizacji tych enzymów w komórkach, jak i podczas odpowiedzi immunologicznej. Opracowałam różne rodzaje narzędzi chemicznych dla proteaz serynowych i cysteinowych, w tym cząsteczki oparte na substratach i inhibitorach. Sondy oparte na inhibitorach (ABPs), są cennymi narzędziami do wykrywania enzymów za pomocą SDS-PAGE i Western-Blot w lizatach komórkowych lub ekstraktach. Jednak obrazowanie aktywności enzymów za pomocą tych cząsteczek jest trudne i wymaga ostrożności oraz dodatkowej walidacji. Ponadto ABPs, poprzez kowalencyjne wiązanie w miejscu aktywnym enzymu mogą zakłócać normalne funkcjonowanie komórki. Dlatego zaproponowałam innowacyjną strategię obejmującą sondy aktywowane enzymatycznie, oparte na epitopach peptydowych, w których fluorescencja może być wykrywana tylko wtedy, gdy są one specyficznie rozszczepiane przez docelową proteazę (fluorogeniczne sondy typu "włącz-wyłącz") i które nie hamują aktywności proteaz, a więc nie wpływają napełnione przez nie fizjologiczne funkcje. Takie podejście było projektem wysokiego ryzyka ze względu na brak „warheada” (fragmentu reagującego cząsteczki), gwarantującego wiązanie z tylko jednym typem proteazy, co zmniejszało ilość możliwych wiązań krzyżowych. Kolejnym dużym wyzwaniem było uzyskanie sond pokonujących barierę błony komórkowej oraz monitorowanie sygnału fluorescencyjnego w środowisku hydrolizy (ograniczenie dyfuzji) w celu precyzyjnej lokalizacji enzymu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej (FACS). Aby rozwiązać wszystkie te problemy, zaprojektowałam sondy składające się z czterech elementów funkcjonalnych: wygaszacza, specyficznej sekwencji rozpoznawczej, łączników i znacznika fluorescencyjnego. Podejście to okazało się skuteczne w obrazowaniu aktywnego GrB w komórkach YT, a zaprojektowane sondy wykazują dobrą rozpuszczalność i przenikalność przez błonę komórkową i dlatego mogą być stosowane do obrazowania aktywnego enzymu za pomocą technik mikroskopowych. Ponadto, sonda taka może być wykorzystana w diagnostyce chorób immunologicznych, w których nadmierna aktywność proteazy powoduje niekontrolowane zniszczenia. Uzyskane przeze mnie sondy mogą być wykorzystywane w badaniach biochemicznych i biologicznych, a także w medycynie do wczesnej diagnostyki lub jeszcze dokładniejszego wykrywania nowotworów. Innowacyjność tych badań ma bardzo duży wpływ na sposób analiz proteaz, dostarczając rezultatów, które powodują zupełnie nowe spojrzenie na biologię proteaz układu odpornościowego, podobnie jak miało to miejsce w przypadku NSPs w neutrofilach.

Przez dziesiątki lat neutrofile były uważane za homogenną populację białych krwinek. Ostatnio wykazano, że komórki te są spolaryzowane i dzielą się na dwie grupy zależne od ich właściwości pro- i przeciwnowotworowych: N1 i N2. W mojej pracy wykazałam, że neutrofile i ich ziarnistości są nierównomiernie wypełnione proteazami serynowymi i że tylko 0,2% ziarnistości azurofilów zawiera wszystkie cztery proteazy serynowe. NSPs są enzymami efektorowymi w neutrofilach, dlatego nasze

odkrycie sugeruje, że funkcja neutrofilów zależy od ich wypełnienia poszczególnymi enzymami. Ponadto wykazaliśmy, że NSPs mają minimalny wpływ na NETozę.

W czasie mojej habilitacji uczestniczyłam jako wykonawca lub kierownik projektu w kilku projektach, w których badałam aktywność proteaz układu odpornościowego. Proteazy te pełnią funkcje efektorowe w odpowiedzi komórkowej prowadzącej do obrony gospodarza. Moim zadaniem było opracowanie inteligentnych odczynników chemicznych, które posłużą jako narzędzia do badania aktywnej formy badanych proteaz. W tym celu zaprojektowałam i opracowałam substraty, inhibitory, sondy chemiczne oparte na substratach lub inhibitorach dla wybranych enzymów układu odpornościowego. Zastosowanie tych cząsteczek przyczyniło się do poszerzenia wiedzy w dziedzinie biochemii i immunologii. Wyniki tych badań zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy JCR, m.in. w JACS (2017) i Nature Communications (2020).

IV. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Po uzyskaniu doktoratu na WUST uzyskałam finansowanie wyjazdu zagranicznego z programu SKILLS (FNP). Dzięki tym funduszom miałam możliwość wyjazdu na drugi staż zagraniczny, tym razem do laboratorium prof. Salvesena. Laboratorium to znajduje się w jednym z wiodących ośrodków badawczych na świecie - Sanford Burnham Medical Research Institute, La Jolla, California, USA. Wybrałam to laboratorium, ponieważ jego kierownik jest doświadczonym naukowcem z rozległą wiedzą w dziedzinie biologii i biochemii enzymów proteolitycznych, które są przedmiotem moich zainteresowań. Liczba cytowań Jego publikacji przekracza 52 100, a indeks h wynosi 99. Prof. Salvesen publikuje w prestiżowych czasopismach, takich jak Nature i Cell. Co więcej, jest on szanowanym naukowcem i cieszy się zaufaniem innych badaczy, o czym przekonałam się podczas konferencji naukowych, w których miałam okazję uczestniczyć. Podczas tego stażu zdobyłam wiele nowych umiejętności biochemicznych.

Ze względu na udaną współpracę z prof. Salvesenem, po powrocie do WUST wykorzystałam możliwość odbycia kolejnego stażu w tym samym laboratorium (finansowanego przez program Harmonia (NCN), jako wykonawca). Podjęłam tę decyzję, ponieważ profesor Guy Salvesen posiada szeroką wiedzę i dzielił się nią ze mną i swoimi współpracownikami, a dla mnie jako stażysty, taki rodzaj mentoringu był niezwykle istotny. W sumie spędziłam 20 miesięcy w laboratorium prof. Salvesena, gdzie zdobyłam wiedzę z zakresu biochemii i biologii komórki, ze szczególnym uwzględnieniem komórek układu odpornościowego.

To stypendium podoktorskie pozwoliło mi znacznie poszerzyć moją wiedzę, gdyż jako chemik, zdobyłam zupełnie nowe umiejętności i wiedzę z zakresu biochemii i biologii komórki. Był to kamień milowy w mojej karierze naukowej, który zaowocował zupełnie nowym podejściem do projektowania cząsteczek chemicznych i wpłynął na zwiększenie moich dotychczasowych zainteresowań naukowych w kierunku biologii komórek odpornościowych. Co więcej, pomogło mi to w zdobyciu grantów na interdyscyplinarne badania w panelach biologicznych, jako kierownik projektów. Ponadto, dzięki temu owocnemu stażowi nawiązałam stałą współpracę z prof. Salvesenem i członkami jego zespołu, ale także

z prof. Danielem Kirchhoferem (Genentech, San Francisco, USA), prof. Phillipem Birdem (Monash University, Australia) i innymi naukowcami, wskazanymi jako współautorzy prezentowanych manuskryptów (H1-H8).

A. 2016-2017, Postdoc w Sanford-Burnham-Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, USA, laboratorium prof. Guy Salvesena.

Podczas mojego stażu podoktorskiego badałam lokalizację i aktywność aktywnych proteaz serynowych w neutrofilach, a także w NETozie. Wykazaliśmy (1) szeroką użyteczność naszych sond do badań aktywności NSPs, (2) nierównomierną lokalizację NSPs w neutrofilach oraz (3) to, że NEToza zachodzi niezależnie od NSPs. W wyniku tych badań opublikowaliśmy dwa manuskrypty, których jestem pierwszym autorem (w JACS (H2) i JBC (H5)).

B. 02.2015-07.2015, Postdoc w Sanford-Burnham Medical Discovery Institute, La Jolla, USA, *laboratorium prof. Guy Salvesena.*

Podczas tego stażu badawczego zajmowałam się zastosowaniem sondy do badania aktywności NSP4 do badań biologicznych. Wykazaliśmy, że opracowana przez nas pierwsza sonda dla NSP4 może być stosowana do monitorowania aktywności NSP4 w neutrofilach. Wyniki te zostały opublikowane na łamach PlosOne (H1).

C. 03.2014, Stażysta, młody naukowiec na Uniwersytecie w Cambridge, Cambridge, Anglia, *laboratorium prof. James Huntington*

Ten krótkoterminowy pobyt był częścią współpracy z firmą XO1 Limited i dotyczył badań nad inhibitorami peptydylowymi trombiny.

V. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Doświadczenie dydaktyczne

Jako asystent, a następnie adiunkt w WUST prowadziłam/prowadzę zajęcia z następujących przedmiotów:

- Microbiology II, laboratorium (w j. angielskim)
- Microbiologia II, laboratorium (w j. polskim)
- Biochemia, ćwiczenia (w j. polskim)
- Chemia Biologiczna, seminarium (w j. polskim)
- Projektowanie syntez organicznych, laboratorium (w j. polskim)

- Projektowanie związków biologicznie czynnych, seminarium (w j. polskim)
- Podstawy chemii organicznej, laboratorium (w j. polskim)
- Metody analityczne w biotechnologii II, wykład (w j. polskim)
- Chemia Bioorganiczna, seminarium (w j. polskim)
- Metody analityczne w biotechnologii II, laboratorium (w j. polskim)
- *Wśród wymienionych przedmiotów jestem autorką kursu „Metody analityczne w biotechnologii II" (w j. polskim)*

Jestem/byłam promotorem pomocniczym rozpraw doktorskich studentów, a także sprawuję nadzór merytoryczny nad rozprawami:

- Dr inż. Sonia Kołt (obrona w 2020)
- Dr inż. Tomasz Janiszewski (obrona w 2021)
- Mgr inż. Sylwia Modrzycka (obrona zaplanowana na wrzesień 2022)
- Mgr Edyta Bielec (rozpoczęcie 1 października 2021)
- Mgr Aleksandra Korba (rozpoczęcie 1 października 2021)
- Mgr Izabela Krauze (rozpoczęcie 1 października 2021)
- Mgr inż. Kornelia Steindel (rozpoczęcie 1 października 2021)
- Mgr inż. Magdalena Wądrzyk (rozpoczęcie 1 października 2021)

Byłam promotorem czterech prac magisterskich w j. polskim oraz sześciu w j. angielskim.
Byłam promotorem sześciu prac inżynierskich.

Doświadczenie w popularyzacji nauki:

- Wygłosiłam wykład w ramach "Dolnośląskiego Festiwalu Nauki" na temat mikroświata komórek
- Wygłosiłam wykład w Liceum Salezjańskim we Wrocławiu na temat znaczenia enzymów proteolitycznych
- Przygotowałam i brałam udział w pokazach chemicznych dla dzieci ze szkół podstawowych i zaprezentowałam kilka eksperymentów, m.in. pastę do zębów dla słoni i kopalnię złota.

Doświadczenie organizacyjne:

- Organizator konferencji *„Gordon Research Seminar on Proteolytic Enzymes and their Inhibitors"*, Il Ciocco, Włochy, 2020 (przełożone na 2022 r. z powodu epidemii COVID-19). Zorganizowałam konferencję, byłam członkiem komitetu naukowego i zarządzałam konferencją.
- Członek zarządu Klubu Stypendystów Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej współorganizowałam zjazdy Klubu (dwukrotnie) (2020, 2021).

VI. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia

- **2021 Powołanie do *Academia Iuvenum* Politechniki Wrocławskiej**
- **2020 Srebrny Krzyż zasług**
- 2020 Nagroda Rektora WUST
- **2018 Nagroda L'Oréal-UNESCO dla kobiet i nauki**
- 2018 Nagroda *Travel Award* na konferencji Gordon Research Conference we Włoszech
- **2017 Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Młodych Wybitnych Naukowców**
- 2017 Nagroda Rektora WUST
- 2017 Nagroda *Travel Award* na *The 10th General Meeting of the International Proteolysis Society*, Banff, Kanada
- **2016 The FEBS Journal Best Poster Prize podczas Cell Death Gordon Research Conference**
- 2016 Nagroda Rektora WUST
- **2016 stypendium START FNP (druga edycja)**
- **2015 stypendium START FNP**
- **2015 Skills - STAŻE, FNP**
- **2014 Wyróżnienie rozprawy doktorskiej**
- 2014 Nagroda Dziekana WUST
- 2013 GRANT plus
- 2011 Przedsiębiorczy doktorant
- 2011 2012 Stypendium dla najlepszych doktorantów Wydziału Chemicznego WUST
- 2010 Stypendium indywidualne w grancie FNP Focus (laureat prof. Marcin Drąg)

VII. Literatura

1. Vivier E, Malissen B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol*. Jan 2005;6(1):17-21. doi:10.1038/ni1153

2. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*. Feb 2008;90(2):227-42. doi:10.1016/j.biochi.2007.10.009

3. Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*. Jul 2006;6(7):541-50. doi:10.1038/nri1841

4. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. Mar 2013;13(3):159-75. doi:10.1038/nri3399

5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. Mar 5 2004;303(5663):1532-5. doi:10.1126/science.1092385

6. Clancy DM, Henry CM, Sullivan GP, Martin SJ. Neutrophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of IL-1 family cytokines. *The FEBS journal*. Jun 2017;284(11):1712-1725. doi:10.1111/febs.14075

7. Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Science signaling*. May 27 2008;1(21):pe25. doi:10.1126/stke.121pe25

8. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. Oct 17 2013;122(16):2784-94. doi:10.1182/blood-2013-04-457671

9. Meyer-Hoffert U. Neutrophil-derived serine proteases modulate innate immune responses. *Front Biosci (Landmark Ed)*. Jan 1 2009;14:3409-18.

10. Bank U, Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol*. Feb 2001;69(2):197-206.

11. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. Jul 17 2014;41(1):21-35. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013

12. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*. Mar 2015;264(1):182-203. doi:10.1111/imr.12266

13. Perdiguero EG, Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol*. Jan 2016;17(1):2-8. doi:10.1038/ni.3341

14. Gordon S, Pluddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC biology*. Jun 29 2017;15(1):53. doi:10.1186/s12915-017-0392-4

15. Zhang C, Yang M, Ericsson AC. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in immunology*. 2021;12:620510. doi:10.3389/fimmu.2021.620510

16. Perera Molligoda Arachchige AS. Human NK cells: From development to effector functions. *Innate immunity*. Apr 2021;27(3):212-229. doi:10.1177/17534259211001512

17. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. Jan 7 2011;331(6013):44-9. doi:10.1126/science.1198687

18. Matosevic S. Viral and Nonviral Engineering of Natural Killer Cells as Emerging Adoptive Cancer Immunotherapies. *Journal of immunology research*. 2018;2018:4054815. doi:10.1155/2018/4054815

19. Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in immunology*. Aug 2008;20(4):207-12. doi:10.1016/j.smim.2008.05.002

20. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*. Apr 2009;9(4):271-85. doi:10.1038/nri2526

21. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual review of immunology*. 1994;12:227-57. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001303

22. Kuby J. *Immunology*. 2nd ed. W.H. Freeman; 1994:1 online resource.

23. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. Mar 19 1998;392(6673):245-52. doi:10.1038/32588

24. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. Nov 24 2010;33(5):657-70. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011

25. Novak N, Koch S, Allam JP, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Jan 2010;125(1):50-9. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.019

26. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;311:17-58. doi:10.1007/3-540-32636-7_2

27. Shurin MR, Smolkin YS. Immune-mediated diseases: where do we stand? *Advances in experimental medicine and biology*. 2007;601:3-12.

28. Baldovino S, Menegatti E, Roccatello D, Sciascia S. Immunological Rare Diseases. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1031:497-509. doi:10.1007/978-3-319-67144-4_26

29. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nature reviews Cancer*. Jun 2021;21(6):345-359. doi:10.1038/s41568-021-00347-z

30. Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine*. Nov 1 1968;128(5):1137-55. doi:10.1084/jem.128.5.1137

31. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*. Jan 1 2004;32(Database issue):D160-4. doi:10.1093/nar/gkh071

32. Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. Oct 29 2015;526(7575):660-5. doi:10.1038/nature15514

33. Sollberger G, Choidas A, Burn GL, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science immunology*. Aug 24 2018;3(26)doi:10.1126/sciimmunol.aar6689

34. Perera NC, Schilling O, Kittel H, Back W, Kremmer E, Jenne DE. NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 17 2012;109(16):6229-34. doi:10.1073/pnas.1200470109

35. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*. Jul 2010;268(1):25-34. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x

36. Gaida MM, Steffen TG, Gunther F, et al. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *Eur J Immunol*. Dec 2012;42(12):3369-80. doi:10.1002/eji.201242628

37. Granot Z, Fridlender ZG. Plasticity beyond cancer cells and the "immunosuppressive switch". *Cancer Res*. Nov 1 2015;75(21):4441-5. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1502

38. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. Jun 18 2015;522(7556):345-348. doi:10.1038/nature14282

39. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. Feb 3 2015;10(4):562-73. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.039

40. Robache-Gallea S, Morand V, Bruneau JM, et al. In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. Oct 6 1995;270(40):23688-92.

41. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. Jul 27 1992;307(1):97-101.

42. Zhu J, Nathan C, Jin W, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell*. Dec 13 2002;111(6):867-78.

43. Fu Z, Akula S, Thorpe M, Hellman L. Potent and Broad but not Unselective Cleavage of Cytokines and Chemokines by Human Neutrophil Elastase and Proteinase 3. *International journal of molecular sciences*. Jan 19 2020;21(2)doi:10.3390/ijms21020651

44. Kessenbrock K, Dau T, Jenne DE. Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. *Journal of molecular medicine*. Jan 2011;89(1):23-8. doi:10.1007/s00109-010-0677-3

45. Kambara H, Liu F, Zhang X, et al. Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. *Cell Rep*. Mar 13 2018;22(11):2924-2936. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.067

46. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol*. Jun 26 2011;12(8):761-9. doi:10.1038/ni.2062

47. Boada-Romero E, Martinez J, Heckmann BL, Green DR. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. Jul 2020;21(7):398-414. doi:10.1038/s41580-020-0232-1

48. Osinska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Central-European journal of immunology*. 2014;39(1):109-15. doi:10.5114/ceji.2014.42135

49. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem*. Mar 4 2005;280(9):8426-34. doi:10.1074/jbc.M413303200

50. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*. May 2010;235(1):35-54. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x

51. Pinkoski MJ, Hobman M, Heibein JA, et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood*. Aug 1 1998;92(3):1044-54.

52. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ*. Jan 2012;19(1):28-35. doi:10.1038/cdd.2011.153

53. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology*. 2008;26:389-420. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404

54. Zhu P, Zhang D, Chowdhury D, et al. Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein Ku70. *EMBO reports*. Apr 2006;7(4):431-7. doi:10.1038/sj.embor.7400622

55. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current opinion in immunology*. Oct 2003;15(5):553-9. doi:10.1016/s0952-7915(03)00108-0

56. Zhou Z, He H, Wang K, et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science*. May 29 2020;368(6494)doi:10.1126/science.aaz7548

57. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*. May 16 2008;133(4):681-92. doi:10.1016/j.cell.2008.03.032

58. Sower LE, Froelich CJ, Allegretto N, Rose PM, Hanna WD, Klimpel GR. Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus alpha-thrombin. *J Immunol*. Apr 1 1996;156(7):2585-90.

59. van Daalen KR, Reijneveld JF, Bovenschen N. Modulation of Inflammation by Extracellular Granzyme A. *Frontiers in immunology*. 2020;11:931. doi:10.3389/fimmu.2020.00931

60. Krotova K, Khodayari N, Oshins R, Aslanidi G, Brantly ML. Neutrophil elastase promotes macrophage cell adhesion and cytokine production through the integrin-Src kinases pathway. *Sci Rep*. Sep 28 2020;10(1):15874. doi:10.1038/s41598-020-72667-3

61. Alfaidi M, Wilson H, Daigneault M, et al. Neutrophil elastase promotes interleukin-1beta secretion from human coronary endothelium. *J Biol Chem*. Oct 2 2015;290(40):24067-78. doi:10.1074/jbc.M115.659029

62. Clancy DM, Sullivan GP, Moran HBT, et al. Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Rep*. Mar 13 2018;22(11):2937-2950. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.062

63. Westphal E, Herzberg M, Neumann I, et al. Neutrophils process interleukin-1beta and interleukin-18 precursors in a caspase-1-like fashion--processing is inhibited by human vascular smooth muscle cells. *European cytokine network*. Mar 2006;17(1):19-28.

64. Goping IS, Barry M, Liston P, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity*. Mar 2003;18(3):355-65. doi:10.1016/s1074-7613(03)00032-3

65. Yu JW, Hoffman S, Beal AM, et al. MALT1 Protease Activity Is Required for Innate and Adaptive Immune Responses. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127083. doi:10.1371/journal.pone.0127083

66. Stackowicz J, Jonsson F, Reber LL. Mouse Models and Tools for the in vivo Study of Neutrophils. *Frontiers in immunology*. 2019;10:3130. doi:10.3389/fimmu.2019.03130

67. de Poot SA, Westgeest M, Hostetter DR, et al. Human and mouse granzyme M display divergent and species-specific substrate specificities. *The Biochemical journal*. Aug 1 2011;437(3):431-42. doi:10.1042/BJ20110210

68. Reynolds DM. The Principles of Fluorescence *Cambridge University Press*. 2017:3-34. Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139045452.004

69. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 20 1967;27(2):157-62.

70. Hajjar E, Broemstrup T, Kantari C, Witko-Sarsat V, Reuter N. Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase--so similar yet so different. *The FEBS journal*. May 2010;277(10):2238-54. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07659.x

71. Vizovisek M, Vidmar R, Drag M, Fonovic M, Salvesen GS, Turk B. Protease Specificity: Towards In Vivo Imaging Applications and Biomarker Discovery. *Trends in biochemical sciences*. Oct 2018;43(10):829-844. doi:10.1016/j.tibs.2018.07.003

72. Kasperkiewicz P, Poreba M, Groborz K, Drag M. Emerging challenges in the design of selective substrates, inhibitors and activity-based probes for indistinguishable proteases. *The FEBS journal*. May 2017;284(10):1518-1539. doi:10.1111/febs.14001

73. Nakajima K, Powers JC, Ashe BM, Zimmerman M. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. *J Biol Chem*. May 25 1979;254(10):4027-32.

74. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. Jul 18 1997;272(29):17907-11.

75. Ostresh JM, Winkle JH, Hamashin VT, Houghten RA. Peptide libraries: determination of relative reaction rates of protected amino acids in competitive couplings. *Biopolymers*. Dec 1994;34(12):1681-9. doi:10.1002/bip.360341212

76. Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA, Craik CS. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 5 2000;97(14):7754-9. doi:10.1073/pnas.140132697

77. Schneider EL, Craik CS. Positional scanning synthetic combinatorial libraries for substrate profiling. *Methods in molecular biology*. 2009;539:59-78. doi:10.1007/978-1-60327-003-8_4

78. Kasperkiewicz P, Kolt S, Janiszewski T, et al. Determination of extended substrate specificity of the MALT1 as a strategy for the design of potent substrates and activity-based probes. *Sci Rep*. Oct 30 2018;8(1):15998. doi:10.1038/s41598-018-34476-7

79. Poreba M, Szalek A, Rut W, et al. Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families. *Sci Rep*. Feb 23 2017;7:43135. doi:10.1038/srep43135

80. Poreba M, Kasperkiewicz P, Snipas SJ, Fasci D, Salvesen GS, Drag M. Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates. *Cell Death Differ*. Sep 2014;21(9):1482-92. doi:10.1038/cdd.2014.64

81. Woodard SL, Jackson DS, Abuelyaman AS, Powers JC, Winkler U, Hudig D. Chymase-directed serine protease inhibitor that reacts with a single 30-kDa granzyme and blocks NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. Dec 1 1994;153(11):5016-25.

82. Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews*. Dec 2002;102(12):4639-750. doi:10.1021/cr010182v

83. Kasperkiewicz P. Peptidyl Activity-Based Probes for Imaging Serine Proteases. *Frontiers in chemistry*. 2021;9:639410. doi:10.3389/fchem.2021.639410

84. Blum G, Mullins SR, Keren K, et al. Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes. *Nature chemical biology*. Sep 2005;1(4):203-9. doi:10.1038/nchembio728

85. Edgington-Mitchell LE, Bogyo M, Verdoes M. Live Cell Imaging and Profiling of Cysteine Cathepsin Activity Using a Quenched Activity-Based Probe. *Methods in molecular biology*. 2017;1491:145-159. doi:10.1007/978-1-4939-6439-0_11

86. Hu HY, Vats D, Vizovisek M, et al. In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate. *Angewandte Chemie*. Jul 14 2014;53(29):7669-73. doi:10.1002/anie.201310979

87. Janiszewski T, Kolt S, Kaiserman D, et al. Noninvasive optical detection of granzyme B from natural killer cells with enzyme-activated fluorogenic probes. *J Biol Chem*. Jul 10 2020;295(28):9567-9582. doi:10.1074/jbc.RA120.013204

88. Kasperkiewicz P, Poreba M, Snipas SJ, et al. Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132818. doi:10.1371/journal.pone.0132818

89. Heutinck KM, ten Berge IJ, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol*. Jul 2010;47(11-12):1943-55. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.020

90. Perera NC, Wiesmuller KH, Larsen MT, et al. NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity. *J Immunol*. Sep 1 2013;191(5):2700-7. doi:10.4049/jimmunol.1301293

91. Perera NC, Jenne DE. Perspectives and potential roles for the newly discovered NSP4 in the immune system. *Expert Rev Clin Immunol*. Aug 2012;8(6):501-3. doi:10.1586/eci.12.39

92. Lin SJ, Dong KC, Eigenbrot C, van Lookeren Campagne M, Kirchhofer D. Structures of neutrophil serine protease 4 reveal an unusual mechanism of substrate recognition by a trypsin-fold protease. *Structure*. Sep 2 2014;22(9):1333-1340. doi:10.1016/j.str.2014.07.008

93. Oleksyszyn J, Powers JC. Irreversible inhibition of serine proteases by peptide derivatives of (alpha-aminoalkyl)phosphonate diphenyl esters. *Biochemistry*. Jan 15 1991;30(2):485-93. doi:10.1021/bi00216a026

94. Kasperkiewicz P, Poreba M, Snipas SJ, et al. Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 18 2014;111(7):2518-23. doi:10.1073/pnas.1318548111

95. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. Jul 2014;15(7):602-11. doi:10.1038/ni.2921

96. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. Nov 2009;16(11):1438-44. doi:10.1038/cdd.2009.96

97. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. Apr 2006;8(4):668-76. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x

98. Leshner M, Wang S, Lewis C, et al. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Frontiers in immunology*. 2012;3:307. doi:10.3389/fimmu.2012.00307

99. Zabieglo K, Majewski P, Majchrzak-Gorecka M, et al. The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol*. Jul 2015;98(1):99-106. doi:10.1189/jlb.4AB1114-543R

100. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*. Aug 7 2014;8(3):883-96. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.044

101. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. Nov 1 2010;191(3):677-91. doi:10.1083/jcb.201006052

102. Farley K, Stolley JM, Zhao P, Cooley J, Remold-O'Donnell E. A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation. *J Immunol*. Nov 1 2012;189(9):4574-81. doi:10.4049/jimmunol.1201167

103. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. Research Support, N.I.H., Extramural. *J Cell Biol*. Jan 15 2007;176(2):231-41. doi:10.1083/jcb.200606027

104. Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176472. doi:10.1371/journal.pone.0176472

105. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. Aug 1 2008;112(3):461-9. doi:10.1182/blood-2007-09-077438

106. Jenne DE, Tschopp J. Granzymes: a family of serine proteases in granules of cytolytic T lymphocytes. *Current topics in microbiology and immunology*. 1989;140:33-47.

107. Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell*. Jun 5 1987;49(5):679-85.

108. Grossman WJ, Revell PA, Lu ZH, Johnson H, Bredemeyer AJ, Ley TJ. The orphan granzymes of humans and mice. *Current opinion in immunology*. Oct 2003;15(5):544-52.

109. Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens*. Dec 2012;80(6):477-87. doi:10.1111/tan.12014

110. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev*. May 2010;235(1):93-104. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00902.x

111. Mahrus S, Craik CS. Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. *Chem Biol*. May 2005;12(5):567-77. doi:10.1016/j.chembiol.2005.03.006

112. Winkler U, Allison NJ, Woodard SL, et al. Characterization, application and potential uses of biotin-tagged inhibitors for lymphocyte serine proteases (granzymes). *Mol Immunol*. May-Jun 1996;33(7-8):615-23.

113. Harris JL, Peterson EP, Hudig D, Thornberry NA, Craik CS. Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B. *J Biol Chem*. Oct 16 1998;273(42):27364-73.

114. Plasman K, Maurer-Stroh S, Ahmad J, et al. Conservation of the extended substrate specificity profiles among homologous granzymes across species. *Mol Cell Proteomics*. Oct 2013;12(10):2921-34. doi:10.1074/mcp.M113.028670

115. Plasman K, Maurer-Stroh S, Gevaert K, Van Damme P. Holistic view on the extended substrate specificities of orthologous granzymes. *J Proteome Res*. Apr 04 2014;13(4):1785-93. doi:10.1021/pr401104b

116. Jans DA, Jans P, Briggs LJ, Sutton V, Trapani JA. Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin in vivo and cytosolic factors in vitro. *J Biol Chem*. Nov 29 1996;271(48):30781-9. doi:10.1074/jbc.271.48.30781

117. Keefe D, Shi L, Feske S, et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*. Sep 2005;23(3):249-62. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.001

118. Horiuchi K, Saito S, Sasaki R, Tomatsu T, Toyama Y. Expression of granzyme B in human articular chondrocytes. *J Rheumatol*. Aug 2003;30(8):1799-810.

119. Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 8 2001;98(10):5746-51. doi:10.1073/pnas.101329598

120. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, et al. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*. Jun 1 1999;93(11):3601-9.

121. Rebeaud F, Hailfinger S, Posevitz-Fejfar A, et al. The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol*. Mar 2008;9(3):272-81. doi:10.1038/ni1568

122. Hailfinger S, Nogai H, Pelzer C, et al. Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 30 2011;108(35):14596-601. doi:10.1073/pnas.1105020108

123. Staal J, Bekaert T, Beyaert R. Regulation of NF-kappaB signaling by caspases and MALT1 paracaspase. *Cell Res*. Jan 2011;21(1):40-54. doi:10.1038/cr.2010.168

124. Vucic D, Dixit VM. Masking MALT1: the paracaspase's potential for cancer therapy. *The Journal of experimental medicine*. Oct 26 2009;206(11):2309-12. doi:10.1084/jem.20092160

125. Hachmann J, Snipas SJ, van Raam BJ, et al. Mechanism and specificity of the human paracaspase MALT1. *The Biochemical journal*. Apr 1 2012;443(1):287-95. doi:10.1042/BJ20120035

126. Snipas SJ, Wildfang E, Nazif T, et al. Characteristics of the caspase-like catalytic domain of human paracaspase. *Biol Chem*. Nov 2004;385(11):1093-8. doi:10.1515/BC.2004.142

PODPIS ZAUFANY
PAULINA MARIA
KASPERKIEWICZ-WASILEWSKA
01.08.2022 13:57:55 [GMT+2]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym