Załącznik 3 do postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

„Opracowanie technologii selektywnej wizualizacji enzymów proteolitycznych w aktywomie”

Dr inż. Marcin Poręba

Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania

Politechnika Wrocławska

Wrocław, 2020

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: **Marcin Poręba**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuły rozprawy doktorskiej

Dyplom **doktora nauk chemicznych** w dyscyplinie Chemia, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław, 2014

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Projektowanie i synteza bibliotek substratów zawierających naturalne i nienaturalne aminokwasy dla ludzkich proteaz cysteinowych z grupy kaspaz i katepsyn"

Promotor rozprawy: Dr hab. Marcin Drąg

Recenzenci: prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk, prof. dr hab. Krzysztof Jóźwiak

Dyplom **magistra inżyniera technologii chemicznej** (specjalność: Medicinal Chemistry), Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław, 2010

Tytuł pracy magisterskiej: „Substrate mapping of the malaria leucyl aminopeptidase using substrates library"

Opiekun pracy: dr Marcin Drąg

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.2020 – obecnie: Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Politechnika Wrocławska

10.2018 – 12.2019: Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

04.2018 – 09.2018: Asystent naukowo-dydaktyczny, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

01.2016 – 03.2018: Staż podoktorski (Marie Skłodowska-Curie Global Fellowship), Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA. Grupa prof. Guya Salvesena

10.2014 – 12.2015: Asystent naukowo-dydaktyczny, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego jest moje osiągnięcie naukowe pod tytułem:

Opracowanie technologii selektywnej wizualizacji enzymów proteolitycznych w aktywomie.

Cykl ten tworzy **11** publikacji naukowych o spójnej tematyce, wyszczególnionych w wykazie zamieszczonym poniżej w punkcie IVb. Sumaryczny Impact Factor dla tych prac wynosi **66.7** (dla **9** prac oryginalnych) oraz **40.4** (dla **2** prac przeglądowych). Łączny IF wynosi **107**. Łączna suma cytowań tych prac: **121**.

a) Cykl publikacji stanowiących osiągniecie naukowe

H1. Poręba M.*, Salvesen G.S., Drąg M.* **(2017)**; „Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity" **Nature Protocols**, 12(10), 2189-2214, doi: 10.1038/nprot.2017.091 (* autorzy korespondencyjni).

(IF **12.42**, pkt MNiSW **200**, cytowania **21**)

H2. Poręba M.*, Solberg R.*, Rut W., Lunde N.N., Kasperkiewicz P., Snipas S.J., Mihelic M., Turk D., Turk B., Salvesen G.S., Drąg M.* **(2016)**; „Counter selection substrate library strategy for developing specific protease substrates and probes" **Cell Chemical Biology,** 23(8), 1023-1035, doi: 10.1016/j.chembiol.2016.05.020 (* autorzy korespondencyjni).

(IF **6.74**, pkt MNiSW **140**, cytowania **23**)

H3. Poręba M.*, Rut W., Vizovisek M., Groborz K., Kasperkiewicz P., Finlay D., Vuori K., Turk D., Turk B., Salvesen G.S., Drąg M.* **(2018)**; „Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes" **Chemical Science**, 9(8), 2113-2129, doi: 10.1039/c7sc04303a (* autorzy korespondencyjni).

(IF **9.56**, pkt MNiSW **200**, cytowania **24**)

H4. Poręba M.*, Groborz K., Vizovisek M., Maruggi M., Turk D., Turk B., Powis G., Drąg M.*, Salvesen G.S.* **(2019)**; „Fluorescent probes towards selective cathepsin B detection and visualization in cancer cells and patient samples" **Chemical Science**, 10(36), 8461-8477, doi: 10.1039/c9sc00997c (* autorzy korespondencyjni).

(IF **9.56**, pkt MNiSW **200**, cytowania **2**)

H5. Poręba M.*#, Groborz K.#, Rut W., Pore M., Snipas S.J., Vizovisek M., Turk B., Kuhn P., Drąg M.*, Salvesen G.S.* **(2019)**; „The Activome: multiplexed probing of activity of proteolytic enzymes using mass cytometry-compatible activity-based probes (TOF-probes)" **bioRxiv**, doi: 10.1101/775627. (* autorzy korespondencyjni, # równy udział w pracy).

(IF **brak**, pkt MNiSW **brak**, cytowania **2**)

H6. **Poręba M.***, Groborz K., Navarro M., Snipas S.J., Drąg M.*, Salvesen G.S.* **(2019);** „Caspase selective reagents for diagnosis apoptotic mechanisms" **Cell Death and Differentiation**, 26(2), 229-244, doi: 10.1038/s41418-018-0110-y (* autorzy korespondencyjni).

(IF **8.09**, pkt MNiSW **140**, cytowania **13**)

H7. Poręba M.*, Rut W., Groborz K., Snipas S.J., Salvesen G.S., Drąg M.* **(2019)**; „Potent and selective caspase-2 inhibitor prevents MDM-2 cleavage in reversine-treated colon cancer cells" **Cell Death and Differentiation**, 26(12), 2695-2709, (* autorzy korespondencyjni).

(IF **8.09**, pkt MNiSW **140**, cytowania **2**)

H8. Groborz K., Gonzalez-Ramirez M, Snipas S.J., Salvesen G.S., Drąg M.*, **Poręba M.* (2020)**; „Exploring the prime site in caspases as a novel chemical strategy for understanding the mechanisms of cell death: a proof of concept study on necroptosis in cancer cells" **Cell Death and Differentiation**, 27(2), 451-465, doi: 10.1038/s41418-019-0364-z (* autorzy korespondencyjni).

(IF **8.09**, pkt MNiSW **140**, cytowania **1**)

H9. Poręba M.*, Szalek A., Rut W., Kasperkiewicz P., Rutkowska-Włodarczyk I., Snipas S.J., Itoh Y., Turk D., Turk B., Overall Ch.M., Kaczmarek L., Salvesen G.S.*, Drąg M.* **(2017);** „Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families" **Scientific Reports**, 7, 43135 (* autorzy korespondencyjni).

(IF **4.12**, pkt MNiSW **100**, cytowania **19**)

H10. Poręba M.*, **(2019)**; „Recent advances in the development of legumain-selective chemical probes and peptide prodrugs" **Biological Chemistry**, 400(12), 1529-1550, doi: 10.1515/hsz-2019-0135. (publikacja przeglądowa).

(IF **3.01**, pkt MNiSW **70**, cytowania **2**)

H11. Poręba M., Szalek A., Kasperkiewicz P., Rut W., Salvesen G.S., Drąg M.* **(2015)**; „Small molecule active site directed tool for studying human caspases" **Chemical Reviews**, 115(22), 12546-12629, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00434. (publikacja przeglądowa).

(IF **37.37**, pkt MNiSW **200**, cytowania **30**)

- Impact Factor podano zgodnie z rokiem opublikowania pracy.
- Punktację MNiSW podano zgodnie z dokumentem z dnia 31 lipca 2019 roku.
- W czasie publikowania pracy **H2**, czasopismo *Chemistry & Biology* zmieniło nazwę na *Cell Chemical Biology*, tak więc IF podano dla czasopisma *Chemistry & Biology*.

Prowadzone przeze mnie badania naukowe (reprezentujące monotematyczny cykl publikacji), stanowiące osiągnięcie naukowe ujęte w przewodzie habilitacyjnym finansowane były przez:

1. **Narodowe Centrum Nauki (NCN)**, w ramach projektu grantowego **Preludium 9** nr 2013/09/N/ST5/02448 w okresie 05.2014 – 11.2015 (7 miesięcy doktoratu oraz 12 miesięcy po doktoracie). Tytuł projektu: „Nienaturalne aminokwasy jako narzędzie do optymalizacji struktury substratów dla ludzkiej proteazy cysteinowej, katepsyny L". Rola w projekcie: **kierownik**.

2. **Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)**, w ramach projektu grantowego **Iuventus Plus** nr IP2012 040172 w okresie 07.2013 – 06.2015 (17 miesięcy doktoratu, 7 miesięcy po doktoracie). Tytuł projektu: „Hybrydowa, kombinatoryczna biblioteka substratów zawierająca naturalne i nienaturalne aminokwasy do badania specyficzności substratowej ludzkiej legumainy". Rola w projekcie: **kierownik.**

3. **Komisja Europejska (KE),** w ramach projektu grantowego **Marie Skłodowska-Curie Global Fellowship** nr 661187 w okresie 01.2016 – 12.2018. Tytuł projektu: „PROVIST: Proteases visualization during tumor progression / Wizualizacja proteaz podczas rozwoju nowotworów". Rola w projekcie: **kierownik** (w ramach tego grantu odbyłem staż naukowy w Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA).

4. **Narodowe Centrum Nauki (NCN)**, w ramach projektu grantowego **OPUS 29** nr UMO-2018/29/B/NZ1/02249 w okresie 02.2019 – obecnie. Tytuł projektu: „Badanie mechanizmów proteolitycznych w pyroptozie, programowanej śmierci komórki wywołującej reakcję zapalną". Rola w projekcie: **kierownik**.

5. **Narodowe Centrum Nauki (NCN)**, w ramach projektu grantowego **HARMONIA 10** nr UMO-2018/30/M/ST5/00440 w okresie 05.2019 – obecnie. Tytuł projektu: „Wykorzystanie lantanowców w markerach do równoległej detekcji aktywności enzymów proteolitycznych". Kierownik projektu: prof. dr hab. Marcin Drąg.

6. **National Institutes of Health (NIH)** w USA, w ramach projektu grantowego **Research Project R01 nr** 5R01GM099040 w okresie 01.2016 – obecnie. Tytuł projektu: „Caspases in inflammatory cell death networks". Kierownik projektu: prof. Guy S. Salvesen.

b) Omówienie celu i osiągnięć naukowych przedłożonych do oceny wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Prowadzone przeze mnie badania naukowe miały charakter wybitnie interdyscyplinarny, dlatego wymagały wykorzystania technik badawczych z różnych dziedzin włączając w to chemię organiczną (synteza peptydów i markerów chemicznych), biochemię (kinetyka reakcji enzymatycznych, inżynieria białek, techniki wizualizacji białek), biologię molekularną (hodowle tkankowe), chemię medyczną (projektowanie związków biologicznie czynnych) i chemię analityczną (cytometria masowa, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna).

WSTĘP TEORETYCZNY

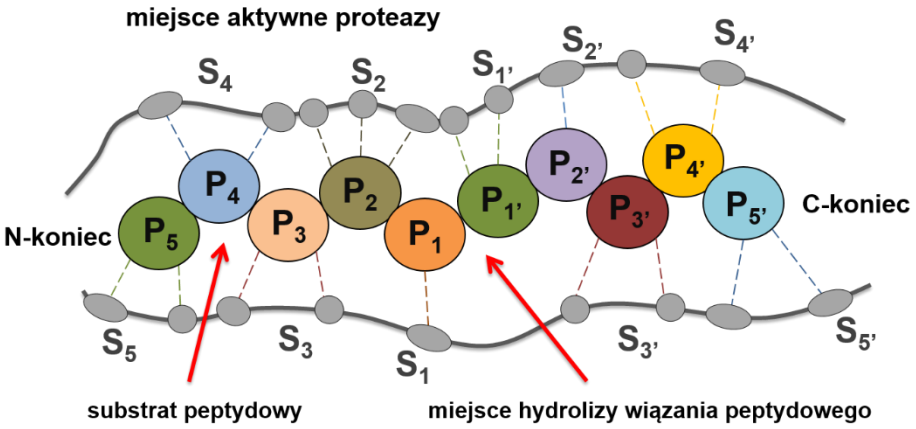
ENZYMY PROTEOLITYCZNE i ich specyficzność substratowa

Enzymy proteolityczne, zwane inaczej peptydazami lub proteazami, to białkowe katalizatory, które są odpowiedzialne przede wszystkim za hydrolizę wiązania peptydowego (amidowego) w substratach peptydowych i białkowych. Poprzez selektywną hydrolizę wybranych substratów enzymy te kontrolują wiele fizjologicznie ważnych procesów włączając w to programowaną śmierć komórki, kaskadę krzepnięcia krwi, dojrzewanie białek, fibrynolizę i wiele innych. Co więcej, hydroliza białek i peptydów prowadzi do recyklingu pojedynczych aminokwasów, które są następnie wykorzystywane jako bloki budulcowe w syntezie białek [1]. Jednak z drugiej strony, zaburzona równowaga w działaniu proteaz (ich nadaktywność katalityczna lub brak aktywności) prowadzi do rozwoju chorób, włączając w to choroby nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne czy choroby wieńcowe [2, 3]. Aby zachować równowagę w organizmie, aktywność enzymów proteolitycznych jest ściśle kontrolowana na kilku poziomach począwszy od ekspresji, poprzez dojrzewanie, modyfikacje post-translacyjne, a skończywszy na oddziaływaniach z naturalnymi inhibitorami i innymi proteazami [3].

Badania nad ludzkim genomem pozwoliły zidentyfikować ponad 700 różnych enzymów proteolitycznych, co stanowi ponad 2% wszystkich kodowanych białek. Z mechanistycznego punktu widzenia, proteazy można podzielić na sześć grup: (1) proteazy serynowe, które w centrum katalitycznym posiadają nukleofilową resztę seryny, (2) proteazy cysteinowe z aktywną resztą cysteiny, (3) proteazy treoninowe z aktywną resztą treoniny, (4) metaloproteazy, które w centrum aktywnym wymagają obecności kationu metalu, (5) proteazy aspartylowe, gdzie za katalizę odpowiada reszta kwasu asparaginowego oraz (6) proteazy o nieznanym typie katalizy. Co ciekawe, proteazy serynowe, cysteinowe i treoninowe wykazują kowalencyjny typ katalizy substratów,

podczas gdy metaloproteazy i proteazy aspartylowe cechują się niekowalencyjnym typem katalizy [1]. Właściwość ta ma bardzo duże znaczenie przy projektowaniu markerów chemicznych, o których będzie mowa w późniejszych rozdziałach. Jednak niezależnie od typu katalizy, którą przeprowadzają proteazy, podstawową właściwością ich aktywności katalitycznej jest tzw. specyficzność substratowa. Otóż proteazy mogą hydrolizować tylko te substraty, których struktura i sekwencja aminokwasowa jest ściśle dopasowana do ich centrum katalitycznego, czyli miejsca gdzie zachodzi reakcja rozpadu substratu na mniejsze produkty. W 1967 roku Schechter i Berger wprowadzili jednolity system określania specyficzności substratowej wszystkich enzymów proteolitycznych [4]. Wg tego systemu w miejscu aktywnym proteazy wyodrębniono kieszenie, do których wiąże się substrat peptydowy (**rysunek 1**). W ogólnym ujęciu substrat wiąże się swoimi aminokwasami (nazywanymi ...-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'P4'-.., pozycje numerowane są od N- do C-końca peptydu) do centrum katalitycznego enzymu zbudowanego przez tzw. kieszenie wiążące substrat (odpowiednio ...-S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4'-...). Wg systemu Schechtera i Bergera, hydroliza wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy pozycjami P1 i P1' (czyli w kieszeniach S1 i S1'), ale tylko wtedy gdy substrat jest komplementarny z centrum aktywnym enzymu. Oczywiście nie wszystkie proteazy mają możliwość wiązania tak dużej liczby aminokwasów w centrum aktywnym. Aminopeptydazy potrafią wiązać tylko jeden aminokwas po stronie N-końca (pozycja P1), podczas gdy diaminopeptydazy potrafią wiązać dwa aminokwasy po stronie N-końca (pozycje P2-P1). Enzymy te należą do egzoproteazy. Niemniej jednak, przedstawiony ogólny schemat jest prawidłowy dla większości endoproteaz, czyli enzymów proteolitycznych które potrafią wiązać kilka aminokwasów po obu stronach hydrolizowanego wiązania peptydowego. Każdy enzym proteolityczny ma swój profil specyficzności substratowej czyli zestaw substratów, które potrafi hydrolizować. I tak na przykład jedne enzymy potrafią hydrolizować jedynie kilka substratów (wąska specyficzność substratowa), podczas gdy inne hydrolizują tysiące białek i peptydów (szeroka specyficzność substratowa). Co więcej, niektóre proteazy w obrębie swoich rodzin jak np. kaspazy, katepsyny czy macierzowe metaloproteazy potrafią hydrolizować strukturalnie podobne substraty, przez co wykazują tzw. nakładającą się specyficzność substratową [5, 6]. Cecha ta stanowi ogromne wyzwanie podczas projektowania selektywnych narzędzi chemicznych do badania wybranych enzymów proteolitycznych.

Poszukiwanie i opracowywanie nowych metod badania specyficzności substratowej proteaz jest od ponad 20 lat bardzo aktywnym obszarem badań [6, 7]. Najbardziej popularne metody opierają się badaniu naturalnych białek i peptydów będących substratami dla proteaz. Inne z kolei polegają na tworzeniu bibliotek substratów składających się z tysięcy peptydów i poddawaniu ich działaniu poszczególnych proteaz, celem wybrania optymalnej sekwencji peptydu. Przez długi czas biblioteki takie były produkowane na fagach (metoda biologiczna) lub w wyniku syntezy chemicznej (metoda chemiczna) i składały się jedynie z naturalnych aminokwasów. Niestety, metody te często okazywały się nieskuteczne, zwłaszcza przy próbie rozróżniania enzymów, które wykazywały nakładającą się specyficzność substratową. Dopiero wprowadzanie nienaturalnych aminokwasów do sekwencji peptydowej substratów pomogło w znacznym stopniu rozwiązać ten problem [8].



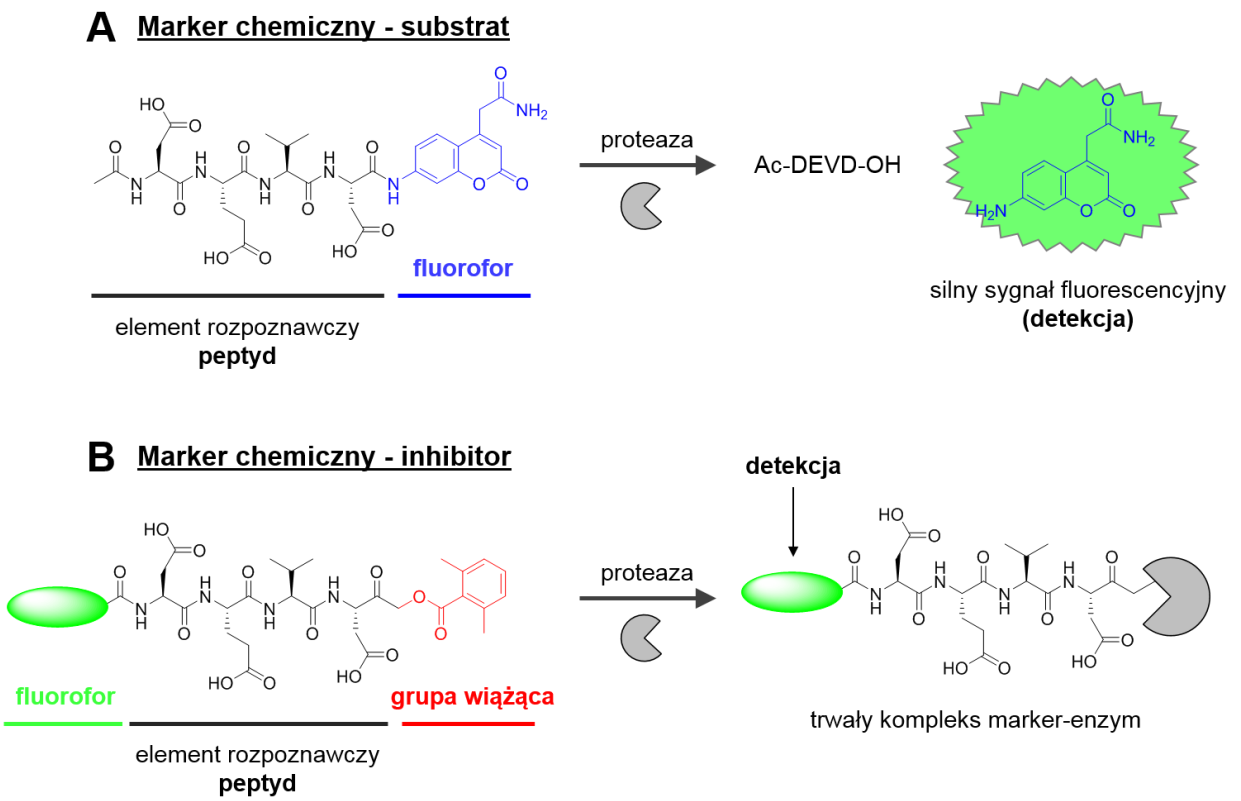
Rysunek 1 Schemat oddziaływania substratu peptydowego z miejscem aktywnym proteazy. Kolorami zaznaczono aminokwasy budujące substrat, natomiast przerywane linie oznaczają oddziaływania poszczególnych aminokwasów substratu z aminokwasami budującymi miejsce aktywne enzymu. Hydroliza wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy pozycjami P1 i P1' (w kieszeniach S1 i S1').

MARKERY CHEMICZNE do wizualizacji enzymów proteolitycznych

W ostatnich dekadach nastąpił ogromny postęp w badaniu biologicznych funkcji wielu enzymów proteolitycznych. Udało się między innymi wyjaśnić rolę kaspaz w procesie programowanej śmierci komórki lub przypisać katepsynom i macierzowym metaloproteazom ich rolę w rozwoju i przerzutowaniu nowotworów [9]. Było możliwe dzięki wykorzystaniu różnych technik badawczych włączając w to genomikę, epigenomikę czy proteomikę. Jednak dużym ograniczeniem tych technik jest brak informacji o dokładnej aktywności katalitycznej badanego enzymu. Badania proteomiczne (np. za pomocą przeciwciał czy spektrometrii mas) pokazują poziom ekspresji enzymu, ale nie informują jaka część jego populacji jest aktywna. Ma to ogromne znaczenie zwłaszcza przy badaniu enzymów proteolitycznych, które podlegają kilkustopniowemu procesowi dojrzewania katalitycznego lub działają w obrębie strukturalnie podobnej grupy enzymów. Dobrym przykładem obrazującym ten problem są cysteinowe katepsyny. Od dawna wiadomo, że nadekspresja tych enzymów wykazuje dodatnią korelację z rozwojem i przerzutowaniem nowotworów [10]. Jednak do tej pory nie wiadomo, które z poszczególnych katepsyn pełnią dominującą rolę w tym procesie. Pokazano bowiem, że wyciszenie (ang. *knock-down*) lub wycięcie (ang. *knock-out*) jednej katepsyny, może być skompensowane przez aktywność pozostałych katepsyn, które wykazując podobną specyficzność substratową mogą ja funkcjonalnie zastąpić [11]. Tak więc wyniki takich eksperymentów mogą prowadzić do błędnych wniosków. Innym przykładem są kaspazy. Ich nakładająca się specyficzność substratowa znacząco utrudnia przypisanie dokładnych funkcji poszczególnym kaspazom [12]. Do tej pory niejasna jest rola kaspazy 10 w zewnątrzkomórkowej inicjacji procesu apoptozy i nekroptozy, rola kaspaz 6 i 7 w fazie wykonawczej procesu apoptozy, czy rola kaspaz 4 i 5 w procesie pyroptozy. Z tego powodu, najlepszym narzędziem do funkcjonalnego badania enzymów proteolitycznych są markery chemiczne [13].

Według ogólnie przyjętej konwencji markery chemiczne to związki służące do detekcji aktywności katalitycznej enzymów proteolitycznych. W odróżnieniu od przeciwciał, markery chemiczne detektują tylko aktywne proteazy i nie wiążą się z (1) proenzymami/zymogenami, (2) proteazami, których aktywność katalityczna jest zahamowana przez naturalne inhibitory, (3) proteazami, które są nieprawidłowo zwinięte, a także (4) z proteazami, które utraciły aktywność katalityczną na skutek braku obecności kofaktorów (np. jonów metali) lub poprzez ich dezaktywację przez inne proteazy [14]. Markery chemiczne można ogólnie podzielić na dwie główne grupy: (1) markery, które są substratami oraz (2) markery, które działają jak inhibitory (**rysunek 2**). Pierwszą grupę stanowią zazwyczaj peptydy, które są wyposażone w znacznik (najczęściej fluorescencyjny). W efekcie reakcji hydrolizy, peptyd rozpada się na dwa fragmenty, z których jeden zaczyna emitować silny sygnał fluorescencyjny wskazujący na aktywność enzymu. Zaletą wykorzystania substratów jest amplifikacja sygnału, ponieważ enzym jako katalizator jest odtwarzany po każdym cyklu reakcji hydrolizy. Wadą jest natomiast brak możliwości dokładnej lokalizacji enzymu (np. w komórce), gdyż po hydrolizie fluorofor dyfunduje z miejsca aktywnego enzymu (**rysunek 2A**). W drugim przypadku marker będący inhibitorem wyposażonym w znacznik (najczęściej biotynę czy fluorofor) wiąże się trwale w miejscu aktywnym enzymu. Zaletą tego rozwiązania jest możliwość dokładnej lokalizacji enzymu. Jednak ograniczeniem tej metody jest brak amplifikacji sygnału, gdyż marker/inhibitor wiąże się z enzymem w stosunku 1:1. Rozwiązaniem tego problemu jest stosowanie silnych fluoroforów, które emitują mocny sygnał nawet przy bardzo małym stężeniu (**rysunek 2B**).

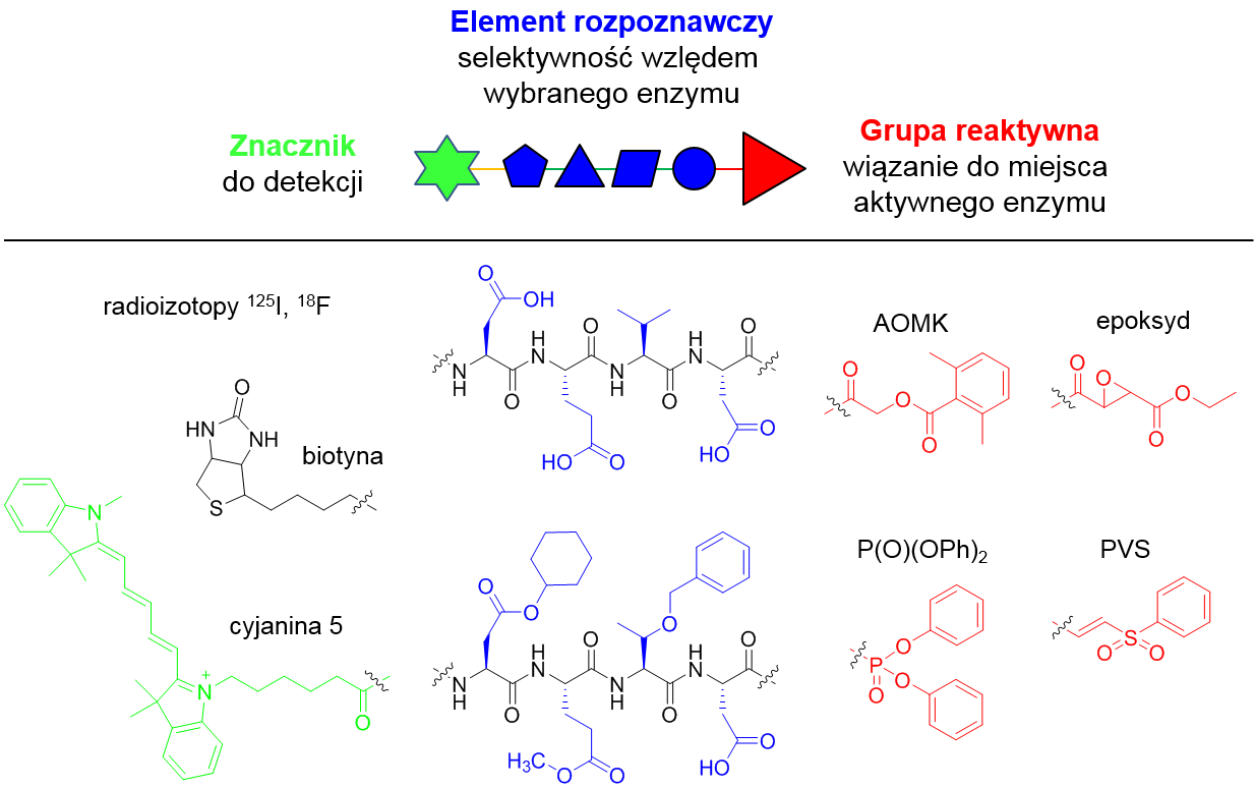
Pierwsze markery chemiczne do detekcji enzymów proteolitycznych, działające jako substraty zostały opracowane ponad 70 lat temu. W jednej z pionierskich prac Harkness i współpracownicy otrzymali prosty substrat chromogeniczny o strukturze leucyna-*beta*-naftyloamina, który służył do wykrywania aktywności leucylowej aminopeptydazy w osoczu [15]. Pierwszym natomiast markerem chemicznym działającym na zasadzie inhibitora była biotynylowana izokumaryna opracowana w 1993 przez grupę prof. Powersa [16]. Marker ten służył do wykrywania aktywności enzymów proteolitycznych z grupy proteaz serynowych. W kolejnych latach nastąpił gwałtowny rozwój markerów chemicznych działających na zasadzie inhibitora. Pionierami w tej dziedzinie (oprócz Jamesa Powersa) byli Benjamin Cravatt i Matthew Bogyo, którzy wnieśli ogromny wkład w rozwój markerów chemicznych [14, 17]. W dalszej części rozprawy habilitacyjnej, stosowanie pojęcia markera chemicznego będzie tożsame z markerem, który trwale wiąże się do miejsca aktywnego proteazy (markery działające na zasadzie inhibitora), gdyż ten typ markerów chemicznych stanowi podstawę niniejszej rozprawy habilitacyjnej.



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

Wizualizacja enzymów proteolitycznych za pomocą markerów chemicznych ma długą historię. Ponad 20 lat temu Benjamin Cravatt z Instytutu Scripps zaproponował terminy ***„activity-based protein profiling***" oraz ***„activtiy-based proteomics"*** co oznaczało badanie proteomu za pomocą markerów chemicznych opartych o aktywność katalityczną enzymów [18]. Pionierskie badania w tym obszarze dotyczyły badania aktywności hydrolaz serynowych w proteomie za pomocą fluorescencyjnych markerów chemicznych. W późniejszym okresie metoda ta została skojarzona z tandemową spektrometrią mas co pozwoliło na analizę kilkudziesięciu enzymów w jednej próbce. W ogólnym ujęciu, markery chemiczne działające na zasadzie inhibitorów (ang. *activity-based probes, ABPs*) składają się z trzech głównych elementów: (1) reaktywnej **grupy wiążącej**, która łączy się z trwale z enzymem, (2) **sekwencji rozpoznawczej** (zazwyczaj peptydu), która odpowiada za selektywne wiązanie się danego markeru z enzymem lub grupą enzymów oraz (3) **znacznika**, który umożliwia detekcję kompleksu marker-enzym (**rysunek 3**). Wśród najczęściej spotykanych reaktywnych **grup wiążących** stosowanych do enzymów proteolitycznych należą epoksydy oraz acyloksymetyloketony (dla proteaz cysteinowych), estry diarylowe kwasów 1-aminoalkilofosfonowych (dla proteaz serynowych) oraz estry winylowe kwasu arylosulfonowego

(dla proteaz treoninowych, głównie proteasomu) [19]. Zaletą tych grup wiążących, jest utworzenie trwałego, kowalencyjnego wiązania z enzymem, dzięki czemu możliwa jest dalsza praca z próbką, np. w zakresie jej rozdziału elektroforetycznego i wizualizacji kompleksu za pomocą techniki *Western blotting*. Wśród najczęściej stosowanych **sekwencji rozpoznawczych** są oczywiście peptydy i peptydomimetyki, które są projektowane tak by selektywnie oddziaływać z enzymem (lub grupą enzymów). Bardzo często te sekwencje składają się z naturalnych aminokwasów, które są wybierane na podstawie sekwencji naturalnych białkowych i peptydowych substratów lub z drodze profilowania danego enzymu za pomocą chemicznych kombinatorycznych bibliotek substratów fluorogenicznych. Jedną z takich metod jest szeroko stosowana metoda pozycyjnego skanowania syntetycznych kombinatorycznych bibliotek (ang. *Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries, PS-SCL*) [12]. Inną z metod jest metoda HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Library*) czyli biblioteki substratów fluorogenicznych, które oprócz naturalnych aminokwasów (jak w metodzie PS-SCL) zawierają także nienaturalne aminokwasy (stąd nazwa *hybrydowa*), dzięki czemu możliwa jest bardzo dokładna analiza miejsca aktywnego enzymu, co skutkuje opracowaniem bardziej selektywnych sekwencji peptydowych [8]. Ostatnim elementem markera jest **znacznik**, dzięki któremu możliwa jest detekcja markera związanego z enzymem. Istnieją trzy główne typy znaczników stosowanych w markerach chemicznych dla enzymów (w tym enzymów proteolitycznych): biotyna, fluorofory oraz radioizotopy. Zastosowanie biotyny w markerach należy do pośrednich metod wizualizacji, gdyż w celu detekcji biotyny musi być zastosowany dodatkowy znacznik, np. fluorescencyjnie znakowana streptawidyna. Pozwala to jednak na wykorzytanie różnych znaczników fluorescencyjnych, dobierając je odpowiednio do rodzaju eksperymentu. Kolejną zaletą biotyny jest możliwość wzbogacenia próbki (ang. *sample enrichment*) lub nawet izolacja danego enzymu poprzez inkubację kompleksu biotynylowany marker-enzym z żywicą (lub kolumną), na której osadzono stereptawidynę. Metoda ta jest stosowana głównie w analizie próbki za pomocą spektrometrii masowej lub w przypadku, gdy stężenie analitu (enzymu) jest bardzo niskie. Zdecydowanie najczęściej stosowanym obecnie typem znacznika są fluorofory. Związki te potrafią emitować światło w zakresie od 300 nm do nawet 800-850 nm, dzięki czemu możliwa jest jednoczesna analiza kilku enzymów za pomocą markerów chemicznych wyposażonych w różne fluorofory (ang. *multiplexing*). Co więcej, niektóre z tych znaczników emitują bardzo silny sygnał fluorescencyjny, dzięki czemu możliwa jest analiza enzymów, które występują w stężeniach subnanonomolarnych. Ponadto znaczniki takie, posiadając zdolność głębokiej penetracji tkanki, są coraz powszechniej wykorzystywane w operacjach chirurgicznych w celu lepszej wizualizacji np. nowotworów [20]. Ostatnią grupą znaczników są radioizotopy jak np. ^{125}I czy ^{18}F, używane głównie w aplikacjach biologicznych i medycznych, choć czasem również w markerach chemicznych do wizualizacji proteaz. Obecnie jest to najrzadziej stosowana metoda ze względu na duże wymagania techniczne i odpowiednie kwalifikacje personelu wykonującego pomiary.



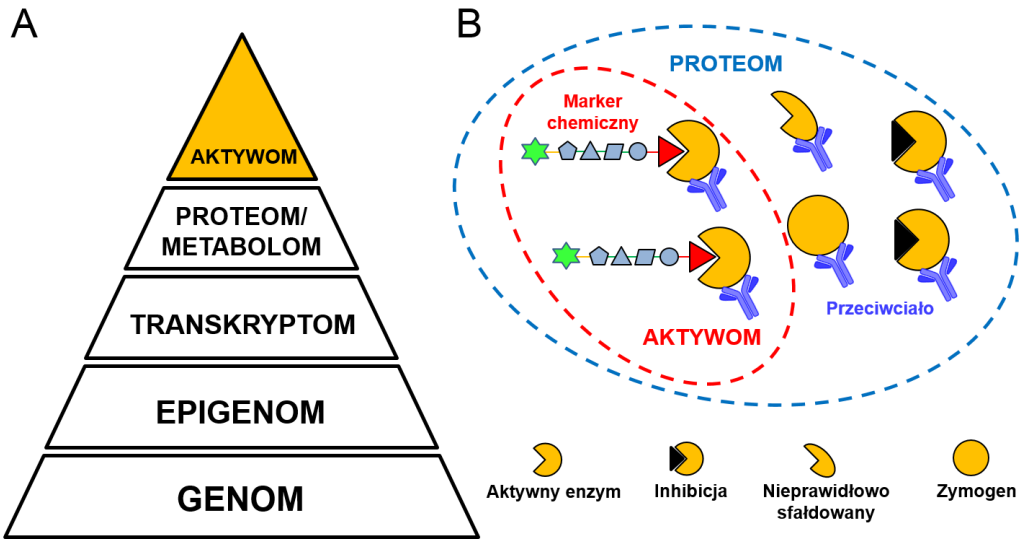
Rysunek 3 Struktura markera chemicznego działającego na zasadzie nieodwracalnego inhibitora. Marker składa się z trzech elementów: (1) elektrofilowej grupy reaktywnej, która reaguje z nukleofilem w centrum aktywnym enzymu, (2) elementu rozpoznawczego odpowiadającego za selektywność markera oraz (3) znacznika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

Wizualizacja aktywności proteaz w AKTYWOMIE NOWOTWORÓW.

Nowotwory są bez wątpienia jednym z najbardziej złożonych systemów w biologii i pomimo ogromnej ilości badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich kilku dekad, choroba ta wciąż odpowiada za miliony zgonów rocznie na całym świecie [21]. Sukces w walce z chorobą nowotworową zależy od wielu czynników, m.in. odpowiednio wczesnej diagnozy, odpowiedniego sklasyfikowania pacjenta oraz wyboru spersonalizowanego leczenia. Obecnie nasza wiedza dotycząca szeroko pojętej choroby nowotworowej jest wynikiem badań (epi)genetycznych, transkryptomicznych, metabolomicznych oraz proteomicznych. Tak znaczący postęp był możliwy dzięki rozwoju nowoczesnych wysokoprzepustowych metod i narzędzi badawczych włączając w to sekwencjonowanie NGS-RNA w badaniach genetycznych, wykorzystanie wysokorozdzielczej spektrometrii masowej i magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach metabolomicznych i proteomicznych, czy wykorzystanie bardzo selektywnych przeciwciał w analizie białek. Wszystkie te dziedziny nauki tworzą piramidę omiczną, gdzie u podstawy znajduje się genom, natomiast na

szczycie jest proteom (**rysunek 4**). Jednak w badaniu aktywności enzymów, a zwłaszcza enzymów proteolitycznych wydaje się zasadne, by na szczycie tej piramidy (nad proteomem) umieścić kolejny element, zwany AKTYWOMEM (**rysunek 4A**). W najprostszym ujęciu aktywom to funkcjonalna część proteomu. Jeśli przyjąć, że proteom to cała pula enzymów (aktywnych i nieaktywnych) to aktywom będzie stanowił tylko tę pulę enzymów, które wykazują aktywność katalityczną. Analiza enzymów poprzez badanie genomu czy transkryptomu dostarcza wielu informacji na temat np. mutacji w tych białkach, jednak nie informuje wprost, czy te białka będą katalitycznie aktywne. Podobnie z badaniem proteomu za pomocą przeciwciał. Biorąc pod uwagę, że aktywność enzymów proteolitycznych jest regulowana na kilku poziomach, zastosowanie przeciwciał dostarczy informacji tylko o ogólnym poziomie ekspresji danego białka. Informację na temat aktywności katalitycznej poszczególnych enzymów (aktywomu) można więc uzyskać tylko stosując odpowiednie markery chemiczne (**rysunek 4B**).

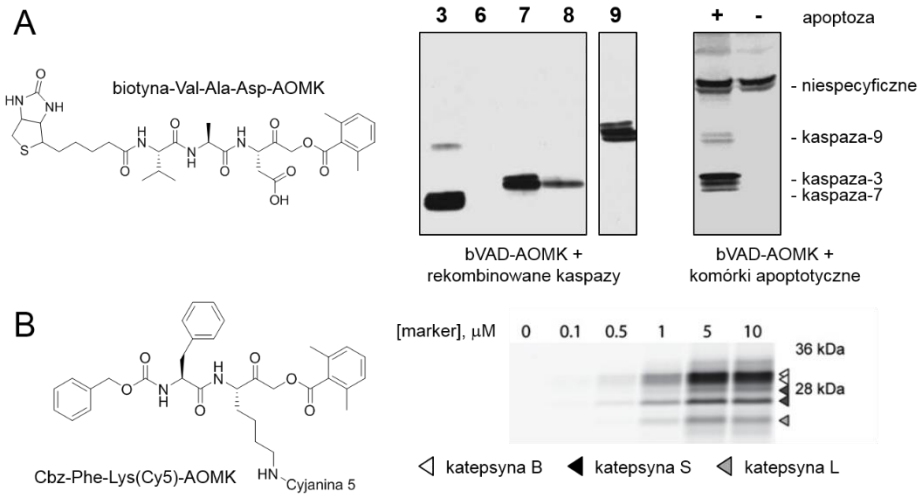
Jak już wcześniej wspomniano, wykorzystaniem markerów chemicznych do badania enzymów zajmuje się dziedzina zwana ***„activity-based protein profilling, ABPP"*** czyli profilowanie białek pod kątem ich aktywności katalitycznej. Stworzyło to podstawy do rozwoju aktywomiki jako dziedziny zajmującej się badaniem aktywomu. Określenie to zostało zaproponowane przez Iaina Pembertona z firmy Photeomix w komunikacie konferencyjnym: „Activomics: a novel approach to biomarker discovery, in chronic low back pain" w 2016 roku [22]. W komunikacie tym można przeczytać: ***„Activomics breaks away from conventional concentration-based omics technologies and places the focus on enzyme activity"*** co bardzo dobrze obrazuje zasadność wprowadzenia tego konceptu. W swoich badaniach autorzy skupili się na analizie modyfikacji post-translacyjnych będących wynikiem działania różnych enzymów, jednak pojęcie aktywomu (i aktywomiki) w ujęciu do markerów chemicznych dla proteaz nie zostało jeszcze opisane. Zasadność badania aktywomu enzymów proteolitycznych w nowotworach poprzez ich selektywną wizualizację opiera się na kilku przesłankach. Po pierwsze, jak wcześniej wspomniano, proteaza jest funkcjonalna jedynie wówczas gdy jest katalitycznie aktywna. Utrata tej aktywności bardzo często oznacza utratę funkcji. Po drugie proteazy działają zawsze w danym systemie biologicznym oddziaływując z innymi proteazami, białkami czy małocząsteczkowymi związkami. Dynamika tego systemu jest pochodną aktywności wielu enzymów i oddziaływań, więc wizualizacja poszczególnych proteaz powinna być bardzo dokładna i specyficzna. Jedynie wtedy będzie można dokładnie określić funkcję danej proteazy np. w nowotworze. Po trzecie, utrata aktywności jednego enzymu proteolitycznego może być kompensowana przez inne enzymy, więc tylko określenie aktywności poszczególnych enzymów dostarczy pełnego obrazu danej sytuacji. Co więcej, w badaniach aktywności katalitycznej enzymów, bardzo często naukowcy próbują korelować wspomnianą aktywność z aktywnością i/lub poziomem ekspresji innych białek, np. białek immunologicznych czy onkologicznych, dzięki czemu możliwe jest określenie roli danego enzymu proteolitycznego w przerzutowaniu nowotworów czy lekooporności danego typu komórek rakowych. Biorąc to wszystko pod uwagę, dokładna analiza aktywomu za pomocą markerów chemicznych może bardzo dobrze uzupełnić obraz danego systemu biologicznego w zakresie jego dynamiki będącej pochodną aktywności poszczególnych enzymów.



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

Wykorzystanie markerów chemicznych do badania enzymów proteolitycznych w aktywomie wymaga od nich posiadania bardzo ważnej cechy, którą jest SELEKTYWNOŚĆ. Podobnie, jak przeciwciała do badania białek, tak i markery chemiczne muszą się cechować wysoką selektywnością, tak by oddziaływały tylko z jednym enzymem lub w szczególnych przypadkach z grupą pokrewnych enzymów. Jak wcześniej wspomniano, początki rozwoju markerów chemicznych dotyczyły otrzymywania nieselektywnych związków chemicznych, które reagowały z wieloma enzymami. W celu dokładnej identyfikacji aktywności poszczególnych enzymów, metody te były wspierane przez zastosowanie wysokorozdzielczej spektrometrii mas. W miarę rozwoju narzędzi do badania specyficzności substratowej proteaz, markery te stawały się coraz bardziej selektywny, dzięki czemu możliwe było zastosowanie ich w konkretnych badaniach biologicznych, do określenia funkcji poszczególnych enzymów proteolitycznych. Jednym z najlepszych przykładów jest marker biotyna-VAD-AOMK (bVAD-AOMK) do oznaczania kaspaz, enzymów proteolitycznych z grupy proteaz cysteinowych, które są odpowiedzialne za programowaną śmierć komórki [23]. Sekwencja VAD (walina-alanina-kwas asparaginowy) jest rozpoznawana przez kilka kaspaz, dzięki czemu łatwo można monitorować proces śmierci komórki. W tym celu marker bVAD-AOMK inkubuje się z komórkami, w których następnie indukowana jest apoptoza. Aktywne kaspazy łączą się trwale z markerem dzięki czemu możliwa jest ich wizualizacja za pomocą techniki *Western blotting*. Na podstawie masy cząsteczkowej poszczególnych prążków

można określić, które kaspazy były aktywowane w trakcie apoptozy (**rysunek 5A**) [24]. Innym przykładem jest fluorescencyjny marker Cbz-Phe-Lys(Cy5)-AOMK (GB123), który jest używany do oznaczania aktywności cysteinowych katepsyn, a więc enzymów, których nadmierna aktywność katalityczna sprzyja rozwojowi i przerzutowaniu nowotworów [25]. Marker GB123 bardzo dobrze wiąże się do katepsyny B, L oraz S, dzięki czemu możliwa jest ich detekcja, która podobnie jak w poprzednim przypadku, opiera się na inkubacji markera z komórkami (lub lizatem komórkowym), a następnie wykonaniu rozdziału elektroforetycznego białek i detekcję wybranych katepsyn na podstawie ich masy cząsteczkowej (**rysunek 5B**) [25]. Oba markery są bardzo użyteczne w badaniach odpowiednio kaspaz i katepsyn, jednak należy wyraźnie zaznaczyć że selektywna detekcja poszczególnych enzymów odbywa się na podstawie ich masy cząsteczkowej, gdyż markery te wiążą się do kilku enzymów jednocześnie. W związku z tym takie markery nie mogą być stosowane np. w badaniach proteaz za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, czy w badaniach z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Ograniczenie to stwarza ogromną potrzebę do opracowania bardzo selektywnych markerów chemicznych, które zostałyby następnie wykorzystane do selektywnej wizualizacji tylko jednego, wybranego enzymu, bez konieczności wspomagania się spektroskopią mas czy elektroforetycznym rozdziałem białek. **Opracowanie takiej technologii jest podstawą niniejszej rozprawy habilitacyjnej.**

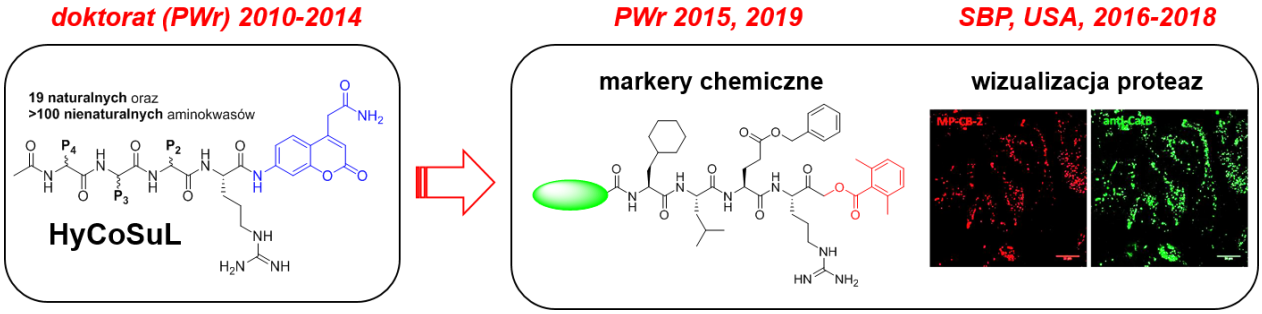


Rysunek 5 Nieselektywne markery w badaniu enzymów proteolitycznych. Panel A. Wizualizacja rekombinowanych kaspaz oraz kaspaz w komórkach apoptotycznych za pomocą biotynylowanego markera biotyna-VAD-AOMK oraz techniki *Western blotting*. **Panel B.** Wizualizacja katepsyn cysteinowych w komórkach RAW za pomocą fluorescencyjnego markera Cbz-Phe-Lys(Cy5)-AOMK i techniki *Western blotting*. W obu przypadkach marker wiąże się z więcej niż jednym enzymem. Rysunki zaadaptowano z publikacji [24, 25].

Selektywna wizualizacja enzymów proteolitycznych w aktywomie.

Badania opisane w niniejszej rozprawie habilitacyjnej dotyczą opracowania oraz syntezy selektywnych markerów chemicznych oraz i dalszego wykorzystania do selektywnej wizualizacji enzymów proteolitycznych w komórkach nowotworowych i próbkach od pacjentów.

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale cechą nadrzędną markerów chemicznych powinna być ich wysoka selektywność względem badanych enzymów proteolitycznych. Tylko w taki sposób można szczegółowo określić aktywność danego enzymu w próbce, dzięki czemu możliwe staje się np. określenie jego dokładnej funkcji biologicznej. Główne metody określania specyficzności substratowej proteaz polegają na profilowaniu tych enzymów za pomocą bibliotek substratów fluorogenicznych, które zawierają naturalne aminokwasy (metoda *PS-SCL*) [12, 26]. Mimo że ta metoda dostarcza wielu informacji na temat budowy miejsca aktywnego proteazy, bardzo często okazuje się nieskuteczna przy projektowaniu selektywnych markerów dla enzymów proteolitycznych wykazujących nakładającą się specyficzność substratową (np. kaspazy czy katepsyny). Podczas swojej pracy doktorskiej pod opieką prof. Marcin Drąga wspólnie z Pauliną Kasperkiewicz opracowaliśmy nową metodę skanowania enzymów proteolitycznych nazwaną HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Library*), która w swojej strukturze zawierała naturalne i nienaturalne aminokwasy [27, 28]. Dzięki zastosowaniu nienaturalnych aminokwasów stało się możliwe znacznie lepsze określenie budowy miejsca aktywnego proteazy, co z kolei skutkowało otrzymaniem bardziej aktywnych i selektywnych substratów fluorogenicznych, mogących rozróżnić tak blisko spokrewnione enzymy jak np. kaspazy apoptotyczne. W swojej pracy **po doktoracie** postanowiłem wykorzystać tę metodę do wytworzenia markerów chemicznych, które następnie użyłem do opracowania technologii selektywnej wizualizacji enzymów proteolitycznych. Metoda HyCoSuL jest obecnie najlepszą metodą do projektowania selektywnych peptydów będących ligandami enzymów proteolitycznych. Na **rysunku 6** przedstawiłem ewolucję moje pracy naukowej od momentu doktoratu do badań będących przedmiotem mojej rozprawy habilitacji. Na realizację swojego stażu podoktorskiego otrzymałem grant Marie Skłodowska-Curie Global Fellowship z Komisji Europejskiej. Był to jedyny grant MSCA-GF przyznany osobie z Polski w edycji 2014. Wszystkie badania biologiczne (w tym wizualizację enzymów za pomocą markerów) wykonałem w laboratorium prof. Guya Salvesena w Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA.



Rysunek 6 W swojej pracy naukowej po doktoracie skupiłem się na opracowaniu metody selektywnej wizualizacji enzymów proteolitycznych w komórkach nowotworowych. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu selektywnych markerów chemicznych, które otrzymano na drodze profilowania specyficzności substratowej wybranych proteaz metodą HyCoSuL, nad którą pracowałem podczas mojej pracy doktorskiej. PWr – Politechnika Wrocławska, SBP – Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA.

BADANIA WŁASNE (H1-H5)

Wizualizacja proteaz lizosomalnych za pomocą markerów chemicznych

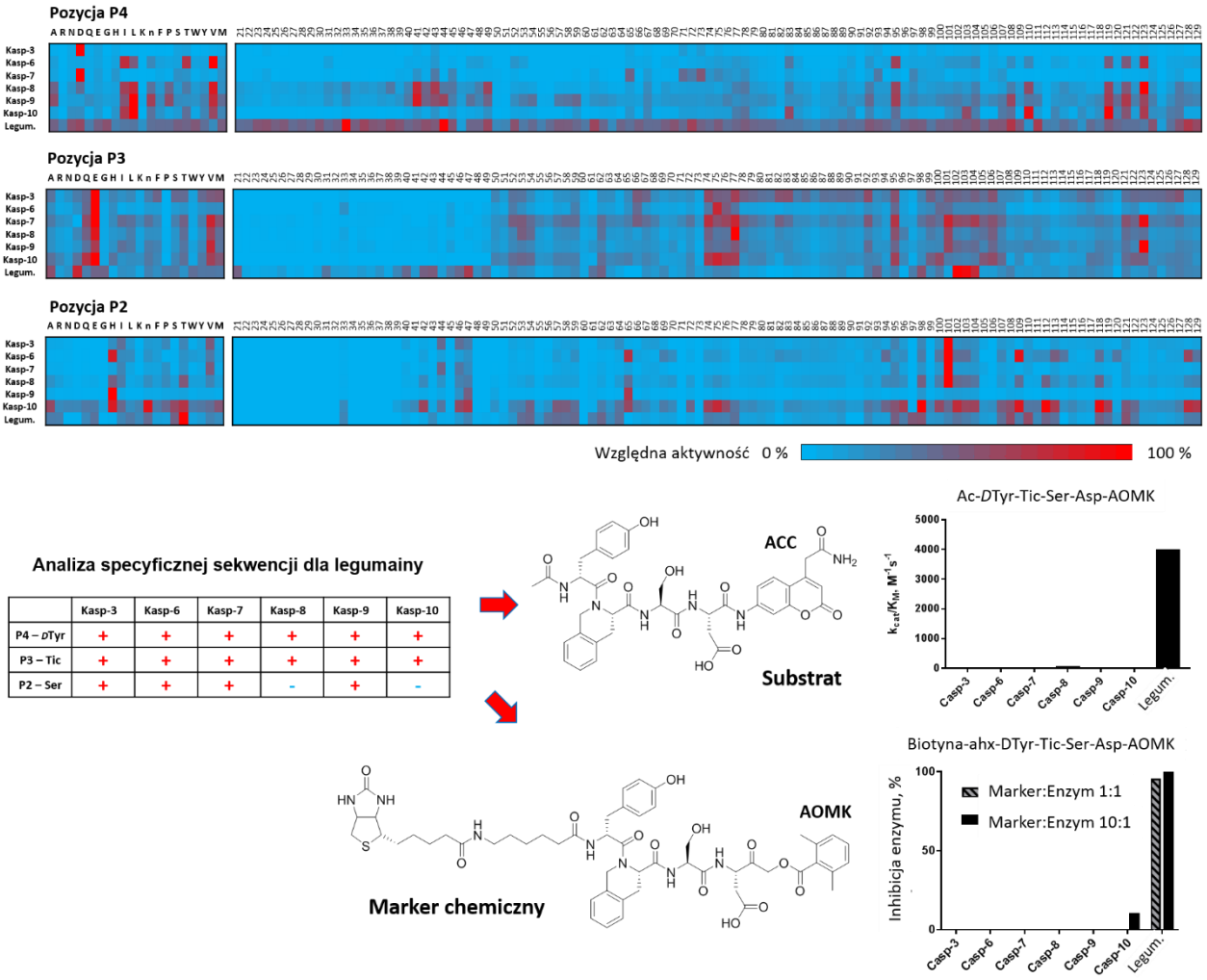
H1. Wykorzystanie metody HyCoSuL do opracowania selektywnych markerów chemicznych (Poręba i współpracownicy, **2017**, *Nature Protocols*).

Moim głównym zadaniem podczas doktoratu było opracowanie metody profilowania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych za pomocą bibliotek substratów zawierających nienaturalne aminokwasy (metoda HyCoSuL). Za pomocą tej metody udało mi się otrzymać selektywne substraty dla ludzkich kaspaz apoptotycznych. Jednak metody profilowania specyficzności proteaz (w tym metoda HyCoSuL) posiadają znacznie szersze zastosowanie. Metody te dostarczają bowiem informacji o tym, jakie peptydy mogę potencjalnie wiązać się z poszczególnymi enzymami proteolitycznymi. Dzięki temu możliwe jest wykorzystanie tych sekwencji do syntezy substratów (moja praca doktorska) lub inhibitorów oraz markerów chemicznych. I właśnie do tego celu wykorzystałem metodę HyCoSuL w swojej pracy po doktoracie. Warto tu podkreślić, że otrzymanie selektywnych markerów chemicznych nie było moim nadrzędnym celem, ale jedynie środkiem do osiągnięcia tego celu jakim było opracowanie technologii do selektywnej wizualizacji poszczególnych enzymów proteolitycznych.

Metoda HyCoSuL została po raz pierwszy opisana w 2014 roku i krótko po tym była już z powodzeniem wykorzystana do określenia specyficzności substratowej kilkunastu enzymów proteolitycznych [27, 28]. W 2017 roku postanowiliśmy napisać dokładny protokół o tym jak stosować tę metodę do badania specyficzności substratowej proteaz [8] (**rysunek 7**). Spora część protokołu dotyczyła bezpośrednio mojej pracy doktorskiej, jednak w protokole zawarłem również informacje o tym, w jaki sposób analizować matryce specyficzności substratowej proteaz w celu otrzymania selektywnych inhibitorów i markerów chemicznych. Opisałem również dokładną procedurę dotyczącą metody wydajnej syntezy chemicznej takich markerów. Tak więc, ta część protokołu dotyczy bezpośrednio mojej pracy podoktorskiej i jest wynikiem mojej pracy i doświadczenia zebranego w latach 2015-2017, podczas realizacji projektów będących podstawą przedstawionej pracy habilitacyjnej.

Procedurę opracowania selektywnego markera chemicznego na podstawie analizy HyCoSuL przedstawiłem na przykładzie legumainy, proteazy cysteinowej, której zwiększona aktywność jest obserwowana w większości typów nowotworów, dzięki czemu enzym ten stanowi doskonały cel terapeutyczny w kontekście opracowywania nowych terapii [29]. W lekko kwaśnym środowisku nowotworów, legumaina (podobnie jak kaspazy) hydrolizuje substraty, które w pozycji P1 zawierają resztę kwasu asparaginowego (Asp). W związku z tym, w celu opracowania selektywnego markera chemicznego dla legumainy konieczna była również analiza specyficzności substratowej kaspaz w pozycjach P4, P3 oraz P2, tak by marker dla legumainy nie detektował także kaspaz. Dokładna analiza specyficzności substratowej tych enzymów pozwoliła na opracowanie sekwencji peptydowej, która nie wiązała się do miejsca aktywnego żadnej z kaspaz. Sekwencja ta (*D*Tyr-Tic-

Ser-Asp) składała się z dwóch nienaturalnych aminokwasów w pozycjach P4 i P3 oraz dwóch naturalnych aminokwasów w pozycjach P2 i P1 [30]. Wykorzystanie tej sekwencji w strukturze markera chemicznego (biotyna-ahx-*D*Tyr-Tic-Ser-Asp-AOMK, gdzie ahx to linker 6-aminoheksanowy) i wykonanie pomiarów kinetyki wiązania się markera do kaspaz i legumainy (stała szybkości inhibicji drugiego rzędu, k_{obs}/I) potwierdziły wysoką selektywność markera względem legumainy i co za tym idzie zasadność wyboru metody HyCoSuL jako narzędzia chemicznego do projektowania wysoce selektywnych markerów chemicznych. W związku z tym metoda ta została przeze mnie wykorzystana w dalszych badaniach do projektowania i syntezy markerów chemicznych także dla innych enzymów proteolitycznych, które odgrywają znaczącą role w rozwoju chorób nowotworowych, w tym kaspaz apoptotycznych i lizosomalnych, cysteinowych katepsyn.



Rysunek 7 Schemat projektowania selektywnych markerów chemicznych dla proteaz z wykorzystaniem metody HyCoSuL. Górny panel przedstawia specyficzność substratową kaspaz apoptotycznych oraz legumainy (Legum.) w pozycjach P4, P3, P2 przedstawioną za pomocą tzw. map cieplnych *(*ang. *heat maps)* (kolor czerwony oznacza duże powinowactwo aminokwasu do danej kieszeni enzymu, kolor niebieski – brak powinowactwa). Wyniki przedstawiono dla naturalnych aminokwasów (jednoliterowe skróty: A, R, N...) oraz ponad 100 nienaturalnych aminokwasów (numery od 21 do 129).

Dolny panel przedstawia metodę selekcji i analizy specyficznej sekwencji peptydowej dla legumainy. W tabeli „+" oznacza pozytywną selekcję (dany aminokwas np. Tic w P3 nie jest rozpoznawany przez kaspazy), natomiast „-" oznacza negatywną selekcję (dany aminokwas jest rozpoznawany przez kaspazę – np. Ser w P2 jest rozpoznawana przez kaspazę-8 i kaspazę-10). Na podstawie optymalnej sekwencji, otrzymano marker chemiczny (biotyna-ahx-*D*Tyr-Tic-Ser-Asp-AOMK), który wykazywał się bardzo dużą selektywnością względem legumainy. Rysunek zaadoptowano z publikacji **H1**.

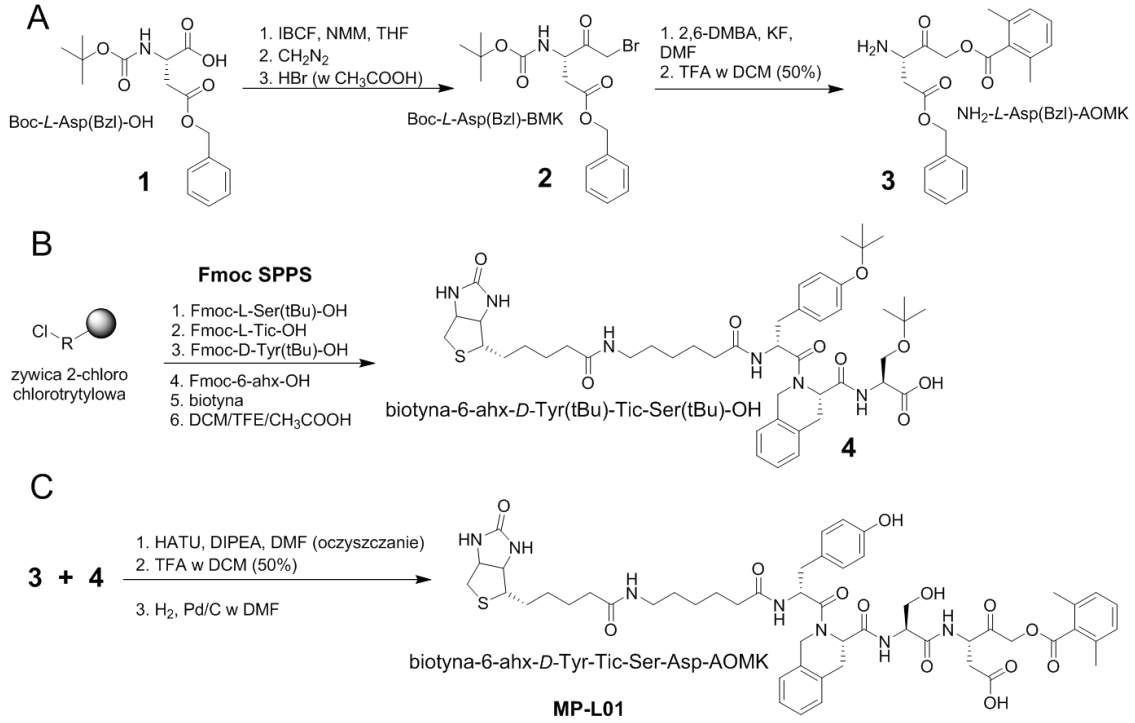
H2. Selektywna wizualizacja aktywności ludzkiej legumainy w komórkach (Poręba i współpracownicy, **2016,** *Cell Chemical Biology*).

Pierwsza z cyklu moich prac dotyczących selektywnej wizualizacji enzymów proteolitycznych za pomocą markerów chemicznych dotyczy ludzkiej legumainy [30]. Badania chemiczne (określenie specyficzności substratowej, synteza substratów i markerów chemicznych dla legumainy i badania kinetyki reakcji enzymatycznych) wykonałem na Politechnice Wrocławskiej (2015). Badania komórkowe i wizualizację wykonałem w SBP, USA (2016).

Legumaina (proteaza aspartylowa, AEP) jest proteazą cysteinową, która jest zlokalizowana głównie w lizosomach i endosomach, jednak w pewnych warunkach może być także wysyłana do cytozolu lub nawet macierzy międzykomórkowej, gdzie przeprowadza selektywną hydrolizę wybranych substratów [31]. Enzym ten wykazuje bardzo wąską specyficzność substratową, gdyż w pozycji P1 rozpoznaje prawie wyłącznie łańcuch boczny asparaginy (Asn). Jednak w lekko kwaśnym środowisku (np. w obrębie nowotworów) ta proteaza potrafi również rozpoznawać w pozycji P1 resztę kwasu asparaginowego, co powoduje, że w tych warunkach legumaina posiada podobną specyficzność substratową jak kaspazy. Co więcej, aktywność legumainy jest również blokowana przez te same inhibitory, których używa się do inhibicji aktywności kaspaz. Powoduje to, że bardzo trudno badać aktywność proteolityczną legumainy za pomocą małocząsteczkowych markerów. A ma to niebagatelne znaczenie, ponieważ enzym ten ma duże znaczenie biologiczne, gdyż bierze udział w regulacji i modelowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej, inhibicji tworzenia się osteoklastów, hydrolizę substratów w celu prezentacji antygenów, proteolitycznej aktywacji pro-MMP2 (macierzowej metaloproteazy 2) do jej aktywnej formy MMP2, czy proteolitycznej regulacji lizosomalnych katepsyn B, H oraz L [31]. Jednak z drugiej strony nadaktywność katalityczna legumainy jest powiązana ze stanami zapalnymi, miażdżycą czy chorobami nowotworowymi [29, 31]. W licznych pracach wykazano, że aktywność katalityczna legumainy może być wykorzystana jak czynnik prognozujący postęp choroby nowotworowej i rokowania pacjentów w nowotworach piersi, żołądka, jelita grubego czy prostaty. Powoduje to, że legumaina jest nie tylko doskonałym celem terapeutycznym w kontekście projektowania leków w oparciu o inhibitory, ale także w kontekście opracowywania markerów chemicznych do wykorzystania w testach diagnostycznych.

W przedstawionej pracy podjąłem próbę opracowania markeru chemicznego dla legumainy oraz jego wykorzystania do wizualizacji tego enzymu w żywych komórkach. Jak wspomniałem wcześniej optymalną sekwencję dla tego enzymu otrzymałem w wyniki profilowania jego specyficzności substratowej za pomocą metody HyCoSuL. Synteza i analiza kinetyczna substratów

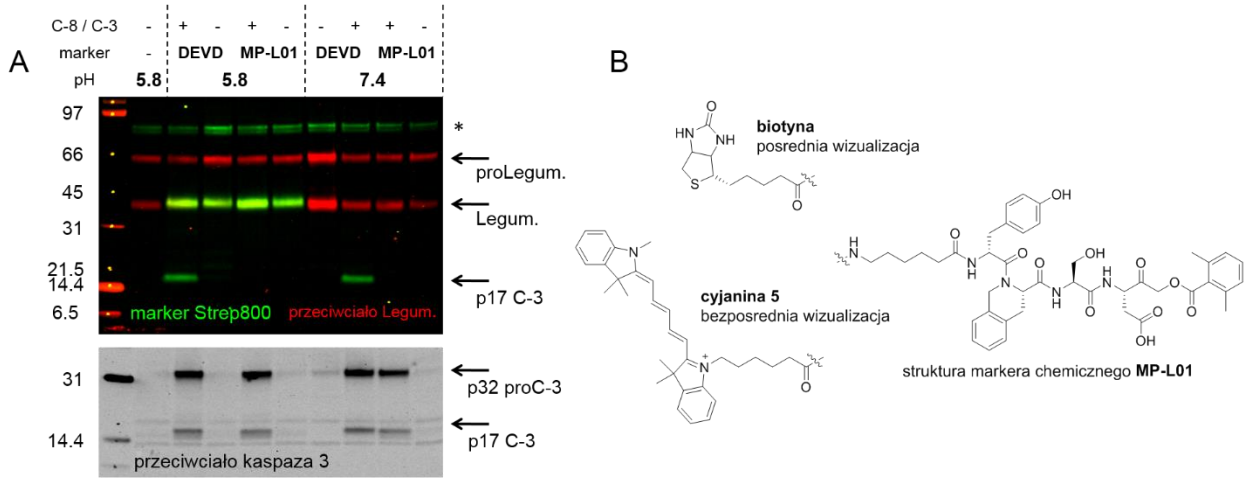
względem legumainy oraz wybranych kaspaz apoptotycznych pokazała, że najbardziej selektywnym peptydem jest tatrapeptyd o sekwencji *D*Tyr-Tic-Ser-Asp, który został następnie wykorzystany do syntezy markera chemicznego. Na potrzeby tego projektu opracowałem wydajną metodę syntezy markera chemicznego zawierającego resztę kwasu asparaginowego w pozycji P1, która opierała się na syntezie blokowej poszczególnych fragmentów inhibitora (**rysunek 8**). Jako znacznik do detekcji markera wybrałem biotynę, gdyż jest ona łatwo wykrywana za pomocą fluorescencyjnie znakowanej streptawidyny. Dzięki temu, w zależności od eksperymentu, możemy „wybarwić" kompleks marker-enzym na różne kolory. Biotynę i peptyd połączyłem ze sobą za pomocą linkera (kwas 6-aminoheksanowy, ahx) by oddalić znacznik od elementu rozpoznawczego (peptydu). Stosowanie linkerów jest powszechną strategią przy projektowaniu markerów, gdyż wiadomo, że sam znacznik, znajdując się blisko miejsca aktywnego proteazy, może z nim oddziaływać tym samym zmieniając parametry kinetyczne markera. Opisana procedura syntezy markera (odpowiednio zmodyfikowana) została także wykorzystana do syntezy pozostałych markerów chemicznych opisanych w niniejszej rozprawie habilitacyjnej. W ogólnym ujęciu polega ona na osobnej syntezie dwóch fragmentów. Fragment A (związek 3 na **rysunku 8**) to grupa wiążąca (AOMK) z przyłączonym aminokwasem w pozycji P1 (w przypadku legumainy jest to reszta kwasu asparaginowego). Fragment B (związek 4 na **rysunku 8**) to fragment peptydowy ze znacznikiem, który został otrzymany na nośniku stałym (metoda SPPS, ang. *solid phase peptide synthesis*). W kolejnym etapie następuje reakcja sprzęgania związku 3 ze związkiem 4 i powstaje związek, który po usunięciu grup ochronnych, jest docelowym markerem chemicznym (**MP-L01**).



Rysunek 8 Schemat syntezy markera chemicznego o sekwencji biotyna-linker-*D*Tyr-Tic-Ser-Asp-AOMK (**MP-L01**) dla legumainy. Synteza jest podzielona na 3 bloki. W pierwszym bloku otrzymywana jest reaktywna grupa wiążąca z przyłączonym aminokwasem w pozycji P1 (łańcuch boczny kwasu asparaginowego jest chroniony grupą benzylową). W drugim bloku metodą syntezy na nośniku stałym

otrzymywany jest fragment znacznik-linker-peptyd-OH. W trzecim bloku następuje reakcja sprzęgania peptydu z grupą reaktywną oraz hydroliza grup ochronnych. Produkt końcowy jest oczyszczany za pomocą HPLC. Rysunek zaadaptowano z publikacji **H2.**

W kolejnym etapie projektu marker **MP-L01** został wykorzystany do wizualizacji legumainy w żywych komórkach. Jako wstępny model komórkowy wybraliśmy linię komórkową M38L. Jest to linia komórkowa, która pochodzi od linii HEK293 i charakteryzuje się wysoką ekspresją legumainy (ang. *legumain-overexpressing cell line*) [32]. Komórki M38L stanowią powszechny i bardzo wygodny model komórkowy do badań legumainy. Eksperyment ten wykonała prof. Rigmor Solberg w laboratorium prof. Guya Salvesena. Okazało się, że marker **MP-L01** z łatwością dostaje się do komórki i wiąże się z aktywną legumainą, nie powodując przy tym żadnych efektów ubocznych w postaci np. śmierci komórki. Dalsze badania z wykorzystaniem markera przeprowadziłem już osobiście. Moim głównym celem było pokazanie, że marker potrafi selektywnie detektować aktywną legumainę. Biorąc pod uwagę fakt, że legumaina i kaspazy wykazują podobną specyficzność substratową wydawało się zasadne, by sprawdzić selektywność markera w komórkach w których obecne są również aktywne kaspazy, głównie kaspaza 8 i kaspaza 3. W tym celu wykonałem kotransfekcję DNA kodującego oba te enzymy do komórek M38L. Zwiększona ekspresja prokaspazy 8 w komórce prowadzi do jej dimeryzacji i w konsekwencji do osiągniecia dojrzałości katalitycznej. W kolejnym kroku aktywna kaspaza 8 aktywuje prokaspazę 3, co w kolejnych etapach prowadzi do śmierci komórki. Po 24 godzinach od wykonania kotransfekcji zebrałem komórki i sporządziłem z nich lizaty, które następnie inkubowałem z markerem **MP-L01.** Po inkubacji przeprowadziłem rozdział elektroforetyczny białek i za pomocą techniki *Western blotting* dokonałem wizualizacji enzymów (**rysunek 9A**). Okazało się, że w komórkach, w których przeprowadziłem kotransfekcję cDNA, nastąpiła aktywacja kaspazy 3, co zostało udowodnione za pomocą przeciwciała kaspazy 3 oraz markera chemicznego: biotyna-linker-DEVD-AOMK, który jest standardowym markerem dla kaspazy 3 (oraz innych kaspaz). Pokazałem także, że marker DEVD wiąże się także z legumainą. Jednak najważniejszym wynikiem eksperymentu było udowodnienie, że marker **MP-L01** łączy się tylko z aktywną legumainą i nie oddziałuje z kaspazą 3. Co więcej pokazałem, że marker ten reaguje z legumainą tylko w lekko kwasowym środowisku (pH = 5.8), a nie reaguje w środowisku obojętnym (pH = 7.4), co jest spowodowane tym, że w środowisku obojętnym łańcuch boczny kwasu asparaginowego w pozycji P1 jest ujemnie naładowany, przez co nie wiąże się do kieszeni S1 legumainy. Badania te potwierdziły, że marker chemiczny **MP-L01** potrafi selektywnie oznaczać aktywną legumainę oraz nie reaguje z kaspazami apoptotycznymi. Co więcej, eksperymenty na żywych komórkach i lizatach komórkowych pokazały, że marker nie reaguje także z cysteinowymi katepsynami, które podobnie jak legumaina występują w lizosomach i bardzo często wykazują krzyżową aktywność enzymatyczną. Zrealizowanie tego projektu pozwoliło mi nawiązać współpracę naukową z prof. Rimgor Solberg (Uniwersytet w Oslo, Norwegia), która zaowocowała dwoma kolejnymi publikacjami [33, 34]. Moim wkładem w te publikacje była synteza markera chemicznego dla legumainy, które zamiast znacznika w postaci biotyny, posiadał cyjaninę 5 – fluorofor, dzięki któremu możliwa była bezpośrednia wizualizacja kompleksu marker-enzym za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej (**rysunek 9B**).



Rysunek 9 Wizualizacja aktywnej legumainy za pomocą selektywnego markera chemicznego MP-L01. **Panel A.** Wizualizacja legumainy w lizatach komórkowych przygotowanych z apoptotycznych komórek M38L. Biotynylowany marker MP-L01 reaguje tylko legumainą, podczas gdy marker DEVD reaguje z legumainą oraz kaspazą 3. Kompleks biotynylowany marker-enzym został zwizualizowany za pomocą fluorescencyjnie znakowanej streptawidyny (na zielono). Prolegumaina (proLegum.) i aktywna legumaina (Legum.) zostały oznaczone za pomocą przeciwciała (na czerwono). Aktywacja kaspazy 3 (z formy p32 do formy aktywnej p17) została potwierdzona za pomocą przeciwciała (dolny panel). **Panel B.** Struktura markera chemicznego dla legumainy: wersja z biotyną (pośrednia detekcja za pomocą fluorescencyjnie znakowanej streptawidyny) oraz wersja z fluorescencyjną cyjaniną 5 jak znacznikiem (bezpośrednia detekcja). Rysunek został zaadaptowany z publikacji **H2**.

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem marker chemiczny (**MP-L01**) do selektywnej wizualizacji aktywnej legumainy w żywych komórkach oraz w lizatach komórkowych linii komórkowej M38L.

2. Marker **MP-L01** nie wykazywał krzyżowej reaktywności z kaspazami oraz katepsynami.

H3. Selektywna wizualizacja aktywności ludzkiej katepsyny L w komórkach (Poręba i współpracownicy, **2018**, *Chemical Science*).

Praca ta opisuje wyniki wizualizacji aktywności katepsyny L uzyskane za pomocą techniki *Western blotting* oraz mikroskopii fluorescencyjnej [35]. Badania chemiczne (określenie specyficzności substratowej, synteza substratów dla katepsyny L i badania kinetyki reakcji enzymatycznych) wykonałem na Politechnice Wrocławskiej (2015). Badania biochemiczne (wyznaczenie parametrów kinetycznych dla markerów), badania komórkowe oraz wizualizację wykonałem w SBP, USA (2016-2017).

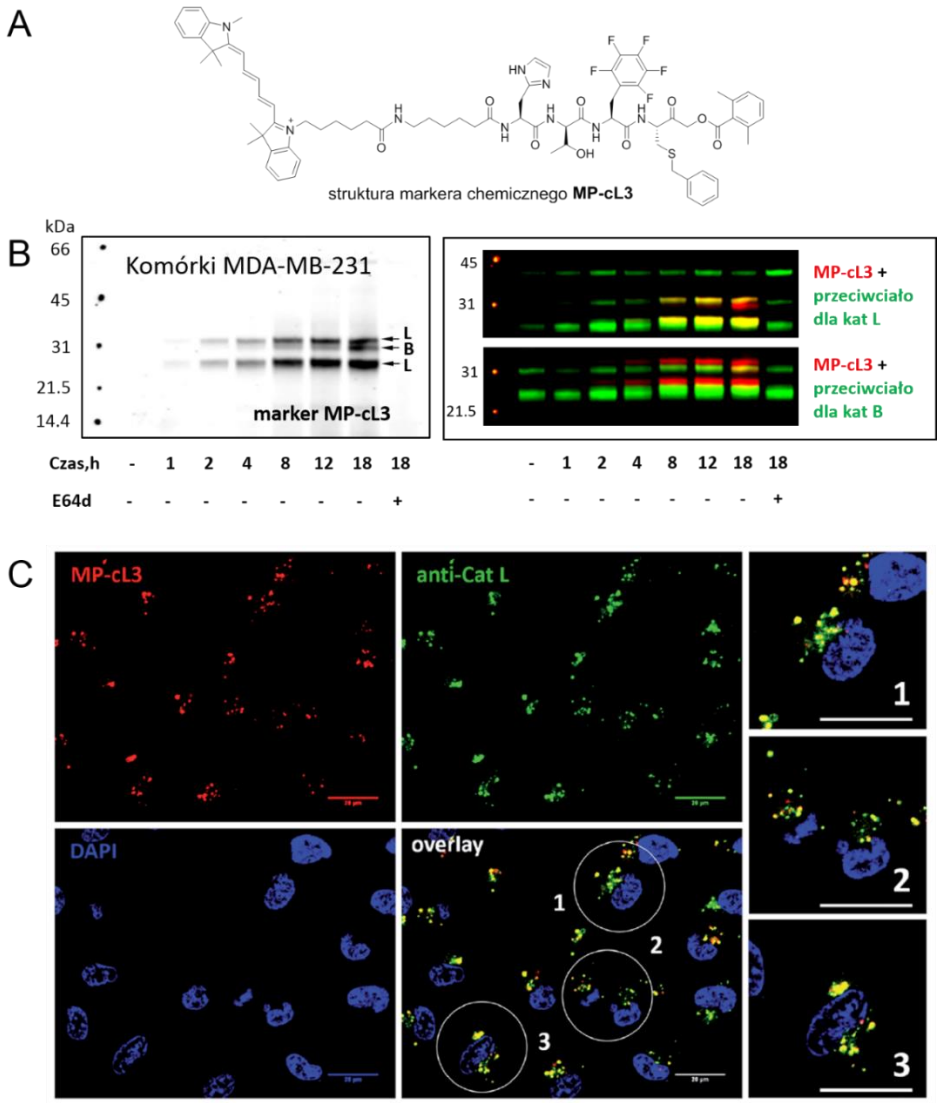
Katepsyna L jest jedną z 11 katepsyn cysteinowych występujących u ludzi. Enzymy te występują w kwaśnym środowisku lizosomów i są odpowiedzialne głównie za

wewnątrzkomórkową degradację białek, autofagię oraz odpowiedź immunologiczną organizmu na czynniki zewnętrzne (biorą udział m.in. w procesie prezentacji antygenów). Ponadto katepsyny cysteinowe odgrywają znaczącą rolę w rozwoju wielu chorób włączając w to choroby autoimmunologiczne, miażdżycę, osteoporozę czy choroby nowotworowe [36]. Z tego względu od wielu lat enzymy te stanowią ważny cel terapeutyczny podczas projektowania leków. Jednak mimo wielu sukcesów w badaniach przedklinicznych i w początkowej fazie badań klinicznych, do tej pory żaden z inhibitorów cysteinowych katepsyn nie został zatwierdzony jako lek [37]. Z drugiej jednak strony nadaktywność tych enzymów jest obserwowana w przypadku wielu nowotworów i stanowi doskonały cel do opracowania metod diagnostycznych w oparciu o markery chemiczne, pomocnych np. podczas operacji onkologicznych. Jednak głównym problemem w opracowaniu takich metod jest nakładająca się specyficzność substratowa katepsyn. W 2006 roku Choe i współpracownicy pokazali za pomocą pozycyjnego skanowania kombinatorycznych bibliotek substratów fluorogenicznych (metoda PS-SCL), że katepsyny hydrolizują podobne substraty, co znacząco utrudnia zaprojektowanie selektywnych inhibitorów i markerów chemicznych dla poszczególnych enzymów z tej grupy [38]. Jedną z najczęściej występujących katepsyn cysteinowych, jest katepsyna L. Enzym ten posiada najwyższą aktywność katalityczną w przedziale pH 5.0-6.0 i podobnie jak inne katepsyny cysteinowe, wykazuje szeroką specyficzność substratową. Katepsyna L jest bardzo interesującym enzymem w kontekście choroby nowotworowej, ponieważ odpowiada m.in. za powstawanie chemoodporności u pacjentów onkologicznych w odpowiedzi na standardowe terapie [39]. Co więcej, w zależności od nowotworu i jego otoczenia tkankowego, katepsyna L może promować lub hamować rozwój nowotworów. W związku z tym lepsze zrozumienie biologii katepsyny L będzie miało duże znaczenie przy projektowaniu nowych terapii oraz metod diagnostycznych.

Obecnie metody wizualizacji aktywności katalitycznej katepsyny L w komórkach i lizatach komórkowych opierają się na wykorzystaniu fluorescencyjnych substratów lub markerów chemicznych. Budowa chemiczna większości tych związków opiera się na sekwencji Phe-Arg, która mimo, że jest bardzo dobrze hydrolizowana przez katepsynę L, jest także niestety rozpoznawana przez inne katepsyny, zwłaszcza strukturalnie podobną katepsynę V oraz katepsynę B, która jest dominującą proteazą w komórkach nowotworowych. **Z uwagi na ważną rolę katepsyny L w nowotworach oraz brak idealnych metod wizualizacji jej aktywności podjąłem próbę opracowania takiej metody.** Kluczowym parametrem było otrzymanie selektywnego markera chemicznego, który nie oddziaływałby z innymi enzymami, zwłaszcza z katepsyną V oraz B. Określenie pełnej specyficzności substratowej katepsyny L w pozycjach P4-P1 za pomocą metody HyCoSuL pozwoliło mi zaprojektować grupę substratów fluorogenicznych, które następnie poddałem analizie parametrów kinetycznych (k_{cat}/K_M, K_M, k_{cat}) względem pięciu najczęściej występujących cysteinowych katepsyn: L, V, B, S oraz K [35]. Analiza kinetyczna pozwoliła mi zidentyfikować kilka peptydów, które posłużyły jako struktury wiodące do zaprojektowania i syntezy markerów chemicznych z grupą reaktywną AOMK. Jako znaczniki dla markera wybrałem biotynę (markery **MP-cL1** oraz **MP-cL2**) oraz cyjaninę 5 (marker **MP-cL3**). Wszystkie markery zawierały wspólny motyw peptydowy: His-*D*Thr-Phe(F_5) (gdzie *D*Thr to *D*-treonina, a Phe(F_5) to pentafluorofenyloalanina) w pozycjach P4-P2 oraz zmienne aminokwasy w pozycji P1 (Arg, Lys

lub Cys(Bzl), gdzie Cys(Bzl) to *S*-benzylocysteina). Pomiary stałych inhibicji drugiego rzędu (k_{obs}/I) oraz testy powinowactwa chemicznego do rekombinowanych katepsyn wykazały, że największą selektywnością względem katepsyny L cechuje się marker **MP-cL3** (Cy5-ahx-His-*D*Thr-Phe(F_5)-Cys(Bzl)-AOMK) i to on został wybranych do dalszych badań (**rysunek 10A**). Marker ten wykazywał bardzo duże powinowactwo do katepsyny L i jedynie szczątkową aktywność względem katepsyny B. W kolejnym etapie badań przeprowadziłem ocenę selektywności markera **MP-cL3** w komórkach ludzkiego raka piersi MDA-MB-231. Komórki te są bardzo dobrym modelem do badań selektywności markera **MP-cL3**, gdyż mają wysoki poziom katepsyny B i znacząco niższy poziom katepsyny L. Wybór tych komórek stanowił więc poważne wyzwanie dla selektywności markera **MP-cL3**. Marker **MP-cL3** inkubowałem z żywymi komórkami MDA-MB-231 i w wyznaczonych punktach czasowych zbierałem komórki, przygotowywałem z nich lizaty, które następnie poddawałem elektroforezie i analizie ze pomocą techniki *Western blotting*. W celu wizualizacji enzymów zastosowałem również przeciwciała. Analiza w podanych odstępach czasowych pokazała, że już po 1 godzinie inkubacji pojawia się sygnał od kompleksu markera z enzymem, co oznacza, że marker posiada zdolność penetracji błony komórkowej i swobodnego dotarcia do lizosomów (**rysunek 10B**). Dalsza analiza wykazała, że nawet przy stosunkowo długiej inkubacji (12 godzin) marker **MP-cL3** wiążę się selektywnie tylko do katepsyny L (które występuje w dwóch katalitycznie aktywnych formach: 30kDa i 25kDa). Dopiero po 18 godzinach marker zaczyna reagować także z katepsyną B. Testy te potwierdziły zatem wysoką selektywność markera oraz pozwoliły ustalić właściwe stężenie i czas inkubacji dla selektywnej wizualizacji katepsyny L w żywych komórkach MDA-MB-231. W następnym kroku, do wizualizacji katepsyny L w komórkach postanowiłem wykorzystać mikroskopię fluorescencyjną. W związku z tym, że przy wizualizacji za pomocą mikroskopu niemożliwe jest określenie ewentualnych oddziaływań markera z innymi enzymami (tak jak można to zobaczyć metodą *Western blotting*), do wizualizacji wykorzystałem wcześniej opracowane warunki inkubacji markera **MP-cL3** z komórkami (stężenie markera 1μM, czas inkubacji 8 godzin). Co więcej, katepsynę L oznaczyłem również przeciwciałem, dzięki czemu możliwa była lokalizacja aktywnego enzymu (marker – czerwony sygnał) oraz aktywnego i nieaktywnego enzymu (przeciwciało – zielony sygnał) (**rysunek 10C**). Otrzymane wyniki pokazały bardzo wysoką kolokalizację obu sygnałów. Co więcej, w komórkach były widoczne zielone punkty, bez czerwonego koloru, co wskazuje na to, że w komórce część katepsyny L była obecna w nieaktywnej formie. Obserwacja ta jest doskonałym potwierdzeniem zasadności wykorzystania markerów do wizualizacji enzymów, gdyż nie cała pula enzymu w komórce posiada aktywność katalityczną. Jako ostatni eksperyment, zbadałem kolokalizację katepsyny L i katepsyny B w komórkach. Mimo że oba te enzymy są zlokalizowane w lizosomach, analiza za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej pokazała, że ten rozkład jest nierównomierny, tj. są lizosomy, które posiadają wysoki poziom obu enzymów, jednak są też takie, w których dominuje tylko jeden z nich. Bardzo istotną zaletą wizualizacji aktywności katepsyny L w komórkach za pomocą markera chemicznego i z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej jest możliwość dokładnego określenia aktywności enzymu w pojedynczych komórkach. Właściwość ta ma bardzo duże znaczenie przy analizie i obrazowaniu aktywności enzymów w układach heterogennych, gdzie obecne są różne komórki, np. w tkance nowotworowej, gdzie oprócz komórek nowotworowych są

także fibroblasty, a także komórki infiltrowane przez komórki nowotworowe jak choćby monocyty, makrofagi i neutrofile.



Rysunek 10 Wizualizacja katepsyny L w komórkach raka piersi MDA-MB-231. Panel A. Struktura chemiczna markera **MP-cL3** do znakowania aktywnej katepsyny L. Marker składa się z fluorescencyjnego znacznika (cyjanina 5, Cy5), elementu rozpoznawczego (peptyd His-*D*Thr-Phe(F_5)-Cys(Bzl)) oraz reaktywnej grupy wiążącej (AOMK). **Panel B.** Wizualizacja katepsyny L w żywych komórkach za pomocą markera **MP-cL3** z wykorzystaniem techniki *Western blotting*. Marker **MP-cL3** wiąże się z katepsyną L już po godzinie inkubacji, natomiast z katepsyną B wiąże się dopiero po 12-18 godzinach. Utworzenie kompleksu marker-katepsyna L (czerwony) potwierdzono za pomocą przeciwciała katepsyny L (zielony). **Panel C**. Wizualizacja katepsyny L w żywych komórkach za pomocą markera **MP-cL3** z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Na zdjęciach widać bardzo dużą kolokalizację między **MP-cL3** (czerwony sygnał) a przeciwciałem katepsyny L (zielony sygnał, *anti-CatL*). Na niebiesko wybarwiono jądro komórkowe (DAPI). Rysunek zaadaptowano z publikacji **H3**.

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem marker chemiczny (**MP-cL3**) do selektywnej wizualizacji aktywnej katepsyny L w żywych komórkach raka piersi MDA-MB-231.

2. Dzięki zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej, określiłem lokalizację i aktywność katalityczną katepsyny L w pojedynczych komórkach.

3. Udowodniłem, że katepsyna L i B nie wykazują 100% korelacji co do swojej lokalizacji w komórce.

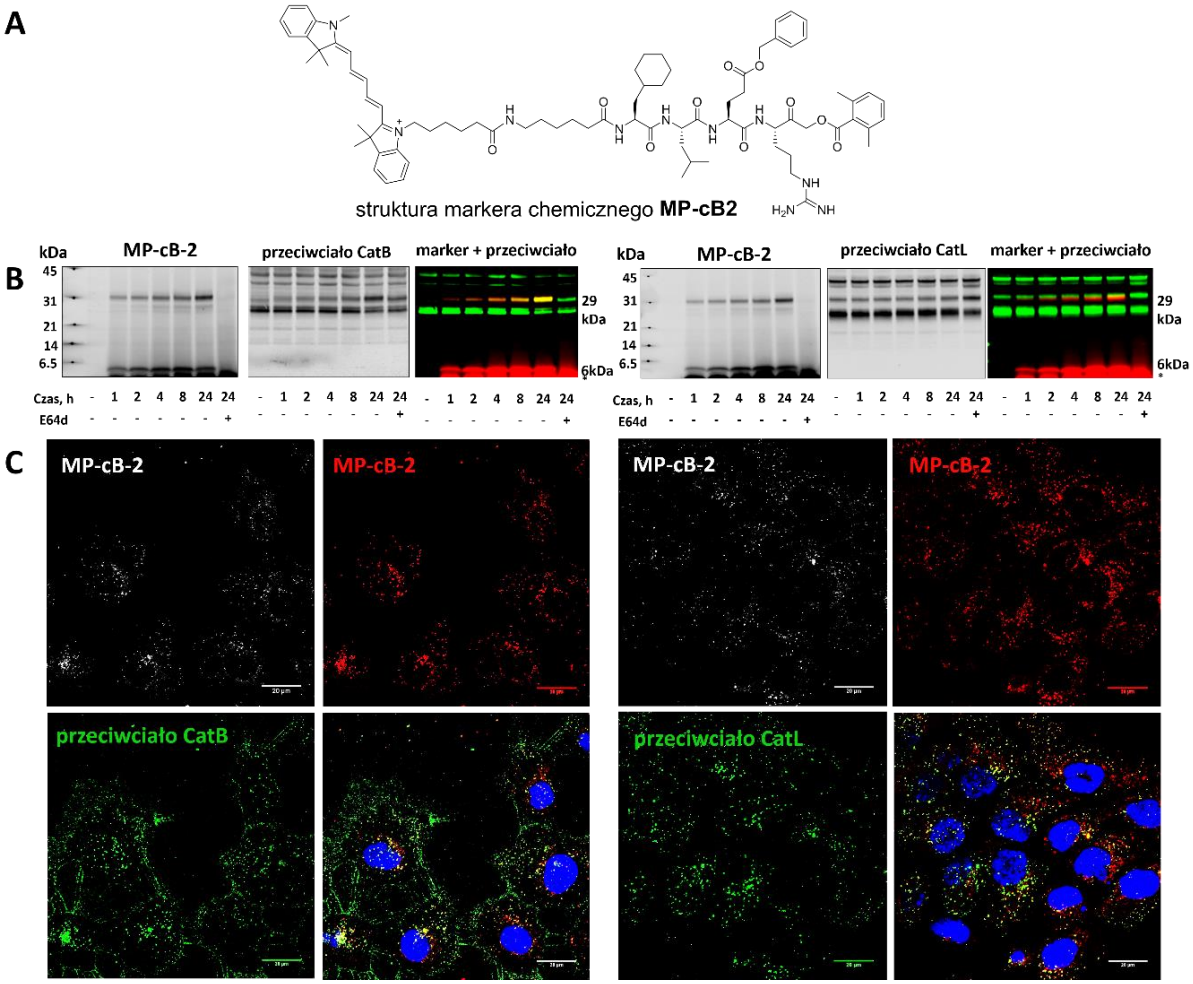
H4. Selektywna wizualizacja aktywności ludzkiej katepsyny B w komórkach (Poręba i współpracownicy, **2019**, *Chemical Science*).

Praca ta opisuje wyniki wizualizacji aktywności katepsyny B uzyskane za pomocą techniki *Western blotting* oraz mikroskopii fluorescencyjnej [40]. Badania chemiczne (określenie specyficzności substratowej, synteza substratów dla katepsyny B i badania kinetyki reakcji enzymatycznych) wykonałem na Politechnice Wrocławskiej (2015). Badania biochemiczne (wyznaczenie parametrów kinetycznych dla markerów), badania komórkowe oraz wizualizację wykonałem w SBP, USA (2016-2018).

Kolejnym enzymem proteolitycznym, dla którego przeprowadziłem próbę wizualizacji za pomocą markera chemicznego była katepsyna B. Podobnie jak katepsyna L, enzym ten należy do cysteinowych katepsyn i jest odpowiedzialny za regulację procesu autofagii, degradację białek czy hydrolizę białek do prezentacji antygenów. Podwyższony poziom katepsyny B został stwierdzony w agresywnych typach nowotworów, co powoduje, że katepsyna B może być markerem prognozowania postępu choroby nowotworowej i rokowań pacjentów dotyczącej odpowiedzi na chemoterapię. Katepsyna B jest najobficiej występującą katepsyną cysteinową w nowotworach, co spowodowało, że enzym ten przez wiele lat znajdował się w centrum badań dotyczących opracowywania nowych leków i metod diagnostycznych [41]. Co ciekawe, wysoka aktywność katepsyny B w komórkach nowotworowych sprawiła, że enzym ten jest wykorzystywany także jako biokatalizator do aktywacji proleków przeciwnowotworowych – najczęściej są to koniugaty przeciwciało–związek cytotoksyczny (ang. *antibody-drug conjugates, ADCs*) [42]. Podobnie jak w przypadku katepsyny L, tak i dla katepsyny B zaprojektowano do tej pory kilka substratów fluorogenicznych i markerów chemicznych. Elementem rozpoznawczym w tych markerach jest najczęściej sekwencja Arg-Arg. Jednak badania pokazały, że ten dipeptyd jest rozpoznawany także przez inne proteazy, włączając w to pozostałe cysteinowe katepsyny oraz proteazy serynowe. Ta krzyżowa reaktywność ma bardzo duże konsekwencje w przypadku badań nowotworów. Wiadomo bowiem, że katepsyna B (podobnie jak wiele proteaz z grupy serynowych) bardzo często występuje w macierzy międzykomórkowej komórek rakowych [43]. Zastosowanie więc substratu czy markera w oparciu o nieselektywną sekwencję Arg-Arg powoduje, że mierzony sygnał nie pochodzi jedynie od katepsyny B, co prowadzi do nieprecyzyjnych wniosków płynących z badań. Łącząc to z faktem, że katepsyna B jest zaangażowana w rozwój praktycznie każdego typu nowotworu, istniała bardzo

duża potrzeba opracowania selektywnego markera do wizualizacji aktywności katepsyny B w komórkach nowotworowych niezależnie od ich rodzaju i pochodzenia. Zadania to stanowiło się kolejny etap w mojej pracy naukowej. Pełną specyficzność substratową katepsyny B, podobnie jak przy poprzednich proteaz, określiłem za pomocą metody HyCoSuL [40]. Wyniki tych badań pozwoliły mi zaprojektować grupę substratów fluorogenicznych dla których wyznaczyłem parametry katalityczne (k_{cat}/K_M, K_M, k_{cat}) względem pięciu katepsyn cysteinowych (B, L, V, S, K). Następnie sekwencje peptydowe z najbardziej selektywnych substratów wykorzystałem do syntezy fluorescencyjnych markerów chemicznych (**MP-cB1**, **MP-cB2** i **MP-cB3**). W markerach tych zastosowałem dwa znaczniki fluorescencyjne: cyjaninę 5 (**MP-cB1** i **MP-cB2**) oraz cyjaninę 7 (**MP-cB3**), tak aby sprawdzić wpływ znacznika na selektywność markera. Pomiary stałych inhibicji drugiego rzędu (k_{obs}/I) oraz testy komeptycyjne powinowactwa chemicznego wykazały, że największą selektywnością względem katepsyny B cechuje się marker **MP-cB2** (Cy5-ahx-Cha-Leu-Glu(Bzl)-Arg-AOMK, gdzie Cha to cykloheksyloalanina, a Glu(Bzl) to ester benzylowy kwasu glutaminokwego) i to on został wybranych do dalszych badań (**rysunek 11A**). Aby udowodnić skuteczność i bardzo szerokie zastosowanie markera **MP-cB2** do selektywnego oznaczania aktywności katepsyny B w różnego rodzaju komórkach, postanowiłem przeprowadzić badania na 18 liniach komórek rakowych: komórki Jurkat T (ostra białaczka szpikowa komórek T), THP-1 (ostra białaczka monocytowa), U266 (szpiczak), K562 (przewlekła białaczka szpikowa), NCI-H226 (płaskonabłonkowy rak płuc), U-937 (chłoniak histiocytarny), MDA-MB-231 (potrójnie negatywny rak gruczołu piersiowego), MCF-7 (rak gruczołu piersiowego), OVCAR-5 oraz SK-OV-3 (rak jajnika), A-431 (rak skóry), PC-3 (rak prostaty), HeLa (rak szyjki macicy), SH-SY5Y (neuroblastoma, szpik kostny), HT-29 oraz HCT-116 (rak jelita grubego), U2-OS oraz SAOS-2 (kostniakomięsak). We wszystkich eksperymentach marker **MP-cB2** (1μM) inkubowałem z żywymi komórkami w różnych przedziałach czasowych. Po zakończeniu inkubacji, wykonałem lizę komórek a następnie przeprowadziłem elektroforetyczny rozdział białek i wykonałem wizualizację kompleksu marker-enzym za pomocą techniki *Western blotting*. We wszystkich przypadkach uzyskałem selektywną detekcję aktywnej katepsyny B (**rysunek 11B**, przykład wizualizacji w komórkach A431). Co więcej, w większości komórek pojawienie się sygnału fluorescencyjnego następowało już po 1-godzinnej inkubacji markera z komórkami. W przypadku komórek pochodzących od białaczki typu T (Jurkat T) oraz chłoniaka histiocytarnego (U-937) sygnał fluorescencyjny był słaby i pojawił się dopiero po 8-godzinnej inkubacji. Wskazuje to na małą aktywność katepsyny B w tych komórkach, co jest w zgodzie w profilem poziomu mRNA katepsyny B w tych liniach komórkowych. Jedyną linią komórkową, w której zauważyłem ślady nieselektywnego oddziaływania markera były komórki THP-1. Komórki te posiadają bardzo wysoką aktywność katepsyny S i właśnie z tym enzymem związał się marker **MP-cB2**. Utworzenie się kompleksu marker-katepsyna B we wszystkich komórkach zostało potwierdzone przeciwciałem katepsyny B. W dalszym etapie sowich badań przeprowadziłem wizualizację katepsyny B za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Do badań wybrałem 6 linii komórkowych i we wszystkich tych liniach potwierdziłem wysoką korelację pomiędzy lokalizacją markera chemicznego **MP-cB2** (czerwony kolor) a lokalizacją przeciwciała katepsyny B (zielony kolor) (**rysunek 11C**, przykład wizualizacji w komórkach A431). Do wszystkich eksperymentów obrazowania aktywności

katepsyny B za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, przeprowadziłem także równoległą wizualizację metodą *Western blotting* by pokazać, że marker **MP-cB2** wiąże się selektywnie tylko do katepsyny B. Podczas swoich badań dokonałem także ciekawego odkrycia dotyczącego lokalizacji katepsyny B w obrębie komórki. Otóż w niektórych typach komórek zaobserwowałem (za pomocą przeciwciał), że katepsyna B znajduje się zarówno w lizosomach jak i w membranie komórki (MDA-MB-231, U2-OS, PC-3). Może mieć to związek z tendencją tych komórek do migracji i przerzutowania, jednak co ciekawe, zastosowanie markera chemicznego **MP-cB2** pokazało, że ta membranowa frakcja katepsyny B może być katalitycznie nieaktywna, gdyż nie nastąpiło związanie się markera do enzymu. Obecnie w swoich badaniach staram się wyjaśnić to zjawisko i znaleźć zależność między aktywnością katepsyny B w lizosomach i membranie, a tendencją komórek do przerzutowania. Ostatnim elementem tych badań, było wykorzystanie markera **MP-cB2** do wizualizacji katepsyny B w komórkach raka płuc pochodzących od pacjenta. Badania te wykonała Katarzyna Groborz. Wyniki tych badań pokazały, że otrzymany marker chemiczny **MP-cB2** jest użyteczny nie tylko w przypadku linii komórkowych, ale znajduje również zastosowanie przy wizualizacji aktywnej katepsyny B w próbkach nowotworowych pobranych od pacjenta.



Rysunek 11 Wizualizacja katepsyny B w komórkach raka skóry A-431. Panel A. Struktura chemiczna markera **MP-cB2** do znakowania aktywnej katepsyny B. Marker składa się z fluorescencyjnego znacznika

(cyjanina 5), elementu rozpoznawczego (peptyd Cha-Leu-Glu(*O*Bzl)-Arg) oraz reaktywnej grupy wiążącej (AOMK). **Panel B.** Wizualizacja katepsyny B w żywych komórkach za pomocą markera **MP-cB2** z wykorzystaniem techniki *Western blotting*. Marker **MP-cB3** wiąże się z katepsyną B już po godzinie inkubacji (6kDa oraz 29kDa). Nawet po 24-godzinnej inkubacji marker nie reaguje z innymi enzymami (m.in. z katepsyną L). Kompleks marker-katepsyna B (czerwony) potwierdzono za pomocą przeciwciała katepsyny B (zielony). **Panel C (lewa strona)**. Wizualizacja katepsyny B w żywych komórkach za pomocą markera **MP-cB2** z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Na zdjęciach widać bardzo dużą kolokalizację między **MP-cB2** (czerwony) a przeciwciałem katepsyny B (zielony). Na niebiesko wybarwiono jądro komórkowe (DAPI). Kolokalizacja sygnałów pomiędzy markerem chemicznym a przeciwciałem (liczona względem markera) wyniosła 94%. **Panel C (prawa strona)** Kolokalizacja katepsyny B (marker **MP-cB2**, czerwony) i katepsyny L (przeciwciało, zielony) w komórkach A431. Pomimo silnej kolokalizacji sygnałów (ponad 70%) w komórkach A431 występują lizosomy, które posiadają katepsynę B i nie posiadają katepsyny L. Rysunek zaadaptowano z publikacji **H4**.

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem marker chemiczny (**MP-cB2**) do selektywnej wizualizacji aktywnej katepsyny B w komórkach rakowych różnego pochodzenia.

2. Dzięki zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej, określiłem lokalizację i aktywność katepsyny B w pojedynczych komórkach.

3. Za pomocą markera wykonano wizualizację aktywnej katepsyny B w komórkach raka płuc pochodzących od pacjenta.

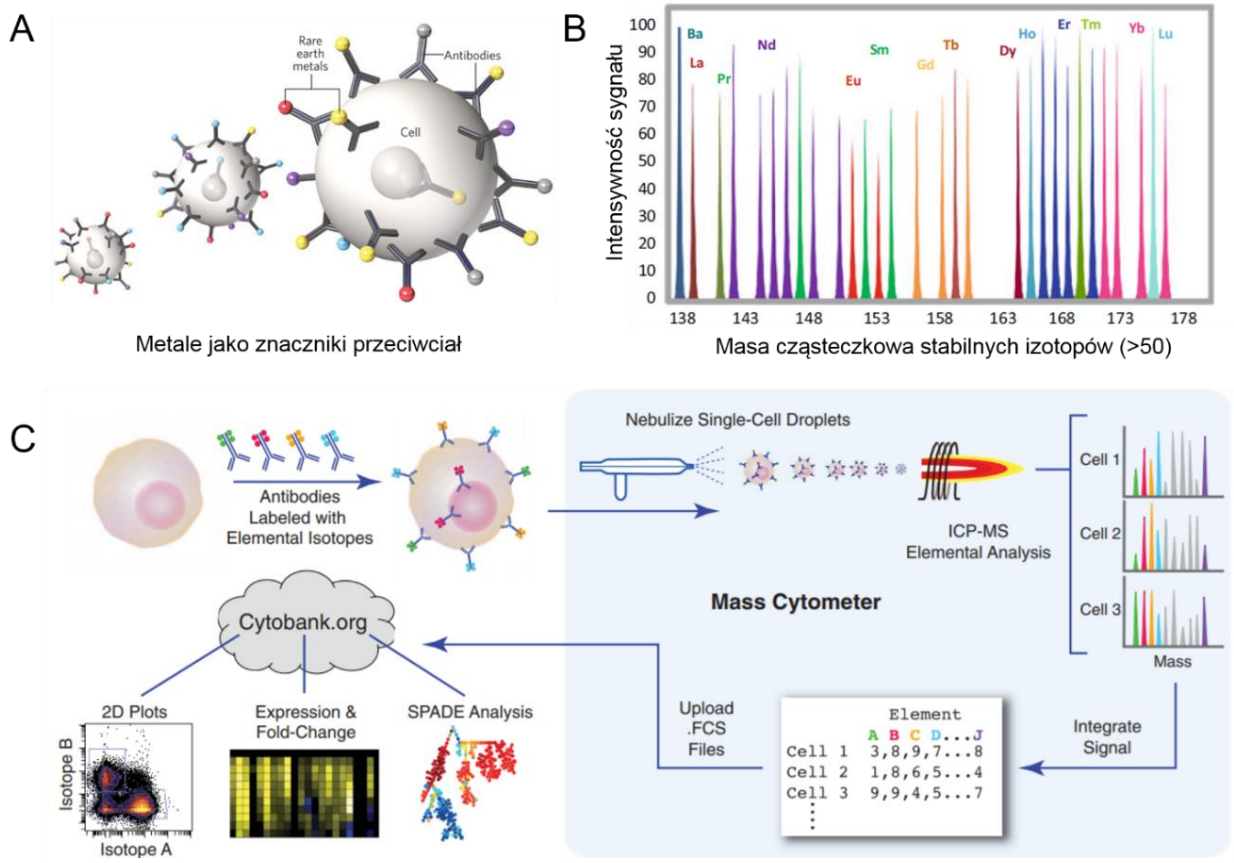
H5. Nowa technologia wizualizacji enzymów proteolitycznych w oparciu o cytometrię masową (Poręba i współpracownicy, **2019**, *bioRxiv*).

Praca ta stanowiła najważniejszy rozdział mojego stażu podoktorskiego w laboratorium prof. Guya Salvesena. Głównym jej tematem jest opracowanie całkowicie nowej technologii do równoległej wizualizacji aktywności enzymów proteolitycznych za pomocą markerów chemicznych znakowanych stabilnymi izotopami metali przejściowych z wykorzystaniem cytometrii masowej [44]. Hipoteza badawcza dotycząca opracowania tej technologii była głównym elementem mojego wniosku grantowego MSCA-GF-2014.

Jak pokazałem w poprzednich swoich pracach (**H2, H3, H4**) biotynylowane i fluorescencyjne markery chemiczne stanowią doskonałe narzędzie do badania aktywności poszczególnych enzymów proteolitycznych w lizatach komórkowych i żywych komórkach. Dzięki temu można określić aktywność enzymatyczną w populacjach komórek (metoda *Western blotting*) lub określić aktywność i dokładną lokalizację enzymów w pojedynczej komórce (mikroskopia fluorescencyjna). Co więcej, dzięki zastosowaniu przeciwciał, można zbadać jaka frakcja danego

enzymu jest katalitycznie aktywna lub wykonać badania korelacyjne z innymi enzymami lub białkami. Niestety zarówno metoda *Western blotting* jak i mikroskopia fluorescencyjna posiadają swoje ograniczenia. Głównym z nich jest brak możliwości detekcji wielu parametrów jednocześnie (m.in. aktywności wielu enzymów). W 2017 Kasperkiewicz i współpracownicy pokazali, że stosując odpowiednie fluorofory do markerów chemicznych można dokonać jednoczesnej wizualizacji 4-5 enzymów proteolitycznych (neutrofilowe proteazy serynowe) [45]. Zastosowanie większej liczby markerów (z innymi fluoroforami) powoduje, że sygnały fluorescencyjne zaczynają się nakładać. Ograniczenia w równoległej analizie enzymów za pomocą fluorescencyjnych markerów chemicznych stanowiły dla nas bardzo silny bodziec do poszukiwania innych technik badawczych, które moglibyśmy wykorzystać do naszych celów. Tą metodą jest cytometria masowa (**rysunek 12**).

Cytometria masowa jest nowoczesną technika analityczną, która łączy w sobie zalety cytometrii przepływowej i spektrometrii mas. Technika ta polega na wykorzystaniu stabilnych izotopów metali przejściowych (głównie lantanowców) jako znaczników dla przeciwciał i sond DNA [46, 47] (**rysunek 12A**). Z uwagi na fakt, że każdy z tych metali (znaczników) ma ściśle określoną masę cząsteczkową, możliwe jest wykorzystanie wielu takich metali podczas jednego eksperymentu, gdyż ich widma masowe się nie nakładają (**rysunek 12B**). Konsekwencją tego jest możliwość równoległego pomiaru ponad 50 parametrów komórkowych (białek, mRNA) na poziomie pojedynczych komórek, co znacząco przewyższa możliwości cytometrii przepływowej, która wykorzystuje znaczniki fluorescencyjne (**rysunek 12C**). W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił gwałtowny rozwój cytometrii masowej zarówno od strony technicznej, jak i jej aplikacji w badaniach nad rozwojem wielu chorób, włączając w to choroby immunologiczne czy choroby nowotworowe. Dzięki cytometrii masowej stało się możliwe dokładne określenie immunofenotypu poszczególnych (pod)typów nowotworów, co przyczyniło się do ich lepszej klasyfikacji i w konsekwencji do doboru optymalnego, spersonalizowanego leczenia [48]. Co więcej, cytometria masowa znajduje obecnie coraz większe zastosowanie w badaniach klinicznych, będąc bardzo użyteczną technologią np. w monitorowaniu postępów leczenia i prognozowaniu skuteczności terapii, a co za tym idzie ma kluczowe znaczenie w szacowaniu czasu przeżywalności pacjentów onkologicznych.



Rysunek 12 Idea cytometrii masowej. Panel A. Cytometria masowa wykorzystuje stabilne izotopy metali przejściowych do znakowania przeciwciał (lub sond DNA). Metale te są dołączone do przeciwciał za pomocą polimerów, które umożliwiają przyłączenie kilkudziesięciu atomów metalu do jednego przeciwciała. **Panel B.** Równoległa detekcja wielu markerów biologicznych (np. białek) jest możliwa, ponieważ każdy izotop posiada indywidualną masę cząsteczkową, dzięki czemu widma masowe izotopów (nawet jeśli różnią się o jedną jednostkę masy atomowej, 1 Da) nie nakładają się na siebie. Obecnie dostępnych komercyjnie jest ponad 50 stabilnych izotopów metali. **Panel C.** Schemat działania cytometrii masowej. Komórki wyznakowane przeciwciałami (z metalami) są kierowane do cytometru masowego, gdzie następuje ich atomizacja w plazmie oraz jonizacja. Następnie dodatnio naładowane jony są kierowane do kwadropulowego analizatora jonów, który identyfikuje jony na podstawie czasu ich przelotu (ang. *Time-Of-Flight analysis, TOF*). Każdy z jonów metali przypisany jest do poszczególnej komórki, dzięki czemu możliwa jest wieloparametryczna analiza markerów biologicznych w obrębie pojedynczych komórek podobnie jak w cytometrii przepływowej (ang. *single cell analysis*). Wyniki, otrzymane w formacie *.fcs*, poddaje się analizie wg wybranych algorytmów w celu wizualizacji wyników przy pomocy wykresów dwu-wymiarowych, analizy SAPDE czy viSNE. W rysunku wykorzystano materiały promocyjne firmy Fluidigm oraz rysunek z publikacji: Bendall i współpracownicy, *Trends in Immunology*, 2012, 33(7), 323-332 [49].

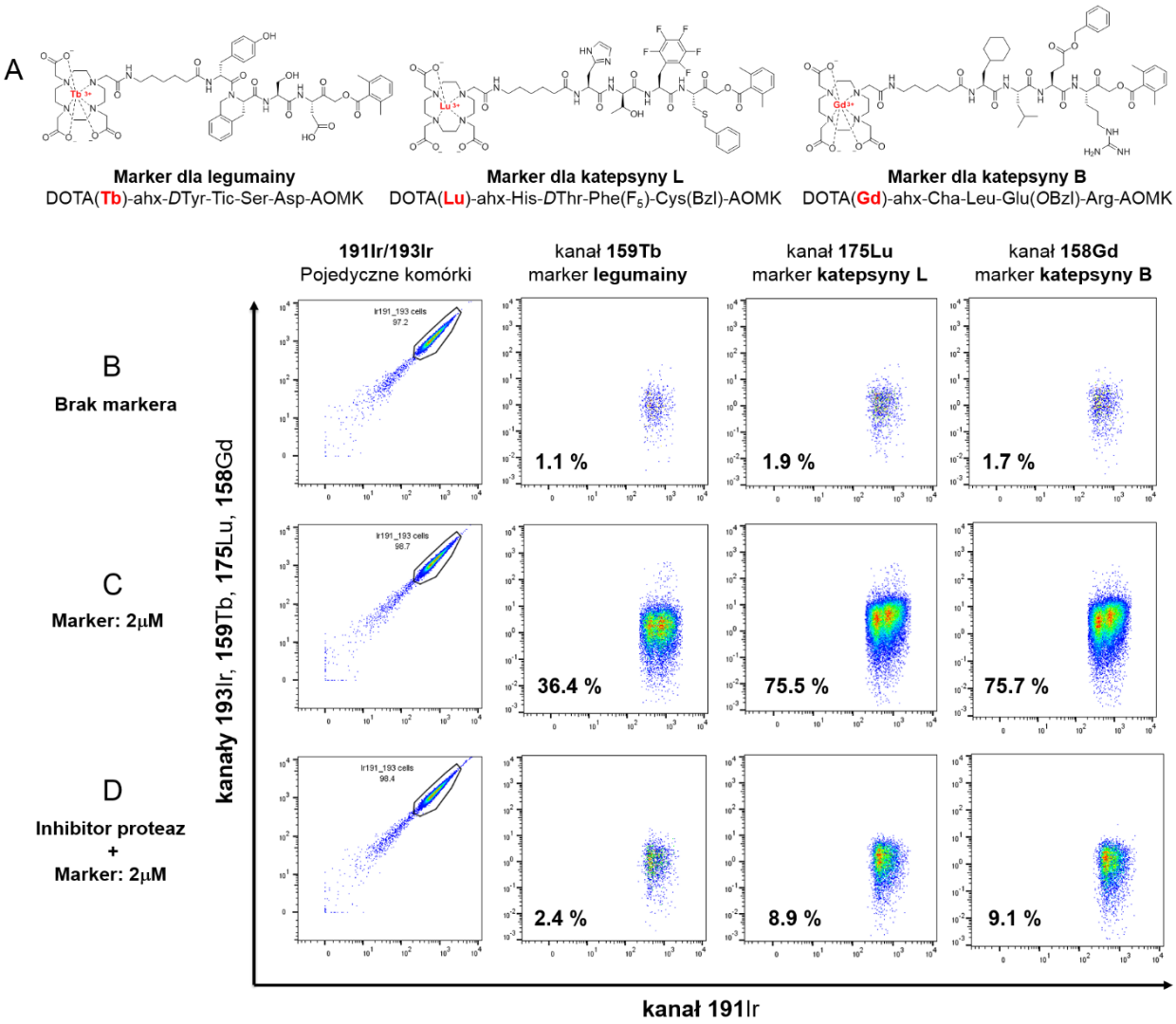
W związku z tym, że cytometria masowa pozwala na wielowymiarową analizę na poziomie pojedynczych komórek, znajduje ona zastosowanie w wielu obszarach nauk o życiu. W moich badaniach postanowiliśmy wykorzystać tę technologię do wizualizacji enzymów. Jednak z uwagi na fakt, że moje badania skupiają się na wizualizacji aktywnych enzymów (aktywomu), stosowanie

przeciwciał z metalami dla proteaz byłoby niewystarczające. Z tego względu podjęliśmy próbę opracowania całkowicie nowej technologii do badania aktywnych enzymów, która odpowiadałaby formatowi cytometrii masowej. W tym celu opracowaliśmy nowy typ markerów chemicznych, które zamiast znaczników fluorescencyjnych posiadają stabilne izotopy wybranych metali. Jako cele molekularne do wizualizacji wybrałem trzy proteazy cysteinowe: legumainę, katepsynę L oraz katepsynę B, gdyż dla tych enzymów opracowałem już selektywne sekwencje peptydowe (elementy rozpoznawcze), które z powodzeniem wykorzystałem w syntezie fluorescencyjnych markerów chemicznych. Jony metali zostały wprowadzone do struktury markerów chemicznych za pomocą tetraxetanu (DOTA), który jest bardzo dobrym środkiem kompleksującym, szczególnie dla jonów lantanowców. Do wyznakowania markerów chemicznych wybrałem terb (^{159}Tb), lutet (^{175}Lu) oraz gadolin (mieszanina izotopów, Gd) (**rysunek 13A**). Kluczowym dla powodzenia projektu było sprawdzenie, czy wymiana fluoroforów na poszczególne metale (skompleksowane za pomocą DOTA) nie wpłynie na właściwości markerów w kontekście ich selektywności oraz zdolności pasywnego transportu do wnętrza komórki. Badania, które przeprowadziłem na rekombinowanych enzymach oraz na dwóch liniach komórkowych (rak piersi MDA-MB-231 oraz rak jelita grubego HCT-116) pokazały, że nowo otrzymane związki zachowują się bardzo podobnie jak ich fluorescencyjne analogi, tj. są selektywne i z łatwością wiążą się do enzymów w żywych komórkach. W następnym etapie badań, wykonałem pierwszą wizualizację aktywności proteaz za pomocą markerów zawierających metal z wykorzystaniem cytometrii masowej (**rysunek 13B, C, D**). W tym celu inkubowałem komórki HCT-116 z markerami w stężeniu 2μM przez 4 godziny. Po tym czasie usunąłem medium hodowlane zawierające marker i przygotowałem komórki do badań na cytometrze masowym (w oparciu o standardowy protokół, który zmodyfikowałem dla celów eksperymentu). Komórki zostały zidentyfikowane za pomocą interkalatorów 191Ir/193Ir, które wiążą się do jądra komórkowego, dzięki czemu możliwe jest wybranie (tzw. bramkowanie, ang. *gating)* tylko pojedynczych komórek do dalszych pomiarów. Wyniki badań pokazały, że komórki HCT-116 cechują się wysokim poziomem aktywnej katepsyny B oraz katepsyny L. Z kolei poziom aktywnej legumainy był znacznie niższy, niż wynikałby to z analizy poziomu ekspresji tego enzymu za pomocą przeciwciał, co potwierdza zasadność stosowania markerów chemicznych do badania enzymów (**rysunek 13C**). Kolejny eksperyment polegał na zahamowaniu aktywności katalitycznej legumainy i katepsyn za pomocą specyficznych inhibitorów, a następnie dodaniu do komórek markerów chemicznych. Analiza cytometryczna pokazała, że sygnał od markerów jest dużo niższy niż w eksperymentach bez inhibitorów, co wskazuje na fakt, że markery selektywnie łączą się z enzymami w żywych komórkach (**rysunek 13D**). Podobne badania przeprowadziłem także na komórkach raka piersi MDA-MB-231 oraz na komórkach ostrej białaczki monocytowej THP-1. Szczególnie ciekawe były wyniki uzyskane na komórkach THP-1. Znalazłem bowiem, że w tych najwyższy poziom aktywności ma katepsyna B, natomiast aktywna legumaina nie występuje prawie wcale. Wyniki te niezależnie potwierdziłem za pomocą fluorescencyjnych markerów chemicznych i techniki Western blotting.

Wyniki moich badań udowodniły, że możliwa jest równoległa i wieloparametryczna analiza aktywności enzymów proteolitycznych za pomocą markerów chemicznych z wykorzystaniem cytometrii masowej. Stwarza to naukowy fundament do wykorzystania tych związków w celu

analizy enzymów i białek w bardziej złożonych układach. W jednym z takich badań (będących częścią publikacji **H5)** wykorzystaliśmy markery znakowane metalami w celu oznaczenia aktywności enzymatycznej legumainy i katepsyn L i B w poszczególnych frakcjach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs*) (badania wykonane przez Katarzynę Groborz). Komórki te cechują się wysoką heterogennością i zawierają m.in. limfocyty B, limfocyty T oraz komórki NK (ang. *Natural Killer Cells*). Dzięki muliparametrowości cytometrii masowej nie było potrzeby izolacji poszczególnych frakcji komórek PBMCs. Zamiast tego całą populację komórek inkubowano z markerami, a następnie przy pomocy przeciwciał znakowanych metalami oznaczyliśmy poszczególne frakcje: CD3 (izotop 154Sm) dla limfocytów T, CD19 (izotop 142Nd) dla limfocytów B oraz CD56 (izotop 176Yb) dla komórek NK. Dzięki temu możliwe było oznaczenie aktywności poszczególnych enzymów w jednym eksperymencie. Najciekawszym wynikiem tego eksperymentu była bardzo duża aktywność katalityczna legumainy w limfocytach typu B, podczas gdy w pozostałych frakcjach ten enzym wykazywał bardzo małą aktywność.

Opracowana technologia otwiera kompletnie nowe możliwości w równoległej analizie aktywności enzymów. Do tej pory najczęściej stosowaną metodą w badaniu enzymów markerami była mikroskopia fluorescencyjna, która pozwala na równoległe monitorowanie jedynie 4-5 enzymów. Dzięki zastosowaniu stabilnych izotopów metali w markerach i wykorzystaniu cytometrii masowej możliwa jest teoretycznie równoległa analiza ponad 50 enzymów, ponieważ obecnie tyle izotopów metali jest komercyjnie dostępnych. Co więcej, w moich badaniach pokazaliśmy, że markery te można stosować razem ze standardowymi przeciwciałami skoniugowanymi z metalami, dzięki czemu możemy dokładnie badań aktywność enzymatyczną w poszczególnych populacjach komórek, a więc zbadać opisany wcześniej aktywom. Uważam, że metoda ta będzie miała bardzo duże zastosowanie np. w enzymatycznych profilowaniu nowotworów, gdzie heterogeniczność próbek jest dużym ograniczeniem w dokładnym określeniu funkcji poszczególnych enzymów w rozwoju tej choroby. Obecnie główny nurt moich badań naukowych koncentruje się na wykorzystaniu markerów i cytometrii masowej do badań nowotworów gruczołu sutkowego u pacjentów. Badania te realizuję w ramach swojego grantu SONATA we współpracy z Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu.



Rysunek 13 Zastosowanie markerów chemicznych do wizualizacji aktywności proteaz w komórkach raka jelita grubego HCT-116 za pomocą cytometrii masowej. **Panel A.** Struktury trzech markerów chemicznych zawierających stabilne izotopy metali dla legumainy, katepsyny L i katepsyny B. **Panele B-D.** Wizualizacja aktywności poszczególnych proteaz w komórkach HCT-116. W każdym eksperymencie wykorzystano dwa interkalatory (191Ir oraz 193Ir) do detekcji jądra komórkowego (pojedyncze komórki). Na osiach y poszczególnych wykresów (tzw. skatergramów) przedstawiono intensywność sygnału kolejno dla jonów 191Ir, 159Tb, 175Lu, oraz 158Gd. Na osiach x przedstawiono intensywność sygnału dla jonów 191Ir. **Panel B.** Przy braku markera chemicznego, sygnał od poszczególnych jonów (Tb, Lu, Gd) jest zaniedbywalnie mały. Detektowane są jedynie pojedyncze atomy metali. **Panel C.** Inkubacja markerów w stężeniu 2μM z żywymi komórkami skutkuje pojawieniem się bardzo dużego sygnału od kompleksu marker-enzym. **Panel D**. Komórki HCT-116 przed dodaniem markera zostały inkubowane z inhibitorem legumainy (MP-L01) lub z inhibitorem cysteinowych katepsyn (E64d) w celu zahamowania aktywności tych enzymów. Następnie został dodany odpowiedni marker zawierający metal. Pojawienie się bardzo słabego sygnału świadczy o fakcie, że markery chemiczne zawierające metale, łączą się tylko z aktywnymi enzymami. Rysunek zaadaptowano z publikacji **H5**.

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem nowy typ markerów chemicznych, zawierających stabilne izotopy metali, do badania aktywności enzymów proteolitycznych w żywych komórkach za pomocą cytometrii masowej. Metoda ta umożliwia jednoczesne badanie aktywności enzymów (markery) oraz poziomu ekspresji wybranych białek (przeciwciała) w próbce.

2. Za pomocą tych markerów zbadałem poziom aktywności legumainy, katepsyny L i katepsyny B w komórkach nowotworowych (rak piersi MDA-MB-231, rak jelita grubego HCT-116, białaczka THP-1). Zbadano również poziom tych enzymów w poszczególnych frakcjach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (*PBMCs*).

3. Opracowanie nowej technologii do równoległej analizy wielu enzymów proteolitycznych w komórkach może mieć ogromne znaczenie przy badaniu aktywomu np. tkanek nowotworowych. Dzięki temu stanie się możliwe określenia dokładnego „odcisku palca" choroby, co wpłynie na lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych prowadzących do jej powstania.

BADANIA WŁASNE (H6-H9)

Wizualizacja kaspaz za pomocą inhibitorów i markerów chemicznych

H6. Selektywne markery chemiczne do wizualizacji aktywacji kaspaz podczas procesu apoptozy (Poręba i współpracownicy, **2018**, *Cell Death and Differentiation*).

Jest to pierwsza z serii moich prac dotyczących wykorzystania inhibitorów i markerów chemicznych do badania roli kaspaz w procesach programowanej śmierci komórki. Dotyczy ona analizy szlaków zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej aktywacji procesu apoptozy [50].

Apoptoza jest naturalnie występującym, ściśle regulowanym procesem, w trakcie którego z organizmu usuwane są uszkodzone lub niefunkcjonalne komórki w celu utrzymania homeostazy [51]. Proces ten jest jednym z typów programowanej śmierci komórki. Włączenie apoptozy jest także pożądanym rezultatem terapii przeciwnowotworowych, zaprojektowanych w celu wyeliminowania komórek rakowych, które charakteryzują się niekontrolowanym podziałem [52]. Proces apoptozy jest koordynowany przez grupę enzymów zwanych kaspazami, które są syntezowane jako nieaktywne zymogeny i są aktywowane na drodze dimeryzacji poprzez selektywną proteolizę lub poprzez wiązanie się do białek adaptorowych (pomocniczymi) tworząc platformy molekularne jak np. platforma DISC (kaspaza 8) czy apoptosom (kaspaza 9) [53]. Ogólnie, kaspazy apoptotyczne klasyfikuje się jako inicjatorowe (kaspazy 8, 9 oraz 10) oraz kaspazy efektorowe (kaspazy 3, 6, 7). Te pierwsze odpowiadają za inicjację procesu apoptozy poprzez aktywację kaspaz efektorowych. Kaspazy efektorowe natomiast, są odpowiedzialne za hydrolizę ściśle określonych substratów, co prowadzi do włączenia procesu apoptozy. Cechami, które

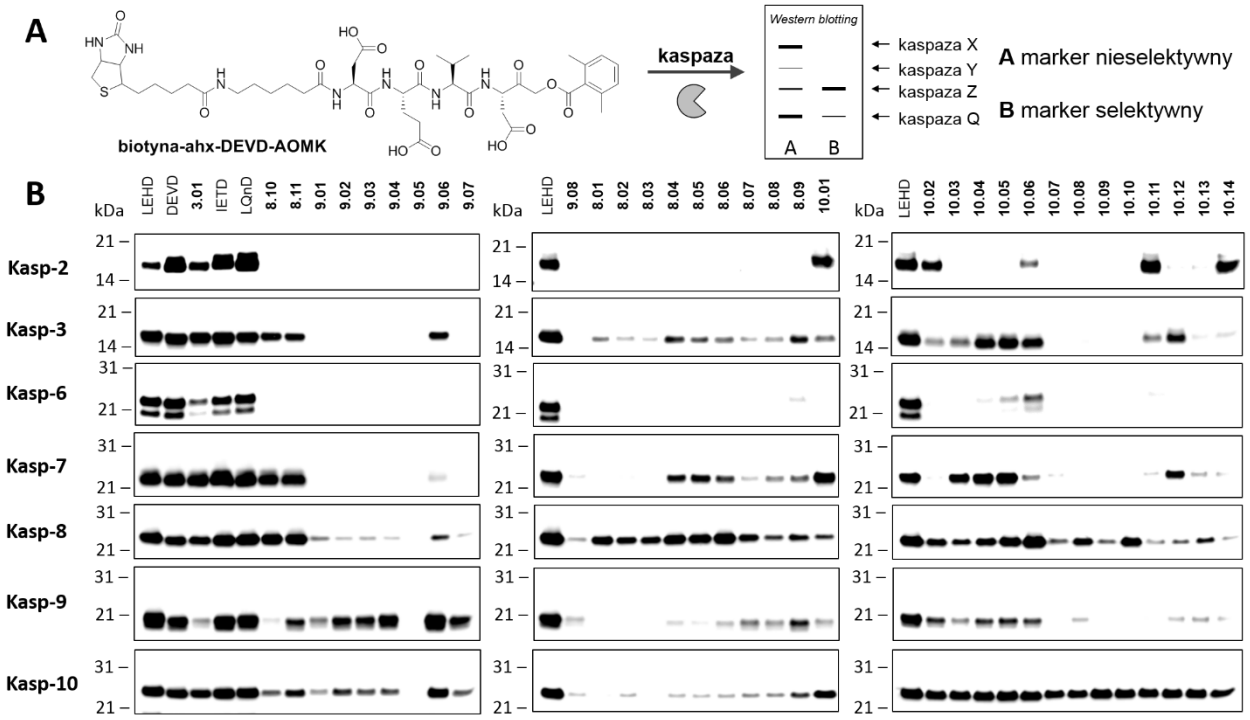
świadczą o apoptozie są m.in. fragmentacja DNA, kondensacja chromatyny, kurczenie się komórki i tworzenie się tzw. ciałek apoptotycznych, które usuwane są z organizmu przez makrofagi, co powoduje że proces apoptozy jest immunologicznie cichy [54]. Przez wiele lat rolę poszczególnych kaspaz w procesie apoptozy badano za pomocą przeciwciał. Było to bardzo wygodne, ponieważ w trakcie aktywacji kaspazy ulegają proteolizie i co za tym idzie, zmieniają swoją masę cząsteczkową, co doskonale można monitorować za pomocą np. techniki Western blotting. **Jednak nie zawsze hydroliza kaspaz oznacza ich aktywację**. Powoduje to, że zasadne staje się wykorzystanie markerów chemicznych do badania tych enzymów.

Badanie ludzkich kaspaz apoptotycznych za pomocą małocząsteczkowych markerów chemicznych jest bardzo trudne. Z trzech powodów. Po pierwsze, konserwatywnie zachowane reszty aminokwasowe budujące centrum katalityczne sprawiają, że enzymy te wykazują nakładającą się specyficzność substratową, co z kolei powoduje, że bardzo trudne staje się odróżnienie tych enzymów za pomocą krótkich sekwencji peptydowych. Po drugie, rekombinowane kaspazy badane w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem soli kosmotropowych[1] posiadają nieco inną aktywność i specyficzność substratową niż kaspazy obecne w komórce. I w końcu po trzecie, pomimo faktu, że w apoptozie bierze udział co najmniej kilka kaspaz, najbardziej aktywną jest kaspaza 3, która swoją aktywnością (i stężeniem) „przysłania" inne kaspazy, uniemożliwiając ich dokładną analizę. W 1997 Thornberry i współpracownicy określili preferencje substratowe ludzkich kaspaz apoptotycznych za pomocą kombinatorycznej biblioteki substratów fluorogenicznych (PS-SCL) w pozycjach P4-P2 [12, 55]. Wyniki te pokazały, że preferowaną sekwencją dla kaspaz 3/7 jest peptyd DEVD, dla kaspazy 6 VEHD, dla kaspazy 8 LETD, dla kaspazy 9 LEHD. W kolejnej publikacji pokazano natomiast, że preferowaną sekwencją dla kaspazy 10 jest AEVD, co uzupełniało pulę substratów dla kaspaz apoptotycznych. W następnych latach na podstawie tych sekwencji tworzono substraty i markery chemiczne służące do „selektywnej" wizualizacji poszczególnych kaspaz. Jednak okazało się, że zarówno substraty jak i markery zawierające te sekwencje wykazują krzyżową reaktywność z kilkoma kaspazami, co znacząco ogranicza ich użyteczność w badaniu procesu apoptozy [56, 57].

Podczas swojej pracy doktorskiej, wykorzystując technologię HyCoSuL, opracowałem nowe substraty fluorogeniczne (zawierające nienaturalne aminokwasy), które były o wiele bardziej selektywne od tych stosowanych komercyjnie [28]. Użyteczność tych substratów potwierdziłem w badaniach *in vtiro* na rekombinowanych, sztucznie aktywowanych kaspazach. W swojej pracy do doktoracie postanowiłem wykorzystać otrzymane sekwencje do syntezy markerów chemicznych, a następnie wykorzystać te markery do wizualizacji kaspaz w komórkach. Wszystkie markery zawierały biotynę jako znacznik oraz grupę reaktywną AOMK, która bardzo łatwo reaguje z centrum katalitycznym kaspaz (**rysunek 14A**). Pomiędzy biotyną i grupa AOMK znajdowała się sekwencja rozpoznawcza składająca się z naturalnych i nienaturalnych aminokwasów. Łącznie zsyntetyzowałem 38 markerów chemicznych: 3 z naturalnymi aminokwasami (LEHD, DEVD,

[1] Sól kosmotropowa to związek, który poprzez stabilizację oddziaływań pomiędzy wodą a białkiem obniża entropię układu. Zastosowanie soli kosmotropowych w wysokim stężeniu (np. 1M cytrynianu sodu), powoduje wymuszoną dimeryzację kaspaz inicjatorowych, co sprawia, że enzymy te stają się aktywne bez udziału białek pomocniczych.

IETD) o szerokiej reaktywności względem kaspaz oraz 35 z naturalnymi i nienaturalnymi aminokwasami o zwiększonej specyficzności względem poszczególnych kaspaz. Badania reaktywności markerów względem poszczególnych kaspaz przeprowadziłem na dwa sposoby. Po pierwsze zmierzyłem stałą inhibicji drugiego rzędu (k_{obs}/I) dla wszystkich markerów względem wszystkich kaspaz apoptotycznych. Po drugie, markery inkubowałem z poszczególnymi kaspazami, a następnie kompleksy marker-enzym wizualizowałem za pomocą techniki *Western blotting* z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanej streptawidyny (**rysunek 14B**). Oba eksperymenty pokazały, że markery zawierające naturalne aminokwasy (LEHD, DEVD, IETD) reagują ze wszystkimi kaspazami przez co są nieselektywne. Natomiast w przypadku markerów z nienaturalnymi aminokwasami okazało się, że niektóre z nich wykazują bardzo dużą selektywność, gdyż wiążą się tylko z jedną kaspazę.



Rysunek 14 Selektywność markerów chemicznych względem kaspaz apoptotycznych. Panel A. Struktura biotynylowanego markera chemicznego dla kaspaz na przykładzie markera biotyna-ahx-DEVD-AOMK dla kaspazy 3. Selektywność markerów był mierzona poprzez ich inkubację z rekombinowanymi kaspazami a następnie wizualizację za pomocą techniki *Western blotting* (biotyna była wizualizowana fluorescencyjną streptawidyną). **Panel B.** Selektywność poszczególnych markerów chemicznych względem siedmiu rekombinowanych kaspaz apoptotycznych. Trzy markery (LEHD, DEVD i IETD) zawierały standardowe sekwencje, pozostałe zaś zawierały naturalne i nienaturalne aminokwasy, co zwiększyło ich selektywność względem poszczególnych kaspaz. Markery z serii 8.01... były projektowane dla kaspazy 8, z serii 9.01.. dla kaspazy 9 i z serii 10.01... dla kaspazy 10. Rysunek zaadaptowano z pracy **H6**.

Wyniki te zachęciły mnie do przeprowadzenia badań komórkowych, w trakcie których inkubowałem markery chemiczne z komórkami ostrej białaczki szpikowej (komórki Jurkat T),

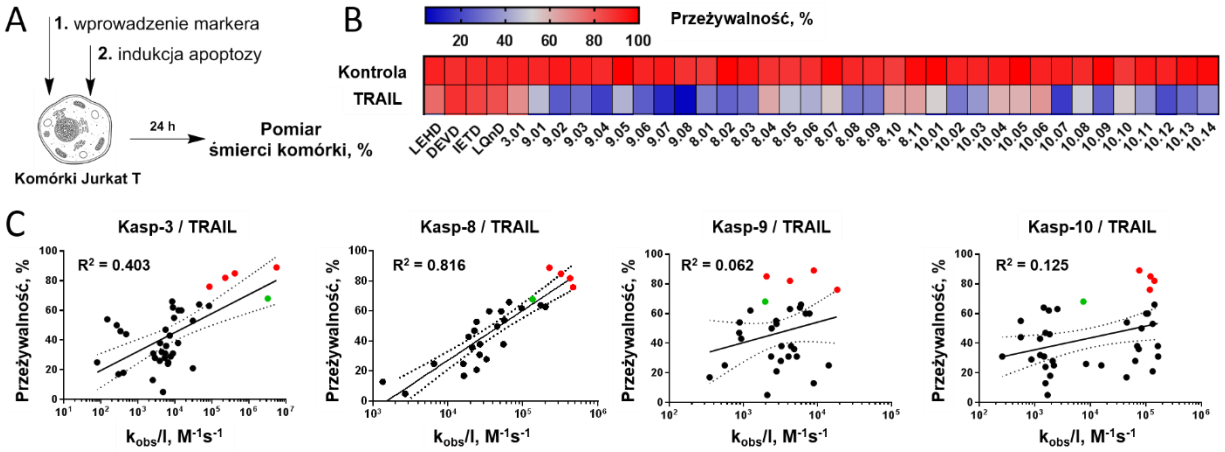
a następnie indukowałem apoptozę za pomocą etopozydu (ścieżka wewnątrzkomórkowa - aktywacja kaspazy 9 i następnie kaspaz 3/7) lub za pomocą białka TRAIL (ścieżka zewnątrzkomórkowa - aktywacja kaspaz 8/10 i następnie kaspaz 3/7). Model komórkowy Jurkat T wybrałem ze względu na bardzo wysoką powtarzalność indukcji apoptozy. Następnie, w wybranych punktach czasowych zrobiłem lizaty z komórek, wykonałem analizę *Western blotting* i inkubowałem membranę z fluorescencyjną streptawidyną w celu wizualizacji kompleksu marker-kaspaza. Niestety wyniki były negatywne. Oprócz kompleksu marker-kaspaza-3 nie udało mi się oznaczyć kompleksu z żadną inną kaspazą (8, 9, 10). Z drugiej strony aktywacja kaspaz 8, 9, 10 musiała zajść, gdyż aktywna była kaspaza 3, a komórki uległy apoptozie. Wyjaśnieniem tej sytuacji może być fakt, że kaspazy inicjatorowe są aktywowane w bardzo niskich stężeniach, co utrudnia ich wizualizację za pomocą techniki Western blotting. Co więcej, po długiej inkubacji markerów z komórkami, większość markerów (nawet tych bardzo selektywnych względem kaspaz 8, 9, 10) reagowała z kaspazą 3 (oraz w mniejszym stopniu z kaspazą 7), co również utrudniało wizualizację innych enzymów. W obliczu tych ograniczeń zaproponowałem inny sposób wizualizacji aktywności poszczególnych kaspaz w komórkach apoptotycznych.

„Wyprawiając się na ryby, Inuici nie wypatrują ryb.
Wypatrują czapli, bo ryb nie sposób zobaczyć.
Ale ptaki polują na ryby tam, gdzie one są.”

Dr Gregory House, Sezon 1

Kaspazy są aktywowane sekwencyjnie. Jedną z głównych kaspaz inicjatorowych jest kaspaza 8, której aktywacja zachodzi na drodze wiązania się prokaspazy z białkami pomocniczymi tworząc wielocząsteczkowy kompleks zwany DISC (ang. *Death-Inducing Signal Complex*) zakotwiczony w membranie od wewnątrz komórki. Aktywacja kaspazy 8 polega na zwiększonym (lokalnie) stężeniu tego enzymu, co prowadzi do jego auto aktywacji. Aktywna kaspaza 8 jest uwalniana do cytozolu, gdzie aktywuje prokaspazę 3. Aktywna kaspaza 3, oprócz tego że włącza apoptozę, aktywuje inne cząsteczki pro-kaspazy 3 prowadząc do amplifikacji sygnału apoptotycznego. Tak więc inhibicja kaspazy 8 powinna prowadzić do inhibicji lub opóźnienia procesu apoptozy. Podobnie z innymi kaspazami. Na tej podstawie zaprojektowałem i wykonałem eksperyment, w którym najpierw wprowadziłem poszczególne markery do komórki, a następnie zainicjowałem proces apoptozy (**rysunek 15A**). Aby mieć pewność, że markery dostały się do wnętrza komórki, zastosowałem proces odwracalnej permabilizacji z wykorzystaniem digitoniny, saponiny steroidowej, która tworzy „dziury” w membranie komórki. Po zakończeniu eksperymentu przeprowadziłem test określający śmiertelność komórek inkubowanych z danym markerem (test kolorymetryczny MTS, który służy do określania (metabolicznie) żywych komórek w danej populacji). Wyniki te skorelowałem ze stałymi inhibicji drugiego rzędu (k_{obs}/I), które wcześniej wyznaczyłem dla rekombinowanych enzymów (**rysunek 15B**). Okazało się, że opóźnienie śmierci komórki jest wprost proporcjonalne do wartości stałych inhibicji markerów względem kaspazy 8,

tzn. najlepsze markery (będące jednocześnie inhibitorami) dla kaspazy 8 powodowały, że jedynie bardzo mała frakcja komórek Jurkat T uległa apoptozie (**rysunek 15C**). Świadczy to o znaczącej roli kaspazy 8 w zewnątrzkomórkowej aktywacji apoptozy za pomocą białka (ligandu) TRAIL. Z drugiej strony korelacja śmierci komórki ze stałymi inhibicji markerów dla kaspazy 10 nie była statystycznie znacząca, co świadczy o małej roli kaspazy 10 w procesie inicjacji apoptozy (**rysunek 15C**). Wyniki te zostały potwierdzone w komórkach Jurkat T pozbawionych kaspazy 8 – w tych komórkach apoptoza praktycznie nie była widoczna. Podobne wyniki otrzymałem podczas badania apoptozy w komórkach raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231, co pokazuje uniwersalność tej technologii. Podsumowując, wobec braku możliwości bezpośredniej detekcji kaspaz, przeprowadziłem pośrednią wizualizację aktywności tych enzymów podczas procesu apoptozy. **W tym przypadku efektem wizualizacji nie była bezpośrednia detekcja kompleksu marker-enzym, ale detekcja konsekwencji jego powstania, czyli np. opóźnienie śmierci komórki.**



Rysunek 15 Pośrednia wizualizacja aktywności kaspaz podczas procesu apoptozy za pomocą zestawu markerów chemicznych. **Panel A.** Markery zostały wprowadzone do komórki na drodze odwracalnej permabilizacji z wykorzystaniem digitoniny. Następnie w komórkach zainicjowano proces apoptozy poprzez dodatnie ligandu TRAIL (zewnątrzkomórkowa ścieżka aktywacji). Po 24 godzinach zmierzono przeżywalność komórek za pomocą testu kolorymetrycznego MTS. **Panel B.** Przeżywalność komórek Jurkat T inkubowanych z poszczególnymi markerami chemicznymi – bez stymulacji komórek (kontrola) oraz po 24-godzinnej stymulacji ligandem TRAIL (TRAIL). Przeżywalność przedstawiono na wykresie typu mapa cieplna. **Panel C.** Korelacja pomiędzy przeżywalnością komórek (%) inkubowanych z poszczególnymi markerami a ich stałymi inhibicji (k_{obs}/I) mierzonymi względem rekombinowanych kaspaz. Wyniki dla kaspazy 8 wskazują bardzo wysoką korelację, co świadczy o jej dużej roli w inicjacji zewnątrzkomórkowego procesu apoptozy za pomocą TRAIL. Czerwone punkty to markery o szerokiej specyficzności substratowej (DEVD, IETD, LEHD, LQnD, gdzi n to norleucyna), zielony punkt to selektywny marker kaspazy 3 i 7 (3.01). Korelacja została przedstawiona jako R^2 – współczynnik korelacji liniowej Pearsona, policzony na podstawie danych wykresów półlogarytmicznych. Rysunek zaadaptowano z pracy **H6**.

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem markery chemiczne o zwiększonej selektywności względem ludzkich kaspaz apoptotycznych, które mogą być wykorzystane do badania procesów programowanej śmierci komórki.

2. Wykorzystujące te markery, udowodniłem dominującą rolę kaspazy 8 w zewnątrzkomórkowej ścieżce indukcji apoptozy w odpowiedzi na stymulację ligandem TRAIL w komórkach Jurkat T oraz MDA-MB-231.

H7. Detekcja aktywności kaspazy 2 w komórkach za pomocą selektywnych inhibitorów (Poręba i współpracownicy, **2019**, *Cell Death and Differentiation*).

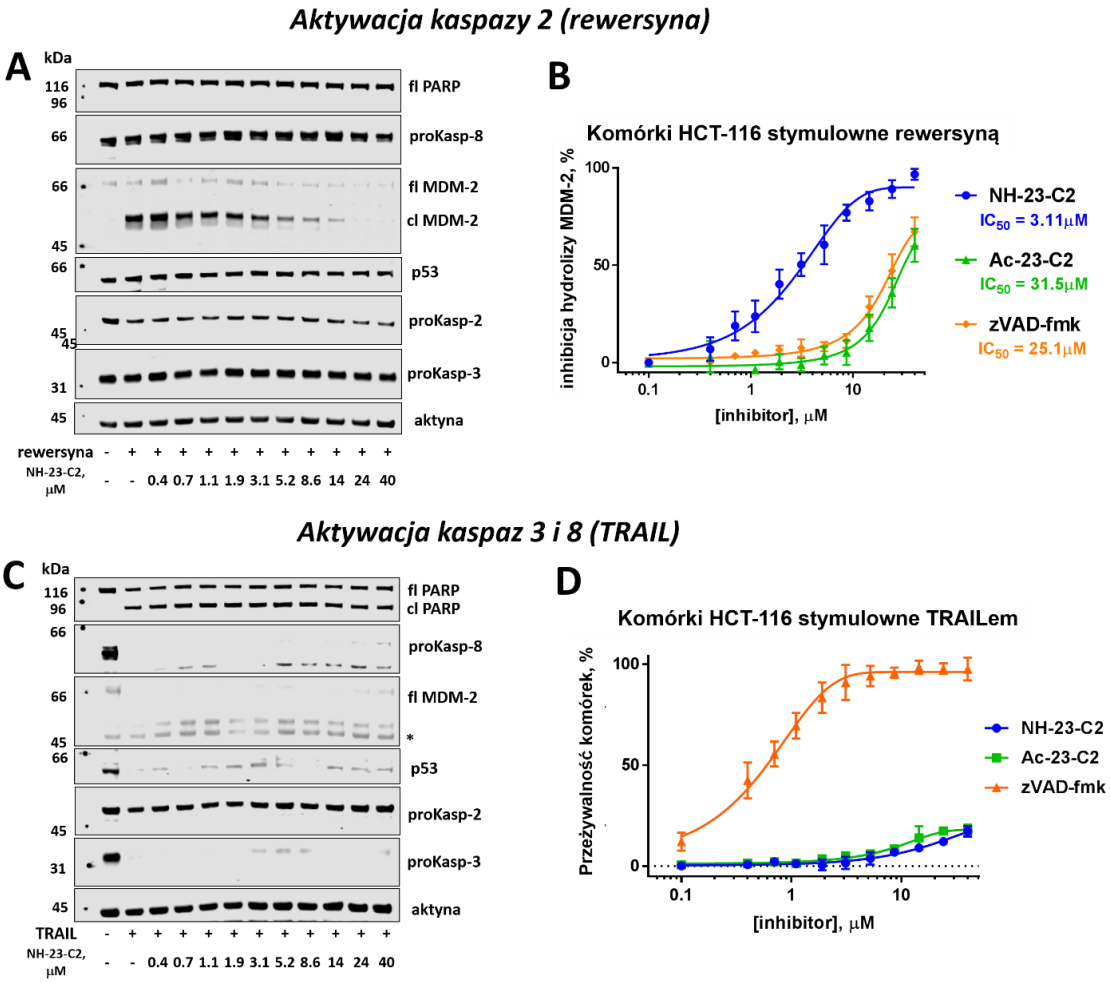
Poprzednie moje badania pokazały, że możliwa jest detekcja aktywnych kaspaz za pomocą markerów, które działają jak inhibitory i nie potrzebują znacznika. Jest to wizualizacja pośrednia, która wymaga jednak analizy pewnych cech, które są następstwem inhibicji poszczególnych kaspaz, jak np. przeżywalność komórek. Podobną strategię wykorzystałem w swojej kolejnej pracy dotyczącej selektywnej detekcji kaspazy 2 za pomocą inhibitora pozbawionego znacznika [58].

Kaspaza 2 wyróżnia się na tle innych kaspaz. Przez wiele lat wokół tej kaspazy narosło wiele kontrowersji i sprzecznych opinii co do jej biologicznej roli. Z jednej strony specyficzność substratowa tego enzymu pokrywa się ze specyficznością substratową kaspaz efektorowych (3 oraz 7), jednak z drugiej strony struktura tego enzymu, posiadającego domenę regulatorową CARD, przybliża go do kaspaz inicjatorowych [59]. Co więcej, kaspaza 2 w odróżnieniu od innych kaspaz posiada ściśle zdefiniowaną kieszeń S5 co sprawia, że znacznie lepiej rozpoznaje substraty pentapeptydowe niż tetrapeptydowe (dla większości kaspaz obecność aminokwasu w pozycji P5 substratu nie ma znaczenia) [60]. Wiadomo także, że w zależności od sytuacji w komórce kaspaza 2 może pełnić rolę inicjatora lub egzekutora procesu apoptozy. Poza tym enzym ten bierze udział w procesach niezwiązanych bezpośrednio ze śmiercią komórki. Podobnie jak inne kaspazy, kaspaza 2 jest aktywowana na drodze dimeryzacji; najczęściej następuje to na drodze tworzenia się kompleksu zwanego PIDDosomem. Enzym ten jest aktywowany w komórce w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego, stres metaboliczny, szok cieplny, uszkodzenie DNA czy senescencję [61]. Trudności w określeniu dokładnej roli kaspazy 2 wynikają między innymi z faktu, że brakuje specyficznych narzędzi chemicznych do wizualizacji aktywności tego enzymu. Większość technik opiera się na stosowaniu przeciwciał, wyciszania/delecji mRNA czy wykorzystując modele mysie z delecją kaspazy 2. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że brak obecności/aktywności kaspazy 2 może być kompensowany przez inne kaspazy, wydaje się bardzo zasadne by opracować metodę do selektywnej wizualizacji tego enzymu. Jednym z najczęściej stosowanych narzędzi chemicznych są substraty oraz inhibitory zawierające w swojej strukturze pentapeptydowy motyw VDVAD, który jest bardzo dobrze rozpoznawany przez kaspazę 2. Jednak tak jak w przypadku innych peptydów, tak i w tym, motyw ten jest nieselektywny, gdyż pokazano że substraty zawierające pentapeptyd VDVAD są bardzo dobrze hydrolizowane przez kaspazę 3, a

inhibitory z tą sekwencją bardzo dobrze hamują aktywność kaspazy 3 oraz kaspazy 8 [57]. W związku z tym podjąłem próbę opracowania nowego markera/inhibitora dla kaspazy 2 i wykorzystania go do wizualizacji tego enzymu. Pracę zacząłem od określenia specyficzności substratowej tego enzymu w pozycjach P4-P2 wykorzystując metodę HyCoSuL. Z uwagi na fakt, że kaspaza 2 ma dobrze zdefiniowaną kieszeń S5, postanowiłem zsyntetyzować pentapeptydową kombinatoryczną bibliotekę substratów fluorogenicznych, za pomocą której określiłem preferencje katalityczne wszystkich apoptotycznych kaspaz (2, 3, 6, 7, 8, 9 oraz 10) w pozycji P5. Dokładna analiza wyników specyficzności poszczególnych kaspaz w pozycjach P5-P2 pozwoliła mi otrzymać sekwencję peptydową, którą wykorzystałem do syntezy inhibitora kaspazy 2 (**NH-23-C2**). Wysoką selektywność tego inhibitora potwierdziłem wykonując pomiary stałych inhibicji drugiego rzędu (k_{obs}/I) oraz badania wiązania się inhibitora do kaspazy za pomocą techniki Western blotting. W związku z tym, że inhibitor nie posiadał znacznika, detekcję kompleksu NH-23-C2-kaspaza przeprowadziłem w następujący sposób: (1) inhibitor inkubowałem z daną kaspazą (w różnym stężeniu inhibitora) przez 30 minut, a następnie (2) resztkową aktywność badanej kaspazy oznaczyłem za pomocą nieselektywnego markera biotyna-LEHD-AOMK, który związał się do każdej kaspazy. Brak sygnału od biotyny (oznaczonej za pomocą fluorescencyjnej streptawidyny) oznaczał inhibicję danej kaspazy. W tym eksperymencie pokazałem, że **NH-23-C2** bardzo dobrze wiąże się do kaspazy 2 i jednocześnie bardzo słabo reaguje z pozostałymi kaspazami.

W kolejnym etapie postanowiłem przeprowadzić badania komórkowe, jednak w związku z brakiem znacznika na inhibitorze **NH-23-C2** musiałem zastosować pośrednią metodę detekcji kaspazy 2. To tego celu wybrałem białko MDM-2 (ang. *murine double minute 2*). MDM-2 jest negatywnym regulatorem białka p53, przez co jest podstawowym czynnikiem hamującym działanie p53. Co więcej, białko MDM-2 jest jednym z bardzo niewielu białek selektywnie hydrolizowanych przez kaspazę 2, a jego hydrolizę można oznaczyć za pomocą przeciwciała wykorzystujące technikę *Western blotting* [62]. Poprzednie badania pokazały, że kaspaza 2 hydrolizuje białko MDM-2 w komórkach raka jelita grubego (HCT-116) w odpowiedzi na stymulację rewersyną. Rewersyna to małocząsteczkowy antagonista receptora adezynowego A3, który działa jak inhibitor kinazy Mps1 powodując nieprawidłową segregację chromosomów. Następstwem tego procesu jest aktywacja kaspazy 2 [63]. Biorąc to pod uwagę, zastosowanie inhibitora kaspazy 2 (**NH-23-C2**) w komórkach poddanych działaniu rewersyny, powinno zahamować aktywność kaspazy 2 i w następstwie zablokować hydrolizę białka MDM-2. W celu zbadania tej hipotezy, inkubowałem komórki HCT-116 z inhibitorem **NH-23-C2** (w różnym stężeniu) a następnie poddałem je działaniu rewersyny. Po 24 godzinach, zebrałem komórki i wykonałem analizę Western blotting przy wykorzystaniu przeciwciał (**rysunek 16A**). Wyniki pokazały, że w odpowiedzi na rewersynę (kontrola bez inhibitora) w komórkach aktywowana została kaspaza 2 (hydroliza MDM-2), natomiast nie zostały aktywowane kaspazy 3 ani 8, gdyż ich proformy (zymogeny) były nadal obecne w komórce (ponadto białko PARP, które jest substratem kaspazy 3 również nie zostało zhydrolizowane). Wraz ze wzrostem stężenia inhibitora **NH-23-C2** sygnał od fragmentu białka MDM-2 zanikał, co oznaczało inhibicję kaspazy 2. W ten sposób potwierdziłem, że rewersyna selektywnie doprowadza do aktywacji kaspazy 2 oraz pokazałem, że inhibitor **NH-23-C2** inhibituje kaspazę 2 w żywych komórkach. Bardzo ważnym elementem tego eksperymentu była także obserwacja, że aktywacja

kaspazy 2 jest bardzo trudna do oceny na podstawie analizy przeciwciałami, gdyż wszystkie prążki dla prokaspazy 2 były podobnej intensywności. Obserwacja ta idealnie pokazuje zasadność poszukiwania innych metod do detekcji aktywności kaspaz. Podobny eksperyment przeprowadziłem także z inhibitorami Ac-23-C2 (acetylowany analog inhibitora NH-23-C2 o słabszym działaniu na kaspazę-2) oraz komercyjnie dostępnym zVADfmk (komercyjny inhibitor kaspaz o szerokiej specyficzności). Oba inhibitory znacznie słabiej inhibitowały kaspazę-2 (**rysunek 16B**). W kolejnym etapie postanowiłem sprawdzić czy inhibitor **NH-23-C2** oddziałuje z innymi kaspazami w komórce. W tym celu aktywowałem kaspazę 3 i 8 poprzez inkubację komórek HCT-116 z ligandem TRAIL (zewnątrzkomórkowa aktywacja apoptozy). Analiza Western blotting pokazała, że kaspazy te ulegają gwałtownej aktywacji (brak prążków pochodzących od proenzymów) oraz że zastosowanie inhibitora **NH-23-C2** w żaden sposób nie wpływa na ich aktywność (**rysunek 16C**). Podobne wyniki uzyskałem dla inhibitora Ac-23-C2. Z kolei inhibitor zVADfmk praktycznie kompletnie zahamował aktywność kaspaz 8 i 3, blokując proces apoptozy (**rysunek 16D**). Dzięki tym eksperymentom pokazałem, że inhibitor **NH-23-C2** nie tylko blokuje aktywność kaspazy 2 w komórce, ale również nie oddziałuje z głównymi kaspazami apoptotycznymi, kaspazą 3 i 8.



Rysunek 16 Wykorzystanie inhibitora NH-23-C2 do selektywnej detekcji kaspazy 2 w komórkach. Panel A. Aktywacja kaspazy i schemat procesowania poszczególnych białek w komórkach HCT-116

stymulowanych rewersyną w obecności różnego stężenia inhibitora **NH-23-C2**. **Panel B.** Wpływ stężenia inhibitora **NH-23-C2** na inhibicję hydrolizy MDM-2. W badaniach zastosowano również inhibitor Ac-23-C2 oraz zVADfmk. **Panel C.** Aktywacja kaspazy i schemat procesowania poszczególnych białek w komórkach HCT-116 stymulowanych TRAIL-em w obecność różnego stężenia inhibitora **NH-23-C2** (fl. oznacza całe białko, ang. *full length*, cl. oznacza fragment białka, ang. *cleaved form*). **Panel D.** Wpływ stężenia inhibitora NH-23-C2, Ac-23-C2 oraz zVADfmk na przeżywalność komórek. Inhibitory **NH-23-C2** oraz Ac-23-C2 nie hamują procesu apoptozy, podczas gdy zVADfmk blokuje apoptozę (=hamuje aktywność kaspaz 3/8) już w submikromolarnych stężeniach. Rysunek zaadaptowano z pracy **H7.**

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem bardzo selektywny inhibitor dla ludzkiej kaspazy 2 (**NH-23-C2**), który następnie wykorzystałem do wizualizacji kaspazy 2 i zbadania jej roli w hydrolizie białka MDM-2 w odpowiedzi na stymulację komórek rakowych rewersyną.

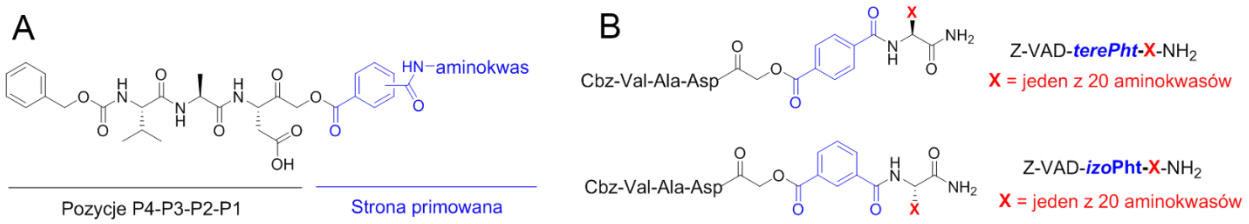
2. Inhibitor NH-23-C2 może być wykorzystany do określenia dokładnej roli kaspazy 2 również w innych procesach komórkowych, np. senescencji czy śmierci komórki wywołanej szokiem cieplnym.

H8. Detekcja aktywności kaspaz podczas procesu nekroptozy za pomocą małocząsteczkowych inhibitorów (Groborz i współpracownicy, **2019**, *Cell Death and Differentiation*).

Apoptoza jest głównym i do tej pory najdokładniej zbadanym procesem programowanej śmierci komórki. Innymi procesami należącymi do tej grupy są pyroptoza i nekroptoza, które także są kontrolowane przez kaspazy. W tej części badań zaproponowałem i opracowałem nową grupę inhibitorów chemicznych dla kaspaz, które następnie wykorzystaliśmy do zbadania roli poszczególnych kaspaz w procesie nekroptozy [64].

Zdecydowana większość badań dotycząca profilowania specyficzności kaspaz koncentruje się na określeniu ich preferencji katalitycznych po nieprimowanej stronie hydrolizowanego wiązania peptydowego (kieszenie: Sn-...-S4-S3-S2-S1) [65]. Ma to oczywiście związek z konstrukcją inhibitorów i markerów chemicznych, które w pozycji P1’ posiadają reaktywną grupę jak np. wspomniane wcześniej epoksydy, halogenometyloketony czy acyloksymetyloketony (AOMK). Z tego względu primowana strona miejsca aktywnego kaspaz (czy w ogóle proteaz) jest bardzo słabo zbadana. Powoduje to, że tracimy połowę oddziaływań związek-enzym, które mogłyby zostać wykorzystane do opracowania selektywnych narzędzi chemicznych w postaci inhibitorów czy markerów chemicznych. W związku z tym postanowiłem zbadań preferencje katalityczne kaspaz po primowanej stronie miejsca aktywnego by sprawdzić, czy możliwe jest wykorzystanie potencjalnych różnic w budowie poszczególnych kaspaz do otrzymania nowych narzędzi

chemicznych. W tym celu wspólnie z Katarzyną Groborz opracowaliśmy strukturę i metodę syntezy nowych inhibitorów kaspaz ze zmiennymi podstawnikami (aminokwasami) w pozycjach primowanych (**rysunek 17**). Jako strukturę wiodącą naszych inhibitorów wybraliśmy motyw Cbz-Val-Ala-Asp (zVAD), ponieważ jest on bardzo często stosowany w konstrukcji ogólnych inhibitorów kaspaz (np. zVAD-fmk) [23] (**rysunek 17A**). Jako grupę wiążące wybraliśmy kwasy *izo*- i *tere*-ftalowe, które następnie przekształciliśmy w odpowiednie acyloksymetyloketony (**rysunek 17B**). Syntezę poszczególnych analogów wykonaliśmy na nośniku stałym, tak aby możliwa była równoległa synteza wielu inhibitorów z różnymi aminokwasami.

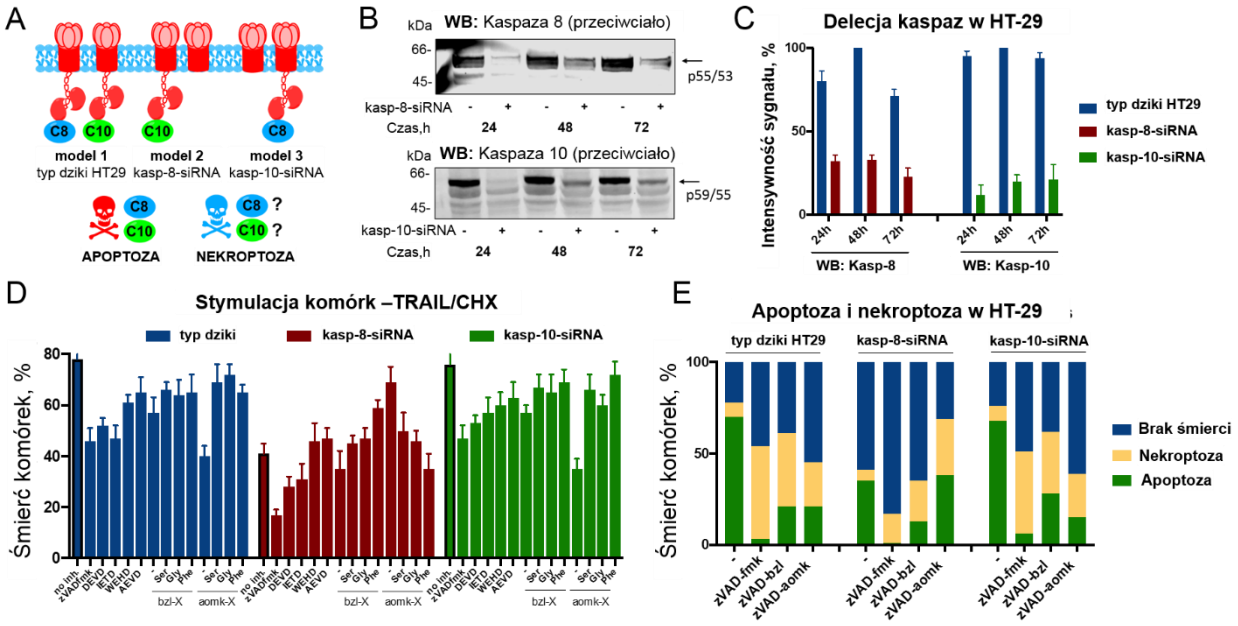


Rysunek 17 Nowa klasa inhibitorów do badania kaspaz. Panel A. Ogólny schemat inhibitorów typu Cbz-Val-Ala-Asp-X do badania primowanej strony miejsca aktywnego kaspaz. W związku z tym, że w strukturze inhibitorów został złamany motyw liniowego łańcucha peptydowego, określenie „pozycje P1'-P2'-P3'-.. zostały zastąpione ogólnym określeniem „strona primowana". **Panel B.** Struktury wiodące dwóch bibliotek inhibitorów kaspaz. Biblioteki te zostały zaprojektowane w oparciu o kwas tereftalowy (górny panel, *tere*Pht) oraz kwas izoftalowy (dolny panel, *izo*Pht). Jako podstawniki po stronie primowanej wykorzystano naturalne aminokwasy. Rysunek zaadaptowano z pracy **H8.**

W następnym kroku przeprowadziliśmy badania kinetyczne z wykorzystaniem tych inhibitorów na dziesięciu kaspazach: mysich kaspazach prozapalnych (1, 11) oraz ludzkich kaspazach prozapalnych (1, 4, 5) i ludzkich kaspazach apoptotycznych (3, 7, 8, 9, 10). W związku z tym, że inhibitory te wykazywały odwracalny typ inhibicji aktywności kaspaz, dla wszystkich tych enzymów wyznaczyliśmy stałą inhibicji Ki (wg równania Morissona [66]). Otrzymane wyniki pokazały, że poszczególne kaspazy mają różne preferencje katalityczne względem badanych inhibitorów, co udowodniło że enzymy te różnią się od siebie pod względem budowy i preferencji primowanej strony miejsca aktywnego. Co więcej, za pomocą tych inhibitorów można odróżnić nawet blisko spokrewnione kaspazy jak kaspazy 1, 4, 5 czy kaspazy 8, 10. Badania kinetyczne przeprowadzone na rekombinowanych kaspazach były bardzo obiecujące, więc postanowiliśmy sprawdzić użyteczność tych inhibitorów w badaniach komórkowych. Jednak w związku z faktem że inhibitory te są odwracalne (co mogłoby ograniczyć ich użyteczność) postanowiliśmy przekształcić najbardziej selektywne inhibitory w analogi wykazujące nieodwracalny typ inhibicji. Jako model komórkowy do dalszych badań wybraliśmy nekroptozę.

Nekroptoza to typ programowanej śmierci komórki, w której główną rolę pełni kaspaza 8 [67]. W najprostszym ujęciu nekroptoza stanowi alternatywę dla apoptozy. W momencie otrzymania tzw. sygnału śmierci, np. poprzez ligand TRAIL, następuje aktywacja kaspazy 8, która aktywuje kaspazę 3, co doprowadza do włączenia apoptozy. Jednak w sytuacji kiedy kaspaza 8 jest zablokowana lub katalitycznie nieaktywna, śmierć komórki zachodzi wg innego mechanizmu. Otóż

w przedstawionej sytuacji, kaspaza 8 łączy się z białkami RIPK1, RIPK3, MLKL oraz FADD tworząc kompleks zwany nekrosomem [68]. Kluczowym dla aktywności tego kompleksu jest fosforylacja kinaz RIP1 i RIP3, która prowadzi do śmierci komórki (nekroptozy) na drodze wyczerpania zapasów ATP i stresu oksydacyjnego. Nekroptozę można zablokować za pomocą związków z grupy nekrostatyn (np. nekrostatyna 1, Nec-1), które hamują aktywność kinaz RIP1 i RIP3. Tak więc przypadku stymulowania komórek np. za pomocą ligandu TRAIL i zablokowaniu apoptozy (zVADfmk) i nekroptozy (Nec-1), komórka nie ulega śmierci. Dominującą rolę w nekroptozie odgrywa kaspaza 8, jednak nieliczne doniesienia literaturowe sugerują, że kaspaza 10 również może brać udział w tym procesie i funkcjonalnie zastąpić kaspazę 8 [69]. W celu sprawdzenia tej hipotezy badawczej, postanowiliśmy zbadać rolę kaspazy 8 i 10 podczas procesu nekroptozy w komórkach raka jelita grubego HT-29. Do tego celu wykorzystaliśmy najbardziej selektywne odwracalne i nieodwracalne inhibitory dla obu kaspaz. Aby uzyskać pełniejszy obraz roli kaspaz w nekroptozie, postanowiliśmy przygotować linie komórkowe z wyciszoną ekspresją kaspazy 8 i kaspazy 10 (**rysunek 18A**). Dokonaliśmy tego za pomocą siRNA dla kaspazy 8 i siRNA dla kaspazy 10. Tak przygotowane trzy modele komórkowe (HT-29 typ dziki, HT-29 kasp-8-siRNA oraz HT-29 kasp-10-siRNA) stanowiły nasz model badawczy (**rysunek 18B,C**). Na początku sprawdziliśmy zdolność poszczególnych inhibitorów do włączania procesu nekroptozy. Aby to zbadać, w poszczególnych typach komórek zainicjowaliśmy apoptozę (TRAIL/CHX, gdzie CHX to cyklodheksymid – inhibitor biosyntezy białek), a następnie dodaliśmy do komórek poszczególnych inhibitorów. Wyniki pokazały, że obraz przeżywalności komórek w komórkach typu dzikiego oraz z wyciszoną ekspresją jest podobny, natomiast w przypadku modelu komórkowego z wyciszona ekspresją kaspazy 8, przeżywalność komórek jest znacząco wyższa (**rysunek 18D**). Wskazuje to na dominującą rolę kaspazy 8 w śmierci komórki, gdyż jest brak powoduje, że zastosowanie inhibitorów nie przełącza apoptozy w nekroptozę. W kolejnym eksperymencie zbadaliśmy dokładnie jaki wpływ na apoptozę i nekroptozę mają poszczególne inhibitory. W tym celu oprócz inkubacji komórek z czynnikami indukującymi apoptozę (TRAIL/CHX) oraz inhibitorami, zastosowaliśmy także inhibitor kinaz RIP1 i RIP3 (nekrostatyna 1, Nec-1). Okazało się, że selektywna inhibicja kaspazy-8 (zVAD-bzl) w komórkach typie dzikim HT-29 przełącza proces apoptozy w nekroptozę, natomiast selektywna inhibicja kaspazy 10 (zVAD-AOMK) powoduje jedynie minimalną zmianę w typie śmierci komórki (**rysunek 18E**). Wyniki te zostały potwierdzone w eksperymentach na pozostałych modelach komórkowych (HT-29 kasp-8-siRNA oraz HT-29 kasp-10-siRNA), co jednoznacznie pokazuje dominującą rolę kaspazy 8 w procesie nekroptozy. Uważam, że ta technologia niesie ze sobą ogromny potencjał badawczy, który może zostać wykorzystany do badania roli poszczególnych kaspaz w innych procesach kontrolowanych przez kaspazy, jak np. apoptoza czy pyroptoza.



Rysunek 18 Badanie roli kaspazy 8 i kaspazy 10 w procesie nekroptozy. Panel A. Schemat trzech modeli komórkowych do badani nekroptozy: model 1 - typ dziki komórek raka jelita grubego HT-29; model 2 - komórki HT-29 z wyciszonym genem kodującym kaspazę 8; model 3 – komórki HT-29 z wyciszonym genem kodującym kaspazę 10. **Panele B, C.** Ekspresja kaspazy 8 i kaspazy 10 w komórkach HT-29 z wyciszonymi genami dla obu tych enzymów; panel B przedstawia ilość prokaspaz za pomocą techniki Western blotting, panel C przedstawia te same dane w postaci wykresów. **Panel D.** Efekt wyciszenia kaspaz 8 i 10 w trzech modelach HT-29 na śmierć komórki (apoptoza + nekroptoza) w zależności od użytego inhibitora. **Panel E**. Pomiar nekroptozy i apoptozy w trzech modelach HT-29. Komórki były inkubowane z inhibitorami oraz z (1. seria) lub bez (2. seria) nekrostatyny-1, a następnie została wyindukowana apoptoza (TRAIL/CHX). Pomiar śmierci komórek (%) został wykonany za pomocą testu MTS. CHX – cykloheksymid (inhibitor biosyntezy białek). Rysunek zaadaptowano z pracy **H8.**

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem nowy typ inhibitorów do selektywnej inhibicji wybranych kaspaz, który opiera się na oddziaływaniach z primowaną stroną miejsca aktywnego kaspaz.

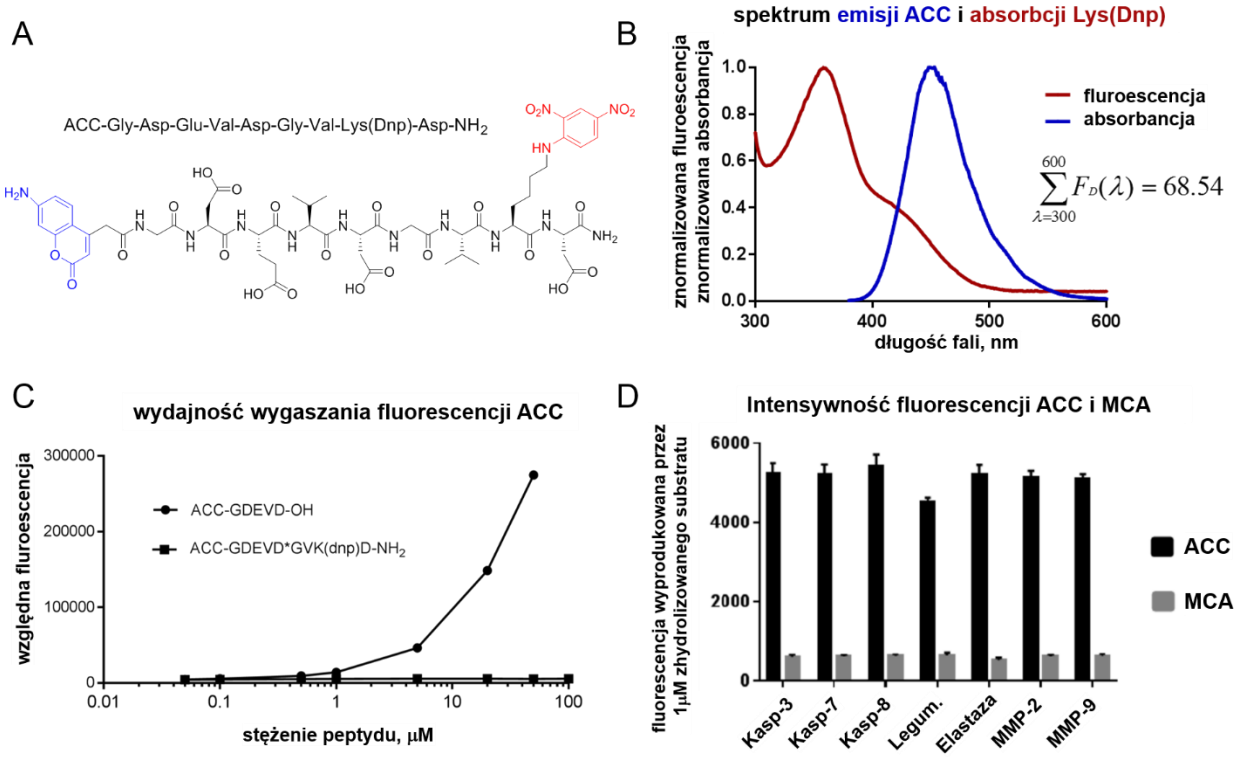
2. Wykorzystano wybrane inhibitory do zbadania roli kaspazy 8 i 10 w procesie nekroptozy w komórkach HT-29. Udowodniono, że kaspaza 8 odgrywa dominującą rolę w tym procesie, podczas gdy kaspaza-10 (nawet w przypadku braku kaspazy 8) nie pełni istotnej roli w nekroptozie, tym samym nie może funkcjonalnie zastąpić tego enzymu.

H9. Nowa para donor-akceptor w substratach wewnętrznie wygaszony (IQF) do czułej detekcji aktywności enzymów proteolitycznych (Poręba i współpracownicy, **2017**, *Scientific Reports*).

W swojej pracy badawczej koncentruję się przede wszystkim na wizualizacji aktywności enzymów proteolitycznych. Zdecydowana część tych badań opiera się na stosowaniu markerów chemicznych, które działają jak inhibitory. Jednak część moich zainteresowań naukowych, z racji tematyki pracy doktorskiej, dotyczy także substratów fluorogenicznych dla proteaz. Technologia HyCoSuL służąca do profilowania specyficzności substratowej proteaz, którą zajmowałem się na doktoracie dotyczy głównie profilowania enzymów w nieprimowanych kieszeniach miejsca aktywnego proteaz (Sn-..-S4-S3-S2-S1), gdyż do kieszeni S1' wiązał się znacznik fluorescencyjny ACC. Enzymy proteolityczne posiadają również tzw. kieszenie primowane (S1'-S2'-S3'-S4'-..-Sn'), które pełnią ważną rolę w wiązaniu substratu i jego hydrolizie. Substraty takie, otrzymywane na drodze syntezy chemicznej, nazywane są często substratami wewnętrznie wygaszonymi (ang. *Internally-Quenched Fluroescence substrates, IQFs*) [70]. Substraty te posiadają znacznik fluorescencyjny (donor) i grupę wygaszającą (akceptor), które są umieszczone po przeciwnych stronach wiązania peptydowego. Rolą akceptora jest wygaszanie sygnału fluorescencyjnego donora, tak długo jak akceptor i donor są w bliskim kontakcie poprzez łańcuch peptydowy. W momencie kiedy enzym hydrolizuje substrat, dystans pomiędzy donorem a akceptorem gwałtownie wzrasta i sygnał fluorescencyjny nie jest już wygaszany. Na tej podstawie mierzona jest kinetyka reakcji enzymatycznej. Zdecydowana większość substratów wewnętrznie wygaszonych na N-końcu posiada grupę MCA (pochodna kumaryny, max. fala emisji 420 nm) jako fluorofor, natomiast na N-końcu posiada grupę 2,4-dinitrofenylową, przyłączoną zazwyczaj do łańcucha bocznego zasadowego aminokwasu, np. lizyny [6]. Para MCA-Lys(Dnp) jest bardzo użyteczna ze względu na jej niska cenę oraz łatwość wprowadzenia jej do struktury substratu peptydowego. Niestety problemem stosowania grupy MCA jest niska czułość substratu, która jest efektem niskiego sygnału fluorescencyjnego emitowanego przez ten fluorofor. Wada ta jest ogromną przeszkodą podczas profilowania specyficzności proteazy używając bibliotek substratów fluorogenicznych składających się z setek czy nawet tysięcy pojedynczych substratów, gdyż wymaga to użycia dużych ilości enzymu, co znacząco podnosi koszty badań.

Szukając rozwiązania tego problemu zaproponowałem aby do substratów wewnętrznie wygaszonych zastosować fluorofor ACC (max. fala emisji 460 nm), a więc dokładnie taki sam, jaki jest stosowany w metodach PS-SCL czy HyCoSuL [71] (**rysunek 19A**). Przeprowadzone przeze mnie badania wstępne pokazały, że fluorescencja znacznika ACC jest bardzo wydajnie wygaszana przez grupę 2,4-dinitrofenylową przyłączoną do łańcucha bocznego lizyny (Lys(Dnp)), co znacząco ułatwiło badania (**rysunek 19B**, **C**). Następnie pokazałem, że intensywność sygnału fluorescencyjnego emitowanego przez ACC jest o ok. 6 razy większa niż w przypadku znacznika MCA. Co ciekawe, różnica ta nie zależy ani od sekwencji peptydowej ani od proteazy użytej do hydrolizy substratu (**rysunek 19D**). W kolejnych etapach badań postanowiliśmy określić dokładne parametry katalityczne substratów z MCA/Lys(Dnp) oraz z ACC/Lys(Dnp) dla kilku enzymów proteolitycznych włączając w to kaspazy, legumainę, elastazę i macierzowe metaloproteazy. Wyniki

tych badań pokazały, że wymiana fluoroforu nie ma dużego wpływu na parametry kinetyczne poszczególnych substratów, jednak ma ogromny wpływ na intensywność tego sygnału i co za tym idzie na czułość samego pomiaru. W kolejnym etapie badań, wykorzystałem parę ACC-Lys(Dnp) do syntezy biblioteki substratów fluorogenicznych i za jej pomocą określiłem specyficzność substratową kaspaz apoptotycznych w pozycji P1'. Okazało się, że wszystkie te enzymy preferują małe reszty aminokwasów, takie jak reszta glicyny, seryny lub alaniny, choć z drugiej strony kaspaza-6 potrafi także hydrolizować substraty zawierające większe reszty aminokwasów jak np. fenyloalanina czy lizyna. Właściwość ta może zostać więc wykorzystana np. do syntezy substratu fluorogenicznego, który byłby selektywnie hydrolizowany przez kaspazę 6. Obecnie substraty wewnętrznie wygaszone zawierające parę ACC-Lys(Dnp) są wykorzystywane w naszym zespole do profilowania specyficzności substratowej wielu medycznie ważnych enzymów włączając w to proteasom czy macierzowe metaloproteazy.



Rysunek 19 Substraty wewnętrznie wygaszone do badania proteaz. Panel A. Struktura substratu typu IQF z parą ACC/Lys(Dnp) do badania aktywności proteolitycznej kaspazy 3. Enzym hydrolizuje substrat pomiędzy resztami Asp (P1) i Gly (P1'), dzięki czemu 2,4-dinitrofenylolizyna (Lys(Dnp)) traci możliwość absorbowania sygnału ACC i następuje wzrost fluorescencji. **Panel B.** Spektrum emisji fluorescencji ACC (przy wzbudzeniu 355nm) oraz spektrum absorpcji Lys(Dnp). Wartość integracji nakładających się spektrów (ang. *Spectra Overlap Intergal*) wynosi ok 69, co oznacza bardzo wydajne wygaszanie sygnału (dla pary MCA/Lys(Dnp) ten parametr ma wartość 67). **Panel C.** Wydajność wygaszania fluorescencji ACC przez Lys(Dnp) zmierzona za pomocą dwóch peptydów: ACC-GDEVD-OH (brak wygaszacza) oraz ACC-GDEVDGVK(Dnp)D-NH2 (zawierająca wygaszacz). **Panel D.** Różnica w emisji fluorescencji przez fluorofor ACC oraz fluorofor MCA. Różnica ta oznacza, że stosowanie substratów zawierających ACC jest ok. 6-razy bardziej czułą metodą niż stosowanie substratów z MCA. Rysunek zaadaptowano z pracy **H9.**

Wnioski dotyczące odkrycia naukowego:

1. Opracowałem nową parę donor-akceptor dla substratów wewnętrznie wygaszonych do zastosowania w badaniu enzymów proteolitycznych

2. Udowodniłem przewagę pary ACC/Lys(Dnp) nad parą MCA/Lys(Dnp) w substratach typu IQF w kontekście intensywności emitowanego sygnału fluorescencyjnego, co znacząco zwiększa czułość pomiaru i obniża ilość potrzebnego enzymu.

H10. Praca przeglądowa dotycząca małocząsteczkowych narzędzi chemicznych do badania kaspaz (Poręba i współpracownicy, **2015**, *Chemical Reviews*).

W związku z tym, że duża cześć mojej pracy podoktorskiej dotyczyła wizualizacji kaspaz w komórkach za pomocą substratów, inhibitorów i markerów chemicznych, przeprowadziłem obszerne badania literaturowe, na podstawie których zaproponowałem zredagowanie publikacji przeglądowej, która zebrałaby możliwie wszystkie badania na temat projektowania, syntezy i wykorzystania narzędzi chemicznych do studiowania kaspaz [65]. Praca ta składa się z trzech głównych rozdziałów: (1) substraty, (2) inhibitory oraz (3) markery chemiczne dla kaspaz; zawiera 53 rysunki, 47 tabel i 441 referencji. Do tej pory jest to najbardziej obszerna publikacja dotycząca małocząsteczkowych narzędzi chemicznych do badania kaspaz.

H11. Praca przeglądowa dotycząca małocząsteczkowych związków do badania legumainy oraz proleków aktywowanych przez ten enzym (Poręba, **2019**, *Biological Chemistry*).

Publikacja ta obejmuje studia literaturowe dotyczące (podobnie jak w pracy **H10**) projektowania, syntezy i wykorzystania małocząsteczkowych narzędzi chemicznych (substraty, inhibitory oraz markery) do wizualizacji i badania funkcji legumainy, asparaginylowej proteazy cysteinowej, którą wyróżnia zdolność do hydrolizy substratów zawierających asparaginę w pozycji P1 substratów [72]. Co więcej, w pracy zawarłem też rozdział dotyczący proleków aktywowanych przez legumainę. Jest to bardzo intensywnie rozwijający się obszar badań, ponieważ legumaina bardzo często jest nadekspresjonowana w nowotworach, więc jej aktywność katalityczną można wykorzystać do selektywnej aktywacji proleków w komórkach nowotworowych. Publikacja ta zawiera 15 rysunków i 110 referencji.

Moja aktywność naukowa, oprócz tej będącej przedmiotem pracy habilitacyjnej, zawiera się w następujących tematach (wszystkie prace z tego rozdziału są opisane w załączniku 4):

Temat 1: Wizualizacja enzymów proteolitycznych za pomocą fluorescencyjnych markerów chemicznych.

Badania zawarte w tym temacie pokrywają się z zakresem moich badań opisanych w dorobku habilitacyjnym, jednak ze względu na mój niewielki wkład nie zdecydowałem się włączyć tych prac do osiągnięcia habilitacyjnego. W pracach tych pełniłem rolę pomocniczą, polegającą głównie na syntezie markerów chemicznych do wizualizacji enzymów proteolitycznych (kaspaza-3 **S1**, legumaina **S2**, **S3**, proteaza MALT-1 **S4**) lub wykonywaniu pojedynczych eksperymentów dotyczących wizualizacji enzymów (proteaza NS2B-NS3 z wirusa ZIKA **S5**). Wyjątkiem jest praca dotycząca wizualizacji aktywności poszczególnych podjednostek katalitycznych proteasomu (**S6**). W tej pracy opracowałem protokół i wykonałem eksperymenty biologiczne dotyczące wizualizacji proteasomu w komórkach rakowych oraz w ludzkich erytrocytach.

Temat 2: Profilowanie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych za pomocą kombinatorycznych bibliotek substratów fluorogenicznych.

Publikacje z tej tematyki stanowią kontynuację mojej pracy doktorskiej, podczas której (wspólnie z dr Pauliną Kasperkiewicz) pod opieką prof. Marcina Drąga zsyntetyzowaliśmy kombinatoryczne biblioteki substratów fluorogenicznych zawierające naturalne i nienaturalne aminokwasy do określania preferencji katalitycznych różnych enzymów proteolitycznych (metoda HyCoSuL). Stworzone przez nas biblioteki były wykorzystane do określenia specyficzności substratowej kilkudziesięciu proteaz, m.in. proteazy NS2B-NS3 z wirusa gorączki Zachodniego Nilu (**S7**), dipeptydylowej aminopeptydazy z *Plasmodium falciparum* (**S8**), prokonwertyny (VII czynnik krzepnięcia) (**S9**), proteazy MALT 1 (**S10**), bakteryjnej proteazy ClpXP z *Listeria monocytogenes* (**S11**), proteaz ClpP z *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (**S12**), neutrofilowej proteazy 4 (NSP4) (**S13**), cysteinowej proteazy autofaginy 2 z *Trypanosoma cruzi* (**S14**) oraz roślinnej proteazy odpowiadającej za śmierć komórki roślinnej (**S15**). Określenie pełnej specyficzności substratowej tych enzymów za pomocą bibliotek zawierających nienaturalne aminokwasy pozwoliło na zaprojektowanie i otrzymanie selektywnych substratów, inhibitorów i markerów chemicznych do badania ich biologicznych funkcji i selektywnej wizualizacji w komórkach i lizatach komórkowych.

W obrębie tej tematyki badawczej brałem również udział w zredagowaniu jednego rozdziału w książce (**S16**, pierwszy autor) i dwóch prac przeglądowych (**S17**, drugi autor i **S18**, czwarty autor). Praca **S16** dotyczyła wykorzystania bibliotek substratów fluorogenicznych do projektowania nowych inhibitorów proteaz mających zastosowanie jako struktury wiodące do opracowywania leków przeciwnowotworowych. Praca **S17** dotyczyła metod chemicznych do poszukiwania nowych substratów, inhibitorów i markerów chemicznych, za pomocą których można rozróżnić proteazy o nakładającej się specyficzności substratowej. Praca **S18** dotyczyła bibliotek kombinatorycznych zawierających nienaturalne aminokwasy do profilowania specyficzności substratowej proteaz.

Temat 3: Badanie udziału kaspaz w procesie pyroptozy, programowanej śmierci komórki wywołującej reakcję zapalną.

Publikacje te stanowią część mojej pracy naukowej dotyczącej badania mechanizmów pyroptozy. Badania zapoczątkowałem podczas stażu podoktorskiego w laboratorium prof. Guya Salvesena i kontynuuję obecnie na Politechnice Wrocławskiej w ramach mojego grantu OPUS z Narodowego Centrum Nauki. W ramach tego tematu opublikowałem dwie prace. Praca **S19** (pierwszy współautor) dotyczyła określenia specyficzności substratowej kaspaz, które biorą udział w procesie pyroptozy. Na tej podstawie zaprojektowałem selektywne substraty, które następnie wykorzystałem do analizy kinetycznej kaspazy-1 i kaspazy-11 (mysie ortologi ludzkich kaspaz). Analiza ta pozwoliła nam lepiej zrozumieć kinetyczną dysproporcje pomiędzy obiema kaspazami w kontekście hydrolizy białek, które są kluczowe dla procesu apoptozy (interleukiny 1-beta, interleukiny 18 i gasderminy D). Druga praca z tej tematyki (**S20**, pierwszy autor) stanowiła komentarz (*preview/perspective*) do pracy Taabazuing i współ. *Cell Chemical Biology* (2017), która opisywała powiązania procesów apoptozy i pyroptozy w makrofagach. Nasz komentarz dotyczył określenia perspektyw dla tego odkrycia w badaniu mechanizmów programowanej śmierci komórki ze szczególnym uwzględnieniem roli enzymów proteolitycznych.

Temat 4: Proleki aktywowane przez enzymy proteolityczne.

Temat ten stanowi bardzo nowy nurt w mojej pracy naukowej. Dotyczy on wykorzystania selektywnych peptydów dla wybranych proteaz do opracowania nowej generacji proleków przeciwnowotworowych, które są aktywowane właśnie za pomocą enzymów proteolitycznych wykazujących nadaktywność katalityczną w obrębie komórek rakowych. Projekt ten realizuję wspólnie z Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu w ramach mojego grantu SONATA z Narodowego Centrum Nauki. Do tej pory opublikowałem jedną pracę z tej tematyki (**S21**), która jest obszerną pracą przeglądową opisującą metody poszukiwania oraz wykorzystanie proleków aktywowanych przez proteazy do leczenia chorób, w tym chorób nowotworowych. W tej pracy zawarłem również swoją hipotezę badawczą, która dotyczy wykorzystania nienaturalnych aminokwasów do projektowania selektywnych linkerów chemicznych do zastosowań w prolekach.

Temat 5: Badanie nowych pochodnych kwasu betulinowego zawierających nienaturalne aminokwasy o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwzapalnym.

Prace te jako jedyne nie są powiązane z enzymami proteolitycznymi. Dotyczą one projektowania i syntezy nowych związków przeciwnowotworowych, będących pochodnymi betuliny. Związki te w swojej strukturze zawierają naturalne i nienaturalne aminokwasy, które zwiększają rozpuszczalność tych związków w wodzie, co znacząco zwiększa ich biodostępność. Do tej pory (wspólnie z naukowcami z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu) opublikowaliśmy trzy prace w tej tematyce oraz jedno zgłoszenie patentowe. W pracy **S22** pokazaliśmy, że pochodne betuliny zawierające nienaturalne aminokwasy bardzo dobrze stymulują syntezę kolagenu w ludzkich fibroblastach. W dwóch pozostałych pracach (**S23** i **S24**) udowodniliśmy, że pochodne betuliny zawierające aminokwasy zasadowe wykazują większą cytotoksyczność względem ludzkich komórek rakowych (czerniak oraz rak płaskonabłonkowy naskórka) niż betulina. Moją rolą w tym projekcie była synteza pochodnych betuliny w multigramowej skali.

---

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

W okresie od stycznia 2016 roku do marca 2018 roku (27 miesięcy) przebywałem (w ramach swojego grantu MSCA-IF-GF) na stażu podoktorskim w Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute (La Jolla, CA, USA) w laboratorium prof. Guya Salvesena. Publikacje będące przedmiotem tej habilitacji (**H1-H9**) są w dużej mierze wynikiem mojego stażu podoktorskiego. We wszystkich tych pracach, posiadam podwójną afiliację (Politechnika Wrocławska oraz SBP Medical Discovery Institute). Ponadto w w trakie pracy w laboratorium prof. Salvesena, odbywałem krótkie staże naukowe w La Jolla Institute of Allergy and Immunology, La Jolla, CA, USA.

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

Osiągnięcia dydaktyczne:

W okresie 2014-2015 (po doktoracie, ale jeszcze przed stażem podoktorskim w USA) byłem opiekunem 12 prac inżynierskim, które dotyczyły badań nad enzymami proteolitycznymi. Po odbyciu stażu podoktorskiego (2016-2018) wróciłem do swojej aktywności dydaktycznej i obecnie jestem promotorem 3 magistratów i 3 inżynierantów, którzy wykonują badania w ramach moich grantów OPUS i SONATA (oba z Narodowego Centrum Nauki).

Moja aktywność dydaktyczna obejmuje także prowadzenie zajęć ze studentami Wydziału Chemicznego na kierunkach Chemia oraz Biotechnologia. Od 2019 roku prowadzę wykład z Chemii Biologicznej, który przejąłem od prof. Marcina Drąga. Samodzielnie natomiast stworzyłem dwa autorskie kursy. Pierwszy z nich to **Chemia Biologiczna Laboratorium.** Kurs składa się z 7 zajęć laboratoryjnych, podczas których studenci uczą się różnych technik obrazowania enzymów w komórkach. **Unikalnym aspektem tego kursu są zajęcia z cytometrii masowej** (aparat Helios, Fluidigm)**.** Jest to bowiem pierwszy i jak dotąd jedyny kurs w Polsce i jeden z niewielu w Europie, na którym studenci uczą się podstaw pracy z cytometrem masowym i jego wykorzystaniem do wieloparametrycznej analizy białek. Drugi z przedmiotów który stworzyłem to **Fluorescence Spectroscopy and Bioimaging** (wykład + laboratorium) na specjalności MONABIPHOT w ramach Europejskich Studiów Magisterskich Erasmus Mundus (EMMC). Wszystkie zajęcia będą prowadzone w języu angielskim. Kurs rozpoczyna się w semestrze letni roku akademickiego 2019/2020 i obejmuje zapoznanie stutendów z takimi technikami badawczymi jak konfokalna mikroskopia fluorescencyjna, cytometria przepływowa oraz cytometria masowa.

Opieka naukowa nad doktorantami:

1. **Wioletta Rut,** okres 2013-2017, tytuł rozprawy doktorskiej: „Zastosowanie naturalnych i nienaturalnych aminokwasów w otrzymywaniu aktywnych i specyficznych markerów dla proteaz cysteinowych i treoninowych". Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej. **Opiekun naukowy**. Promotor: prof. Marcin Drag.

2. **Katarzyna Groborz**, okres 2016-obecnie, tytuł rozprawy doktorskiej: „Wizualizacja enzymów proteolitycznych za pomocą cytometrii masowej". Wydział Chemiczny Politechniki Wroclawskiej. **Promotor pomocniczy.** Promotor: prof. Marcin Drąg.

3. **Natalia Horbach**, okres 2019 – obecnie, tytuł rozprawy (roboczy): „Badanie mechanizmów pyroptozy w komórkach nowotowrowych". Szkoła Doktorska przy Politechnice Wrocławskiej. **Promotor pomocniczy.** Promotor: prof. Marcin Drąg.

Osiągnięcia organizacyjne:

1. 12th Korea-Poland Conference on Organic Chemistry, 2020, Politechnika Wrocławska, Wrocław, funkcja: członek komitetu organizacyjnego.

2. The 10th General Meeting of the International Proteolysis Society, 2015, Banff, Kanada. Funkcja: współorganizator warsztatów: "Practical Enzyme Kinetics"

Osiągniecia popularyzujące naukę:

W latach **2011-2015 oraz** w roku **2019** w ramach kilku edycji **Dolnośląskiego Festiwalu Nauki** przeprowadziłem ponad 40 wykładów popularnonaukowych dla uczniów szkół podstawowych i ponadpodstawowych z cylu: „Co Einstein powiedział swojemu fryzjerowi?" oraz „Co Pan na to, Panie Feynman?". Wykłady odbywały się we Wrocławiu (edycja stacjonarna) oraz w miastach województwa dolnośląskiego (Lubin, Legnica, Dzierżoniów, Jelenia Góra, Zgorzelec, Głogów, Wałbrzych, Kłodzko) podczas edycji regionalnych. Za swój udział i zaangażowanie w tym festiwalu dwukrotnie otrzymałem nagrodę Rektora Politechniki Wrocławskiej.

7. Inne informacje

W 2015 roku jako jedyna osoba z Polski otrzymałem prestiżowe Marie Skłodowska-Curie Global Fellowship na realizację stażu podoktorskiego poza granicami Europy (laboratorium prof.

Guya Salvesena, USA). Od tamtej pory regularnie (razem z Wrocławskim Centrum Transferu Technologii) organizujemy warsztaty z pisania wniosków grantowych. Poza tym udzielam indywidualnych (bezpłatnych) konsultacji z naukowcami, którzy aplikują o te granty. Do tej pory 4 osoby, z którymi pracowałem nad ich wnioskami otrzymały finansowanie.

Lista nagród za działalność naukową:

1. **University of Western Australia Collaboration Award** (wspólnie z prof. Juliana Hamzah), 2019, Uniwersytet Zachodniej Australii. Nagroda za wspólny projekt naukowy dotyczący wizualizacji enzymów proteolitycznych w nowotowrach. Dzięki tej nagrodzie odbyłem 2-miesięczny staż naukowy w laboratorium prof. Hamzah (Harry Perkins Institute, Perth, Australia).

2. **Najlepsza Technolgia do Badania Proteaz**, 2018, FEBS Organization. Nagroda wręczona na międzynarodowej konferencji FEBS Workshop on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portoroz, Słowenia. Przyznana za opracowanie nowej technologii chemicznej do równoległej analizy enzymów proteolitycznych w aktywomie za pomocą cytometrii masowej.

3. **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** dla Wybitnych Młodych Naukowców, 2017, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Stypendium przyznane za całokształt osiągnięć naukowych.

4. **Travel Award (grant konferencyjny),** 2015, The 9th General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS), Penang, Malezja. Grant konferencyjny przyznany przez IPS na podstawie abstraktu wystąpienia.

5. **Nagroda za najlepszą prezentację (jedną z pięciu),** 2015, 32th Winter School on Proteinases and Their Inhibitors; Tiers, Włochy. Nagroda za prezentację dotyczącą wizualizacji katepsyny L za pomocą markerów chemicznych.

6. **Stypendium START**, 2014 oraz 2013, Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej. Stypednium przyznane za osiągnięcia naukowe.

7. **Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego** dla Najlepszych Doktorantów, 2014, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Stypendium przyznane za całokształt osiągnięć naukowych.

8. **Travel Award (grant konferencyjny),** 2013, The 8th General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS), Kapsztad, RPA. Grant konferencyjny przyznany przez IPS na podstawie abstraktu wystąpienia.

9. **Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej,** 2012 oraz 2013 za osiągnięcia naukowe.

LITERATURA DO AUTOREFEATU

1. Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J. & Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic acids research.* **42**, D503-9.
2. Drag, M. & Salvesen, G. S. (2010) Emerging principles in protease-based drug discovery, *Nature reviews Drug discovery.* **9**, 690-701.
3. Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nature reviews Drug discovery.* **5**, 785-99.
4. Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochemical and biophysical research communications.* **27**, 157-62.
5. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database, *Nucleic acids research.* **38**, D227-33.
6. Poreba, M. & Drag, M. (2010) Current strategies for probing substrate specificity of proteases, *Current medicinal chemistry.* **17**, 3968-95.
7. Chen, S., Yim, J. J. & Bogyo, M. (2019) Synthetic and biological approaches to map substrate specificities of proteases, *Biological chemistry.* **401**, 165-182.
8. **Poreba, M.,** Salvesen, G. S. & Drag, M. (2017) Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity, *Nature protocols.* **12**, 2189-2214.
9. Bond, J. S. (2019) Proteases: History, discovery, and roles in health and disease, *The Journal of biological chemistry.* **294**, 1643-1651.
10. Joyce, J. A., Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraudo, E., Tsai, F. Y., Greenbaum, D. C., Hager, J. H., Bogyo, M. & Hanahan, D. (2004) Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis, *Cancer Cell.* **5**, 443-53.
11. Akkari, L., Gocheva, V., Quick, M. L., Kester, J. C., Spencer, A. K., Garfall, A. L., Bowman, R. L. & Joyce, J. A. (2016) Combined deletion of cathepsin protease family members reveals compensatory mechanisms in cancer, *Genes & development.* **30**, 220-32.
12. Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. & Nicholson, D. W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis, *The Journal of biological chemistry.* **272**, 17907-11.
13. Fonovic, M. & Bogyo, M. (2007) Activity based probes for proteases: applications to biomarker discovery, molecular imaging and drug screening, *Current pharmaceutical design.* **13**, 253-61.
14. Fonovic, M. & Bogyo, M. (2008) Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases, *Expert review of proteomics.* **5**, 721-30.
15. Harkness, J., Roper, B. W., Durant, J. A. & Miller, H. (1960) The serum leucine aminopeptidase test: an appraisal of its value in diagnosis of carcinoma of pancreas, *Br Med J.* **1**, 1787-90.
16. Kam, C. M., Abuelyaman, A. S., Li, Z., Hudig, D. & Powers, J. C. (1993) Biotinylated isocoumarins, new inhibitors and reagents for detection, localization, and isolation of serine proteases, *Bioconjugate chemistry.* **4**, 560-7.
17. Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M. & Cravatt, B. F. (2004) Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **101**, 10000-5.
18. Liu, Y., Patricelli, M. P. & Cravatt, B. F. (1999) Activity-based protein profiling: the serine hydrolases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **96**, 14694-9.
19. Sanman, L. E. & Bogyo, M. (2014) Activity-based profiling of proteases, *Annual review of biochemistry.* **83**, 249-73.
20. Garland, M., Yim, J. J. & Bogyo, M. (2016) A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application, *Cell Chem Biol.* **23**, 122-136.
21. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2020) Cancer statistics, 2020, *CA Cancer J Clin.* **70**, 7-30.

22. Pemberton, I. (2016) Activomics, a novel approach to biomarker discovery, in chronic low back pain, *Conference Paper: VIII Simpar 2016, At Rome*. **Fighting Pain 3(2)**, 50-51.
23. Van Noorden, C. J. (2001) The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition, *Acta histochemica.* **103**, 241-51.
24. Kato, D., Boatright, K. M., Berger, A. B., Nazif, T., Blum, G., Ryan, C., Chehade, K. A., Salvesen, G. S. & Bogyo, M. (2005) Activity-based probes that target diverse cysteine protease families, *Nature chemical biology.* **1**, 33-8.
25. Blum, G., von Degenfeld, G., Merchant, M. J., Blau, H. M. & Bogyo, M. (2007) Noninvasive optical imaging of cysteine protease activity using fluorescently quenched activity-based probes, *Nature chemical biology.* **3**, 668-77.
26. Backes, B. J., Harris, J. L., Leonetti, F., Craik, C. S. & Ellman, J. A. (2000) Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin, *Nature biotechnology.* **18**, 187-93.
27. Kasperkiewicz, P., Poreba, M., Snipas, S. J., Parker, H., Winterbourn, C. C., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2014) Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **111**, 2518-23.
28. Poreba, M., Kasperkiewicz, P., Snipas, S. J., Fasci, D., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2014) Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates, *Cell death and differentiation*.
29. Liu, C., Sun, C., Huang, H., Janda, K. & Edgington, T. (2003) Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy, *Cancer research.* **63**, 2957-64.
30. **Poreba, M.**, Solberg, R., Rut, W., Lunde, N. N., Kasperkiewicz, P., Snipas, S. J., Mihelic, M., Turk, D., Turk, B., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2016) Counter Selection Substrate Library Strategy for Developing Specific Protease Substrates and Probes, *Cell Chem Biol.* **23**, 1023-35.
31. Dall, E. & Brandstetter, H. (2016) Structure and function of legumain in health and disease, *Biochimie.* **122**, 126-50.
32. Smith, R., Johansen, H. T., Nilsen, H., Haugen, M. H., Pettersen, S. J., Maelandsmo, G. M., Abrahamson, M. & Solberg, R. (2012) Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M, *Biochimie.* **94**, 2590-9.
33. Lunde, N. N., Haugen, M. H., Bodin Larsen, K. B., Damgaard, I., Pettersen, S. J., Kasem, R., Rut, W., Drag, M., Poreba, M., Johansen, H. T. & Solberg, R. (2017) Glycosylation is important for legumain localization and processing to active forms but not for cystatin E/M inhibitory functions, *Biochimie.* **139**, 27-37.
34. Lunde, N. N., Gregersen, I., Ueland, T., Shetelig, C., Holm, S., Kong, X. Y., Michelsen, A. E., Otterdal, K., Yndestad, A., Broch, K., Gullestad, L., Nyman, T. A., Bendz, B., Eritsland, J., Hoffmann, P., Skagen, K., Goncalves, I., Nilsson, J., Grenegard, M., Poreba, M., Drag, M., Seljeflot, I., Sporsheim, B., Espevik, T., Skjelland, M., Johansen, H. T., Solberg, R., Aukrust, P., Bjorkbacka, H., Andersen, G. O. & Halvorsen, B. (2019) Legumain is upregulated in acute cardiovascular events and associated with improved outcome - potentially related to anti-inflammatory effects on macrophages, *Atherosclerosis*.
35. **Poreba, M.**, Rut, W., Vizovisek, M., Groborz, K., Kasperkiewicz, P., Finlay, D., Vuori, K., Turk, D., Turk, B., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2018) Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes, *Chem Sci.* **9**, 2113-2129.
36. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B. & Turk, D. (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers, *Biochimica et biophysica acta.* **1824**, 68-88.
37. Kramer, L., Turk, D. & Turk, B. (2017) The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management, *Trends in pharmacological sciences.* **38**, 873-898.

38. Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D. C., Lecaille, F., Bogyo, M., Bromme, D., Ellman, J. A. & Craik, C. S. (2006) Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities, *The Journal of biological chemistry*. **281**, 12824-32.
39. Zheng, X., Chu, F., Chou, P. M., Gallati, C., Dier, U., Mirkin, B. L., Mousa, S. A. & Rebbaa, A. (2009) Cathepsin L inhibition suppresses drug resistance in vitro and in vivo: a putative mechanism, *Am J Physiol Cell Physiol.* **296**, C65-74.
40. **Poreba, M.,** Groborz, K., Vizovisek, M., Maruggi, M., Turk, D., Turk, B., Powis, G., Drag, M. & Salvesen, G. S. (2019) Fluorescent probes towards selective cathepsin B detection and visualization in cancer cells and patient samples, *Chem Sci.* **10**, 8461-8477.
41. Aggarwal, N. & Sloane, B. F. (2014) Cathepsin B: multiple roles in cancer, *Proteomics Clin Appl.* **8**, 427-37.
42. Senter, P. D. & Sievers, E. L. (2012) The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma, *Nature biotechnology*. **30**, 631-7.
43. Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Turk, V. & Kos, J. (2003) Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro, *Experimental cell research.* **283**, 206-14.
44. **Poreba, M.,** Groborz, K., Rut, W., Pore, M., Snipas, S. J., Vizovisek, M., Turk, B., Kuhn, P., Drag, M. & Salvesen, G. (2019) The Activome: multiplexed probing of activity of proteolytic enzymes using mass cytometry-compatible activity-based probes (TOF-probes), *BioRxiv*. **Preprint server**.
45. Kasperkiewicz, P., Altman, Y., D'Angelo, M., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2017) Toolbox of Fluorescent Probes for Parallel Imaging Reveals Uneven Location of Serine Proteases in Neutrophils, *Journal of the American Chemical Society*. **139**, 10115-10125.
46. Bandura, D. R., Baranov, V. I., Ornatsky, O. I., Antonov, A., Kinach, R., Lou, X., Pavlov, S., Vorobiev, S., Dick, J. E. & Tanner, S. D. (2009) Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Analytical chemistry*. **81**, 6813-22.
47. Bendall, S. C., Simonds, E. F., Qiu, P., Amir el, A. D., Krutzik, P. O., Finck, R., Bruggner, R. V., Melamed, R., Trejo, A., Ornatsky, O. I., Balderas, R. S., Plevritis, S. K., Sachs, K., Pe'er, D., Tanner, S. D. & Nolan, G. P. (2011) Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum, *Science.* **332**, 687-96.
48. Wagner, J., Rapsomaniki, M. A., Chevrier, S., Anzeneder, T., Langwieder, C., Dykgers, A., Rees, M., Ramaswamy, A., Muenst, S., Soysal, S. D., Jacobs, A., Windhager, J., Silina, K., van den Broek, M., Dedes, K. J., Rodriguez Martinez, M., Weber, W. P. & Bodenmiller, B. (2019) A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer, *Cell.* **177**, 1330-1345 e18.
49. Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M. & Chattopadhyay, P. K. (2012) A deep profiler's guide to cytometry, *Trends Immunol.* **33**, 323-32.
50. **Poreba, M.,** Groborz, K., Navarro, M., Snipas, S. J., Drag, M. & Salvesen, G. S. (2019) Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms, *Cell death and differentiation.* **26**, 229-244.
51. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nature reviews Molecular cell biology*. **9**, 231-41.
52. Reed, J. C. (2002) Apoptosis-based therapies, *Nature reviews Drug discovery.* **1**, 111-21.
53. Denault, J. B. & Salvesen, G. S. (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death, *Chemical reviews.* **102**, 4489-500.
54. Saraste, A. & Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc Res.* **45**, 528-37.
55. Rano, T. A., Timkey, T., Peterson, E. P., Rotonda, J., Nicholson, D. W., Becker, J. W., Chapman, K. T. & Thornberry, N. A. (1997) A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE), *Chemistry & biology*. **4**, 149-55.
56. Berger, A. B., Sexton, K. B. & Bogyo, M. (2006) Commonly used caspase inhibitors designed based on substrate specificity profiles lack selectivity, *Cell research.* **16**, 961-3.

57. McStay, G. P., Salvesen, G. S. & Green, D. R. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways, *Cell death and differentiation.* **15**, 322-31.
58. **Poreba, M.**, Rut, W., Groborz, K., Snipas, S. J., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2019) Potent and selective caspase-2 inhibitor prevents MDM-2 cleavage in reversine-treated colon cancer cells, *Cell death and differentiation.* **26**, 2695-2709.
59. Bouchier-Hayes, L. & Green, D. R. (2012) Caspase-2: the orphan caspase, *Cell death and differentiation.* **19**, 51-7.
60. Schweizer, A., Briand, C. & Grutter, M. G. (2003) Crystal structure of caspase-2, apical initiator of the intrinsic apoptotic pathway, *The Journal of biological chemistry.* **278**, 42441-7.
61. Fava, L. L., Bock, F. J., Geley, S. & Villunger, A. (2012) Caspase-2 at a glance, *J Cell Sci.* **125**, 5911-5.
62. Oliver, T. G., Meylan, E., Chang, G. P., Xue, W., Burke, J. R., Humpton, T. J., Hubbard, D., Bhutkar, A. & Jacks, T. (2011) Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop, *Molecular cell.* **43**, 57-71.
63. Fava, L. L., Schuler, F., Sladky, V., Haschka, M. D., Soratroi, C., Eiterer, L., Demetz, E., Weiss, G., Geley, S., Nigg, E. A. & Villunger, A. (2017) The PIDDosome activates p53 in response to supernumerary centrosomes, *Genes & development.* **31**, 34-45.
64. Groborz, K., Gonzalez Ramirez, M. L., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., Drag, M. & **Poreba, M.** (2020) Exploring the prime site in caspases as a novel chemical strategy for understanding the mechanisms of cell death: a proof of concept study on necroptosis in cancer cells, *Cell death and differentiation.* **27**, 451-465.
65. **Poreba, M.**, Szalek, A., Kasperkiewicz, P., Rut, W., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2015) Small Molecule Active Site Directed Tools for Studying Human Caspases, *Chemical reviews.* **115**, 12546-629.
66. Copeland, R. A. (2000) Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis., *2nd edn New York: Wiley*.
67. Newton, K., Wickliffe, K. E., Dugger, D. L., Maltzman, A., Roose-Girma, M., Dohse, M., Komuves, L., Webster, J. D. & Dixit, V. M. (2019) Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis, *Nature.* **574**, 428-431.
68. Seifert, L. & Miller, G. (2017) Molecular Pathways: The Necrosome-A Target for Cancer Therapy, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* **23**, 1132-1136.
69. Tanzer, M. C., Khan, N., Rickard, J. A., Etemadi, N., Lalaoui, N., Spall, S. K., Hildebrand, J. M., Segal, D., Miasari, M., Chau, D., Wong, W. L., McKinlay, M., Chunduru, S. K., Benetatos, C. A., Condon, S. M., Vince, J. E., Herold, M. J. & Silke, J. (2017) Combination of IAP antagonist and IFNgamma activates novel caspase-10- and RIPK1-dependent cell death pathways, *Cell death and differentiation.* **24**, 481-491.
70. Stennicke, H. R., Renatus, M., Meldal, M. & Salvesen, G. S. (2000) Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8, *The Biochemical journal.* **350 Pt 2**, 563-8.
71. **Poreba, M.**, Szalek, A., Rut, W., Kasperkiewicz, P., Rutkowska-Wlodarczyk, I., Snipas, S. J., Itoh, Y., Turk, D., Turk, B., Overall, C. M., Kaczmarek, L., Salvesen, G. S. & Drag, M. (2017) Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families, *Sci Rep.* **7**, 43135.
72. **Poreba, M.** (2019) Recent advances in the development of legumain-selective chemical probes and peptide prodrugs, *Biological chemistry.* **400**, 1529-1550.

Parametr aktywności naukowej	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	14	33	47
Publikacje nierecenzowane (platforma bioRxiv)	0	1	1
Rozdziały w książkach w języku angielskim	1	1	2
Sumaryczny Impact Factor (zgodnie z rokiem opublikowania)	**72.6**	**209.0**	**281.6**
Liczba punktów MNiSW (lista z 2019 roku)	1760	4180	5940
Liczba cytowań (Web of Science)	110	754	864
Liczba cytowań z wyłączeniem autocytowań (Web of Science)	**82**	**610**	**692**
Indeks Hirscha	7	19	19
Udział w konferencjach krajowych	1	2	3
Udział w konferencjach zagranicznych	14	10	24
Wykłady na zaproszenie (konferencje i seminaria)	2	10	12
Kierowanie międzynarodowymi projektami badawczymi	0	1	1
Kierowanie polskimi projektami badawczymi	4	2	6
Udział w projektach badawczych	2	1	3
Zgłoszenia patentowe (krajowe)	0	1	1
Zgłoszenia patentowe (międzynarodowe)	0	1	1
Nagrody	7	5	12