

## 2. Załącznik do Wniosku

### AUTOREFERAT

---

Przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych, w szczególności  
określonych w art. 16 ust. 2 Ustawy  
z dnia 14 marca 2003 r.

---

**dr Magdalena Wysocka**

Pracownia Chemii Bioorganicznej

Katedra Biochemii Molekularnej

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 30-03-2016

# I. IMIĘ I NAZWISKO:

**Magdalena Wysocka**

# II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCOWOŚCI I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

1. Dyplom doktora nauk chemicznych w zakresie chemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, **2008**.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej w syntezie substratów chromogenicznych wybranych proteinaz.*  
Promotor rozprawy: *prof. dr hab. Krzysztof Rolka*
2. Dyplom magistra chemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, **2003**.  
Tytuł pracy magisterskiej: *Chemiczna synteza fragmentu 91-120 ludzkiego białka prionu.*  
Opiekun pracy: *dr Hanna Miecznikowska*

# III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ ARTYSTYCZNYCH:

1. **2009-obecnie**, adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański.
2. **2008-2009**, asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański.

## IV. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH:

Tabela 1: Wykaz najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych.

Lp.	Wykaz osiągnięć	Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora	Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	Łącznie
1.	Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports (JCR)</i>	5	32	37
2.	Kierownik projektów wewnętrznych Uniwersytetu Gdańskiego	–	4	4
3.	Kierownik projektów zewnętrznych (MNiSW)	–	3	3
4.	Udział w projektach badawczych (wykonawca)	1	3	4
5.	Zgłoszenie patentowe	–	1	1
6.	Autorstwo lub współautorstwo monografii, publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (w tym recenzowane materiały pokonferencyjne)	1	17	18
7.	Liczba cytowań ( <i>bez autocytowań</i> )	17	140	157
8.	<i>Impact factor</i> publikacji	12,44	95,31	107,75
9.	Liczba punktów MNiSW	154	854	1008
10.	Indeks Hirsha	1	10	10

- V** WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O
- STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

*Moim osiągnięciem naukowym, uzyskanym po otrzymaniu stopnia naukowego doktora, stanowiącym istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej chemia, określonym w art. 16 ust. 2. Ustawy, jest jednotematyczny cykl publikacji pt.:*

## PEPTYDY I PEPTYDOMIMETYKI JAKO NARZĘDZIA DO BADANIA ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

*Cykl ten tworzy 12 publikacji naukowych o spójnej tematyce, wyszczególnionych w wykazie zamieszczonym poniżej w punkcie Va. Wszystkie wymienione pozycje znajdują się w bazie Journal Citation Reports (JCR), a ich sumaryczny impact factor wynosi 40,58 (punkty MNiSW 366). Wykaz publikacji przedstawiony jest w porządku chronologicznym, natomiast pełne teksty publikacji oraz oświadczenia współautorów znajdują się w załącznikach.*

### **A) Wykaz publikacji (autor/autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania):**

- H.1.** Wysocka M., Lesner A., Majkowska G., Łęgowska A., Guzow K., Rolka K., Wiczek W., *The new fluorogenic substrates of neutrophil proteinase 3 optimized in prime site region*, Anal. Biochem., 399, 196-201, (2010). [IF 3,24], punkty MNiSW 32
- H.2.** Wysocka M., Lesner A., Guzow K., Kulczycka J., Łęgowska A., Wiczek W., Rolka K., *Highly specific substrates of proteinase 3 containing 3-(2-benzoxazol-5-yl)-L-alanine and their application for detection of this enzyme in human serum*, Anal. Chem., 82, 3883-3889, (2010). [IF 5,87], punkty MNiSW 32
- H.3.** Wysocka M., Spichalska B., Lesner A., Jaros M., Brzozowski K., Łęgowska A., Rolka K., *Substrate specificity and inhibitory study of human airways trypsin-like proteinase*, Bioorg. Med. Chem., 18, 5504-5509, (2010). [IF 2,98], punkty MNiSW 32
- H.4.** Wysocka M., Lesner A., Popow J., Łęgowska M., Rolka K., *Pegylated FRET peptides as substrates of proteolytical enzymes*, Prot. Pept Lett., 19, 1237-44, (2012). [IF 1,99], punkty MNiSW 15
- H.5.** Wysocka M., Lesner A., Gruba N., Korkmaz B., Gauthier F., Kitamatsu M., Łęgowska A., Rolka K., *Three wavelength substrate system of neutrophil serine proteinases*, Anal. Chem., 84, 7241-8, (2012). [IF 5,69], punkty MNiSW 45

- H.6.** Wysocka M., Lesner A., *Future of protease assay*, *Curr Pharm Des.*, 19, 1062-1067, (2013). [IF 3,29], punkty MNiSW 35
- H.7.** Popow-Stellmaszyk J., Wysocka M., Lesner A., Korkmaz B., Rolka K., *A new proteinase 3 substrate with improved selectivity over human neutrophil elastase*, *Anal. Biochem.*, 442, 75-82, (2013). [IF 2,31], punkty MNiSW 30
- H.8.** Wysocka M., Gruba N., Miecznikowska A., Popow-Stellmaszyk J., Gütschow M., Stirnberg M., Furtmann N., Bajorath J., Lesner A., Rolka K., *Substrate specificity of human matriptase-2*, *Biochimie*, 97, 121-127, (2014). [IF 2,96], punkty MNiSW 70
- H.9.** Łęgowska M., Wysocka M., Burster T., Pikuła M., Rolka K., Lesner A., *Ultrasensitive internally quenched substrates of human cathepsin L*, *Anal Biochem.*, 466, 30-37, (2014). [IF 2,22], punkty MNiSW 25
- H.10.** Wysocka M., Wojtysiak A., Okońska M., Gruba N., Jarzab M., Wenta T., Lipińska B., Grzywa R., Sieńczyk M., Rolka K., Lesner A., *Design and synthesis of new substrates of HtrA2 protease*, *Anal Biochem.*, 475, 44-52, (2015). [IF 2,22], punkty MNiSW 25
- H.11.** Gruba N., Wysocka M., Brzezińska M., Dębowski D., Rolka K., Martin N., Lesner A., *Novel internally quenched substrate of the trypsin-like subunit of 20S eukaryotic proteasome*, *Anal Biochem.*, (2015) Aug 24. Pii: S0003-2697(15)00395-4. Doi: 10.1016/j.ab.2015.08.019. [IF 2,22], punkty MNiSW 25
- H.12.** Wysocka M., Gruba N., Grzywa R., Gieldoń A., Bąchor R., Brzozowski K., Sieńczyk M., Jenne D., Szewczuk Z., Rolka K., Lesner A., *PEGylated substrates of NSP4 protease: A tool to study protease specificity*, *Sci. Rep.* 6, 22856; doi: 10.1038/srep22856 (2016). [IF 5,58], punkty MNiSW 40

*Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5.*

**B) Omówienie celu naukowego/ artystycznego ww. pracy/ prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

**PRZEDMOWA.** Zaprezentowany cykl 12 jednotematycznych publikacji naukowych [H.1 – H.12] z zakresu chemii dotyczy projektowania, syntezy i analizy aktywności substratowej wybranych proteinaz: proteinazy 3 (PR3), ludzkiej elastazy neutrofilnej (HNE), ludzkiej trypsynopodobnej proteazy dróg oddechowych (HAT), katepsyny G (CG), matryptazy-2 (MT-2), katepsyny L (Cat L), HtrA2, proteasomu 20S, a także czwartej neutrofilnej proteinazy serynowej (NSP4).

Wyniki prac eksperymentalnych wykonanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora stanowiących podstawę niniejszej pracy, zostały opublikowane w 12 recenzowanych artykułach zamieszczonych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

**WSTĘP.** Enzymy proteolityczne inaczej nazywane proteinazami należą do grupy enzymów hydrolitycznych, których podstawową funkcją jest hydroliza wiązania peptydowego w cząsteczkach substratów takich jak, białka i peptydy [1]. Proteoliza, ponieważ tak określa się wspomniane wyżej zjawisko, zalicza się do kluczowych procesów każdego organizmu. Reakcje katalizowane przez proteinazy zachodzą wraz z powstaniem życia, aż po jego kres. Wśród nich można wymienić proces zapłodnienia, kontroli cyklu komórkowego, różnicowanie tkanek, przekazywanie sygnałów, trawienie białek, wczesną odpowiedź immunologiczną czy apoptozę [2-4]. Enzymy proteolityczne stanowią około 2% całego ludzkiego genomu [5].

Ze względu na mechanizm hydrolizy wiązania peptydowego i budowę aparatu katalitycznego wyróżniamy siedem odmiennych grup – rodzin proteinaz, wśród których możemy wyodrębnić: proteinazy serynowe, cysteinowe, aspartylowe, metaloproteinazy, proteinazy treoninowe i te o wciąż niepoznanym mechanizmie katalitycznym [6]. Pomimo powyższych różnic, każda z tych grup enzymów oddziałuje z cząsteczką substratu w jego miejscu aktywnym (**Rys. 1**). Mechanizm proteolizy składa się z procesu wiązania cząsteczki substratu, jego hydrolizy i uwolnienia powstałych produktów.

W 1967 roku Schechter i Berger zaproponowali nazewnictwo miejsc aktywnych enzymu i oddziałującego z nim substratu, które reszty substratu określa symbolem P, a odpowiadające im reszty enzymu symbolem S [7].

[1]. Neurath H., *Evolution of proteolytic enzymes*, Science, (1984), 224, 350-357.

[2]. Barrett A. J., *Cellular proteolysis. An overview*, Ann N Y Acad Sci., (1992), 674, 1-15.

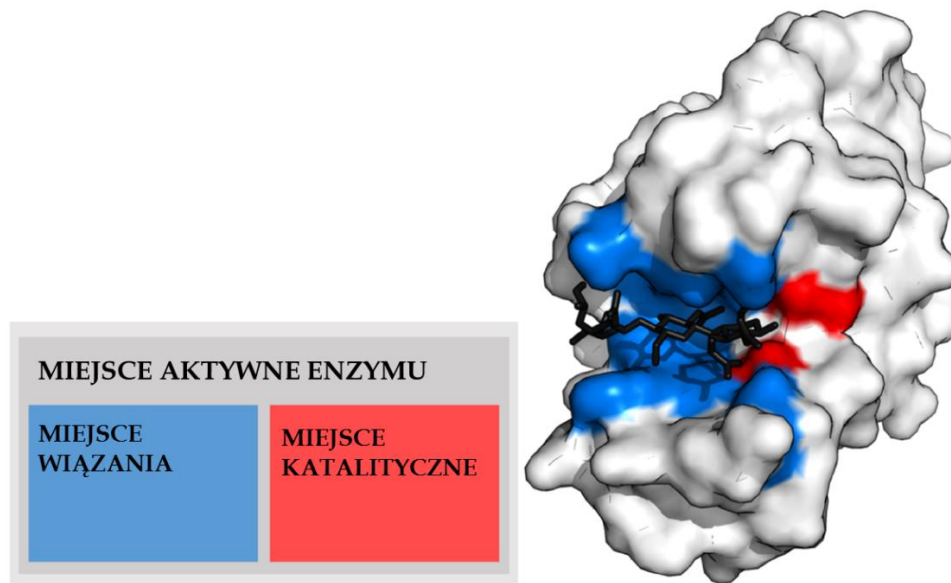
[3]. Wyllie A.H., *Apoptosis: an overview*, Br Med Bull., (1997); 53, 451-465.

[4]. Laflamme B.A., Wolfner M.F., *Identification and function of proteolysis regulators in seminal fluid*, Mol Reprod Dev., (2013), 80, 80-101.

[5]. Puente X.S., Sánchez L.M., Overall C.M., López-Otín C., *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*, Nat Rev Genet., (2003), 4, 544-558.

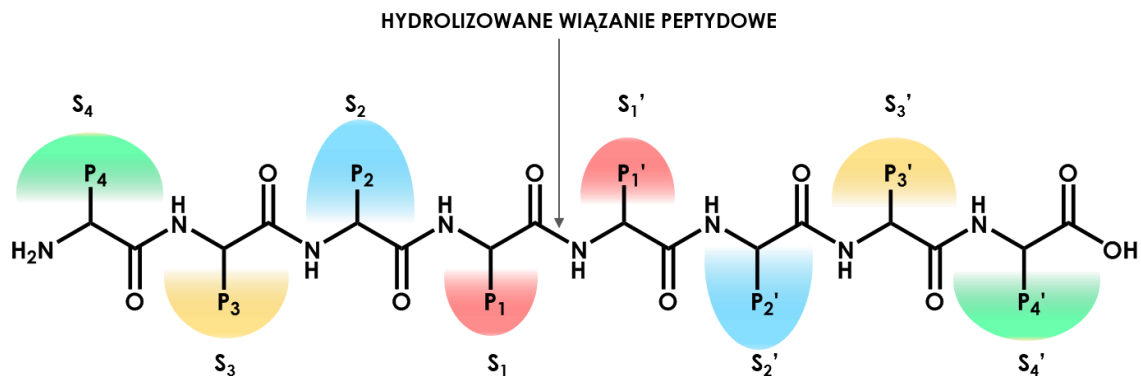
[6]. *Handbook of Proteolytic enzymes*, 3<sup>rd</sup> edition, Editor in Chief: N. D. Rawlings and G. S. Salvensen, Academic Press, 2013, ISBN: 978-0-12-382219-2.

[7]. Schechter I., Berger A., *On the size of the active site of proteases. I. Papain*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1967), 27, 157-162.



RYSUNEK 1: Budowa przestrzenna miejsca aktywnego enzymu.

**Rysunek 2** przedstawia schemat miejsca aktywnego enzymu oddziałującego z substratem. Podczas procesu hydrolizy wiązania peptydowego rozpadowi ulega wiązanie pomiędzy resztami  $P_1$ - $P_1'$ . Kolejne reszty stanowiące fragment  $N$ -końcowy określa się, jako  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ,  $P_n$ . Natomiast te znajdujące się po  $C$ -końcowej stronie hydrolizowanego łańcucha jako  $P_2'$ ,  $P_3'$ ,  $P_4'$ ,  $P_n'$ .



RYSUNEK 2: Nomenklatura oddziaływań enzym-substrat. Rysunek na podstawie [7].

W każdym żywym organizmie proces proteolizy jest ściśle monitorowany zarówno w czasie, jak i przestrzeni. Wśród mechanizmów kontroli możemy wyróżnić kompartmentalizację, obecność inhibitorów, syntezę nieaktywnych proenzymów czy autodegradację proteinaz [8,9]. Jednak na skutek wadliwej, bądź nieefektywnej weryfikacji aktywności jednego lub kilku enzymów może dojść do nadmiernego lub zdelokalizowanego ich działania w wyniku czego dochodzi do zaburzeń homeostazy organizmu. Istnieje wiele doniesień literaturowych łączących nadmierną i niekontrolowaną aktywność enzymów proteolitycznych z procesami chorobowymi (patofizjologicznymi) [10,11]. **Tabela 1** przedstawia wybrane przykłady tego zjawiska.

TABELA 1: Przykłady enzymów proteolitycznych, jako markerów stanów chorobowych.

ENZYM	STAN PATOLOGICZNY	ODNOŚNIK LIT.
KLK3 i inni przedstawiciele kalikrein	nowotwory prostaty i twarzoczaszki	[12-14]
Proteazy wirusowe	zakażenia wirusowe	[15,16]
Proteazy bakteryjne	zakażenia bakteryjne	[17,18]
Moczowy tkankowy aktywator plazminogenu (utPA)	nowotwory	[19,20]
Furyna i pozostałe konwertazy probiałkowe	zakażenia bakteryjne, nowotwór prostaty	[21,22]
Matrypataza-2	nowotwór piersi	[23,24]
HtrA2	nowotwory jajników	[25,26]
Kaspazy	obniżona aktywność markera choroby nowotworowej	[27,28]
Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej	nowotwory	[29,30]
Proteinazy neutrofilne	procesy zapalne, nowotwór płuc	[31-33]
Katepsyny	nowotwory piersi, skóry	[34,35]

- [8]. Turk B., Turk D., Salvesen G.S., *Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators*, *Curr Pharm Des.*, (2002), 8, 1623-1637.
- [9]. Khokha R., Murthy A., Weiss A., *Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity*, *Nat Rev Immunol.*, (2013), 13, 649-665.
- [10]. Strowig T., Henao-Mejia J., Elinav E., Flavell R., *Inflammasomes in health and disease*, *Nature*, (2012), 481, 278-286.
- [11]. Hadler-Olsen E., Fadnes B., Sylte I., Uhlin-Hansen L., Winberg J.O., *Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease*, *FEBS J.*, (2011), 278, 28-45.
- [12]. Pampalakis G., Sotiropoulou G., *Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer*, *Biochim Biophys Acta.*, (2007), 1776, 22-31.
- [13]. Clements J.A., Willemsen N.M., Myers S.A., Dong Y., *The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers*, *Crit Rev Clin Lab Sci.*, (2004), 41, 265-312.
- [14]. LeBeau A.M., Kostova M., Craik C.S., Denmeade S.R., *Prostate-specific antigen: an overlooked candidate for the targeted treatment and selective imaging of prostate cancer*, *Biol Chem.*, (2010) 391, 333-43.
- [15]. Lee S.K., Potempa M., Swanson R., *The choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly*, *J Biol Chem.*, (2012), 287, 40867-40874.
- [16]. Polacek C., Gullberg M., Li J., Belsham G.J., *Low levels of foot-and-mouth disease virus 3C protease expression are required to achieve optimal capsid protein expression and processing in mammalian cells*, *J Gen Virol.*, (2013), 94, 1249-1258.
- [17]. Broz P., Monack D.M., *Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections*, *Immunol Rev.*, (2011), 243, 174-190.
- [18]. Caulfield A.J., Walker M.E., Gielda L.M., Latham W.W., *The Pla protease of Yersinia pestis degrades fas ligand to manipulate host cell death and inflammation*, *Cell Host Microbe.*, (2014), 15, 424-434.
- [19]. Nielsen V.G., Matika R.W., Ley M.L., Waer A.L., Gharagozloo F., Kim S., Nfonsam V.N., Ong E.S., Jie T., Warneke J.A., Steinbrenner E.B., *Tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis is enhanced in patients with breast, lung, pancreas and colon cancer*, *Blood Coagul Fibrinolysis.*, (2014), 25, 248-253.
- [20]. McMahon B., Kwaan H.C., *The plasminogen activator system and cancer*, *Pathophysiol Haemost Thromb.*, (2008), 36, 184-94.
- [21]. Yao Z., Sun B., Hong Q., Yan J., Mu D., Li J., Sheng H., Guo H., *PACE4 regulates apoptosis in human prostate cancer cells via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial signaling pathways*, *Drug Des Devel Ther.*, (2015), 9, 5911-5923.
- [22]. Couture F., D'Anjou F., Desjardins R., Boudreau F., Day R., *Role of proprotein convertases in prostate cancer progression*, *Neoplasia*, (2012), 14, 1032-1042.
- [23]. Wang C.Y., Meynard D., Lin H.Y., *The role of TMPRSS6/matriptase-2 in iron regulation and anemia*, *Front Pharmacol.*, (2014), 5, 1-6.
- [24]. Sanders A.J., Webb S.L., Parr C., Mason M.D., Jiang W.G., *The type II transmembrane serine protease, matriptase-2: Possible links to cancer?*, *Anticancer Agents Med Chem.*, (2010), 10, 64-69.
- [25]. Xu Z., Chen Y., Xu G., Peng C., Liu E., Li Y., Niu J., Li C., *Omi/HtrA2 pro-apoptotic marker differs in various hepatocellular carcinoma cell lines owing to pcd/pea-15 expression level*, *Oncol Rep.*, (2015), 905-912.
- [26]. Li S., Wan M., Cao X., Ren Y., *Expression of AIF and HtrA2/Omi in small lymphocytic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma*, *Arch Pathol Lab Med.*, (2011), 135, 903-908.
- [27]. Olsson M., Zhivotovsky B., *Caspases and cancer*, *Cell Death Differ.*, (2011), 18, 1441-1449.
- [28]. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S., *Old, new and emerging functions of caspases*, *Cell Death Differ.*, (2015), 22, 526-39.
- [29]. Deryugina E.L., Quigley J.P., *Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature*, *Matrix Biol.*, (2015), 44-46, 94-112.
- [30]. Houghton A.M., *Matrix metalloproteinases in destructive lung disease*, *Matrix Biol.*, (2015), 44-46, 167-174.
- [31]. Heutinck K.M., ten Berge I.J., Hack C.E., Hamann J., Rowshani A.T., *Serine proteases of the human immune system in health and disease*, *Mol Immunol.*, (2010), 47, 1943-1955.
- [32]. Gregory A.D., Kliment C.R., Metz H.E., Kim K.H., Kargl J., Agostini B.A., Crum L.T., Oczypok E.A., Oury T.A., Houghton A.M., *Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis*, *J Leukoc Biol.*, (2015), 98, 143-52.
- [33]. Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L., *Neutrophil extracellular traps in cancer progression*, *Cell Mol Life Sci.*, (2014), 71, 4179-4194.
- [34]. Löser R., Pietzsch J., *Cysteine cathepsins: their role in tumor progression and recent trends in the development of imaging probes*, *Front Chem.*, (2015), Jun 23;3:37. doi: 10.3389/fchem.2015.00037. eCollection 2015.
- [35]. Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers*, *Biochim Biophys Acta.*, (2012), 1824, 68-88.



Skoro więc niepożądana aktywność proteolityczna może prowadzić do stanów patologicznych, a nawet śmierci organizmu, to detekcja aktywnego enzymu proteolitycznego może stanowić element diagnostyki takich zaburzeń w organizmie.

Do tej pory opracowano wiele metod ułatwiających określanie aktywności enzymów proteolitycznych. W **tabeli 2** przedstawiłam wybrane z nich [36-42].

**TABELA 2:** Wybrane metody oznaczania aktywności proteolitycznej.

METODA	PRZYKŁADY OZNACZEŃ	ODNOŚNIK LIT.
substraty chromogeniczne	enzymy krzepnięcia krwi	[36]
substraty fluorescencyjne	kaspazy	[37]
substraty luminescencyjne	panel proteinaz	[38]
powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR)	kaspaza 3	[39]
elektrochemiczne	kaspaza 3	[40]
test immunoenzymatyczny (ELISA)	enzym konwertujący TNF (czynnik martwicy nowotworu)	[41]
sondy molekularne	panel proteinaz	[42]

W obszarze moich zainteresowań znalazły się peptydy znakowane ugrupowaniami fluorescencyjnymi, których hydroliza katalizowana przez określony enzym proteolityczny prowadzi do rozpadu takiego peptydomimetyku (substratu), a w konsekwencji do wzrostu fluorescencji układu. Jedną z cech, którą związek taki powinien posiadać, jest oprócz wysokiego stopnia powinowactwa do określonego (oznaczanego) enzymu, czy też znaczącej szybkości hydrolizy, jego selektywność czyli podatność na proteolizę tylko przez wybrany enzym proteolityczny.

Jeden z dwóch nurtów niniejszego opracowania stanowiło otrzymywanie selektywnych substratów wybranych enzymów proteolitycznych, na drodze syntezy chemicznej, umożliwiające wytworzenie narzędzi do wstępnej diagnostyki wybranych schorzeń organizmu ludzkiego. Drugi nurt prowadzonych badań stanowiła charakterystyka specyficzności substratowej określonych enzymów proteolitycznych. Oba kierunki moich badań posiadały punkty wspólne.

[36]. Rosén S., *Chromogenic methods in coagulation diagnostics*, (2005), 25, 259-266.

[37]. Packard B.Z., Komoriya A., *Intracellular protease activation in apoptosis and cell-mediated cytotoxicity characterized by cell-permeable fluorogenic protease substrates*, *Cell Res.*, (2008), 18, 238-247.

[38]. Leippe D.M., Nguyen D., Zhou M., Good T., Kirkland T.A., Scurria M., Bernad L., Ugo T., Vidugiriene J., Cali J.J., Klaubert D.H., O'Brien M.A., *A bioluminescent assay for the sensitive detection of proteases*, *Biotechniques*, (2011), 51, 105-110.

[39]. Chen H., Mei Q., Hou Y., Zhu X., Koh K., Li X., Li G., *Fabrication of a protease sensor for caspase-3 activity detection based on surface plasmon resonance*, *Analyst.*, (2013), 138, 5757-5771.

[40]. Xiao H., Liu L., Meng F., Huang J., Li G., *Electrochemical approach to detect apoptosis*, *Anal Chem.*, (2008), 80, 5272-5275.

[41]. Wang Y.W., Ren H.L., Wang H.F., Li F.D., Li H.H., Zheng Y.H., *Combining detection of Notch1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme is a reliable biomarker for the diagnosis of abdominal aortic aneurysms*, *Life Sci.*, (2015), 127, 39-45.

[42]. Serim S., Haedke U., Verhelst S.H., *Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments*, *ChemMedChem.*, (2012), 7, 1146-1159.

Większość prowadzonych prac to efekt współpracy z: Pracownią Fotobiofizyki Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, Uniwersytetem w Tours, Uniwersytetem w Okayamie, Uniwersytetem w Bonn, Zakładem Chemii Medycznej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, Katedrą Biochemii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Helmholtz Centrum w Monachium, Zakładem Endokrynologii i Cukrzycy Uniwersytetu Medycznego w Ulm, Instytutem Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu w Utrechcie, Zakładem Elektrochemii Wydziału Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku.

**CEL NAUKOWY PRACY.** Prowadzone prace miały na celu opracowanie metod syntetycznych prowadzących do otrzymania zestawu związków chemicznych służących do monitorowania aktywności proteolitycznej wybranych enzymów. W swoich badaniach skoncentrowałam się na analizie specyficzności substratowej takich enzymów jak: elastaza, proteinaza 3, proteinaza HAT, katepsyna G, matryptaza-2 ludzkich komórek tucznych, mitochondrialnej proteinazy HtrA2, ludzkiego proteasomu 20S, katepsyny L oraz czwartej neutrofilnej proteinazy serynowej. W wyniku opracowania powyższych metod otrzymałam 67 substratów fluorogenicznych i 2 inhibitory.

W ramach moich badań opracowałam i wykorzystywałam nowatorską metodę badania specyficzności substratowej enzymów w obszarze C-końcowym (ang. prime subsites) [43].

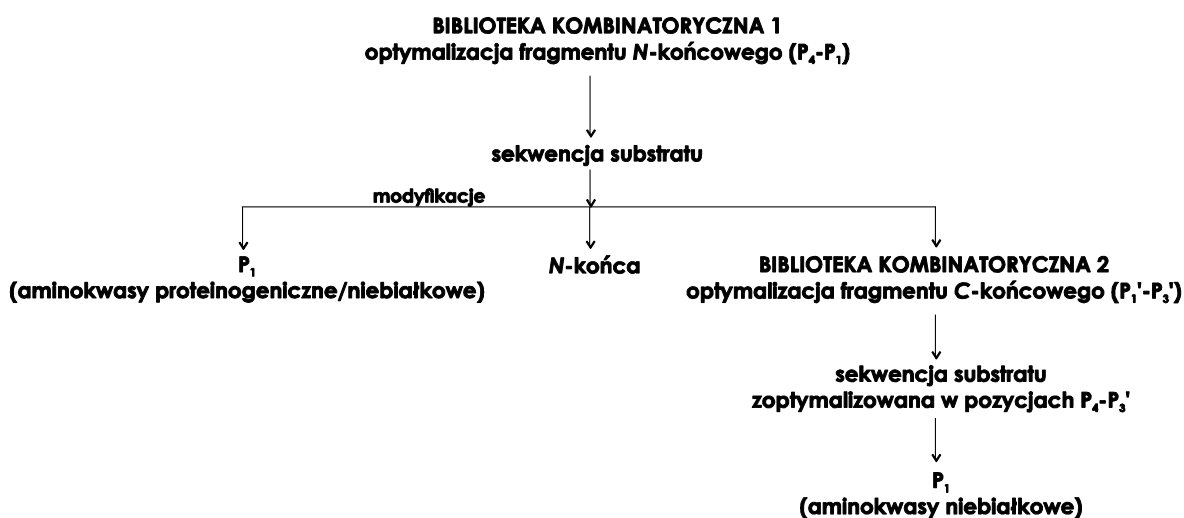
W przypadku HAT, matryptazy-2, katepsyny L, HtrA2, podjednostek ludzkiego proteasomu 20S oraz NSP4 prace prowadziły do określenia specyficzności substratowej do tej pory niescharakteryzowanych enzymów [44-49]. W przypadku HAT otrzymane substraty stały się strukturą wiodącą do zaprojektowania i syntezy wydajnych inhibitorów tego enzymu [44].

Kolejną grupą związków, którą otrzymaliśmy w ramach prowadzonych prac były selektywne substraty pozwalające na detekcję określonego enzymu proteolitycznego w obecności innych proteinaz często o zbliżonej selektywności. Na tym etapie badań skoncentrowałam się na grupie neutrofilnych proteinaz serynowych, których poziom aktywności w materiale biologicznym ma istotną wartość diagnostyczną.

- 
- 43 [H.7]. Popow-Stellmaszyk J., **Wysocka M.**, Lesner A., Korkmaz B., Rolka K., *A new proteinase 3 substrate with improved selectivity over human neutrophil elastase*, Anal. Biochem., (2013), 442, 75-82.
- 44 [H.3]. **Wysocka M.**, Spichalska B., Lesner A., Jaros M., Brzozowski K., Łęgowska A., Rolka K., *Substrate specificity and inhibitory study of human airways trypsin-like proteinase*, Bioorg. Med. Chem., (2010), 18, 5504-5509.
- 45 [H.8]. **Wysocka M.**, Gruba N., Miecznikowska A., Popow-Stellmaszyk J., Gütschow M., Stirnberg M., Furtmann N., Bajorath J., Lesner A., Rolka K., *Substrate specificity of human matryptase-2*, Biochimie, (2014), 97, 121-127.
- 46 [H.9]. Legowska M., **Wysocka M.**, Burster T., Pikuła M., Rolka K., Lesner A., *Ultrasensitive internally quenched substrates of human cathepsin L*, Anal Biochem., (2014), 466, 30-37.
- 47 [H.10]. **Wysocka M.**, Wojtysiak A., Okońska M., Gruba N., Jarzab M., Wentz T., Lipińska B., Grzywa R., Sieńczyk M., Rolka K., Lesner A., *Design and synthesis of new substrates of HtrA2 protease*, Anal Biochem., (2015), 475, 44-52.
- 48 [H.11]. Gruba N., **Wysocka M.**, Brzezińska M., Dębowski D., Rolka K., Martin N., Lesner A., *Novel internally quenched substrate of the trypsin-like subunit of 20S eukaryotic proteasome*, Anal Biochem., (2015) Aug 24. Pii: S0003-2697(15)00395-4. Doi: 10.1016/j.ab.2015.08.019.
- 49 [H.12]. **Wysocka M.**, Gruba N., Grzywa R., Gieldoń A., Bąchor R., Brzozowski K., Sieńczyk M., Jenne D., Szewczuk Z., Rolka K., Lesner A., *PEGylated substrates of NSP4 protease: A tool to study protease specificity*, Sci. Rep. 6, (2016), 22856; doi: 10.1038/srep22856.

Opracowaliśmy niezwykle selektywne substraty charakteryzujące się wysoką stałą specyficzności  $k_{cat}/K_M$  umożliwiające detekcję pM stężeń badanych enzymów. Szczególną uwagę poświęciliśmy enzymowi neutrofili ludzkich, jakim jest proteinaza 3, której podwyższona aktywność koreluje z pozytywną diagnozą ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń, dawniej nazywaną chorobą Wegenera [50]. Ta szczególna odmiana zapalenia naczyń jest chorobą rzadką i często nieuleczalną. Otrzymany w ramach niniejszych prac substrat stanowi jeden z elementów diagnostyki tej choroby.

Ogólny schemat postępowania w trakcie procedury otrzymywania wydajnych i selektywnych substratów wybranych proteinaz zamieściłam na **rysunku 3**.



RYSUNEK 3: Ogólna strategia prowadzonych badań.

**WYNIKI.** Grupa związków, jaką są substraty zawierające w swej cząsteczce znacznik fluorescencyjny posiada istotne znaczenie w dwóch obszarach badań nad enzymami proteolitycznymi. Pierwszy z nich to wykorzystanie znakowanych fluorescencyjnie mieszanin peptydów (podbibliotek, ang. sublibraries) w celu charakterystyki miejsc wiązania substratu (ang. substrat mapping). Drugi to otrzymywanie znakowanych peptydów i ich wykorzystanie, jako narzędzi diagnostycznych do monitorowania aktywności wybranej proteinazy.

Analizę specyficzności substratowej realizowaliśmy wykorzystując metodę syntezy na fazie stałej z zastosowaniem procedury Fmoc/tBu, stosując metodę porcjowania i łączenia (w przypadku bibliotek kombinatorycznych). Wzór ogólny syntetyzowanych bibliotek zawierających substraty fluorescencyjne zamieściłam poniżej:

50 [H.2]. Wysocka M., Lesner A., Guzow K., Kulczycka J., Łęgowska A., Wiczek W., Rolka K., *Highly specific substrates of proteinase 3 containing 3-(2-benzoxazol-5-yl)-L-alanine and their application for detection of this enzyme in human serum*, Anal Chem., (2010), 82, 3883-3889.

**ABZ-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-ANB-NH<sub>2</sub>**

gdzie:

- ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy (donor fluorescencji)  
X<sub>4</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>2</sub> – zbiór 19 proteinogennych reszt aminokwasowych, z wyjątkiem cysteiny  
X<sub>1</sub> – określone reszty aminokwasowe determinujące specyficzność badanego enzymu  
ANB-NH<sub>2</sub> – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (akceptor fluorescencji)

Dzięki występowaniu w cząsteczce peptydu pary donor–akceptor obserwowano wygaszanie fluorescencji donora w wyniku bezpromienistego transferu energii wzbudzenia elektronowego (ang. fluorescence resonance energy transfer, FRET). W przypadku hydrolizy wiązania peptydowego znajdującego się pomiędzy resztą P<sub>1</sub>, a cząsteczką amidu kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego [51] lub 3-nitro-L-tyrozyny [52], tak oznakowanego peptydu obserwuje się wzrost fluorescencji proporcjonalny do aktywności (pośrednio stężenia) enzymu [43-50, 53-55]

Procedurę wyznaczania właściwej specyficznej sekwencji zwaną dekonwolucją biblioteki, prowadziliśmy metodą iteracyjną, analizując każdą z pozycji X wobec badanego enzymu proteolitycznego. W procesie, o którym mowa powyżej otrzymaliśmy sekwencje substratów najwydajniej ulegających proteolizie, a także ustaliliśmy specyficzność substratową badanej proteazy.

Drugi obszar badań dotyczył oznaczania aktywności enzymatycznej określonej proteinazy, jako markera stanu patologicznego. W tym celu stosowaliśmy zmodyfikowane substraty (wyselekcjonowane w trakcie badań specyficzności), tak aby zwiększyć selektywność ich oddziaływań tylko z jednym wybranym enzymem proteolitycznym. W celu osiągnięcia zamierzonego celu dokonaliśmy wymiany istotnych reszt aminokwasowych peptydu wyjściowego na ich niebiałkowe odpowiedniki. W procesie tym modyfikacji ulegał też znacznik fluorescencyjny [50,54,55].

- 
- [51]. Hojo K., Maeda M., Iguchi S., Smith T., Okomata H., Kawasaki K., *Amino acids and peptides. XXXV. Facile preparation of p-nitroanilide analogs by the solid-phase method*, Chem. Pharm. Bull., (2000), 48, 1740-1744.
- [52]. Meldal M., Breddam K., *Anthralanilamide and nitrotyrosine as a donor-acceptor pair in internally quenched fluorescent substrates for endopeptidases: multicolumn peptide synthesis of enzyme substrates for subtilisin Carlsberg and pepsin*, Anal Biochem, (1979),195, 228-235.
- 53 [H.1]. Wysocka M., Lesner A., Majkowska G., Łęgowska A., Guzow K., Rolka K., Wiczek W., *The new fluorogenic substrates of neutrophil proteinase 3 optimized in prime site region*, Anal. Biochem., (2010), 399, 196-201.
- 54 [H.4]. Wysocka M., Lesner A., Popow J., Łęgowska M., Rolka K., *Pegylated FRET peptides as substrates of proteolytical enzymes*, Prot. Pept Lett., (2012), 19, 1237-1244.
- 55 [H.5]. Wysocka M., Lesner A., Gruba N., Korkmaz B., Gauthier F., Kitamatsu M., Łęgowska A., Rolka K., *Three wavelength substrate system of neutrophil serine proteinases*, Anal. Chem., (2012), 84, 7241-7248.

## SUBSTRATY ZE ZNACZNIKIEM C-KOŃCOWYM (ANB)

### *Ludzka trypsynopodobna proteaza dróg oddechowych (HAT)*

Ludzka trypsynopodobna proteaza dróg oddechowych (HAT) należy do enzymów transmembranowych [56], a jej funkcja w organizmie ludzkim to między innymi degradacja fibrynogenu i aktywacja receptora PAR2 (ang. protease-activated receptor 2) [57].

Warto podkreślić, że jako pierwsza grupa na świecie określiliśmy specyficzność substratową HAT. Do tej pory znana była tylko pierwszorzędowa specyficzność tego enzymu.

Wyselekcjonowane metodami chemii kombinatorycznej sekwencje substratowe dla proteiny HAT to: ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH<sub>2</sub> oraz ABZ-Arg-Gln-Asp-Lys-ANB-NH<sub>2</sub>. Substraty wykazywały wysokie wartości stałej specyficzności ( $k_{cat}/K_M$ ) odpowiednio  $454,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\times\text{s}^{-1}$  i  $195,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\times\text{s}^{-1}$ . Chciałabym podkreślić, że jeden z otrzymanych związków wykazuje 8-krotnie wyższą stałą specyficzności niż wartość wyznaczona dla dotychczas powszechnie stosowanego substratu dla proteiny HAT (Boc-Phe-Ser-Arg-4-MCA,  $k_{cat}/K_M = 58,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\times\text{s}^{-1}$ ). Następnie na podstawie sekwencji otrzymanych substratów zsyntetyzowaliśmy dwa peptydomimetyki zawierające na C-końcu grupę aldehydową. Stałe hamowania, które wyznaczaliśmy dla obu związków wskazują, że są one wydajnymi inhibitorami tego enzymu (stałe inhibicji  $K_i$  wynoszą odpowiednio: ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-H 54,3 nM, ABZ-Arg-Gln-Asp-Lys-H 112,3 nM) (Tabela 3). Ponadto obecność reszty kwasu asparaginowego w pozycji X<sub>2</sub> sprawia, że wykazują one wysoką selektywność wobec badanych proteinaz (ludzkie: matryptaza i tryptaza oraz bydlęca  $\beta$ -trypsyna) [44].

TABELA 3: Siła hamownia i selektywność inhibitorów HAT.

PEPTYD	ENZYM	$K_i$ [nM]
ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-H	HAT	54,3±2,1
	Matryptaza	972,9±82,2
	Tryptaza	2127,5±171,9
	Bydlęca $\beta$ -trypsyna	3925,1±94,8
ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-H	HAT	112,3±7,5
	Matryptaza	1710,7±110,1
	Tryptaza	3753,3±282,5
	Bydlęca $\beta$ -trypsyna	7232,2±252,9

[56]. Yasuoka S., Ohnishi T., Kawano S., Tsuchihashi S., Ogawara M., Masuda K., Yamaoka K., Takahashi M., Sano T, *Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway*, Am J Respir Cell Mol Biol., (1997), 16, 300-308.

[57]. Chokki M., Eguchi H., Hamamura I., Mitsunashi H., Kamimura T., *Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF alpha-converting enzyme activity in airway epithelial cells*, FEBS J., (2005), 272, 6387-6399.

### Substraty neutrofilnej proteiny 3

Sekwencję substratu proteiny 3 modyfikowaliśmy w dalszym procesie poprzez przyłączenie do C-końcowej grupy karboksylowej ANB, znajdującej się w pierścieniu aromatycznym, 19 aminokwasów proteinogennych. Wzór ogólny syntetyzowanych związków zamieściłam poniżej:



gdzie:

- ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy (donor fluorescencji)
- X – zbiór 19 proteinogennych reszt aminokwasowych, z wyjątkiem cysteiny
- ANB-NH<sub>2</sub> – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (akceptor fluorescencji)

Otrzymane substraty inkubowaliśmy z dwoma enzymami, o podobnej specyficzności pierwszorzędowej, wyizolowanymi z neutrofilii ludzkich: elastazą i proteinazą 3 [58]. W porównaniu do substratu wyjściowego proteiny 3: ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH<sub>2</sub> ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 189 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ), jedynie dwa z otrzymanych związków charakteryzowały się wyższymi parametrami kinetycznymi otrzymanymi dla badanego enzymu [53].

Stwierdzenie to dotyczy dwóch substratów: ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-Asn-NH<sub>2</sub> ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 201 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ) i ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-Gln-NH<sub>2</sub> ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 275 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ). Warty podkreślenia jest fakt, że otrzymane przez nas substraty oprócz wyżej wspomnianej specyficzności wykazywały niezwykle dużą selektywność wobec ludzkiej elastazy neutrofilnej, w obecności której nie ulegały hydrolizie. Na podstawie otrzymanych wyników mogę stwierdzić, że poprzez odpowiednią modyfikację C-końcowej funkcji karboksylowej resztami aminokwasowymi można otrzymać selektywne i specyficzne substraty proteinaz. Ponadto, wpływ modyfikacji pozycji primowanych na parametry kinetyczne otrzymanych związków zmotywował mnie do zaprojektowania bibliotek peptydowych zawierających zmienne pozycje właśnie w tym obszarze oddziaływań enzym-substrat.

[58]. Pham C.T., *Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response*, Int J Biochem Cell Biol., (2008), 40, 1317-1333.

**SUBSTRATY ZE ZNACZNIKIEM C-KOŃCOWYM (Tyr(3-NO<sub>2</sub>))****Substraty neutrofilnej proteinazy 3**

W celu szczegółowej analizy wspomnianych wyżej oddziaływań enzym-substrat, zmuszona byłam zastąpić dotychczas stosowaną parę donor – akceptor (ABZ – ANB-NH<sub>2</sub>) na taką, która charakteryzowałaby się wyższą efektywnością wygaszania energii dla dłuższych łańcuchów peptydowych. Na podstawie danych literaturowych wybrałam pochodną L-tyrozyny modyfikowaną w pozycji 3 grupą nitrową [52]. Zaprojektowany substrat zawierający parę: ABZ– Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> wykazywał podobne właściwości spektralne, jak ten zawierający cząsteczkę kwasu ANB.

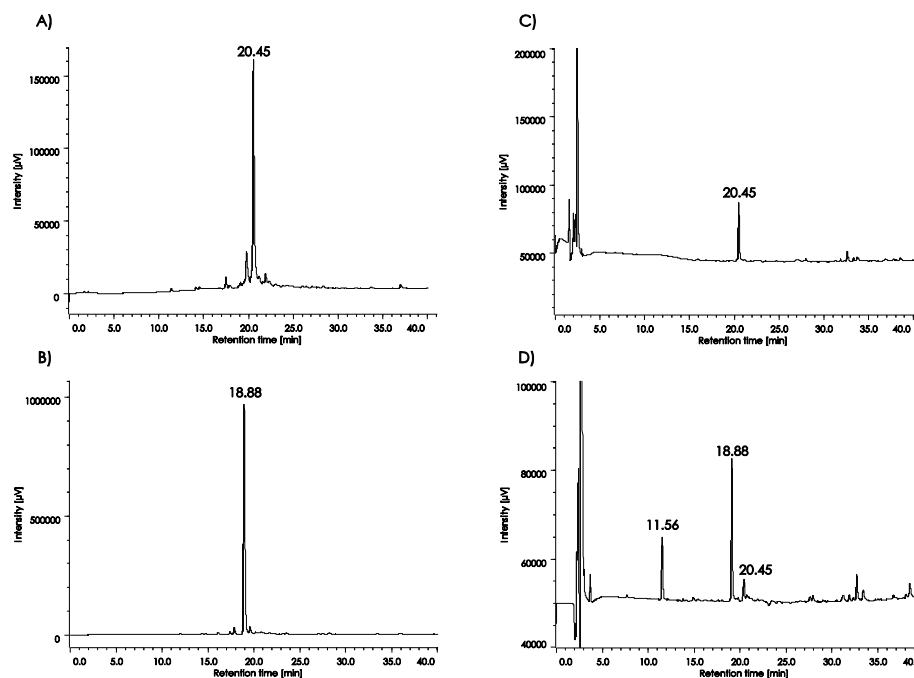
Kolejnym krokiem była synteza biblioteki o wzorze ogólnym:

**ABZ-peptyd-X<sub>1</sub>'-X<sub>2</sub>'-X<sub>3</sub>'-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>**

gdzie:

ABZ	– kwas 2-aminobenzoesowy (donor fluorescencji)
peptyd	– Tyr-Tyr-Abu
X <sub>1</sub> ', X <sub>2</sub> ', X <sub>3</sub> '	– zbiór 19 proteinogennych reszt aminokwasowych, z wyjątkiem cysteiny
Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	– amid 3-nitro-L-tyrozyny (akceptor fluorescencji)

której równoległa dekonwolucja wobec dwóch enzymów wyizolowanych z neutrofilii ludzkich: proteinazy 3 i elastazy doprowadziła do otrzymania związku ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>, którego stała specyficzności wynosiła ( $k_{\text{cat}}/K_M = 1596 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ), a więc ponad ośmiokrotnie więcej niż do tej pory otrzymanego przeze mnie substratu [43]. Ponadto badania te zawierają opis metody za pomocą, której można określić specyficzność substratową dowolnego enzymu proteolitycznego zarówno w pozycjach primowanych, jak i we fragmencie N-końcowym (nieprimowanym). Kluczowym etapem w określaniu podatności na proteolizę określonych podbibliotek, czy też pojedynczych peptydów, jest ich dokładna analiza przy zastosowaniu technik spektrometrii mas oraz chromatografii na fazach odwrotnych z wykorzystaniem detektora fluorescencji. Analiza tego typu pozwala potwierdzić obecność silnie fluorescencyjnego produktu powstałego w wyniku hydrolizy odpowiedniej biblioteki i tym samym ustalić, które wiązanie peptydowe uległo hydrolizie. Jest to szczególnie istotne w pierwszych dwóch etapach procesu dekonwolucji. Przykład tak opracowanej procedury przedstawia **rysunek 4**.



**RYСУNEK 4:** Analiza HPLC ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>: A) i B) detekcja fluorescencyjna  $\lambda_{ex} = 320$  nm,  $\lambda_{em} = 450$  nm, C) i D) detekcja UV<sub>226</sub>. A) i C) chromatogramy substratu, B) i D) chromatogramy substratu po upływie 15 minut inkubacji z PR3. Sygnały:  $t_R = 18,88$  min, fragment *N*-końcowy: ABZ-Tyr-Tyr-Abu-OH;  $t_R = 20,45$  min, ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>;  $t_R = 11,56$ , Asn-Pro-Glu-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>.

Badania o podobnej specyficy mające na celu ustalenie specyficzności określonego enzymu proteolitycznego prowadziliśmy także dla matryptazy-2, katepsyny L, proteinazy HtrA2, ludzkiego proteasomu oraz proteinazy NSP4. Poniżej przedstawię wyniki, które uzyskaliśmy dla tych enzymów.

### Matryptaza -2

Enzym ten jest przedstawicielem proteaz transmembranowych, a w obrębie jego budowy przestrzennej można wyróżnić dwie domeny strukturalne: domenę katalityczną i domenę transmembranową kotwiczącą enzym w błonie komórkowej. W świetle najnowszych badań uważa się, że matryptaza-2 zaangażowana jest w metabolizm jonów żelaza w organizmie [59,60]. Ponadto nadekspresja tego enzymu u człowieka koreluje z rozwojem raka piersi.

W ramach współpracy nawiązanej przez prof. Krzysztofa Rolkę z prof. Michaeliem Gütschowem z Reńskiego Uniwersytetu Fryderyka Wilhelma w Bonn otrzymaliśmy preparat zawierający domenę katalityczną matryptazy-2 i określiliśmy pełną specyficzność substratową tego enzymu [45]. W wyniku przeprowadzonych prac polegających na dekonwolucji **biblioteki kombinatorycznej 1**, a następnie **biblioteki kombinatorycznej 2 (Rys. 3)** wyselekcjonowaliśmy specyficzne i selektywne substraty, za pomocą których możliwe jest monitorowanie aktywności tego enzymu (**Tabela 4**).

[59]. Szabo R., Bugge T.H., *Type II transmembrane serine proteases in development and disease*, Int J Biochem Cell Biol., (2008), 40, 1297-1316.

[60]. Finberg K.E., Heeney M.M., Campagna D.R., Aydinok Y., Pearson H.A., Hartman K.R., Mayo M.M., Samuel S.M., Strouse J.J., Markianos K., Andrews N.C., Fleming M.D., *Mutations in Tmprss6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)*, Nat Genet., (2008), 40, 569-571.



TABELA 4: Parametry kinetyczne substratów matryptazy-2.

SEKWENCJA	$K_M$ [M]×10 <sup>-6</sup>	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [s <sup>-1</sup> ×M <sup>-1</sup> ]×10 <sup>4</sup>
ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	8,35±1,21	3,79±0,38	45,42±1,82
ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ala-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	35,5±8,81	2,24±0,28	6,32±0,78
ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	24,5±3,92	2,66±0,17	10,98±1,05

Ponadto wykazaliśmy, że sekwencja aminokwasowa C-końcowego fragmentu łańcucha peptydowego, który ulega rozpadowi katalizowanemu przez matryptazę-2, powinna zawierać małe alifatyczne reszty aminokwasowe takie jak: Ala, Ser czy Gly. Otrzymane w ten sposób dane mogą stanowić podstawę do projektowania nowych selektywnych inhibitorów tego niezwykle interesującego enzymu.

### *Katepsyna L*

Analizę specyficzności substratowej przeprowadziliśmy również dla enzymu należącego do rodziny proteinaz cysteinowych – katepsyny L. Proteinaza ta występuje głównie w lizosomach, choć jej obecność wykryto także w jądrze komórkowym gdzie bierze udział w proteolizie histonów [61,62]. Celem naszych badań było otrzymanie selektywnego substratu fluorogenicznego, który byłby jednocześnie wydajnie hydrolizowany przez katepsynę L. W tym celu zaprojektowaliśmy trzy serie związków:

**ABZ-Bip-X<sub>1</sub>-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>**

**ABZ-Bip-X<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>'-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>**

**ABZ-Bip-X<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>'-X<sub>2</sub>'-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>**

gdzie:

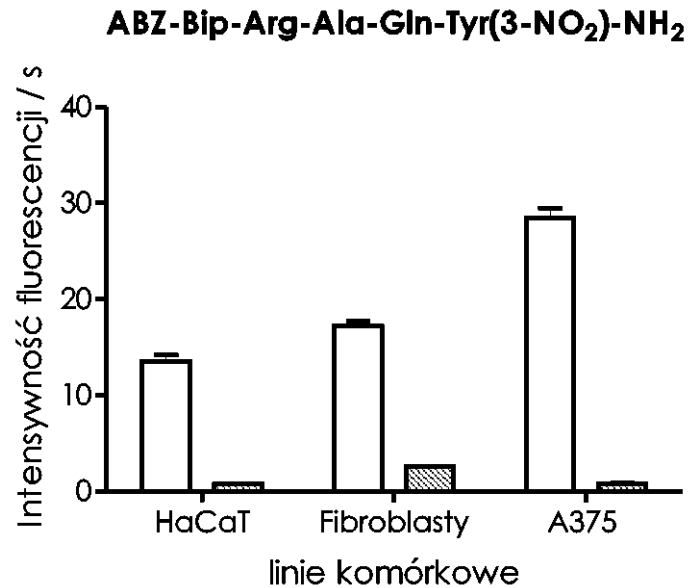
- ABZ – kwas 2-aminobenzoowy (donor fluorescencji)
- Bip – difenyl-L-alanina
- X<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>', X<sub>2</sub>' – zbiór 19 proteinogennych reszt aminokwasowych, z wyjątkiem cysteiny
- Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> – amid 3-nitro-L-tyrozyny (akceptor fluorescencji)

z których ostatecznie wyselekcjonowaliśmy substrat o niezwykle wysokiej stałej specyficzności ( $k_{cat}/K_M = 2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ) o sekwencji ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln-Tyr(NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> [46]. Przy użyciu tego związku mogliśmy z powodzeniem oznaczyć aktywność katepsyny L o stężeniu około 10 pM. Otrzymany substrat wykazywał także istotną selektywność wobec enzymów z rodziny katepsyn lizosomalnych. Pozwoliło to na zastosowanie wyselekcjonowanego związku do określania aktywności katepsyny L w materiale biologicznym. W tym celu zainkubowaliśmy otrzymany substrat z lizatem komórek zdrowych (keratynocyty i fibroblasty), jak i komórek nowotworowych (czerniak – linia A375).

[61]. Guncar G., Pungercic G., Klemencic I., Turk V., Turk D., *Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S*, EMBO J., (1999), 15, 18, 793-803.

[62]. Goulet B., Baruch A., Moon N.S., Poirier M., Sansregret L.L., Erickson A., Bogyo M., Nepveu A., *A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor*, Mol Cell., (2004), 14, 207-219.

Uzyskane wyniki wskazują na podwyższoną o 40-50% aktywność katepsyny L w komórkach raka skóry (Rys. 5). Wynik ten może być podstawą szybkiego testu diagnostycznego za pomocą którego byłoby możliwe wstępne diagnozowanie raka skóry.

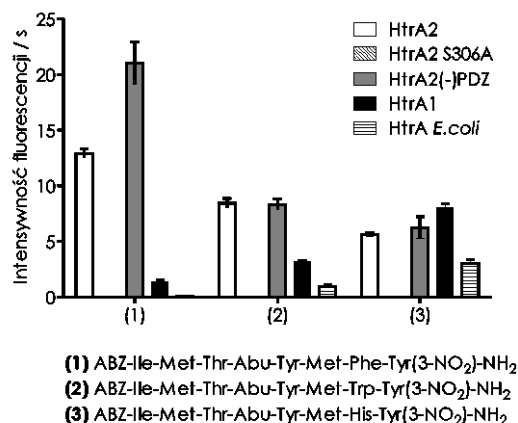


RYSUNEK 5: Aktywność katepsyny L w lizatach linii komórkowych: keratynocytów (HaCaT), fibroblastów oraz czerniaka (A375) – białe słupki. Zakreślone słupki – kontrola, gdzie lizaty komórkowe uprzednio inkubowano z inhibitorem katepsyny L.

### HtrA2

W ramach prowadzonych badań nad enzymami proteolitycznymi nawiązaliśmy współpracę z grupą prof. dr hab. Barbary Lipińskiej z Katedry Biochemii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematem wspólnych badań były eukariotyczne białka z rodziny HtrA (ang. high temperature requirement A), które wykazują aktywność opiekuńczą (ang. chaperon), jak i proteolityczną [63]. Pierwszym enzymem dla którego określiliśmy specyficzność substratową był enzym HtrA2. Proteinaza ta w organizmie ludzkim występuje w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. HtrA2 jest zaangażowana w procesie regulacji cyklu życiowego komórek w tym i apoptozy. Jej podwyższona aktywność obserwowana jest w procesach nowotworowych. Stosując metody chemii kombinatorycznej otrzymaliśmy peptydomimetyk, który może stanowić narzędzie do monitorowania aktywności tego enzymu w układach biologicznych. Związek o sekwencji ABZ-Ile-Met-Thr-Abu-Tyr-Met-Phe-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> wykazywał stałą specyficzności  $k_{cat}/K_M = 14\ 535\ M^{-1}\times s^{-1}$  [47] oraz niezwykle wysoką selektywność wobec innych enzymów z rodziny HtrA (Rys. 6).

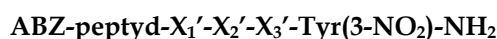
[63]. Gray C.W., Ward R.V., Karran E., Turconi S., Rowles A., Viglienghi D., Southan C., Barton A., Fantom K.G., West A., Savopoulos J., Hassan N.J., Clinkenbeard H., Hanning C., Amegadzie B., Davis J.B., Dingwall C., Livi G.P., Creasy C.L., *Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response*, Eur J Biochem., (2000), 267, 5699-5710.



RYSUNEK 6: Wykres przyrostu intensywności fluorescencji w czasie substratów 1, 2 i 3 w obecności panelu proteinaz z rodziny HtrA.

### Eukariotyczny proteasom 20S

Proponowane badania miały na celu otrzymanie fluorescencyjnych pochodnych peptydowych, będących substratami ludzkiego proteasomu 20S: multikatalicznego kompleksu białkowego występującego w każdej żywej komórce [64,65]. Aktywność proteolityczna proteasomu znajduje się w obrębie podjednostki 20S w domenach:  $\beta 1$  i  $\beta 1'$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 2'$  oraz  $\beta 5$  i  $\beta 5'$  (odpowiednio: kaspazo-, trypsyno- i chymotrypsynopodobna). Związki te, zaprojektowane zostały w taki sposób, aby ulegały selektywnej hydrolizie, czyli były podatne na działanie tylko jednej podjednostki ludzkiego proteasomu o określonej specyficzności substratowej. W kolejnym etapie badań ocenialiśmy poziom aktywności wybranej podjednostki u osób zdrowych i ze zdiagnozowanym przebiegiem określonej choroby nowotworowej. W tym celu zsyntetyzowaliśmy trzy biblioteki o wzorze ogólnym:



**peptyd:** Val-Val-Ser-Tyr – podjednostka chymotrypsynowa,  
 Val-Val-Ser-Arg – podjednostka trypsynowa,  
 Ile-Leu-Met-Asp – podjednostka kaspazowa,

gdzie:

ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy (donor fluorescencji)  
 $X_1'$ ,  $X_2'$ ,  $X_3'$  – zbiór 19 proteinogennych reszt aminokwasowych, z wyjątkiem cysteiny  
 $\text{Tyr}(3\text{-NO}_2)\text{-NH}_2$  – amid 3-nitro-L-tyrozyny (akceptor fluorescencji)

Sekwencje peptydów dla trzech podjednostek katalitycznych proteasomu (Val-Val-Ser-Tyr, Val-Val-Ser-Arg oraz Ile-Leu-Met-Asp) wyselekcjonowaliśmy metodami chemii kombinatorycznej w ramach prac prowadzonych wspólnie z dr Dawidem Dębowskim z Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

[64]. Kopp F., Hendil K.B., Dahmann B., Kristensen P., Sobek A., Uerkvitz W., *Subunit arrangement in the human 20S proteasome*, Proc Natl Acad Sci U S A, (1997), 94, 2939-2944.

[65]. Groll M., Heinemeyer W., Jäger S., Ullrich T., Bochtler M., Wolf D.H., Huber R., *The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study*, Proc Natl Acad Sci U S A, (1999), 96, 10976-10983.

Proces dekonwolucji powyższych bibliotek, zoptymalizowanych w pozycjach prim (według notacji Schechtera Bergera), pozwolił nam wyselekcjonować trzy substraty, które niezwykle wydajnie ulegały hydrolizie w obecności określonej podjednostki ludzkiego proteasomu (Tabela 5).

TABELA 5: Sekwencje substratów wyselekcjonowanych wobec proteasomu 20S.

SEKWENCJA SUBSTRATU	PODJEDNOSTKA PROTEASOMU	ODNOŚNIK LIT.
ABZ-Val-Val-Ser-Tyr↓-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	– chymotrypsynowa	[66]
ABZ-Val-Val-Ser-Arg↓-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	– trypsynowa	[48]
ABZ-Ile-Leu-Met-Asp↓-Ala-Met-Leu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	– kaspazopodobna	[67]

gdzie: ↓ - miejsce hydrolizy enzymatycznej (P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>')

Otrzymane substraty w obecności proteasomu ulegały selektywnej hydrolizie przez wybraną podjednostkę proteasomu do dwóch fragmentów powstałych na skutek rozpadu wiązania peptydowego pomiędzy resztami P<sub>1</sub> i P<sub>1</sub>'. Stosując trzy powyższe substraty fluorogeniczne byliśmy w stanie oznaczyć aktywność proteasomu w wybranym materiale biologicznym. Niestety nie powiodła się próba modyfikacji N-końcowej cząsteczki fluoroforu, tak aby otrzymać związki różniące się długością fali emitowanego promieniowania. Wszelkie modyfikacje tej pozycji prowadziły do utraty przez substrat wymaganej specyficzności, a w konsekwencji do zahamowania jego proteolizy.

W ramach współpracy z prof. dr hab. Joanną Chorostowską-Wynimko z Państwowego Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie oraz dr hab. Marcinem Matuszewskim z Katedry Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego prowadziliśmy zbórkę materiału do badań (ludzkie osocze i mocz) w celu określenia profilu aktywności proteasomu u osób zdrowych i ze stwierdzonymi chorobami nowotworowymi oraz z zaburzeniami układu odpornościowego.

Przeprowadzone badania pozwoliły nam stwierdzić, że substrat ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> ulega w buforowanym moczu pacjentów chorych na raka pęcherza rozpadowi charakterystycznemu dla podjednostki chymotrypsynopodobnej ludzkiego proteasomu. W celu przeprowadzenia eksperymentów w obecności specyficznych i selektywnych inhibitorów proteasomu nawiązaliśmy kontakt z dr Alexeim Kisselevem z Dartmouth Medical School, USA, od którego otrzymaliśmy powyższe związki. Hydroliza substratu była hamowana w obecności inhibitorów proteasomu 20S. Zjawiska tego nie obserwowaliśmy dla próbek moczu pochodzących od zdrowych ochotników. Uzyskane wyniki zostały objęte zgłoszeniem patentowym [68].

[66]. Gruba N., **Wysocka M.**, Brzezinska M., Dębowski D., Gorodkiewicz E., Lesner A., Rolka K., *New internally quenched substrates of human 20S proteasome*, Peptides 2014, Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia, European Peptide Society, Sofia 2014, (E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev, eds.), str. 48-50.

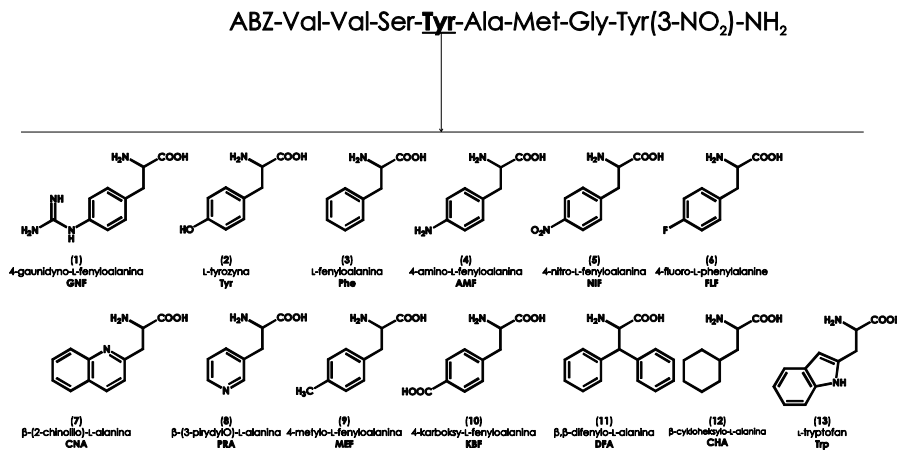
[67]. Gruba N., **Wysocka M.**, Dębowski D., Lesner A., Rolka K., *Characteristics of caspase-like specificity of human 20S proteasome using combinatorial chemistry methods*, Peptides 2014, Proceedings of 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, Sofia, European Peptide Society, Sofia 2014, (E. Naydenova, T. Pajpanova, D. Danalev, eds.), str. 344-345.

[68]. Dębowski D., Gruba N., Lesner A., **Wysocka M.**, *Nowy związek, sposób jego otrzymywania, roztwór farmaceutyczny zawierający nowy związek, sposób określania obecności choroby nowotworowej, zestaw do wykrywania nowotworów oraz zastosowanie hydrolizy nowego związku do wykrywania nowotworów*. Zgłoszenie patentowe nr P.408905, (2014).

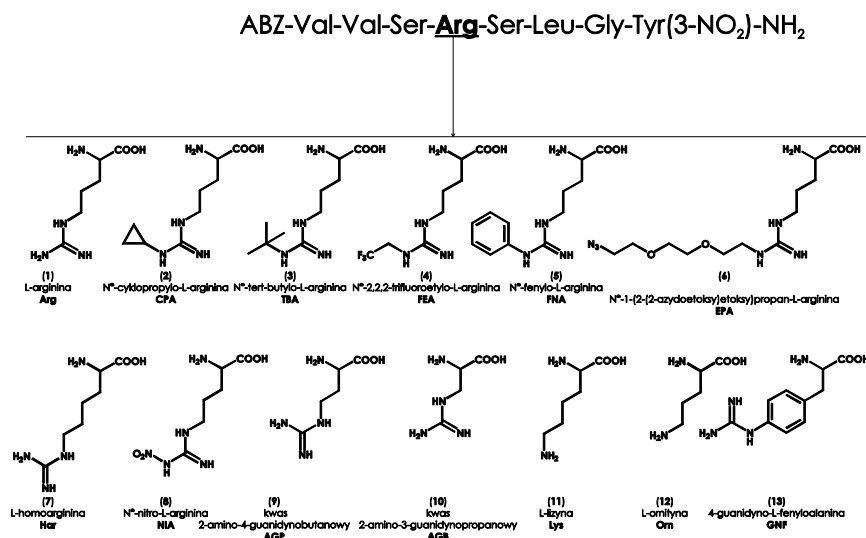
Przeprowadzone badania nie pozwoliły nam jednoznacznie potwierdzić użyteczności pozostałych dwóch substratów hydrolizowanych przez podjednostkę trypsyno- i kaspazopodobną w diagnostyce raka pęcherza. W obu przypadkach nie stwierdziliśmy prostej zależności chory – zdrowy.

Uzyskane wyniki zdecydowanie wskazują, że otrzymaliśmy wysoce selektywne, charakteryzujące się wysokimi wartościami stałej specyficzności ( $k_{cat}/K_M$ ) substraty fluorogeniczne ludzkiego proteasomu 20S i 26S. Modyfikacje pozycji P<sub>1</sub> substratów o specyficzności chymotrypsynowej (Rys. 7) i trypsynowej (Rys. 8) wykazały, że proteasom wydajnie hydrolizuje substraty zawierające w tej pozycji białkowe reszty aminokwasowe (Tyr, Phe, Trp) dla specyficzności chymotrypsynowej lub Arg dla trypsynowej.

Związkami o interesujących właściwościach okazał się substrat o sekwencji ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>. Peptyd ten ulegał wydajnej proteolizie katalizowanej przez podjednostkę trypsynopodobną, a nie jak się pierwotnie spodziewaliśmy chymotrypsynopodobną.



RYSUNEK 7: Wzory strukturalne serii pochodnych aminokwasowych wprowadzonych w pozycję P<sub>1</sub> substratu ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>.



RYSUNEK 8: Wzory strukturalne serii pochodnych arginyiny wprowadzonych w pozycję P<sub>1</sub> substratu ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>.

Wyselekcjonowane substraty:

ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>

ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>

ABZ-Ile-Leu-Met-Asp-Ala-Met-Leu-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>

ABZ-Val-Val-Ser-Phe(4-guanidyno)-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>

poddaliśmy szczegółowym badaniom w obecności inhibitorów oraz aktywatora proteasomu 20S (SDS) oraz 26S. Limity detekcji w przypadku proteasomu 20S zamieściłam w **tabeli 6**.

**TABELA 6:** Limity oznaczalności otrzymanych substratów wobec proteasomu 20S.

SEKWENCJA SUBSTRATU	LIMIT DETEKCJI [pM]
ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	5
ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	5
ABZ-Ile-Leu-Met-Asp-Ala-Met-Leu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	58
ABZ-Val-Val-Ser-Phe(4-guanidyno)-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	12

Wartości uzyskane dla wyselekcjonowanych substratów charakteryzują się wyższym limitem detekcji w odniesieniu do komercyjnie dostępnych testów immunochemicznych (ELISA), których użycie jest kosztowne, a stosowana procedura oznaczania długotrwała.

Związki: ABZ-Val-Val-Ser-Phe(4-guanidyno)-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub>, ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> oraz ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> poddaliśmy wstępnym badaniom w materiale biologicznym. W przypadku osocza pacjentów z zdiagnozowanym nowotworem pęcherza obserwowaliśmy dużą zmienność ze względu na metodologię poboru materiału (aktywacja osoczowych czynników krzepnięcia). Natomiast mocz tych samych pacjentów to materiał diagnostyczny, dla którego byliśmy w stanie otrzymać jasną zależność chory – zdrowy. Wzrost fluorescencji hamowany jest przez dostępne komercyjnie inhibitory proteasomu, a substrat ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> ulegał proteolizie w sposób identyczny, jak dla izolowanego proteasomu.

## MODYFIKACJE N- i C-KOŃCA SUBSTRATÓW

### *Modyfikacje substratów ze znacznikiem C-końcowym (ANB)*

Badania nad serią substratów wyselekcjonowanych wobec: proteinyazy 3 [69], katepsyny G [70], elastazy neutrofilnej [71] i proteazy HAT [44] były kontynuacją prac nad wpływem wydłużenia cząsteczki substratu na jego siłę i selektywność oddziaływań z enzymem.

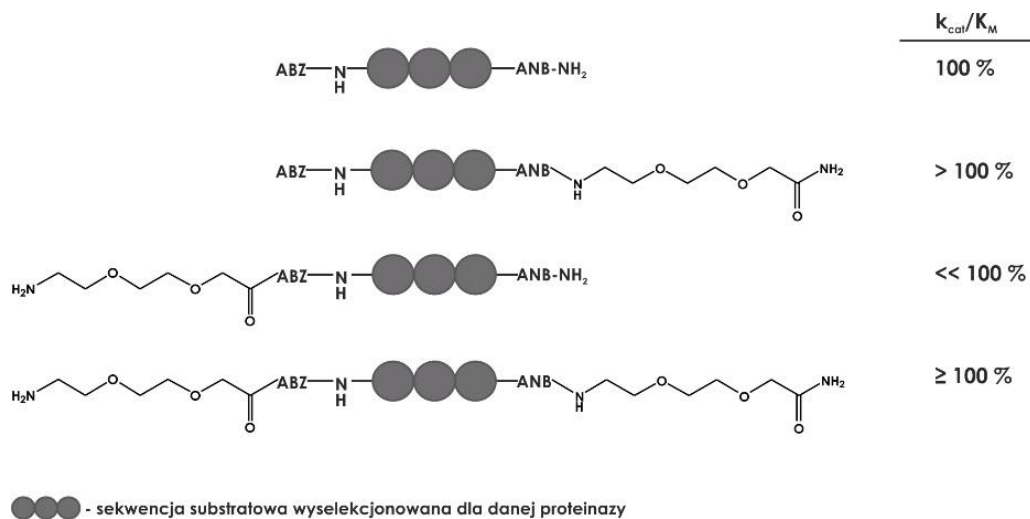
[69]. Wysocka M., Lesner A., Guzow K., Mackiewicz L., Łęgowska A., Wiczek W., Rolka K., *Design of selective substrates of proteinase 3 using combinatorial chemistry methods*, Anal. Biochem., (2008), 378, 208-215.

[70]. Lesner A., Wysocka M., Guzow K., Wiczek W., Łęgowska A., Rolka K., *Development of sensitive cathepsin G fluorogenic substrate using combinatorial chemistry methods*, Anal. Biochem., (2008), 375, 306-312.

[71]. Wysocka M., Kwiatkowska B., Rzakiewicz M., Lesner A., Rolka K., *Selection of new chromogenic substrates of serine proteinases using combinatorial chemistry methods*, Comb. Chem. High T. Scr., (2007), 10, 171-180.

Modyfikacje tej serii związków polegały na wprowadzeniu do sekwencji cząsteczki sfunkcjonalizowanego glikolu polietylenowego – PEG (kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy) odpowiednio na C- lub N-koniec cząsteczki substratu lub na obu tych grupach jednocześnie.

Taka zmiana istotnie zwiększała rozpuszczalność otrzymanych związków w roztworach wodnych. W wyniku syntezy chemicznej otrzymaliśmy 16 substratów, dla których wyznaczaliśmy parametry kinetyczne ( $k_{cat}$ ,  $K_M$  oraz  $k_{cat}/K_M$ ). Analizując otrzymane dane mogliśmy jednoznacznie stwierdzić, że obecność łańcucha polietylenowego w N-końcowym fragmencie substratu istotnie zwiększa (3-4-krotnie) jego parametry kinetyczne, zaś odwrotny skutek przynosi modyfikacja C-końcowej grupy karboksylowej prowadząc do znaczącego (2-3-krotnego) obniżenia stałej specyficzności w porównaniu do związku wyjściowego głównie poprzez obniżenie szybkości proteolizy tak otrzymanych związków (Rys. 9). Paralelne wprowadzenie pochodnych glikolu na N- i C-końcu w niewielkim stopniu wpływa na stałą specyficzności, jednocześnie sprawiając, że otrzymane peptydomimetyki są doskonale rozpuszczalne w roztworach wodnych [54].

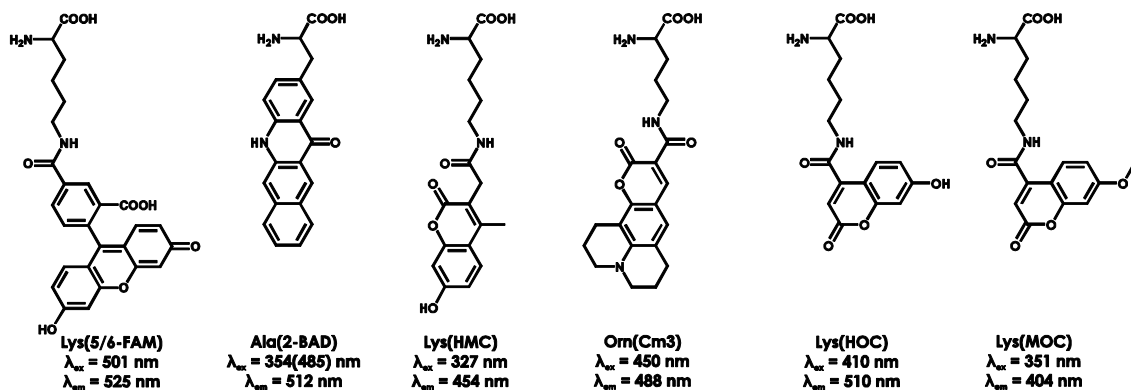


RYSUNEK 9: Schemat modyfikacji sekwencji substratów cząsteczką sfunkcjonalizowanego glikolu polietylenowego.

Wyselekcjonowane substraty o najwyższej stałej specyficzności samodzielnie poddałam ocenie ich właściwości biologicznych w Pracowni Hodowli Tkankowej Zakładu Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego kierowanego przez prof. dr hab Piotra Trzonkowskiego. Badania te polegały na ocenie ich zdolności do migracji przez błonę komórkową linii nowotworowych i zdrowych komórek. Niestety żaden z badanych substratów nie penetrował efektywnie błony komórkowej: linii nowotworowych (HELA, Jurkat), jak również nietransformowanych (ludzkie neutrofile i fibroblasty).

### Substraty modyfikowane w obszarze donora i akceptora fluorescencji

Kolejna modyfikacja substratów neutrofilnych proteinaz serynowych polegała na wymianie dotychczasowej pary donor - akceptor fluorescencji (ABZ – ANB-NH<sub>2</sub>) i wprowadzeniu w to miejsce zestawu pochodnych aminokwasowych Lys, Orn oraz Ala. Aminokwasy te posiadały w łańcuchu bocznym ugrupowania fluorescencyjne, których właściwości spektralne zostały dobrane tak, aby po wzbudzeniu donora emitował on promieniowanie w charakterystycznym obszarze widma, różnym dla każdego z badanych enzymów (Rys. 10).



RYSUNEK 10: Wzory strukturalne wybranych fluorescencyjnych pochodnych aminokwasowych Lys, Orn oraz Ala.

Następnie na podstawie naszych wcześniejszych prac oraz danych literaturowych wybraliśmy trzy sekwencje peptydowe, które ulegają selektywnej hydrolizie enzymatycznej przez jeden enzym należący do grupy neutrofilnych proteinaz serynowych (katepsyna G, ludzka elastaza neutrofilna i proteinaza 3). Do trzech wyselekcjonowanych sekwencji substratowych wprowadziłam na N- i C-końcu każdą z wybranych fluorescencyjnych par donor - akceptor (**para 1:** Lys(5/6-FAM) / Ala(2-BAD), **para 2:** Lys(HMC) / Orn(Cm3), **para 3:** Lys(HOC) / Lys(MOC)). Warto podkreślić, że na tym etapie otrzymaliśmy trzy nieopublikowane do tej pory kombinacje par donor - akceptor, których wartości maksimum emisji fluorescencji znacznie się od siebie różnią. Wartości stałych specyficzności wyznaczone dla 9 substratów były czynnikiem decydującym o wyborze odpowiedniej kombinacji znaczników fluorescencyjnych (tabela 7) [55].



TABELA 7: Parametry kinetyczne wyznaczone wobec neutrofilnych proteinaz serynowych.

SEKWENCJA	ENZYM	$K_M$ [M]×10 <sup>-6</sup>	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [s <sup>-1</sup> ×M <sup>-1</sup> ]×10 <sup>4</sup>
<b>(1) PEG-HOC-Tyr-Tyr-Abu-MOC</b>	<b>PR3</b>	<b>18,5±0,4</b>	<b>9,7±1,5</b>	<b>52,41±3,21</b>
(2) PEG-HOC-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-MOC	CG	27,6±5,3	3,1±0,4	11,21±0,95
(3) PEG-HOC-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-MOC	HNE	125,1±8,3	5,1±1,3	4,08±1,05
(4) PEG-FAM-Tyr-Tyr-Abu-BAD	PR3	31,4±2,2	3,8±1,2	12,22±5,27
(5) PEG-FAM-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-BAD	CG	9,9±1,1	2,7±0,3	27,27±1,51
<b>(6) PEG-FAM-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-BAD</b>	<b>HNE</b>	<b>24,2±3,1</b>	<b>6,2±0,9</b>	<b>25,60±1,64</b>
(7) PEG-HMC-Tyr-Tyr-Abu-CM3	PR3	24,3±1,2	7,8±0,7	32,15±2,83
<b>(8) PEG-HMC-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-CM3</b>	<b>CG</b>	<b>19,0±1,1</b>	<b>7,2±2,1</b>	<b>37,90±1,89</b>
(9) PEG-HMC-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-CM3	HNE	74,5±3,7	1,3±0,1	7,41±0,36

gdzie:

PEG = kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy; HOC = Lys(HOC)-OH, gdzie HOC = 7-hydroksy-2-kumaryna; MOC = Lys-(Moc)-OH, gdzie Moc = 7-metoksy-kumaryna; FAM = Lys(Fam)-OH, gdzie Fam = 5(6)-fluoresceina, BAD = Ala(BAD)-OH, gdzie Bad = [benzo]βlakrydyna-12(5H)-on-2-yl; HMC = Lys(Hmc)-OH, gdzie Hmc = 7-hydroksy-4-metylo kumaryna i CM3 = Orn(Cm3)-OH, gdzie Cm3 = 3-kumaryna 343.

Ostatecznie do dalszych badań wybraliśmy trzy peptydy charakteryzujące się najwyższymi stałymi specyficzności wobec badanych enzymów:

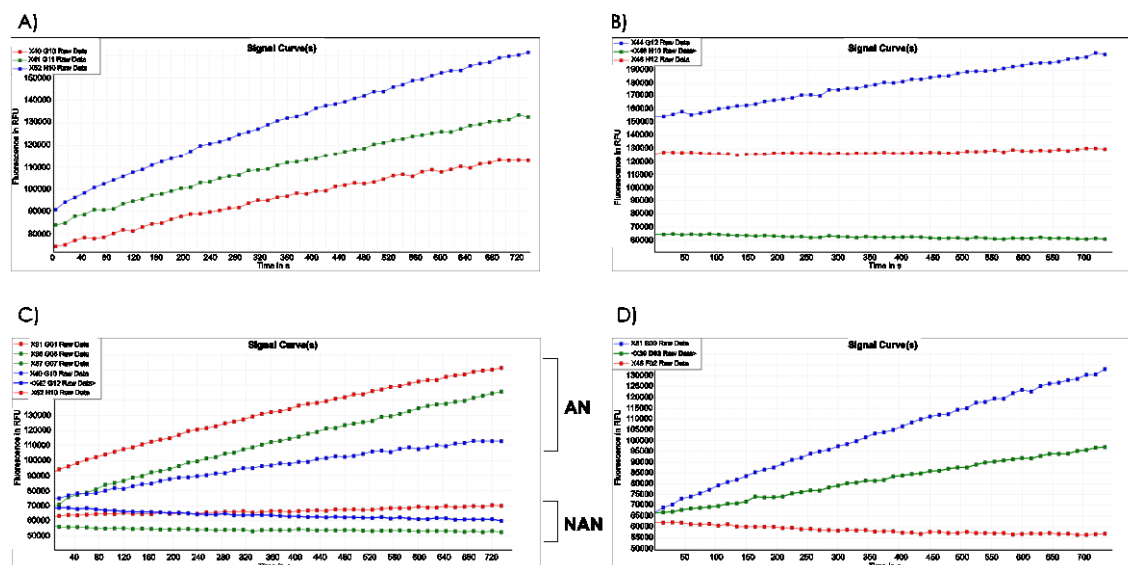
(1) PEG-HOC-Tyr-Tyr-Abu-MOC	PR3
(6) PEG-FAM-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-BAD	HNE
(8) PEG-HMC-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-CM3	CG

i poza parametrami kinetycznymi, wyznaczyliśmy minimalne stężenie enzymów skutkujące zauważalnym wzrostem fluorescencji. Otrzymane dane zamieściłam w **tabeli 8**.

TABELA 8: Limity oznaczalności wyznaczone dla wybranych substratów.

SEKWENCJA SUBSTRATU	ENZYM	LIMIT DETEKCJI [nM]
(1) PEG-HOC-Tyr-Tyr-Abu-MOC	PR3	1,8
(6) PEG-FAM-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-BAD	HNE	112,8
(8) PEG-HMC-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-CM3	CG	37,3

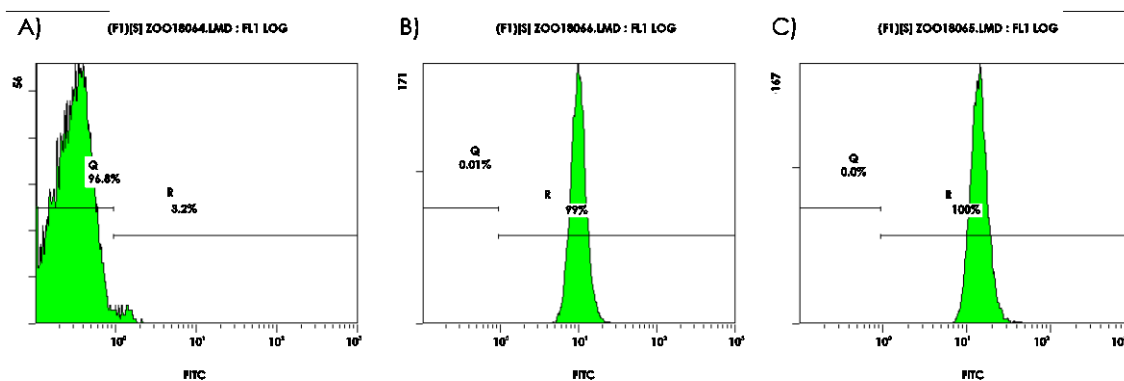
Ponadto dla każdego z nich oznaczyliśmy selektywność wobec badanych enzymów. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazywały, że wzrost fluorescencji peptydów jest następstwem hydrolizy enzymatycznej wiązania peptydowego P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'. Następnie powtórzyliśmy wybrane eksperymenty (wyznaczanie limitu detekcji) dla mieszaniny trzech substratów (PR3, CG, HNE) w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Wyniki eksperymentów przedstawiłam na **rysunku 11**.



**RYSUNEK 11:** Wzrost intensywności fluorescencji w czasie mierzony dla: A) inkubacja pojedynczego substratu z odpowiednim enzymem (substrat 1 z PR3, substrat 6 z HNE, substrat 8 z CG) przedstawione na jednym rysunku, B) równomolowa mieszanina substratów (1, 6 i 8) inkubowana z HNE, C) równomolowa mieszanina substratów inkubowana z nieaktywowanymi neutrofilami (NAN - dolne trzy linie) i aktywowanymi (AN - górne trzy linie), D) równomolowa mieszanina trzech substratów inkubowana z aktywowanymi neutrofilami z dodatkiem selektywnego inhibitora PR3. Kolory linii odpowiadają: czerwona -  $\lambda_{em} = 404$  nm (substrat PR3: PEG-HOC-Tyr-Tyr-Abu-MOC), niebieska -  $\lambda_{em} = 512$  nm (substrat HNE: PEG-FAM-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-BAD), zielona -  $\lambda_{em} = 454$  nm (substrat CG: PEG-HMC-Val-Thr-Gln-Ser-Asp-CM3).

W celu przeprowadzenia eksperymentów w obecności ludzkich neutrofilów nawiązaliśmy kontakt z grupą badawczą profesora Francisca Gauthier z Francuskiej Akademii Nauk w Tours (Francja) – światowego eksperta w dziedzinie badań nad neutrofilami i ich fluorescencyjnymi substratami. W efekcie tej współpracy przeprowadziliśmy szereg eksperymentów z użyciem trzech wyselekcjonowanych uprzednio substratów fluorescencyjnych. Inkubacja badanych substratów z aktywowanymi neutrofilami odpowiadała zakresowi stężeń określonego enzymu od 72 nM do 584 nM. W przypadku użycia nieaktywowanych neutrofilów poziom stężeń enzymów znajdował się poniżej limitu oznaczalności (0,32 nM). Minimalna ilość komórek w obecności których obserwowano zauważalny wzrost fluorescencji to: dla PR3 – 35 000 komórek, CG – 60 000 komórek, a HNE 180 000 komórek, podane wartości są obarczone 15% błędem.

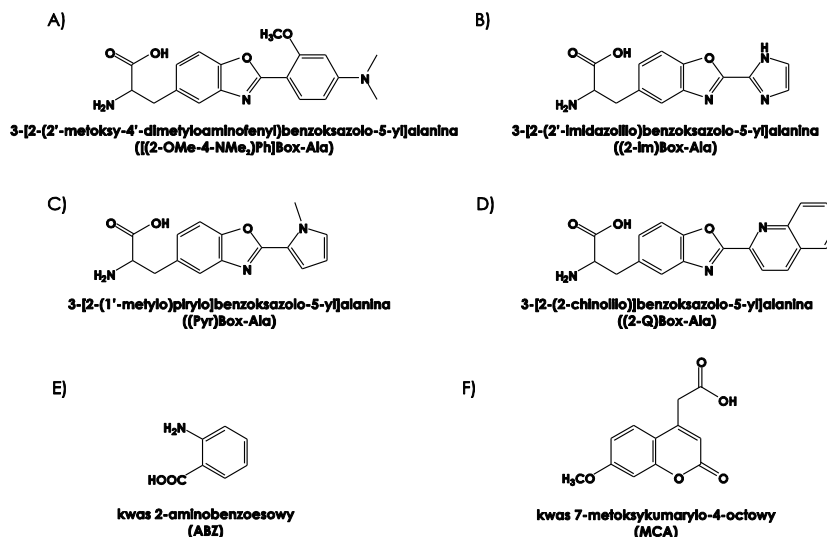
Ponadto, stosując substrat elastazowy: PEG-FAM-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-BAD (stężenie 45 nM) udowodniliśmy, że jest on zdolny do penetracji błony komórkowej i w obrębie komórki wykazuje zauważalny FRET, który wraz z czasem ulega zmniejszeniu (obserwuje się wzrost fluorescencji donora, a zmniejszenie akceptora), choć mechanizm tego procesu jest wciąż nieznan. Stopień penetracji błony komórkowej jest wysoki, choć zależny od czasu. Dane z cytometru przepływowego (rys. 12) wskazują, że najwyższą fluorescencję obserwujemy po 20 minutowej inkubacji komórek z substratem, a 60 minutowa inkubacja skutkuje obniżeniem fluorescencji komórek o jedną trzecią.



RYSUNEK 12: Analiza techniką cytometrii przepływowej nieaktywowanych ludzkich neutrofilów z substratem (6) (HNE); A) próbka kontrolna, B) inkubacja 5 minut, C) inkubacja 20 minut.

### Substraty modyfikowane w obszarze donora fluorescencji

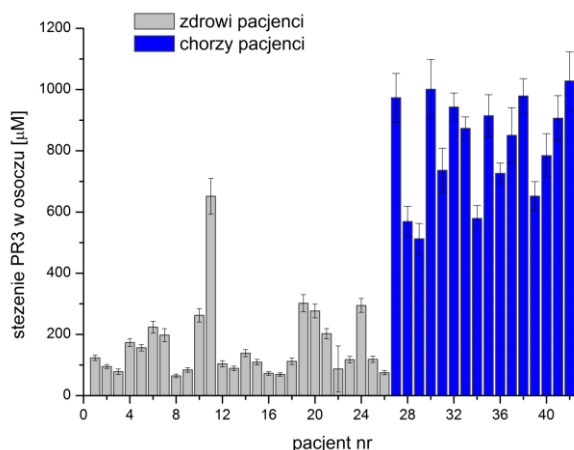
Kolejna strategia polegała na selekcji i badaniu aktywności jednego z enzymów proteolitycznych ludzkich neutrofilów – proteinazy 3. Sekwencją startową był substrat: ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH<sub>2</sub>, w którym postanowiliśmy zmodyfikować N-końcową grupę fluoroforu serią pochodnych benzoksazolo-L-alaniny (Rys. 13). W wyniku tych badań otrzymaliśmy substrat o sekwencji (Pyr)Box-Ala-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH<sub>2</sub> o stałej specyficzności  $k_{cat}/K_M = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ , ponad 8-krotnie wyżej od wartości uzyskanej dla sekwencji wyjściowej [50]. Ponadto wyselekcjonowany związek wykazywał niezwykle wysoką selektywność i w ludzkim serum ulegał hydrolizie tylko w obecności tego enzymu.



RYSUNEK 13: Struktury chemiczne pochodnych 3-(2-benzoksazolo-5-yl)alaniny (A-D), ABZ (E) i MCA (F) wprowadzonych na N-końiec peptydu.

Tak otrzymany związek wykorzystaliśmy do oznaczania aktywności badanego enzymu w ludzkim serum. Wstępne badania przeprowadzone we współpracy z dr Julią Kulczycką z Zakładu Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanego przez prof. dr hab. Piotra Trzonkowskiego na próbie 12 pacjentów wskazały na korelację aktywności tego enzymu ze stężeniem przeciwciał przeciwjądrowych (c-ANCA), które są jednym z markerów

ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (dawniej nazywaną chorobą Wegenera) poważnej choroby autoimmunoagresyjnej, która nieleczone prowadzi do śmierci chorego (**Rys. 14**) [72].



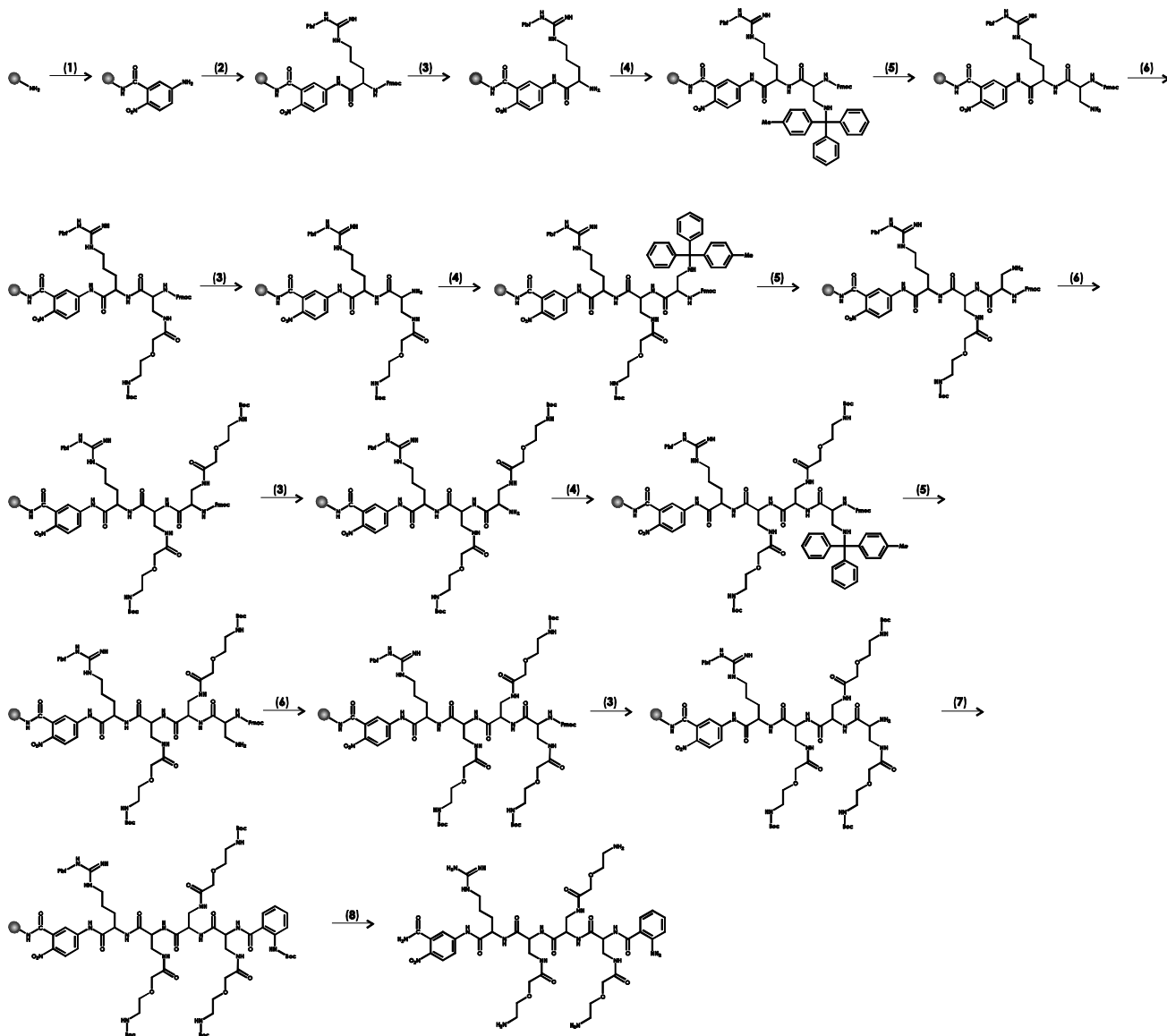
**RYSUNEK 14:** Graficzne przedstawienie wyników uzyskanych na próbie serum od 42 pacjentów (30 próbek c-ANCA – negatywnych i 12 próbek c-ANCA – pozytywnych).

Spodziewamy się, że opracowana przez nas metoda pozwoli w przyszłości na lepszą i szybszą diagnostykę tego poważnego schorzenia. Obecnie, w ramach współpracy z prof. dr hab. Zbigniewem Zdrojewskim kierownikiem Katedry Chorób Tkanki Łącznej i Geriatrii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, prowadzimy pogłębione badania na większej grupie pacjentów, u których poziom proteiny 3 i przeciwciał c-ANCA będzie korelowany z klinicznym przebiegiem choroby.

#### BIBLIOTEKA KOMBINATORYCZNA PEPTYDOMIMETYKÓW DAPEG

W ostatnim okresie skoncentrowałam swoje zainteresowania naukowe na otrzymaniu i badaniu właściwości fizykochemicznych i enzymatycznych zaprojektowanych przeze mnie innowacyjnej klasy peptydomimetykach [49]. Nowo otrzymane substraty zsyntetyzowałam metodą submonomeryczną według schematu przedstawionego na **rysunku 15**. Cyklicznie powtarzane etapy: przyłączania reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego w postaci pochodnej (Fmoc-Dap(Mtt)), usuwania ugrupowania ochronnego grupy  $\beta$ -aminowej ((Mtt - *p*-metylotrytylowej), semiortogonalnej do osłony Boc i Cbz), następnie proces przyłączania odpowiedniej pochodnej PEG o zmiennej ilości powtórzeń grupy oksaetylenowej oraz dodatkowo różniących się terminalną grupą funkcyjną. Powyższy schemat syntezy prowadził w rezultacie do otrzymania nowych cząsteczek peptydomimetyków, które nazwaliśmy DAPEG (jako hybryda reszty aminokwasowej DAP i pochodnej glikolu polietylenowego – PEG). W moim przekonaniu potencjał tej nowej klasy związków jest nieograniczony.

[72]. Kantari C., Pederzoli-Ribeil M., Amir-Moazami O., Gausson-Dorey V., Moura I.C., Lecomte M.C., Benhamou M., Witko-Sarsat V., *Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis*, Blood, (2007), 110, 4086-4095.

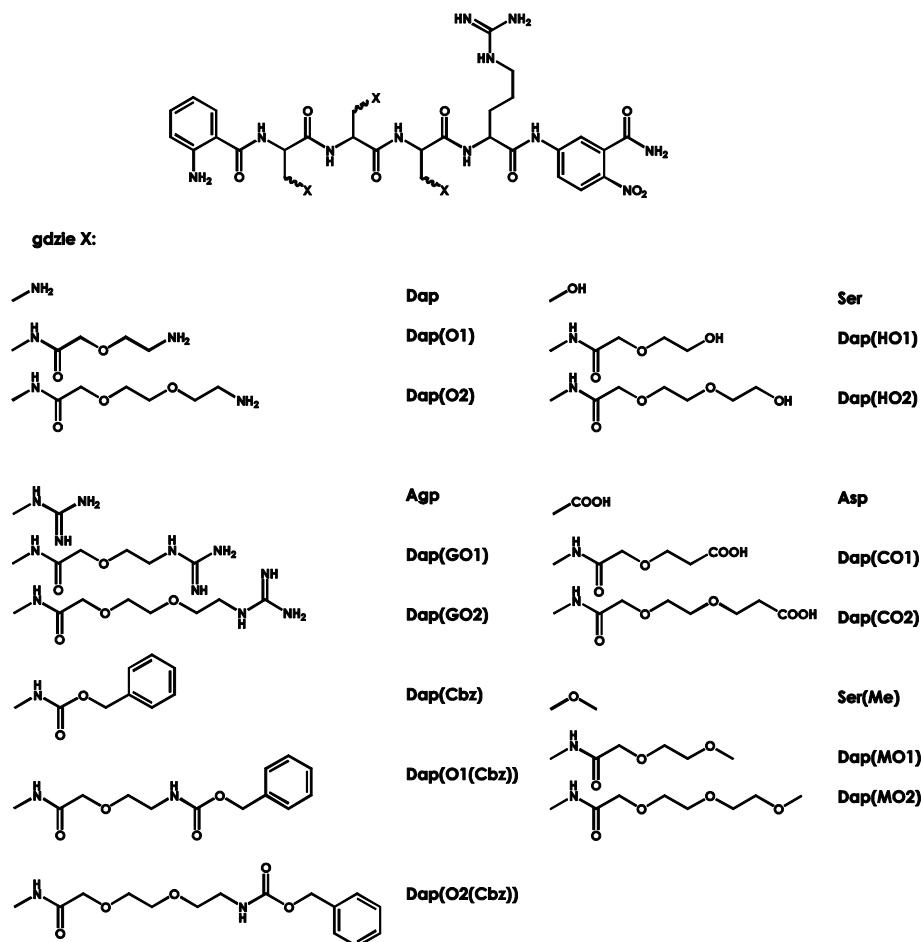


- (1) a ANB (3 eq.), TBTU (3 eq.), DMAP (2 eq.), DIPEA (6 eq.)  
 b ANB (3 eq.), HBTU (3 eq.), DMAP (2 eq.), DIPEA (6 eq.)  
 c ANB (3 eq.), HATU (3 eq.), DMAP (2 eq.), DIPEA (6 eq.)  
 (2) Fmoc-Arg(Pbf) (9 eq.), POCl<sub>3</sub> (9 eq.) w pirydynie  
 -15°C (20'), 20°C (30'), 40°C (6h)  
 (3) 20% piperydyna w NMP  
 (4) Fmoc-Dap(Mtt) (3 eq.), TBTU (3 eq.), DIPEA (6 eq.)  
 (5) a TFA/TIS/DCM (1:2:97 v:v:v) (30')  
 b 1% DIPEA in DMF (2×3')  
 (6) O1(Boc) (2 eq.), TBTU (2 eq.), DIPEA (4 eq.)  
 (7) Boc-ABZ (2 eq.), TBTU (2 eq.), DIPEA (4 eq.)  
 (8) usuwanie peptydów z żywicy: TFA/fenol/TIS/H<sub>2</sub>O (88:5:2:5 v/v)

RYSUNEK 15: Schemat syntezy metodą submonomeryczną peptydomimetyków DAPEG.

Ze względu na niezwykle wręcz elastyczność pochodnych glikolu polietylenowego i szeroki wachlarz grup funkcyjnych tego typu związku, w połączeniu z określoną kombinacją powtórzeń grupy oksaetylenowej oraz wspomnianych ugrupowań chemicznych mają możliwość dopasowania się do cząsteczki docelowej liganda.

Selekcję sekwencji substratu o najwyższej podatności na proteolizę wobec nowoodkrytej proteiny neutrofilii ludzkich NSP4 [73] o specyficzności trypsynowej przeprowadziłam metodami chemii kombinatorycznej syntetyzując bibliotekę zamieszczoną na **rysunku 16**.

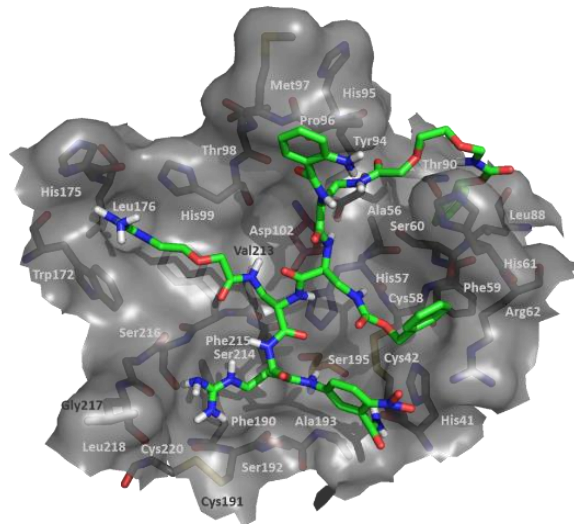


RYSUNEK 16: Wzór ogólny biblioteki kombinatorycznej DAPEG.

Otrzymany w wyniku dekonwolucji powyższej biblioteki substrat:

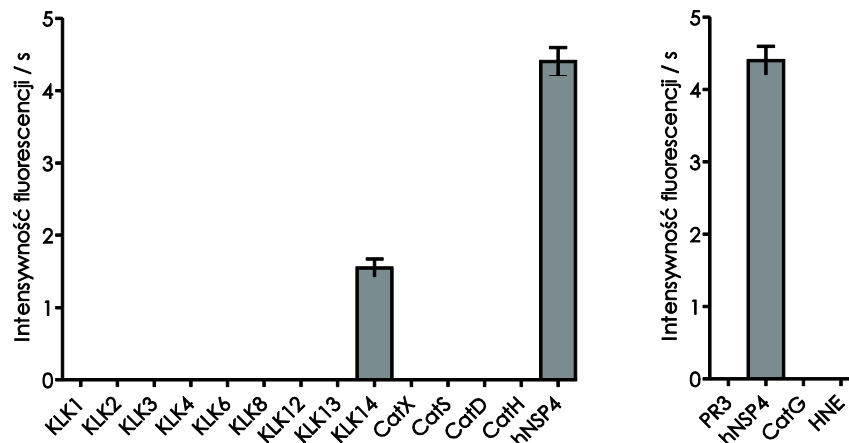
ABZ-Dap(O2(Cbz))-Dap(Cbz)-Dap(GO1)-Arg-ANB-NH<sub>2</sub> jest zupełnie nowym peptydomimetykiem oddziałującym, według wyników modelowania molekularnego, z centrum aktywnym enzymu poza klasycznymi miejscami wiązania, a dokładniej w miejscach na powierzchni enzymu zdefiniowanych jako drugorzędowe miejsca wiązania oddalone od miejsca aktywnego (ang. exosites) (**Rys. 17**).

[73]. Hu H.Y., Gehrig S., Reither G., Subramanian D., Mall M.A., Plettenburg O., Schultz C, *FRET-based and other fluorescent proteinase probes*, *Biotechnol J.*, (2014), 9, 266-281.



RYSUNEK 17: Model oddziaływań proteiny NSP4 z otrzymanym substratem:  
 ABZ-Dap(O2(Cbz))-Dap(Cbz)-Dap(GO1)-Arg-ANB-NH<sub>2</sub>.

W ramach współpracy z prof. dr hab. Zbigniewem Szewczukiem z Zespołu Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek, Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego dokonaliśmy analizy fragmentacyjnej MS/MS nowego substratu i otrzymane wyniki w pełni dokumentują jego budowę. Wykonaliśmy również badania dwuwymiarowego NMR, które potwierdziły budowę jego cząsteczki. Otrzymany substrat oddziałuje z NSP4 w sposób niezwykle wydajny (stała specyficzności  $k_{cat}/K_M$  ponad  $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ) i niezwykle selektywny (wśród 16 enzymów eksperymentalnych tylko jeden – KLK 14 w nieznaczny sposób hydrolizowała otrzymany przeze mnie związek) (Rys. 18).



RYSUNEK 18: Selektowność substratu ABZ-Dap(O2(Cbz))-Dap(Cbz)-Dap(GO1)-Arg-ANB-NH<sub>2</sub>.

**PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH OŚIĄGNIĘĆ:**

1. W wyniku prowadzonych badań (stosując techniki chemii kombinatorycznej oraz syntezę równoległą) otrzymaliśmy **67** substratów fluorogenicznych i **2** inhibitory przedstawione w **tabeli zbiorczej 9**.
2. Wraz ze współpracownikami dokonałam charakterystyki specyficzności substratowej **9** proteinaz (**8** serynowych i **1** cysteinowej).
3. Opracowaliśmy nowe metody syntetyczne i strategię pozwalającą na otrzymanie bibliotek peptydowych zawierających substraty fluorogeniczne.
4. Dla **7** wybranych enzymów zsyntetyzowaliśmy 10 bibliotek kombinatorycznych (zawierających w sumie **177 307** związków), których rozwiązanie (dekonwolucja) zaowocowało otrzymaniem niezwykle selektywnych substratów.
5. Opracowaliśmy metodę analizy proteinazy 3 w materiale biologicznym, przy użyciu której możliwa jest wstępna diagnostyka ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń.
6. Otrzymaliśmy system substratów pozwalających na jednoczesną analizę trzech enzymów należących do grupy neutrofilnych proteinaz serynowych.
7. Opracowaliśmy metodę syntezy nowych peptydomimetyków, których elementami budulcowymi są reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego modyfikowane w łańcuchu bocznym funkcjonalizowanymi łańcuchami kwasu mono- lub dioksaetylenowego. Wymienione wyżej pochodne użyliśmy, jako elementy składowe tetrapeptydowej biblioteki substratów – peptydomimetyków, w której trzy pozycje zmienne (zawierały równomolową mieszaninę użytych związków), a jedna nie ulegała modyfikacjom. W wyniku procesu dekonwolucji takiej biblioteki otrzymaliśmy wydajne i niezwykle selektywne substraty proteinaz trypsynopodobnych, takich jak NSP4 czy kalikreina 14.
8. Zaproponowaliśmy zastosowanie otrzymanych substratów podjednostki chymotrypsynowej proteasomu 20S, jako narzędzi do diagnostyki nowotworu pęcherza moczowego.

**TABELA 9:** Struktury pierwszorzędowe otrzymanych związków.

SEKWENCJA	ENZYM	NUMER ANALOGU W PUBLIKACJI	NUMER PUBLIKACJI
1. ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-Gln-NH <sub>2</sub>	PR3/ HNE	14	H.1.
2. ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-Asn-NH <sub>2</sub>		16	
3. [(2-OMe-4-NMe) <sub>2</sub> Ph]Box-Ala-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH <sub>2</sub>		1	
4. (2-im)Box-Ala-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH <sub>2</sub>		2	
5. (Pyr)Box-Ala-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH <sub>2</sub>	PR3	3	H.2.
6. (2-Q)Box-Ala-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH <sub>2</sub>		4	
7. MCA-Ala-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH <sub>2</sub>			



8.	ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH <sub>2</sub>		1	
9.	ABZ-Arg-Gln-Asp-Lys-ANB-NH <sub>2</sub>		2	
10.	ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-H	HAT	1a	H.3.
11.	ABZ-Arg-Gln-Asp-Lys-H		2a	
12.	ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		1A	
13.	PEG-ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-NH <sub>2</sub>	PR3	1B	
14.	PEG-ABZ-Tyr-Tyr-Abu-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		1C	
15.	ABZ-Phe-Val-Thr-Gnf-ANB-NH <sub>2</sub>		2	
16.	ABZ-Phe-Val-Thr-Gnf-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		2A	
17.	PEG-ABZ-Phe-Val-Thr-Gnf-ANB-NH <sub>2</sub>	CG	2B	
18.	PEG-ABZ-Phe-Val-Thr-Gnf-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		2C	
19.	ABZ-Phe-Phe-Pro-Val-ANB-NH <sub>2</sub>		3	
20.	ABZ-Phe-Phe-Pro-Val-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		3A	H.4.
21.	PEG-ABZ-Phe-Phe-Pro-Val-ANB-NH <sub>2</sub>	HNE	3B	
22.	PEG-ABZ-Phe-Phe-Pro-Val-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		3C	
23.	ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>		4A	
24.	PEG-ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH <sub>2</sub>		4B	
25.	PEG-ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-PEG-NH <sub>2</sub>	HAT	4C	
26.	PEG <sub>2</sub> -ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH <sub>2</sub>		4D	
27.	PEG <sub>3</sub> -ABZ-Arg-Gln-Asp-Arg-ANB-NH <sub>2</sub>		4E	
28.	PEG-HOC-Tyr-Tyr-Abu-MOC	PR3	1	
29.	PEG-HOC-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-MOC	CG	2	
30.	PEG-HOC-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-MOC	HNE	3	
31.	PEG-FAM-Tyr-Tyr-Abu-BAD	PR3	4	
32.	PEG-FAM-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-BAD	CG	5	H.5.
33.	PEG-FAM-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-BAD	HNE	6	
34.	PEG-HMC-Tyr-Tyr-Abu-CM3	PR3	7	
35.	PEG-HMC-Val-Thr-Gnf-Ser-Asp-CM3	CG	8	
36.	PEG-HMC-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Asp-Arg-Gln-CM3	HNE	9	
37.	ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		2	
38.	ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		3	
39.	ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	PR3	4	H.7.
40.	ABZ-Tyr-Tyr-Abu-Asn-Glu-Pro-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		5	
41.	ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		I	
42.	ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ala-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	MT-2	II	H.8.
43.	ABZ-Ile-Arg-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		III	
44.	ABZ-Bip-Arg-Ala-Ser-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>			
45.	ABZ-Bip-Arg-Ala-Gln-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	Cat L		H.9.
46.	ABZ-Bip-Arg-Ala-Ala-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>			

47.	ABZ-Ile-Met-Thr-Abu-Tyr-Met-Phe-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		1	
48.	ABZ-Ile-Met-Thr-Abu-Tyr-Met-Trp-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		2	
49.	ABZ-Ile-Met-Thr-Abu-Tyr-Met-His-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		3	
50.	ABZ-Ile-Met-Thr-Ser-Tyr-Met-Phe-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	HtrA2	1a	H.10.
51.	ABZ-Ile-Met-Val-Ser-Tyr-Met-Phe-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		1b	
52.	ABZ-Ile-Met-Val-Abu-Tyr-Met-Phe-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		1c	
53.	ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		1	
54.	ABZ-Val-Val-Ser-CPA-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		2	
55.	ABZ-Val-Val-Ser-TBA-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		3	
56.	ABZ-Val-Val-Ser-FEA-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		4	
57.	ABZ-Val-Val-Ser-FNA-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		5	
58.	ABZ-Val-Val-Ser-EPA-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		6	
59.	ABZ-Val-Val-Ser-Har-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		7	
60.	ABZ-Val-Val-Ser-NIA-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	20S	8	H.11.
61.	ABZ-Val-Val-Ser-AGP-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		9	
62.	ABZ-Val-Val-Ser-AGB-Ser-Leu-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		10	
63.	ABZ-Val-Val-Ser-Lys-Ala-Ser-Leu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		11	
64.	ABZ-Val-Val-Ser-Orn-Ala-Ser-Leu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		12	
65.	ABZ-Val-Val-Ser-GNF-Ala-Ser-Leu-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		13	
66.	ABZ-Val-Val-Ser-Arg-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		14	
67.	ABZ-Val-Val-Ser-GNF-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>		15	
68.	ABZ-Val-Val-Ser-Arg-ANB-NH <sub>2</sub>		16	
69.	ABZ-Dap(O <sub>2</sub> (Cbz))-Dap(Cbz)-Dap(GO1)-Arg-ANB-NH <sub>2</sub>	NSP4	3	H.12.

## VI. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH (ARTYSTYCZNYCH):

### Okres 1998 – 2008 (przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora)

W latach 1998 – 2003 studiowałam na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Wykonywana w okresie studiów magisterskich praca badawcza dotyczyła syntezy fragmentu ludzkiego białka prionu 91-120. Temat będący przedmiotem pracy magisterskiej realizowałam w ramach współpracy prof. dr hab. Krzysztofa Rolki z prof. dr hab. Henrykiem Kozłowskim z Wydziału Chemii Uniwersytetu we Wrocławiu. Pracę magisterską: *Chemiczna synteza fragmentu 91-120 ludzkiego białka prionu* wykonywałam pod opieką dr Hanny Miecznikowskiej (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański), a w roku 2003 uzyskałam tytuł zawodowy magistra.

W październiku 2003 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Katedrze Chemii Bioorganicznej (obecnie Katedra Biochemii Molekularnej) Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę doktorską: *Zastosowanie metod chemii kombinatorycznej w syntezie substratów*

*chromogenicznych wybranych proteinaz* wykonywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Rolki. Pracę doktorską obroniłam w czerwcu 2008 roku uzyskując stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie chemii.

Głównymi zagadnieniami mojej pracy było zaprojektowanie oraz synteza bibliotek peptydowych substratów chromogenicznych zawierających na C-końcu resztę kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (ANB). W trakcie prowadzonych badań scharakteryzowałam cztery proteiny serynowe (bydlęcą  $\alpha$ -chymotrypsynę, oraz trzy proteiny neutrofilne: ludzką elastazę, katepsynę G oraz proteinazę 3). W wyniku badań enzymatycznych otrzymanych bibliotek wyselekcjonowałam 13 sekwencji peptydowych najwydajniej ulegających hydrolizie pod wpływem badanych proteinaz. Otrzymane substraty poddałam dalszym modyfikacjom uzyskując ich 59 analogów.

Wyniki wszystkich prowadzonych prac badawczych z okresu 2003–2008 zostały przedstawione na 3 konferencjach (w tym jedna o zasięgu międzynarodowym) oraz opublikowane w 5 artykułach naukowych (Załącznik 3) znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (sumaryczny IF 12,44).

W trakcie studiów doktoranckich prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne z Biochemii dla studentów Chemii oraz Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz ćwiczenia laboratoryjne z Chemii Organicznej dla studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

#### **Okres 2008 – 2016 (po uzyskaniu stopnia naukowego doktora)**

We wrześniu 2008 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Bioorganicznej (obecnie Katedrze Biochemii Molekularnej) Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, a od lutego 2009 roku pracuję na stanowisku adiunkta.

#### **Do głównych zagadnień naukowo badawczych podjętych po uzyskaniu stopnia doktora należą:**

1. Określanie specyficzności substratowej wybranych enzymów proteolitycznych poprzez projektowanie, syntezę metodami chemii kombinatorycznej bibliotek peptydowych oraz ich analizę biochemiczną. Wybrane proteiny to: cztery neutrofilne proteiny serynowe (HNE, CG, PR3 oraz NSP4), ludzkie: tryptaza, matryptaza-2, HtrA2, Cat L, proteasom 20S oraz szereg enzymów bakteryjnych (SufA, SplD, Stp A, B i C).
2. Projektowanie, synteza oraz badania biologiczne selektywnych i wydajnie hydrolizowanych substratów, jako sond molekularnych wybranych enzymów o istotnym znaczeniu w diagnostyce medycznej – (proteinaza 3, elastaza neutrofilna, proteasom 20S).

3. Opracowanie strategii oznaczania specyficzności substratowej enzymów w obszarze reszt C-końcowych.
4. Projektowanie nowych jednostek strukturalnych peptydów będących podstawionymi resztami kwasu L-2,3-diaminopropionowego (DAP) modyfikowanego w łańcuchu bocznym pochodnymi glikolu polietylenowego (PEG) i bibliotek z nich złożonych do otrzymania nowych sond molekularnych wybranych enzymów proteolitycznych.
5. Uczestnictwo w badaniach nad określaniem właściwości antymikrobiotycznych wybranych peptydów (OGTI i HV-BBI) i ich peptydomimetyków oraz ocenie ich potencjału hamowania wzrostu bakterii patogennych.
6. Poszukiwanie nowych typów inhibitorów niskocząsteczkowych proteiny 3 i katepsyny G: aldehydowych i fosfonowych pochodnych peptydów.
7. Udział w pracach dotyczących otrzymywania cząsteczek inhibitorów wybranych proteinaz serynowych, których sekwencję wyjściową stanowiła cząsteczka SFTI-1.
8. Badania biologiczne fluorescencyjnych pochodnych SFTI-1.

Stosunkowo szeroki zakres prowadzonych prac naukowo-badawczych z pogranicza chemii i biochemii wymagał interdyscyplinarnego podejścia do analizy problemów oraz nawiązania współpracy naukowych z wieloma uznanymi ośrodkami badawczymi:

1. Prof. Timo Burster, *Department of Neurosurgery, Ulm University Medical Center, Ulm Germany*; współpraca obejmuje badania komórkowe wybranych substratów i inhibitorów.
2. Prof. Wiesław Wiczak, *Pracownia Fotobiofizyki, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański*; współpraca dotyczy otrzymywania nowych związków fluorescencyjnych i ich zastosowaniu, jako donory fluorescencji w projektowaniu nowych wydajnych substratów enzymów proteolitycznych.
3. Dr Julia Kulczycka, *Laboratorium Immunologii i Transplantologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku*; współpraca dotyczy oznaczania aktywności proteiny 3 w osoczu ludzkim.
4. Prof. Francis Gauthier i dr Brice Korkmaz, *Faculté de Médecine de Tours, Université François Rabelais in Tours, France*; współpraca dotyczy badań komórkowych wykonywanych na neutrofilach ludzkich.
5. Prof. Józef Oleksyszyn i dr hab. Marcin Sieńczyk, *Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii Wydział Chemicznego Politechniki Wrocławskiej*; współpraca skoncentrowana jest na projektowaniu i syntezie chemicznej nieodwracalnych inhibitorów (peptydomimetyków fosfonowych) wybranych proteinaz.
6. Prof. Barbara Lipińska, *Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański*; współpraca dotyczy projektowania, syntezy chemicznej oraz badań enzymatycznych

substratów i modulatorów aktywności enzymów z rodziny HtrA.

7. Prof. Dieter Jenne, *Helmholtz Centrum w Monachium*; współpraca dotyczy określania specyficzności i syntezy sond molekularnych neutrofilnej proteiny 4.
8. Prof. Nathaniel Martin, *Faculty of Science, Utrecht University, The Netherlands*; współpraca dotyczy projektowania i syntezy nowych substratów proteasomu ludzkiego.
9. Dr hab. Ewa Gorodkiewicz, *Zakład Elektrochemii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku*; współpraca dotyczy badań nad substratami ludzkiego proteasomu.
10. Dr Mizuki Kitamatsu, *Department of Bioscience and Biotechnology, Okayama University, Japonia*; współpraca dotyczy syntezy fluorescencyjnych pochodnych Lys, Orn i Ala i ich wykorzystania do syntezy substratów proteinaz neutrofilii ludzkich.

Wyniki wszystkich badań uzyskanych w okresie 2008–2016 (po uzyskaniu stopnia naukowego doktora) zostały przedstawione w formie: **32** artykułów w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports: (Analytical Biochemistry, Analytical Chemistry, Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, Biochimie, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Biopolymers, Chembiochem, Current Pharmaceutical Design, Journal of Biological Chemistry, Journal of Peptide Science, Molecular Diversity, Peptides, PLoS ONE, Protein and Peptide Letters, Scientific Reports)*, **13** prac opublikowanych w recenzowanych sprawozdaniach zjazdowych, **1** zgłoszenia patentowego, a także zostały zaprezentowane w formie **55** referatów ustnych lub prezentacji posterowych na 16 konferencjach naukowych (krajowych i międzynarodowych).

Mój pełen dorobek naukowo-dydaktyczny został omówiony szczegółowo w Załączniku 3.

→ **Mój łączny dorobek naukowy to 37 opublikowanych prac z listy JCR,  
1 zgłoszenie patentowe.**

**Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora byłam współautorem 5 opublikowanych prac z listy JCR.**

→ **Sumaryczny Impact Factor (zgodny z rokiem publikacji) opublikowanych prac wynosi 107,75  
(przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora 12,44).**

→ **Liczba cytowań w latach 2008 – 2016 (bez autocytowań) wg. WoS wynosi 157  
(przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora – 17)**

→ **Indeks Hirsha – 10 (wg. WoS).**

Prowadzone przeze mnie prace naukowo-badawcze finansowane były/są przez: **Komitet Badań Naukowych** (grant promotorski), **Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego** (3 granty Iuventus Plus), **Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego** (4 granty). Obecnie pełnię funkcję opiekuna naukowego grantu NCN (Preludium 5) mgr Jadwigi Popow-Stellmaszyk:

*Fluorescencyjne substraty proteinaz neutrofilii: projektowanie, synteza, selekcja metodami chemii kombinatorycznej oraz ich zastosowanie w charakterystyce wybranych enzymów proteolitycznych.*

W zakresie aktywności dydaktycznej prowadzę następujące zajęcia dla studentów Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego: Biochemia (ćwiczenia laboratoryjne), Biochemia (ćwiczenia audytoryjne), pracownice: dyplomową, specjalizacyjną oraz magisterską dla studentów Katedry Biochemii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Dotychczas wypromowałam 7 dyplomantów i 10 magistrów. Aktualnie jestem opiekunem dwóch prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym w dwóch pracach doktorskich: *Badanie specyficzności substratowej ludzkiego proteasomu metodami chemii kombinatorycznej* (mgr Natalia Gruba, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) i *Substraty i niskocząsteczkowe inhibitory wybranych enzymów proteolitycznych z rodziny kallikrein. Synteza chemiczna i badania enzymatyczne* (mgr Anna Wojtyśiak, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański).

#### **Dalsze plany naukowo-badawcze:**

Moje plany naukowo-badawcze na najbliższe lata można podzielić na kilka głównych nurtów:

1. Projektowanie, synteza i charakterystyka związków, których elementy budulcowe stanowią będą reszty DAPEG. W najbliższym czasie planuję otrzymać biblioteki dla enzymów proteolitycznych o specyficzności chymotrypsynowej i elastazowej.
2. Wykorzystując selektywne sekwencje substratów planuję otrzymać na drodze syntezy chemicznej konjugaty tych związków z kropkami kwantowymi. Uzyskane w ten sposób nowe substraty zamierzam scharakteryzować i poddać badaniom biologicznym.
3. Charakterystyka enzymów z rodziny kalikrein (substraty, inhibitory).
4. Wybrane selektywne związki planuję przyłączyć do elektrod o określonych właściwościach, tak aby otrzymać nowy innowacyjny system detekcji enzymów proteolitycznych. Prace te zamierzam prowadzić w ramach współpracy z grupą badawczą prof. dr hab. Tadeusza Ossowskiego z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.
5. Kolejnym obszarem badawczym, który można uznać za kontynuację dotychczas prowadzonych prac, będzie diagnostyka wybranych stanów patologicznych w materiale biologicznym (min. ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń, rak pęcherza itp.). Prace te prowadzimy w ramach współpracy zespołu z zespołami lekarzy z: Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (prof. dr hab. Zbigniew Zdrojewski, dr hab. Marcin Matuszewski), Oddziału Urologii Onkologicznej i Ogólnej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Białymstoku (dr Tomasz Guszcz) oraz Instytutu Chorób Płuc i Gruźlicy w Warszawie (prof. dr hab. Joanna Chorostowska-Wynimko).

Magdalena Wysocka