

Wieloparametryczna analiza aktywności enzymów proteolitycznych przy użyciu cytometrii masowej

STRESZCZENIE

Enzymy proteolityczne, inaczej proteazy, są katalizatorami komórkowymi, które odpowiedzialne są za przyspieszenie reakcji hydrolizy wiązania amidowego w substratach białkowych. Proteazy stanowią kluczowy element w wielu ścieżkach sygnalizacyjnych komórki oraz umożliwiają utrzymanie homeostazy. Aktywność tych enzymów jest kontrolowana przez wewnątrzkomórkowe inhibitory, które uniemożliwiają nadmierną hydrolizę substratów białkowych. W przypadku mutacji genowych bądź chorób prowadzących do zaburzenia działania enzymów proteolitycznych, istnieje możliwość wystąpienia poważnych stanów patofizjologicznych, takich jak m.in. choroby neurodegeneracyjne, nowotworzenie czy zaburzenia krzepnięcia krwi. W związku z powyższym, precyzyjna analiza aktywności poszczególnych proteaz jest niezwykle istotna w ocenie stanu fizjologicznego poszczególnych komórek czy tkanek. Do dziś złotym standardem w tego typu badaniach jest zastosowanie tzw. markerów chemicznych, które nieodwracalnie łączą się z celowanym białkiem bądź grupą białek, tylko i wyłącznie w ich katalitycznie aktywnej formie, umożliwiając ich detekcję w próbkach biologicznych. Głównym problemem w zastosowaniu tych narzędzi chemicznych jest fakt, iż wiele proteaz współpracuje ze sobą w niezwykle złożonych komórkowych sieciach sygnalizacyjnych. W związku z tym, niezbędne jest przeprowadzenie wieloparametrycznej analizy, która ukaże wszystkie badane elementy aktywnie działające w obrębie danego systemu. W niniejszej pracy opisano główne założenia rozprawy doktorskiej dr inż. Katarzyny Groborz, które odnoszą się do projektowania, syntezy oraz walidacji nowego typu narzędzi chemicznych do badania aktywności proteaz przy użyciu cytometrii masowej. Otrzymane narzędzia, nazwane markerami chemicznymi typu TOF (ang. *Time Of Flight*), posiadają zalety tradycyjnych markerów chemicznych oraz umożliwiają wieloparametryczną analizę złożonych systemów biologicznych przy użyciu nowoczesnej technologii, jaką jest cytometria masowa.

WPROWADZENIE

Ostatnie dwa dziesięciolecia charakteryzują się niemal eksponentywnym wzrostem wiedzy w dziedzinach biologii, chemii oraz ich pochodnych. To z kolei wiąże się z podobnym tempem wzrostu zapotrzebowania na coraz to doskonalsze, niezwykle precyzyjne i relatywnie łatwo dostępne technologie, które umożliwiłyby naukowcom z różnych dziedzin prowadzenie badań interesujących ich systemów. Cytometria przepływowa, której wynalezienie datowane jest na 1934 rok [1], jest jedną z kilku technologii, które umożliwiły ogromny rozwój nauk biologicznych i medycznych. Jest to technika analityczna, która opiera się o wykorzystanie przeciwciał znakowanych fluoroforami w celu detekcji poszczególnych cząsteczek biologicznych. Mechanizm działania cytometru przepływowego jest stosunkowo prosty - po odpowiednim przygotowaniu zawiesiny oznakowanych komórek, próbka jest kierowana cienkim strumieniem przez optoelektryczny układ rejestrujący, gdzie pojedyncze komórki są oświetlane przez wiązki monochromatycznego światła spolaryzowanego (lasera) [2]. W aparacie stosowane jest tzw. ogniskowanie hydrodynamiczne, w którym płyn osłaniający płynie szybciej niż centralny strumień zawierający komórki. Cyfrowe układy elektroniczne oraz stały układ optyczny w klasycznym cytometrze przepływowym pozwalają na jednoczesną, wieloparametrową analizę około 12 (w niektórych źródłach mowa jest o 16 [3]) znaczników fluorescencyjnych oraz dwóch parametrów rozpraszania. Cytometria przepływowa jest bardzo wydajną metodą, która pozwala na analizę dużej ilości próbek w stosunkowo krótkim czasie. Jedną z najważniejszych wad tej techniki jest występowanie niespecyficznego sygnału pochodzącego od nakładających się widm absorpcji i emisji fluoroforów skoniungowanych z przeciwciałami [3,4]. Dodatkowymi źródłami niespecyficznego sygnału są autofluorescencja komórkowa oraz produkty degradacji fluoroforów użytych do analizy [4]. Niemniej jednak, cytometria przepływowa umożliwiła ogromny postęp w dziedzinach biologicznych i znalazła zastosowanie m.in. w diagnostyce chorób autoimmunologicznych czy badaniu cyklu komórek nowotworowych [5].

dr inż. Katarzyna Małgorzata Groborz✉

Genentech Inc. South San Francisco, USA

https://doi.org/10.18388/pb.2021_477

✉autor korespondujący: groborzk@gene.com

Słowa kluczowe: analiza aktywności enzymatycznej, cytometria masowa, enzymy proteolityczne, inhibitory proteaz, markery chemiczne, proteazy cysteinowe,

Wykaz stosowanych skrótów: Marker chemiczny – małowartościowy związek chemiczny służący do badania aktywności enzymatycznej, składający się z: grupy wiążącej, tworzącej nieodwracalny kompleks z badanym enzymem w stosunku 1:1; linkera; grupy reporterowej/ znacznika, który umożliwia detekcję (oraz lokalizację) badanego białka. Marker TOF (ang. *Time Of Flight*) – zaprojektowane i opracowane w pracy doktorskiej dr inż. Groborz markery chemiczne, w których grupą reporterową jest ugrupowanie DOTA ze schelatowanym jodem metalu (lantanowca); wykorzystane w cytometrii masowej. Znacznik/ Grupa reporterowa – jeden z trzech elementów małowartościowych markerów chemicznych - grupa chemiczna, którą wykrywa się za pomocą poszczególnych technik wizualizacji, np. fluorofory w mikroskopii fluorescencyjnej.

ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY W RAMACH

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Firmy Merck sp. z o.o. za Najlepszą Pracę Doktorską z Biochemii im. Witolda Drabikowskiego

Laureat: dr Katarzyna Groborz

TYTUŁ ROZPRAWY: Narzędzia chemiczne do badania enzymów proteolitycznych przy użyciu cytometrii masowej

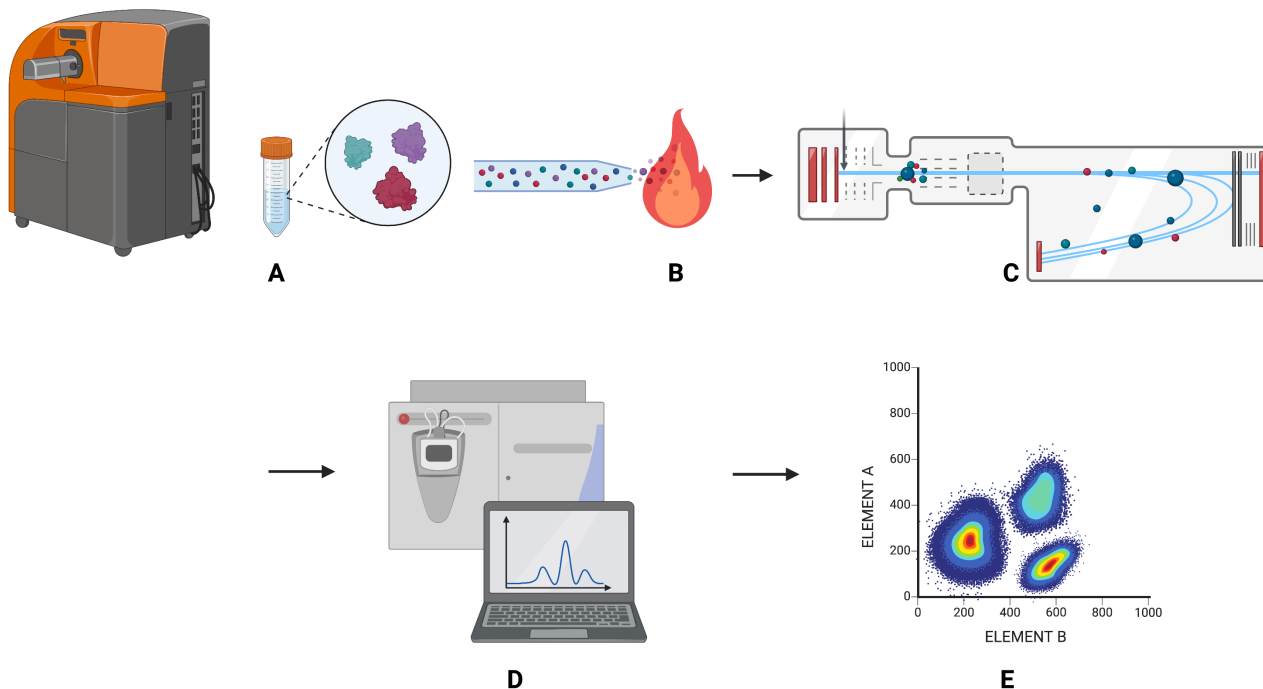
Promotor: prof. dr hab. Marcin Drąg

Z upływem czasu zapotrzebowanie na coraz to bardziej skomplikowane analizy cytometryczne wzrastało, w związku z czym poszukiwano bardziej wydajnego systemu, który posiadałby zalety cytometrii przepływowej oraz dodatkowo umożliwił detekcję większej liczby parametrów. Cytometria masowa typu TOF (ang. *Time Of Flight*) (technologia CyTOF) jest stosunkowo nową techniką, która opiera się o spektrometrię mas sprzężoną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS), w której to izotopy metali wykorzystywane są jako „znaczniki” przeciwciał [7]. Dzięki temu możliwe są dokładne pomiary ponad 50 różnych parametrów na poziomie pojedynczej komórki. W znakowaniu przeciwciał stosowane są jedynie izotopowo czyste metale, charakteryzujące się dużą masą cząsteczkową, tak, aby uniknąć nakładania się widm metali występujących naturalnie. W pierwszym etapie celowane białka znajdujące się wewnątrz komórki znakowane są tzw. markerami (przeciwciałami bądź małymi cząsteczkami chemicznymi), które uprzednio zostały skoniugowane z izotopowo czystym metalem. Próbką jest kolejno przygotowywana do analizy, po czym komórki w niej zawarte zostają rozpylone i wędrują przez plazmę argonową, która powoduje atomizację próbki oraz jonizację metali sprzężonych z markerami komórkowymi. Sygnał pochodzący od metali jest analizowany przez spektrometr masowy z czasem przelotu (MS-TOF). Metodologia służąca do znakowania przeciwciał oraz pierwszy cytometr masowy zostały opracowane w 2009 roku w grupie prof. Tannera na Uniwersytecie w Toronto, we współpracy z firmą DVS Sciences, Inc. [8]. Schemat działania cytometru masowego przedstawiony jest na rycinie 1.

PROTEAZY CYSTEINOWE

Kataliza reakcji chemicznych zachodzących w komórkach jest niezbędna w celu utrzymania funkcji życiowych na stałym, bezpiecznym poziomie - niemal wszystkie procesy metaboliczne zachodzą z udziałem odpowiednich białek katalitycznych. Proteazy, które odpowiadają za przyspieszenie reakcji hydrolizy wiązania peptydowego, biorą udział w wielu niezwykle istotnych szlakach biologicznych, takich jak fibrylizacja, proces programowanej śmierci komórki (apoptoza, pyroptoza, nekroptoza i wiele innych) czy krzepnięcie krwi [9-11]. Jako, iż enzymy proteolityczne kontrolują tak ważne mechanizmy komórkowe, ich zaburzona aktywność może przyczyniać się do powstawania zmian patofizjologicznych, takich jak np. choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory [12,13].

Enzymy proteolityczne, które stosują katalizę kowalencyjną w celu spełnienia swoich funkcji, można podzielić ze względu na rodzaj nukleofilowej reszty aminokwasowej w miejscu aktywnym. Ta reszta aminokwasowa odpowiada za przeprowadzenie efektywnej reakcji hydrolizy wiązania peptydowego. Proteazy cysteinowe posiadają resztę cysteiny w centrum aktywnym, proteazy serynowe - serynę, a proteazy treoninowe - treoninę. Ponadto, w centrum aktywnym proteaz znajdują się dodatkowe reszty aminokwasowe (dwie w przypadku występowania triady, jedna w przypadku diady katalitycznej), które współpracują z tym jednym, głównym aminokwasem. Umożliwia to utworzenie kompleksu przejściowego oraz ułatwia otrzymanie produktu reakcji. W przypadku proteaz cysteinowych, w pierwszym etapie katalizy utworzona zostaje para jonowa



Rycina 1. Schemat działania cytometru masowego (CyTOF). Próbką zawierającą mieszaninę komórek znakowanych przeciwciałami (lub innymi markerami) skoniugowanymi z metalami jest przepuszczana przez tzw. nebulizator służący do rozpylania zawiesiny (A). Uformowany aerosol jest kierowany do źródła plazmy wzbudzonej indukcyjnie (B). Pojedyncze krople wody, zawierające komórki zostają odparowane, zatomizowane, a poszczególne jony ulegają jonizacji. Jony o niskiej masie są usuwane, a chmura pozostałych jonów (w tym metali) jest kierowana do analizatora masy TOF (C) Jony są rozdzielane na podstawie masy i kierowane do detektora (D). Detektor mierzy ilość poszczególnych izotopów metali dla pojedynczej komórki w próbce; dane generowane są w formacie FCS i analizowane przy użyciu odpowiedniego oprogramowania (E). Rysunek wykonano w programie BioRender.

między reaktywną cysteiną a histydyną, gdzie grupa sulfhydrylowa cysteiny jest deprotonowana przez pierścień imidazolowy histydyny [14]. Utworzony w ten sposób tzw. anion tiolanowy przeprowadza kolejno atak nukleofilowy na elektrofilowy atom węgla przy grupie karbonylowej (C=O). Dzięki temu możliwe jest utworzenie tetraedrycznego produktu przejściowego, który następnie przekształca się w acyloenzym. Fragment substratu z N-końca jest uwalniany, a reszta histydyny w miejscu aktywnym powraca do formy zdeprotonowanej. Acyloenzym reaguje z cząsteczką wody co pozwala na uwolnienie C-końcowego fragmentu substratu. W ten sposób reszta cysteiny w miejscu aktywnym jest ponownie zprotonowana, a enzym gotowy do przyjęcia i hydrolizy następnego substratu [14].

Proteazy cysteinowe dzielą się na kłany, które z kolei dzielone są na rodziny. Największym z klanów jest klan CA, w skład którego wchodzi ponad 20 rodzin. Jego przedstawicielem jest papaina, a przyporządkowanie innych proteaz do klanu CA odbywa się na zasadzie podobieństwa ich struktur krystalicznych do struktury papainy. Papaina składa się z dwóch domen białkowych połączonych miejscem aktywnym [15], gdzie domena N-końcowa, składa się z α -helisy, natomiast domena C-końcowa posiada kształt β -baryłki. Drugim co do wielkości klanem proteaz cysteinowych jest klan CD, a najważniejsze proteazy należące do tego klanu to kaspazy, legumaina, klostripainy, gingipaina R oraz separaza [13]. Enzymy proteolityczne z klanu CD posiadają w swoim miejscu aktywnym diadę katalityczną, a ich przynależność do tego klanu jest określana na podstawie obecności tych samych reszt aminokwasowych wokół katalitycznej reszty cysteiny [16] oraz struktury trzeciorzędowej. Co więcej, proteazy z klanu CD wykazują podobieństwa na poziomie biochemicznym. Każda poszczególna rodzina charakteryzuje się ścisłą preferencją w kierunku konkretnego aminokwasu w pozycji P1 (nomenklatura Schechter i Berger [17]), np. kaspazy hydrolizują substraty białkowe posiadające w pozycji P1 kwas asparaginowy, a legumaina tylko i wyłącznie substraty z asparaginą w pozycji P1. Innymi klanami z grupy proteaz cysteinowych są kłany CE, CF oraz CL [13].

MARKERY CHEMICZNE

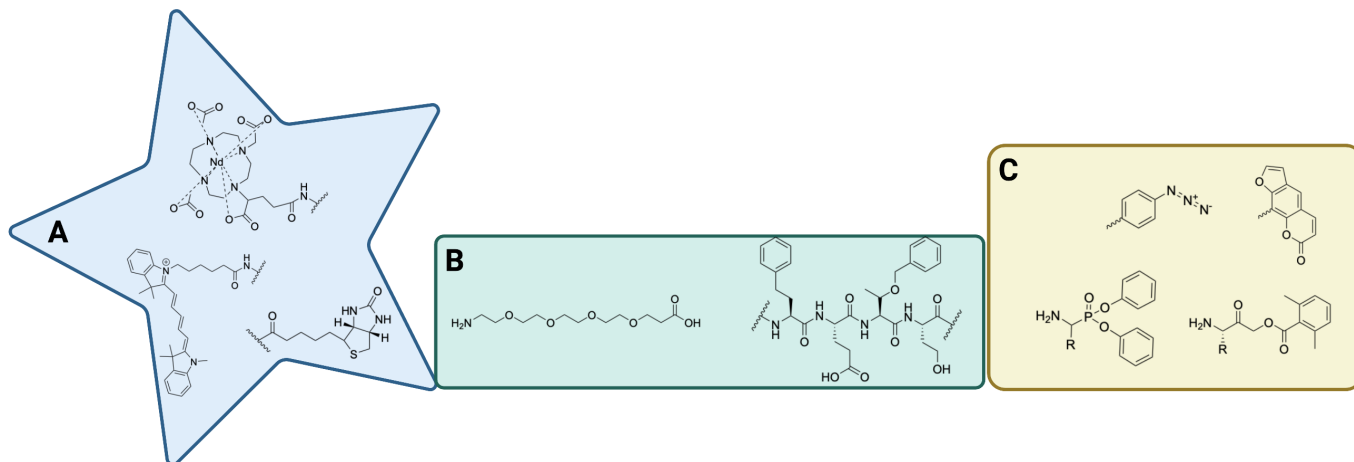
W związku z rosnącym zainteresowaniem badaczy dotyczącym uczestnictwa enzymów proteolitycznych w różnorodnych szlakach sygnalizacyjnych komórki, w ostatnich dziesięcioleciach zaobserwować można dynamiczny rozwój metod służących do badania specyficzności substratowej proteaz. Większość z nich skoncentrowana jest na oddziaływaniach typu enzym-substrat w centrum aktywnym enzymu, jednak istnieją również metody wychodzące poza obszar miejsca aktywnego, a badają one oddziaływania enzymów z substratami w kontekście ich struktury trzeciorzędowej.

Różnorodne metody profilowania genetycznego, umożliwiające badanie m.in. translokacji czy amplifikacji genów, dostarczyły wielu informacji na temat ekspresji poszczególnych białek [18, 19]. Ponadto, szeroko stosowane nokauty genowe [20] czy profilowanie transkrypcyjne umożliwiającą wgląd zarówno w procesy fizjologiczne jak i patologiczne,

m.in. powstawanie nowotworów [21] czy patogenezę bakteryjną [22]. Powyższe metody opierają się na profilowaniu i manipulowaniu ekspresją genów w celu wywnioskowania funkcji danego białka, co sprawia, iż na ogół nie są one w stanie wychwycić zdarzeń posttranslacyjnych. Te z kolei decydują o dalszym losie białka, a w przypadku proteaz, to właśnie modyfikacje posttranslacyjne decydują o ich przyszłej aktywności i tym samym roli w szlakach sygnalnych komórki. Aktywność enzymów proteolitycznych jest ich cechą decydującą, która to dopełnia obraz uzyskany na podstawie badań genetycznych oraz proteomicznych. Pod wpływem konieczności określenia, czy dane białko jest w pełni funkcjonalne, a więc czy w danym czasie istnieje w swojej aktywnej formie, dział proteomiki wprowadził strategię analizy tego zjawiska. Należą do nich między innymi chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrią mas [23,24], drożdżowy system dwuhybrydowy [24] oraz mikromacierze białkowe [25]. Techniki te znacząco wzbogaciły zrozumienie wzorców ekspresji, interakcji oraz właściwości funkcjonalnych białek *in vitro*. Niemniej jednak, dokładna ocena stanu funkcjonalnego białek w komórkach i tkankach, wymaga bezpośrednich oraz niezwykle precyzyjnych metod oceny ich aktywności. Dziedzina proteomiki, która zajmuje się badaniem aktywności i regulacji białek w złożonych proteomach to tzw. *Activity Based Protein Profiling* (ABPP). ABPP opiera się o stosowanie małowcząsteczkowych związków chemicznych (ang. *Activity-Based Probes*) do znakowania i izolowania odrębnych zestawów białek na podstawie ich aktywności enzymatycznej [26]. Jedną z najważniejszych cech takich związków chemicznych jest selektywność w stosunku do celowanego białka, co pozwala na analizę złożonych układów biologicznych, takich jak lizaty komórkowe, tkanki, a nawet całe organizmy. Markery chemiczne powinny celować w dużą i stosunkowo łatwą do analizy grupę enzymów tak, aby zapewnić funkcjonalny obraz badanego proteomu. Dzięki odpowiedniej kombinacji grup reaktywnych oraz elementów wiążących w strukturze, markery chemiczne zapewniają zrównoważony poziom detekcji, co w praktyce oznacza minimalizację reaktywności krzyżowej z innymi białkami.

Według ogólnie przyjętej konwencji małowcząsteczkowe markery chemiczne do badania aktywności enzymów składają się z trzech elementów [26]. Podstawowym elementem każdego markera jest grupa reaktywna, kowalencyjnie wiążąca miejsce aktywne enzymu. Grupy reaktywne można dalej przyporządkować do poszczególnych klas: (1) ugrupowania elektrofilowe, modyfikujące resztę nukleofilową w centrum aktywnym enzymu bądź (2) ugrupowania foto reaktywne, które znakują reszty aminokwasowe w miejscu aktywnym pod wpływem promieniowania UV. Ponadto, małowcząsteczkowe markery chemiczne posiadają jeszcze dwa elementy: grupę reporterową, która pozwala na detekcję oznakowanego białka oraz linker. Budowa małowcząsteczkowych markerów chemicznych została przedstawiona na rycinie 2.

Enzymy proteolityczne stanowią około 2% wszystkich produktów genowych w organizmie człowieka [27]. Ogromne znaczenie biologiczne przypisywane proteazom sprawia, iż poszukiwanie selektywnych narzędzi do analizy ich aktywności w układach *in vitro* oraz *in vivo* jest pręż-



Rycina 2. Schemat budowy małowcząsteczkowych markerów chemicznych. Markery składają się z trzech części: (A) grupy reporterowej umożliwiającej detekcję, (B) linkera (specyficzna sekwencja peptydowa bądź niespecyficzne linkery) oraz (C) ugrupowania wiążącego (ugrupowanie kowalencyjnie łączące się z enzymem). Rysunek wykonany w programie BioRender.

nie rozwijającym się obszarem naukowym. Opisane do tej pory metody projektowania małowcząsteczkowych markerów chemicznych niezwykle wzbogaciły zrozumienie interakcji pomiędzy białkami katalitycznymi a ich substratami, niemniej jednak posiadają one kilka ograniczeń wynikających nie tylko z ich właściwości (budowa uniemożliwiająca penetrację błon komórkowych, nakładanie się widm fluorescencyjnych, brak selektywności wobec celowanej proteazy), ale również ze złożoności procesów zachodzących w komórkach. W ramach rozprawy doktorskiej pt. „Narzędzia chemiczne do badania enzymów proteolitycznych przy użyciu cytometrii masowej” zaprojektowano, zsyntetyzowano oraz przeprowadzono analizę nowego typu markerów chemicznych, które są kompatybilne z cytometrią masową (tzw. markery typu TOF). Pozwoliło to na opracowanie nowej technologii, która umożliwi wieloparametryczną analizę aktywnych form enzymów w złożonych populacjach komórkowych. To z kolei umożliwi znaczne poszerzenie wiedzy na temat złożonych procesów biologicznych, w których centralną rolę odgrywiają proteazy.

SYNTEZA WYBRANYCH MARKERÓW TYPU TOF ORAZ ICH ZASTOSOWANIE W ANALIZIE AKTYWNOŚCI PROTEAZ CYSTEINOWYCH W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Na podstawie źródeł literaturowych oraz badań własnych zaprojektowano specyficzne sekwencje peptydowe i kolejno zsyntetyzowano markery chemiczne składające się z trzech elementów:

- (1) ugrupowania chelatującego jony metali (DOTA) na N-końcu,
- (2) szkieletu peptydowego o sekwencji specyficznej dla danej proteazy oraz
- (3) grupy wiążącej miejsce aktywne enzymu na C-końcu.

Aby zwiększyć odległość ugrupowania chelatującego metal od sekwencji peptydowej, a tym samym zachować jej

selektywność wobec celowanej proteazy, do struktury markerów wprowadzono linker. W celu określenia w jaki sposób skompleksowane w cząsteczce metale wpływają na powinowactwo enzymu do markera chemicznego, zaprojektowano panel związków dla legumainy, katepsyny L oraz katepsyny B, gdzie dla każdego enzymu zsyntetyzowano po dwa/trzy markery, różniące się obecnością w cząsteczce lantanowcem (Gd, Tb, Lu) (Ryc. 3).

BADANIA KINETYCZNE MARKERÓW TOF

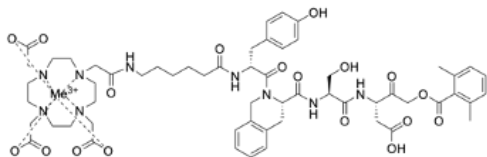
W kolejnym etapie badań sprawdzono aktywność oraz selektywność otrzymanych markerów chemicznych pod względem rekombinowanych enzymów proteolitycznych. W przypadku katepsyn wykonano dodatkowe pomiary mające na celu sprawdzenie, czy zaprojektowane związki wykazują krzyżową reaktywność względem strukturalnie podobnych katepsyn (katepsyna S, katepsyna V oraz katepsyna K). Parametry kinetyczne inhibicji (k_{obs}/I) wyznaczono przy użyciu spektrofotometry SPECTRA MAX Gemini EM. Do określenia poziomu inhibicji i wyznaczenia parametrów k_{obs}/I (stała szybkości inhibicji drugiego rzędu) użyto substratów peptydowych ze znacznikiem fluorogenicznym ACC (ang. 7-Amino-4-carbamoylmethylcoumarin). Poszczególne markery TOF (Tab. 1) rozcieńczano serynie na 96-dołkowych płytkach, następnie dodawano odpowiedni substrat i (zaraz przed pomiarem) preinkubowany enzym. Analiza wyników została wykonana w programie GraphPad Prism, a parametry k_{obs}/I zostały wyznaczone na podstawie równania pseudopierwszego rzędu. Równanie to można opisać następująco: ilość wytwarzanego produktu (P) zachodzi z początkową szybkością (V) i jest hamowana w czasie (t) z szybkością (k_a):

$$P = \frac{V}{k_a} * (1 - e^{-k_a * t}) + C$$

Wartość k_{app} (pozorna szybkość hamowania w obecności substratu) przy każdym stężeniu inhibitora została wyznaczona poprzez dopasowanie krzywej za pomocą regresji nieliniowej. Następnie, uzyskane wartości wykreślono w funkcji stężenia inhibitora (I), tak, aby uzyskać pozorną sta-

LEGUMAINA

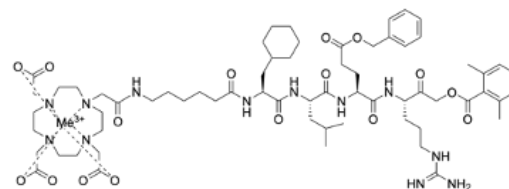
Me³⁺:
Mix-Gd
159-Tb



DOTA(Me)-Ahx-D-Tyr-Tic-Ser-Asp-AOMK

KATEPSYNA B

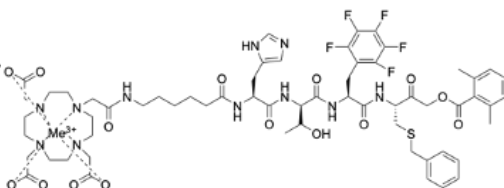
Me³⁺:
Mix-Gd
159-Tb
175-Lu



DOTA(Me)-Ahx-Cha-Leu-Glu(Obzl)-Arg-AOMK

KATEPSYNA L

Me³⁺:
Mix-Gd
159-Tb
175-Lu



DOTA(Me)-Ahx-His-D-Thr-Phe(F₃)-Cys(Bzl)-AOMK

Rycina 3. Struktury markerów chemicznych typu TOF dla wybranych proteaz cysteinowych. Markery chemiczne typu TOF składają się z trzech części: (1) ugrupowania DOTA znajdującego się na N-końcu, (2) sekwencji peptydowej specyficznej dla danej proteazy oraz (3) ugrupowania kowalencyjnie wiążącego centrum aktywne danej proteazy.

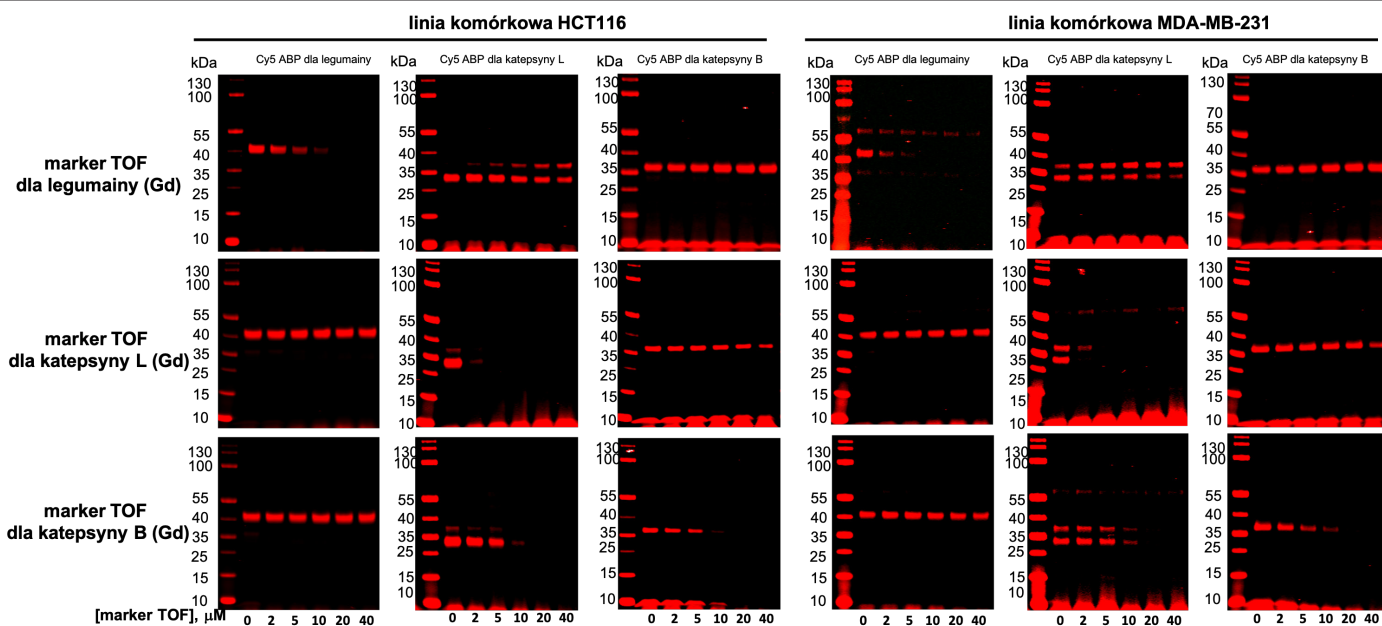
łą szybkości drugiego rzędu dla inhibicji (k_{app}/I). Kolejno, obliczono wartość bezwzględną stałej szybkości drugiego rzędu k_{obs}/I jako:

$$\frac{k_{obs}}{I} = \frac{k_{app}}{I} * \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)$$

BADANIA SELEKTYWNOŚCI MARKERÓW CHEMICZNYCH TYPU TOF W NOWOTWOROWYCH LINIACH KOMÓRKOWYCH

Przeprowadzone badania kinetyczne markerów TOF przy użyciu czystych, rekombinowanych enzymów po-

kazały, iż charakteryzują się one wysokim stopniem selektywności wobec celowanych proteaz. W związku z powyższym zaplanowano bardziej złożony eksperyment i określono selektywność otrzymanych markerów TOF w nowotworowych liniach komórkowych. Jako że markery chemiczne TOF posiadają znacznik w postaci ugrupowania DOTA ze schelatowanym jonem metalu, ich wizualizacja przy użyciu elektroforezy żelowej nie jest możliwa. Aby rozwiązać ten problem, zaprojektowano dwuetapowy eksperyment, gdzie dwie linie komórkowe (HCT116- nowotwór jelita grubego oraz MDA-MB-231 - nowotwór piersi) były w pierwszej kolejności inkubowane w różnych stężeniach



Rycina 4. Pełne żełe prezentujące selektywność markerów TOF liniach komórkowych HCT116 i MDA-MB-231. W pierwszym etapie eksperymentu komórki były inkubowane z markerami TOF o różnych stężeniach (4 godziny), a następnie „szczątkowa” aktywność proteaz została oznaczona przy użyciu 1 μM odpowiedniego markera fluorescencyjnego. Rysunek zaadoptowany z rozprawy doktorskiej dr inż. Katarzyny Groborz.

Tabela 1. Parametry kinetyczne markerów TOF względem celowanych proteaz ($k_{obs}/I M^{-1}s^{-1}$). Wszystkie pomiary zostały wykonane trzykrotnie, S.D.<10%. N.I. oznacza, iż nie zaobserwowano inhibicji.

Celowana proteaza	Sekwencja peptydowa markeru TOF	Metal	Legumaina	Katepsyna L	Katepsyna B	Katepsyna V	Katepsyna S	Katepsyna K
LEGUMAINA	DTyr-Tic-Ser-Asp	mix-Gd	28,500	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
		159-Tb	24,700	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
KATEPSYNA L	His-DThr-Phe(F5)-Cys(Bzl)	mix-Gd	n.i.	229,300	889	248	85	n.i.
		159-Tb	n.i.	232,500	1,250	150	194	n.i.
		175-Lu	n.i.	227,000	929	128	172	n.i.
KATEPSYNA B	Cha-Leu-Glu(Bzl)-Arg	mix-Gd	n.i.	772	211,000	2,180	2,530	n.i.
		159-Tb	n.i.	860	144,000	1,510	940	n.i.
		175-Lu	n.i.	250	108,000	1,320	564	n.i.

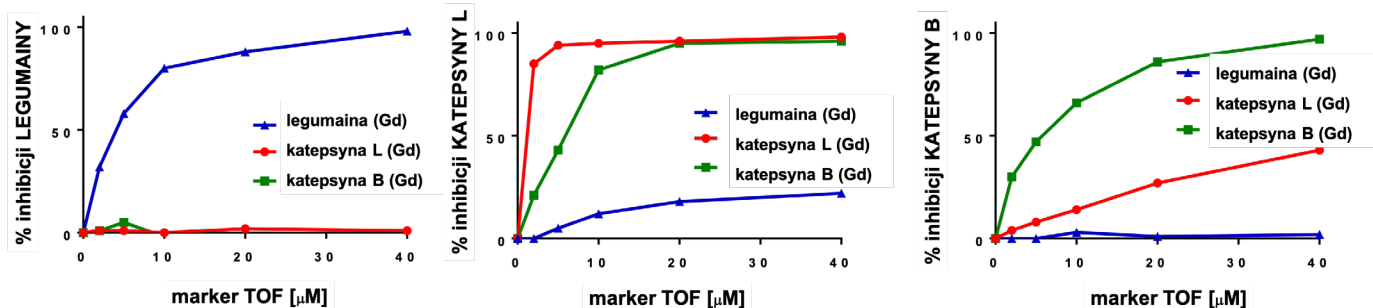
niach z markerami TOF przez cztery godziny, a następnie z odpowiadającymi im strukturalnie markerami fluorescencyjnymi (przez kolejne cztery godziny). Eksperyment ten miał na celu określenie „szczątkowej” aktywności celowanych proteaz za pomocą fluorescencyjnych markerów chemicznych, które strukturalnie różniły się od markerów TOF jedynie grupą reporterową. Przygotowane próbki, zawierające oznakowane komórki, były następnie lizowane, denaturowane i kolejno poddawane analizie przy użyciu elektroforezy żelowej. Na rycinie 4 przedstawiono wyniki eksperymentów z użyciem markerów TOF dla katepsyny L, katepsyny B oraz legumainy.

Intensywność prążków na żelu pochodzących od markerów fluorescencyjnych została kolejno określona za pomocą oprogramowania ImageStudioLite®, a uzyskane wyniki na-

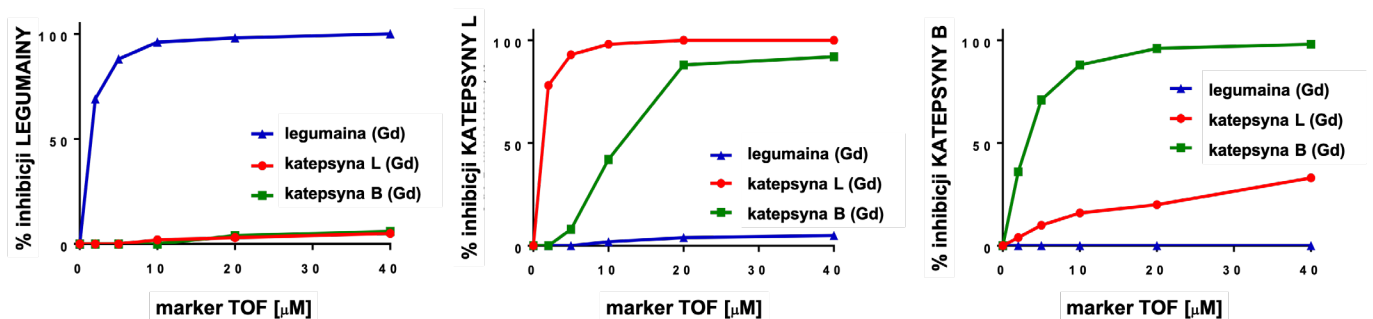
niesiono na wykresy (Ryc. 5). Marker TOF dla legumainy nie wykazuje krzyżowej reaktywności, a aktywność katepsyny B oraz katepsyny L nie jest hamowana nawet w przypadku zastosowania wysokich stężeń markera dla legumainy. W przypadku katepsyn cysteinowych, markery TOF wykazują wysoki stopień selektywności w szerokim zakresie stężeń. Marker TOF dla katepsyny L hamuje katepsynę B w ok. 20% powyżej stężenia 2.5 μ M.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż otrzymane markery chemiczne TOF wykazują selektywność wobec wybranych enzymów proteolitycznych w odpowiednich stężeniach. Eksperymenty przeprowadzane na liniach komórkowych są o wiele bardziej skomplikowane niż w przypadku enzymów rekombinowanych czy lizatów, gdyż mechanizm „wejścia” małych cząsteczkowych zwią-

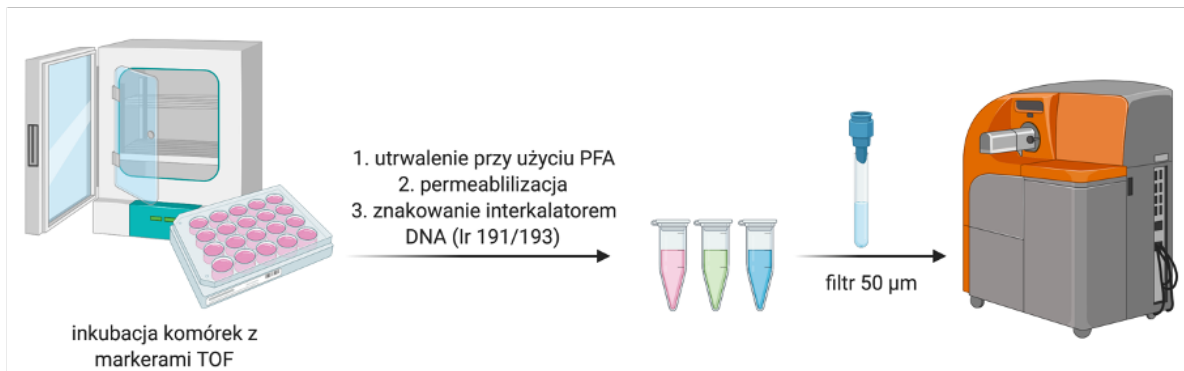
linia komórkowa HCT-116



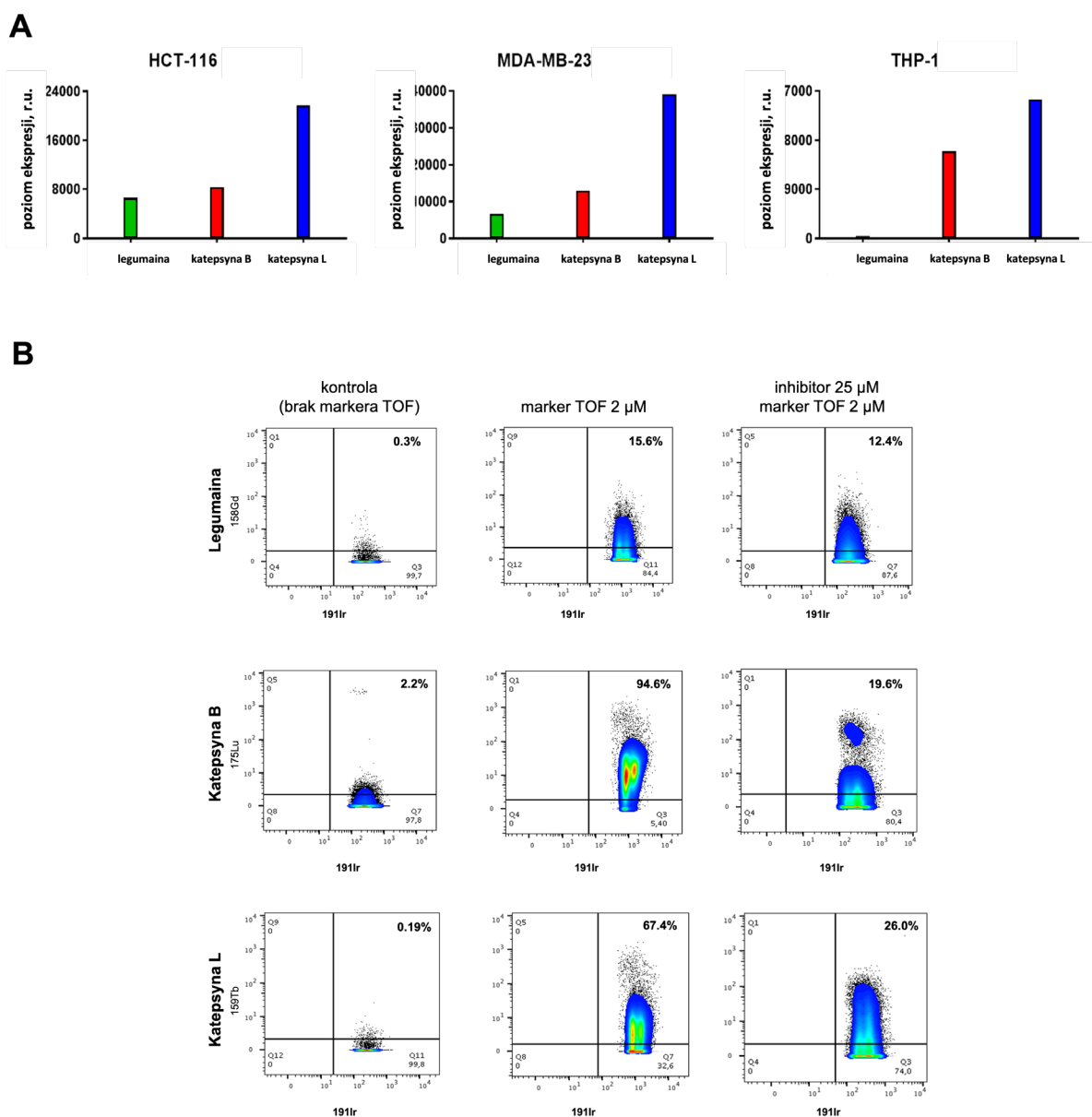
linia komórkowa MDA-MB-231



Rycina 5. Wykresy inhibicji proteaz przez wybrane markery chemiczne typu TOF. Badania wykonano na liniach komórkowych HCT116 oraz MDA-MB-231. Rysunek zaadaptowany z rozprawy doktorskiej dr inż. Katarzyny Groborz.



Rycina 6. Uproszczony schemat przygotowania próbek do analizy za pomocą instrumentu CyTOF. W pierwszym etapie żywe komórki THP-1 poddano inkubacji z panelem markerów TOF. Kolejno komórki zebrano, utrwalono, permeabilizowano i oznakowano interkalatorem DNA. Po całonocnej inkubacji, próbki przemyto dwukrotnie buforem FACS, dwukrotnie wodą i zawieszono w roztworze zawierającym ziarna kalibracyjne. Po przepuszczeniu przez filtr (50 µm), pojedyncze komórki analizowano przy użyciu cytometru masowego. Rysunek wykonano w programie BioRender. Rysunek zaadoptowany z rozprawy doktorskiej dr inż. Katarzyny Groborz.



Rycina 7. (A) Poziom ekspresji proteaz cysteinowych w liniach komórkowych HCT116, MDA-MB-231 oraz THP-1. Dane uzyskane z programu Geneinvestigator. Linia THP-1 charakteryzuje się bardzo niską zawartością białka legumainy (B) Analiza aktywności legumainy, katepsyny B oraz katepsyny L w komórkach THP-1. Eksperymenty wykonano na nieoznakowanych komórkach w celu określenia tła pochodzącego od poszczególnych izotopów metali. 94.6% komórek zawierało aktywną formę katepsyny B, 67.4% katepsyny L i 15.0% legumainy. Zastosowanie inhibitora (E64d dla katepsyn oraz MP-L01 [28] dla legumainy) przed inkubacją komórek z markerami TOF powoduje znaczne obniżenie sygnału.

ków chemicznych do wnętrza komórki nie jest dokładnie zbadany. W związku z tym nie ma pewności, iż markery z ugrupowaniem chelatującym DOTA są równie efektywnie pobierane przez komórkę jak te posiadające znacznik fluorescencyjny (i na odwrót). Niemniej jednak, wyniki badań jednoznacznie wskazują na skuteczność markerów w nieodwracalnym wiązaniu aktywnej formy wybranych proteaz. Przedstawione badania zostały wykonane we współpracy z dr hab. inż. Marcinem Porębą w laboratorium prof. Guya Salvarena.

BADANIA AKTYWNOŚCI WYBRANYCH PROTEAZ CYSTEINOWYCH ZA POMOCĄ CYTOMETRII MASOWEJ.

Kolejnym etapem badań było zastosowanie otrzymanych markerów chemicznych TOF w cytometrii masowej. Wstępne eksperymenty przeprowadzono przy użyciu białczkowej linii komórkowej THP-1. W celu przeprowadzenia analizy aktywności wybranych enzymów, komórki w odpowiedniej ilości inkubowano z 2 μ M poszczególnych markerów TOF przez cztery godziny. Po tym czasie, komórki były zbierane do probówek typu eppendorf i dwukrotnie przemywane roztworem DPBS w celu odmycia nadmiaru niezwiązanego markera TOF. Kolejno, próbki traktowano 4% roztworem PFA (parafomaldehyd) w DPBS i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Ten proces służy tzw. utrwaleniu próbki- po dodaniu roztworu PFA wolne grupy aminowe występujące w białkach komórkowych są sieciowane, niejako „zamrażając” komórkę w danym momencie. Po tym etapie komórki są uznawane za martwe, gdyż wszystkie procesy życiowe, takie jak np. oddychanie wewnątrzkomórkowe, zostają zatrzymane. Nie jest to jednoznaczne z utratą aktywności wszystkich białek, w tym enzymów proteolitycznych, natomiast sama komórka nie jest już zdolna do podziału. Kolejno, próbki przemywano dwukrotnie roztworem PBS i zawieszano w buforze do permeabilizacji błony komórkowej. Po krótkiej inkubacji, komórki wirowano i ponownie zawieszano w buforze permeabilizującym, zawierającym interkalator DNA (Ir 191/193). Tak przygotowane próbki umieszczane były w temperaturze 4°C i inkubowane całą noc. Kolejnego dnia próbki przemywano dwukrotnie buforem FACS oraz dwukrotnie dejonizowaną wodą. Tak przygotowane próbki były kolejno zawieszane w roztworze zawierającym tzw. ziarna kalibracyjne (ang. *calibration beads*) i analizowane przy użyciu cytometru masowego (Ryc. 6).

Przy użyciu markerów TOF dla katepsyny L, katepsyny B oraz legumainy przeprowadzono analizę zawartości aktywnych proteaz w linii komórkowej THP-1. Linia ta charakteryzuje się bardzo niską zawartością legumainy (Ryc. 7A), a więc przedstawiony poniżej eksperyment miał na celu określenie użyteczności markerów TOF oraz opracowanej metody. Jak widać na Ryc. 7B, w celu analizy każdej z proteaz przeprowadzono trzy eksperymenty. Pierwszy eksperyment miał na celu określenie poziomu tła, w związku z czym analizie poddano komórki, które oznakowano jedynie irydem. Drugą partię próbek znakowano poszczególnymi markerami TOF w stężeniu 2 μ M. Trzeci eksperyment zakładał zahamowanie aktywności proteaz cysteinowych w komórce i kolejno ich analizę z użyciem selektywnych związków chemicznych. Zaprojektowane

związki łączą się tylko i wyłącznie z aktywną formą enzymu, w związku z czym sygnał zaobserwowany po zastosowaniu inhibitorów proteaz prawdopodobnie pochodzi od pozostałego w komórkach, niezwiązanego markera TOF, bądź niespecyficznych oddziaływań z innymi enzymami. Jednak na podstawie wcześniej przeprowadzonych analiz biochemicznych można wywnioskować, iż bardziej prawdopodobną opcją jest niewystarczające odmycie związków znakujących proteazy, szczególnie, iż poziom sygnału pochodzącego od markera dla legumainy jest taki sam w przypadku zastosowania inhibitora, jak i bez niego. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na optymalizację metody znakowania aktywnych form enzymów proteolitycznych w nowotworowych liniach komórkowych.

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy przedstawiono główne założenia rozprawy doktorskiej dr inż. Katarzyny Groborz. Rozprawa pt. „Narzędzia chemiczne do badania enzymów proteolitycznych przy użyciu cytometrii masowej” miała na celu zaprojektowanie i syntezę nowych, selektywnych narzędzi chemicznych do wieloparametrycznej analizy aktywności medycznie ważnych enzymów z zastosowaniem cytometrii masowej. Opracowanie narzędzia posłużyło do analizy zawartości aktywnych form proteaz w różnorodnych próbkach biologicznych, takich jak komórki nowotworowe czy świeża krew pacjentów (wyniki przedstawiono w [29]). Zarówno katepsyny cysteinowe jak i legumaina są kluczowymi enzymami w wielu procesach biologicznych. Narzędzia biochemiczne do badania aktywności tych enzymów *in vitro* oraz *in vivo* są kluczowe w celu zrozumienia ich roli zarówno w stanach normalnych, jak i patofizjologicznych. Do tej pory opisano wiele małowcząsteczkowych związków chemicznych, służących do analizy proteaz cysteinowych, niemniej jednak większość z nich wykazuje szereg niedoskonałości uniemożliwiających precyzyjną ewaluację procesów biologicznych. Są to między innymi brak selektywności wobec celowanego białka, słaba przepuszczalność przez błony czy wysoka toksyczność. Ponadto, małowcząsteczkowe markery chemiczne najczęściej zawierają w swojej strukturze fluorescencyjne grupy reporterowe, które nie tylko wykazują szerokie widma absorpcji i emisji, ale również niespecyficznie łączą się zarówno z błoną komórkową jak i innymi komponentami komórkowymi. W opisywanej rozprawie doktorskiej znaleziono rozwiązanie, które pozwoliło na wieloparametrową analizę aktywności proteaz w złożonych systemach biologicznych. Dzięki połączeniu optymalnych inhibitorów proteaz z chelatorem jonów metali uzyskano nowy rodzaj niezwykle selektywnych związków chemicznych kompatybilnych z cytometrią masową. Badania przedstawione w opisywanej rozprawie doktorskiej są pierwszymi eksperymentami tego typu.

PIŚMIENNICTWO

1. Moldavan A (1934) Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells. *Science* 80(2069): 188-189
2. McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120: 5.1.1-5.1.11
3. Belkina AC, Snyder-Cappione JE (2017) OMIP-037: 16-color panel to measure inhibitory receptor signatures from multiple human immune cell subsets. *Cytometry A*, 91(2): 175-179

4. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M (2004) Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4(8): 648-55
5. Cossarizza A, et al. (2019) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* 49(10): 1457-1973
6. Cabral-Marques O, Schimke LF, de Oliveira EB Jr, El Khawanky N, Ramos RN, Al-Ramadi BK, Segundo GRS, Ochs HD, Condino-Neto A (2019) Flow Cytometry Contributions for the Diagnosis and Immunopathological Characterization of Primary Immunodeficiency Diseases With Immune Dysregulation. *Front Immunol* 10: 2742
7. Spitzer MH, Nolan G (2016) Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell* 165(4): 780-91
8. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, Pavlov S, Vorobiev S, Dick JE, Tanner SD (2009) Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 81(16): 6813-22
9. Walsh PN, Ahmad SS (2002) Proteases in blood clotting. *Essays Biochem* 38: 95-111
10. Porter AG, Janicke RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6(2): 99-104
11. Boffa MB, Bell R, Stevens WK, Nesheim ME (2000) Roles of thermal instability and proteolytic cleavage in regulation of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 275(17): 12868-78
12. Joyce JA, Hanahan D (2004) Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* 3(12): 1516-619
13. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D227-33
14. Grzonka Z, Jankowska E, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R, Lanekiewicz L, Wiczek W, Wiczerzak E, Ciarkowski J, Drabik P, Janowski R, Kozak M, Jaskólski M, Grubb A (2001) Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* 48(1): 1-20
15. Kay J, Kassell B (1971) The autoactivation of trypsinogen. *J Biol Chem* 246(21): 6661-5
16. Chen JM, Rawlings ND, Stevens RA, Barrett AJ (1998) Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett* 441(3): 361-5
17. Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27(2): 157-62
18. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70
19. Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8): 789-99
20. Barrangou R, Doudna JA (2016) Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* 34: 933-941
21. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3(6): 537-49
22. Daily JP, Le Roch KG, Sarr O, Fang X, Zhou Y, Ndir O, Mboup S, Sultan A, Winzeler EA, Wirth DF (2004) In vivo transcriptional profiling of *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 3: 30
23. Washburn MP, Wolters D, Yates JR (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19(3): 242-7
24. Ito T, Ota K, Kubota H, Yamaguchi Y, Chiba T, Sakuraba K, Yoshida M (2002) Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Mol Cell Proteomics* 1(8): 561-6
25. MacBeath G (2002) Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 32 Suppl: 526-32
26. Berger AB, Vitorino PB, Bogoy M (2004) Activity-based protein profiling: applications to biomarker discovery, *in vivo* imaging and drug discovery. *Am J Pharmacogenomics* 4(6): 371-81
27. Puente XS, Sanchez LM, Gutierrez-Fernandez A, Velasco G, Lopez-Otin C (2005) A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 2): 331-4
28. Poreba M, Solberg R, Rut W, Lunde NN, Kasperkiewicz P, Snipas SJ, Mihelic M, Turk D, Turk B, Salvesen GS, Drag M (2016) Counter Selection Substrate Library Strategy for Developing Specific Protease Substrates and Probes. *Cell Chem Biol* 23(8): 1023-35
29. Poreba M, Groborz KM, Rut W, Pore M, Snipas SJ, Vizovisek M, Turk B, Kuhn P, Drag M, Salvesen GS (2020) Multiplexed Probing of Proteolytic Enzymes Using Mass Cytometry-Compatible Activity-Based Probes. *J Am Chem Soc* 39: 16704-16715

Multiparametric analysis of proteolytic enzyme activity using mass cytometry

Katarzyna Małgorzata Groborz✉

Genentech Inc. South San Francisco, USA

✉corresponding author: groborzk@gene.com

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

ABSTRACT

Proteolytic enzymes are cell catalysts that are responsible for accelerating amide bond hydrolysis in their corresponding protein substrates. Proteases are key elements in multiple cell signaling pathways and they help to maintain homeostasis. The activity of these enzymes is controlled by intracellular inhibitors that prevent excessive hydrolysis of protein substrates. Particular cases of protease gene mutations can cause serious pathophysiological conditions, such as neurodegenerative diseases, cancer or blood coagulation disorders. Therefore, there is an urgent need for a precise analysis of the activity of individual proteases. To this date, the golden standard in this type of investigation is the use of activity-based probes (ABPs) that irreversibly bind to the target protein in its catalytically active form, and enable its detection in biological samples. The main problem in dissecting protease activities inside the cell is the fact that many of them work together in extremely complex cellular signaling networks. Therefore, it is necessary to be able to perform a multi-parameter analysis that will show all of the sampled elements actively operating within a given system. This work describes the main assumptions of the doctoral dissertation of dr inż. Katarzyna Groborz, which concern the design, synthesis and validation of a new type of chemical tools for studying the activity of proteases using mass cytometry. These tools, so-called TOF probes (Time Of Flight), possess the advantages of traditional activity-based probes and also enable multi-parameter analysis of complex biological systems using high-throughput technology-mass cytometry.

