

MONITOROWANIE AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ JAKO ELEMENT DIAGNOSTYKI CHORÓB CYWILIZACYJNYCH

PROTEOLYTIC ACTIVITY MONITORING AS AN
ELEMENT OF DIAGNOSTICS OF CIVILIZATION
DISEASES

**Natalia Gruba*, Anita Romanowska, Wiktoria
Rejmak, Honorata Sikora, Magdalena Wysocka,
Adam Lesner**

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

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

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Enzymy proteolityczne. Homeostaza i stany patologiczne
2. Systemy kontroli aktywności proteaz
3. Monitorowanie aktywności
4. Sondy aktywności
5. Przykłady diagnostycznego zastosowania enzymów

Piśmiennictwo cytowane

Dr Natalia Gruba, ukończyła studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii UG w 2012 roku, tam również w 2016 roku otrzymała stopień doktora. Od 2013 r. zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, aktualnie na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Środowiska. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań nad profilowaniem aktywności enzymów proteolitycznych oraz określaniem ich specyficzności substratowej.



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

Mgr Anita Romanowska, zatrudniona w Katedrze Technologii Środowiska Wydziału Chemii UG, uczestniczka międzywydziałowych interdyscyplinarnych studiów doktoranckich Chemia z Fizyką realizowanych w Uniwersytecie Gdańskim. Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej dotyczą projektowania, syntezy i badań biologicznych peptydomimetyków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego.



<https://orcid.org/0000-0001-6585-3029>

Mgr Wiktoria Rejmak, od 2020 roku absolwentka kierunku Chemia na Uniwersytecie Gdańskim. Obecnie doktorantka w Katedrze Technologii Środowiska, zajmująca się syntezą nowych analogów ludzkiej katelicydiny (LL-37) o zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną w ramach projektu PRELUDIUM BIS 1.



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

Mgr Honorata Sikora, doktorantka Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Gdańskiego o specjalizacji Chemia. Zakres zainteresowań obejmuje analizę aktywności proteolitycznej enzymów w rozwoju nefropatii cukrzycowej, ze szczególnym uwzględnieniem metaloproteaz.



<https://orcid.org/0000-0002-7292-3125>

Dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG, zatrudniona w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jej zainteresowania naukowe obejmują profilowanie enzymów proteolitycznych przy zastosowaniu metod chemii kombinatorycznej, analizę oddziaływań kwas nukleinowy - białko oraz białko - niskocząsteczkowy ligand. Ostatnio w centrum jej zainteresowań znalazła się synteza związków efektywnie przenikających do wnętrza komórki.



<https://orcid.org/0000-0003-2216-5597>

Prof. dr hab. Adam Lesner, kierownik Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jego zainteresowania naukowe obejmują badania nad zjawiskiem proteolizy, poprzez tworzenie nowych syntetycznych narzędzi do oznaczania aktywności proteaz. Ponadto jest zaangażowany w projekty dotyczące opracowywania nowych immunomodulatorów, związków antymikrobiotycznych oraz penetrujących błonę komórkową.



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

ABSTRACT

Proteolytic enzymes are essential for the proper functioning of every living cell. Due to their great importance in controlling metabolic changes in living organisms, they could be used in the diagnosis of civilization diseases. Hence, the search for new methods of determining and controlling their activity is extremely important. Our team, has been studying substrates of proteases and their potential use in detection of biomarkers activity for many years.

Keywords: proteolytic enzymes, substrate specificity, civilization diseases, cancerous diseases

Słowa kluczowe: enzymy proteolityczne, specyficzność substratowa, choroby cywilizacyjne, choroby nowotworowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABZ	– kwas 2-aminobenzoesowy
ACC	– kwas 7-aminokumarylo-4-octowy
AMC	- 7-amino-4-metylokumaryna
AMF	- 4-amino-4-flourokumaryna
ANB	- kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy
CatC	- katepsyna C
Cbz	- benzyloksykarbonyl
DABCYL	- kwas 4-(4'-dimetyloaminofenyloazo)benzoesowy
Dap	- kwas 2,3-diaminopropionowy
Dnp	- 2,4-dinitrofenol
EDANS	- kwas 5-[(2-aminoetylo)amino]naftaleno-1-sulfonowy
G1	- 1 stopień zaawansowania nowotworu (<i>ang. grade 1</i>)
G2	- 2 stopień zaawansowania nowotworu (<i>ang. grade 2</i>)
G3	- 3 stopień zaawansowania nowotworu (<i>ang. grade 3</i>)
GO1	- kwas 5-guanidyno-3-oksapentanowy
HNE	- ludzka elastaza neutrofilowa
HTRA	- proteaza ang. High Temperature Requirement A
KLK13	- kallikreina 13
MCA	- kwas (7-metoksy-4-kumarylo)octowy
NSPs	- proteazy serynowe neutrofilii
O2	- kwas 3,6-dioksaoktanowy
PR3	- proteinaza 3
Thi	- 2-acetylo-4-tetrahydroksybutyloimidazol
Tyr(3-NO ₂)	- 3-nitro-L-tyrozyna

WPROWADZENIE

Badania nad możliwością wykorzystania enzymów proteolitycznych w diagnostyce chorób cywilizacyjnych stanowią nowy, rozwijający się obszar nauki. Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę diagnozowanych przypadków nowotworów oraz liczbę zgonów nimi spowodowanych, poszukiwanie nowych metod wykrywania chorób na wczesnym etapie może stanowić ogromną szansę dla pacjentów, jak i całego systemu opieki zdrowotnej. Obecnie pacjent, o tym, że ma nowotwór dowiaduje się często, gdy jest już za późno na efektywne leczenie lub zastosowanie jakiegokolwiek terapii. W poniższym artykule podsumowujemy prowadzone w Naszym zespole badania nad profilowaniem enzymów proteolitycznych oraz ich wykorzystaniem w diagnostyce chorób cywilizacyjnych.

1. ENZYMY PROTEOLITYCZNE. HOMEOSTAZA I STANY PATOLOGICZNE

Proteazy należą do grupy enzymów z klasy hydrolaz, które katalizują hydrolityczny rozpad wiązania peptydowego białek i peptydów. To właśnie ta reakcja decyduje o naszym zdrowiu i nierzadko życiu [1,2]. Proces proteolizy, czyli hydrolitycznego rozpadu białek i peptydów, stanowi główny element homeostazy, czyli samoregulacji każdego żywego organizmu [3]. Począwszy od powstania życia, podziałów komórkowych, trawienia, poprzez podział komórki, obronę przed mikroorganizmami czy ostatecznie śmierć komórki czy organizmu – stanowią wybrane przykłady procesu proteolizy. Utrzymanie homeostazy to nie jedyny przykład, w którym enzymy proteolityczne odgrywają istotną rolę [4]. Ich nadmierna lub niekontrolowana aktywność prowadzi do szeregu procesów degradacyjnych, patologii czy ciężkich lub śmiertelnych chorób. Typowym przykładem są tu zaburzenia krzepliwości krwi wynikające z braku czynników krzepnięcia, które są w istocie rzeczy enzymami proteolitycznymi [5]. Z kolei dziedziczna mutacja genetyczna skutkująca brakiem proteazy - katepsyny C, prowadzi do szeregu zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu człowieka noszącym nazwę Zespołu Papillon- Lefèvre. W wyniku schorzenia, osoba posiadająca tą mutację, cierpi na choroby przyzębia, rogowacenie naskórka czy inne powikłania wynikające z obniżenia odporności [6]. Przykładów zaangażowania proteaz w procesy destrukcyjne można mnożyć, lecz nawet te poruszone powyżej dowodzą, że proces monitorowania funkcji czy też aktywności enzymów proteolitycznych może stanowić element diagnostyczny procesów patologicznych. Poniżej zaprezentowane zostaną metody oznaczania aktywności proteaz, ich rola w wybranych stanach patologicznych, które stanowiły przedmiot zainteresowania autorów tego artykułu.

2. SYSTEMY KONTROLI AKTYWNOŚCI PROTEAZ

Enzymy proteolityczne występują w naszym organizmie w dwóch odmiennych stanach aktywności. Pierwszy z nich to enzym, który nie jest zdolny do katalizowania reakcji proteolizy i nosi miano nieaktywnego [7]. Proces zahamowania aktywności enzymatycznej jest jednym z najstarszych procesów kontroli tego zjawiska i ze względu na jego rangę obejmuje szereg mechanizmów [8]. Chronologicznie pierwszy z etapów regulacji zachodzi tuż po syntezie enzymu w rybosomach. Powstały enzym zazwyczaj występuje w postaci nieaktywnej, zwanej proenzymem czy też zymogenem [9]. Taka forma enzymu zostaje przetransportowana do odpowiedniego miejsca/lokalizacji komórkowej i tam ulega aktywowaniu. Proces ten zachodzi poprzez hydrolizę enzymatyczną nieaktywnej formy, bądź rzadziej przez inną cząsteczkę enzymu aktywowanego. Proteaza staje się aktywna i w tym momencie zaczyna się swoisty wyścig z czasem. Aktywność powstałej formy enzymu musi być odpowiednia i ściśle regulowana tak, aby katalizować w odpowiednim miejscu i czasie, tylko wybrane reakcje, nie hydrolizując przy tym innych białek stanowiących budulec każdej żywej komórki [10,11]. Aktywność enzymatyczną organizm reguluje na szereg sposobów, między innymi poprzez zmienne pH środowiska reakcji, łączenie się aktywnej formy enzymu z inhibitorami w sposób nieodwracalny lub odwracalny, pułapkowanie aktywnej formy enzymów wewnątrz olbrzymich białek zwanych makroglobulinami, czy też autohydrolizę, czyli zdolność do hydrolitycznego rozpadu cząsteczek tego samego enzymu [12,13]. Inne systemy kontroli aktywności to między innymi: regulacja allosteryczna proteaz z grupy HTRA, czy też kowalencyjna modyfikacja aparatu katalitycznego prowadząca do utraty jego funkcji [14]. Przykładem może być tutaj regulacja aktywności kaspaz poprzez nitrozowanie tiolowej grupy katalitycznej cysteiny, który to proces w istotny sposób reguluje procesy apoptotyczne [15].

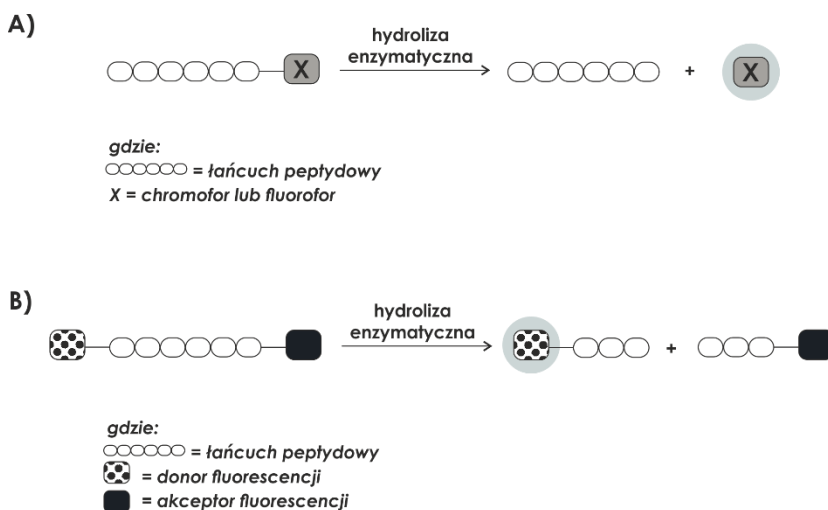
3. MONITOROWANIE AKTYWNOŚCI

Z powyższych rozważań jasno wynika, że kluczowa dla funkcji enzymu jest jego aktywność proteolityczna kontrolowana wieloetapowo, a nie ilość czy stężenie proteazy.

Istnieje szereg metod naukowych mających na celu pomiar aktywności proteazy bądź proteaz. Do najbardziej powszechnych należą te, które wykorzystują niskocząsteczkowe substraty lub znakowane nieodwracalne inhibitory określonych enzymów proteolitycznych ogólnie zwanych niskocząsteczkowymi sondami aktywności [16,17].

Pierwsza grupa - substraty peptydowe, pod wpływem aktywnej formy proteazy, ulegają hydrolizie do fragmentów, czego efektem jest pojawienie się mierzalnego

sygnału optycznego. Dochodzi do uwolnienia cząsteczki barwnej (chromoforu) np. 4-nitroanilidu, kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego [18,19] lub cząsteczki emitującej fluorescencję (donora fluorescencji) np. pochodnych kumaryny (AMF, AMC, ACC) (Rysunek 1A) [20-22]. Alternatywnie w wyniku hydrolizy enzymatycznej może dojść do zmniejszenia efektu wygaszania donora przez akceptor fluorescencji, co z kolei powoduje wzrost emisji fluorescencji (Rysunek 1B). Uwalnianie określonego indywiduum chemicznego, którego stężenie mierzone jest w funkcji czasu przy zastosowaniu różnych metod detekcji, stanowi podstawę oznaczania aktywności proteaz [23]. Powszechnie stosowanymi przykładami par donor-akceptor stanowią: ABZ-Dnp, ABZ-Tyr(3-NO₂), Dabcyl-Edans [24-26]. Jedną z podstawowych cech, charakteryzującą substraty powinna być ich absolutna lub wysoka selektywność w stosunku do określonego enzymu proteolitycznego. Istotną zaletą metody oznaczania aktywności opisanej powyżej, jest fakt amplifikacji w czasie uzyskiwanego sygnału. W wyniku proteolizy dochodzi do ciągłego uwolnienia określonej ilości cząsteczek reporterowych (chromogenicznych bądź fluorescencyjnych), co znacznie ułatwia proces ich monitorowania [8].



Rysunek 1 Budowa i schemat działania (A) substratów zawierających C -końcowy znacznik (B) substratów wykazujących zjawisko wewnątrzcząsteczkowego transferu energii

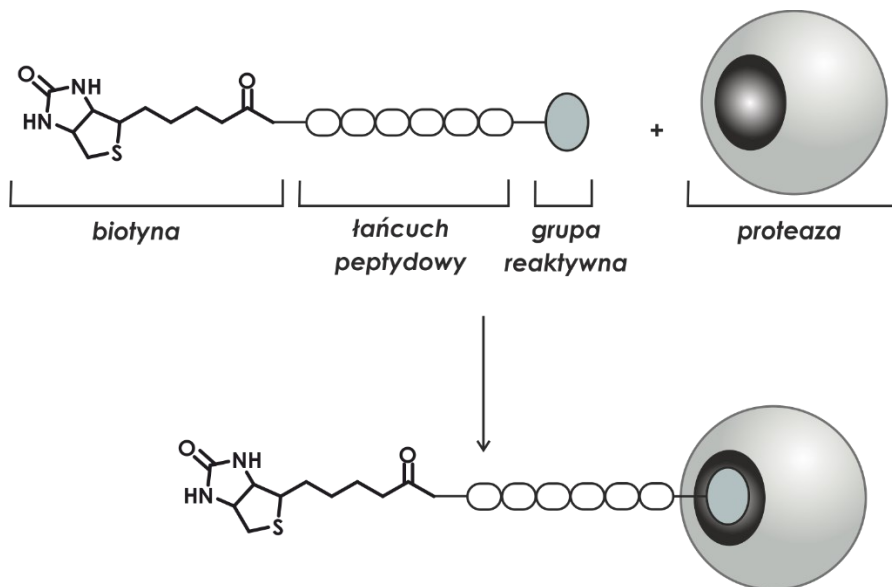
Figure 1. Structure and mechanism of (A) substrates with C-terminal tag (B) intramolecularly quenched substrates

Istnieje szereg metod prowadzących do otrzymania wyżej wymienionych związków, choć dwie z nich: selekcja metodami chemii kombinatorycznej oraz projektowanie z wykorzystaniem struktury docelowych/badanych proteaz (ang. *rational drug design*), należą do najczęściej stosowanych [27,28]. Wymienione

strategie są w istocie na tyle odmienne, że stanowią idealne połączenie zazwyczaj prowadzące do sukcesu. Istnieje jednak wiele prac, w tym naszej grupy badawczej, w których zastosowanie jednej z nich owocuje otrzymaniem niezwykle selektywnego substratu oddziałującego z wybraną proteazą (PR3, CatC, proteasom, NSPs) [29-34].

4. SONDY AKTYWNOŚCI

Niskocząsteczkowe sondy aktywności to grupa inhibitorów nieodwracalnych o wysokiej lub bezwzględnej selektywności wobec badanego enzymu proteolitycznego, zbudowanych z trzech zasadniczych fragmentów [33]. Rysunek 2 przedstawia schematyczną budowę tej grupy związków, gdzie każdy z elementów składowych jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania sond aktywności. Pierwszy z nich to grupa reaktywna (ang. *warhead*), która reaguje z określoną resztą aminokwasową aparatu katalitycznego określonej grupy enzymów. Drugi z fragmentów to część peptydowa, w znaczącym stopniu decydująca o selektywności wiązania/oddziaływań z określonym enzymem. Sekwencja peptydu pochodzi zazwyczaj z selektywnego wobec określonej proteazy substratu, o którym wspomniano wyżej [34]. Trzeci element to znacznik o określonych cechach takich jak: fluorescencja, luminescencja lub powinowactwo do określonego liganda, tak jak obserwujemy to w przypadku oddziaływań biotyny z białkami z grupy awidyn [35].



Rysunek 2. Niskocząsteczkowa sonda aktywności
Figure 2. Low molecular activity probe

5. PRZYKŁADY DIAGNOSTYCZNEGO ZASTOSOWANIA ENZYMÓW

Zastosowanie diagnostyczne enzymów stanowi obiekt prac naszej grupy badawczej. Poniżej przedstawimy kilka przykładów.

W tym miejscu chcielibyśmy zaznaczyć, że wybór proteaz jako potencjalnych celów diagnostycznych wynika bezpośrednio z ich funkcji oraz łatwości w oznaczaniu. Istnieją dwa teoretyczne scenariusze, w których proces oznaczania aktywności proteaz może być pomocny. Pierwszy z nich dotyczy enzymów, które nie występują lub nie wykazują aktywności w materiale (płynach, tkankach) pochodzącym od zdrowego człowieka. Przykładem może być tutaj infekcja wirusowa lub bakteryjna skutkująca pojawieniem się enzymów proteolitycznych pochodzenia egzogenego [36]. W takim przypadku rozpad selektywnego substratu pod wpływem takiej proteazy prowadzi do pozytywnej diagnozy i w konsekwencji potwierdzenia zakażenia. Badania tego typu prowadziliśmy nad proteazą wirusa Zika, w której identyfikacja selektywnej sekwencji mogłaby stać się elementem diagnostyki zakażenia tym wirusem [37,38]. Określiśmy specyficzną sekwencję ABZ-Val-Lys-Lys-Arg-Ala-Ala-Trp-Tyr(3-NO₂)-NH₂, wykazującą doskonałe parametry kinetyczne (k_{cat}/K_M osiąga prawie $1,26 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$), nie rozpoznawaną przez białka wirusa West Nile.

Poszukiwanie nowych testów diagnostycznych pozwalających na szybkie i bezinwazyjne rozpoznanie choroby jest jednym z kluczowych zagadnień w walce z nowotworami. Rak pęcherza moczowego z roku na rok zbiera coraz większe żniwo przypadków śmiertelnych, z tego względu, że choroba jest wykrywana zbyt późno. Od kilku lat nasz zespół prowadzi badania nad wykorzystaniem enzymów proteolitycznych do wczesnego rozpoznania tego stanu patologicznego. Pierwszym przykładem jest ludzki proteasom 20S [39]. Zoptymalizowaliśmy specyficzny substrat ABZ-Val-Val-Ser-Tyr-Ala-Met-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂, wykazujący doskonałą stałą specyficzności ($9,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) i wysoką wartość $k_{cat} = 8 \text{ s}^{-1}$. Używając tego peptydu, zidentyfikowaliśmy aktywność chymotrypsynową proteasomu w większości próbek moczu uzyskanych od pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego, podczas gdy aktywność proteasomu w próbkach moczu zdrowych ochotników była poniżej granicy wykrywalności (0,5 pmola). Dodatkowo opracowaliśmy wysoce czułe sondy do określania aktywności podjednostki trypsynowej tego enzymu [40]. Wyselekcjonowaliśmy peptydomimetyk o ogólnym wzorze ABZ-Dap(O₂(Cbz))-Dap(GO1)-Dap(O₂(Cbz))-Arg-ANB-NH₂, którego hydroliza przebiegała według kinetyki sigmoidalnej, charakterystycznej dla enzymów allosterycznych, uzyskując wartości $K_m = 3,22 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}$, $k_{cat} = 245 \text{ s}^{-1}$, i $k_{cat}/K_m = 7,61 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Substrat pozwala na wykrycie ludzkiego proteasomu

20S w stężeniu do 10^{-11} M. Związek wykorzystaliśmy również do wykrycia enzymu w próbkach moczu pobranych od pacjentów z rakiem pęcherza moczowego.

Kolejnym przykładem jest wykorzystanie jako biomarkera ludzkiej kallikreiny 13. Opracowaliśmy wysoce czuły substrat, ABZ-Val-Arg-Phe-Arg-Ser-Thr-Gln-Tyr(3-NO₂)-NH₂, odpowiedni do oznaczania aktywności KLK13, charakteryzujący się $k_{cat}/K_M \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ [25]. Posiadając odpowiednie narzędzia, wykorzystaliśmy je do określenia obecności enzymu w próbkach moczu pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego, w zależności od stopnia rozwoju choroby [41]. Próbkę pobrane od pacjentów z nowotworem ze stopniem stopniu rozwoju G2 i G3 zawierały aktywną proteolitycznie kallikreinę 13, co potwierdziła analiza kinetyczna i detekcja immunochemiczna. Interesującym jest fakt, że enzym nie został wykryty w moczu pacjentów ze stopniem G1 raka pęcherza.

Wiadomo, że procesy zapalne odgrywają złożoną rolę w karcynogenezie. Z tego względu zdecydowaliśmy się na pomiar aktywności proteolitycznej w próbkach moczu pobranych od pacjentów z nowotworami nabłonkowymi i/lub stanami zapalnymi [42]. Wykazaliśmy, że substrat ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH₂ może być stosowany jako marker stanu zapalnego związanego bądź nie z nowotworami nabłonkowymi. Dodatkowo okazało się, że stan zapalny związany jest z aktywnością elastazy neutrofilowej (HNE) u ludzi. Podejrzewamy, że aktywność proteolityczna próbek moczu wynika z odpowiedzi neutrofilii na czynnik zapalny, który jest bezpośrednio związany z procesem nowotworowym.

W toku prowadzonych badań nad nowotworem pęcherza moczowego udało nam się potwierdzić, że wraz z rozwojem choroby zmienia się także profil enzymatyczny, co można wykorzystać w ocenie stopnia rozwoju tego schorzenia [43]. Wykazaliśmy, że substraty ABZ-Ile-Leu-Pro-Trp-ANB-NH₂ (G1), ABZ-Leu-Glu-Thr-Lys-ANB-NH₂ (G2) oraz ABZ-Thr-Gln-Leu-Val-ANB-NH₂ (G3) mogą być stosowane jako narzędzia diagnostyczne do wykrywania raka pęcherza, a także otrzymaliśmy panel substratów do rozróżnienia trzech etapów rozwoju nowotworu. Przedstawiona metoda może być wykorzystana do diagnozowania raka pęcherza moczowego ze wskazaniem stadium rozwoju choroby.

Określanie aktywności poszczególnych enzymów proteolitycznych w próbkach biologicznych może mieć istotne znaczenie w rozpoznawaniu chorób cywilizacyjnych, do jakich należy cukrzyca. Zastosowaliśmy zoptymalizowany wcześniej [30], wysoce selektywny substrat fluorescencyjny dla katepsyny C: Thi-Ala(Mca)-Ser-Gly-Tyr(3-NO₂)-NH₂, i udowodniliśmy, że w przypadku nefropatii cukrzycowej poziom enzymu wzrasta, co może stanowić ważny czynnik prognostyczny w rozwoju tej choroby [44].

Podsumowując, monitorowanie aktywności proteolitycznej określonego enzymu lub grupy enzymów, przy użyciu syntetycznych specyficznych selektywnych związków (substratów bądź znakowanych inhibitorów), może w naszej

ocenie stanowi istotny element diagnostyki wybranych chorób cywilizacyjnych (takich jak nowotwory, przewlekły proces zapalny czy cukrzyca). Kluczową rolę w tym zakresie jest określenie celu czyli właściwa identyfikacja określonej proteazy a następnie otrzymanie narzędzi chemicznych o wysokim stopniu selektywności. Uważamy że w świetle naszych badań wybrane proteazy o zmienionej aktywności w stosunku do ich poziomu z grupy kontrolnej mogą w przyszłości stać się celami molekularnymi nie tylko w diagnostyce lecz także w terapii.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C. López-Otín, J. S. Bond, Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 30433.
- [2] J.A. Mótyán, F. Tóth, J. Tózsér, Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 2013, **3**, 923.
- [3] K. Tanaka, The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 2009, **85**, 12.
- [4] H.Y. Chang, X. Yang, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, **64**, 821.
- [5] S.A. Smith, R.J. Travers, J.H. Morrissey, How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2015, **50**, 326.
- [6] A. Shawli, Y. Almaghrabi, A.S. AlQuhaibi, Y. Alghamdi, A.M. Aboud, A Mutation in Cathepsin C Gene Causing Papillon-Lefèvre Syndrome in a Saudi Patient: A Case Report. *Cureus*, 2020, **12**, 6546.
- [7] M.C. Ferrall-Fairbanks, C.A. Kieslich, M.O. Platt, Reassessing enzyme kinetics: Considering protease-as-substrate interactions in proteolytic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2020, **117**, 3307.
- [8] P.K. Robinson, Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.*, 2015, **59**, 1.
- [9] A.R. Khan, M.N. James, Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.*, 1998, **7**, 815.
- [10] S.H. Lecker, A.L. Goldberg, W.E. Mitch, Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, **17**, 1807.
- [11] J. Hanna, A. Guerra-Moreno, J. Ang, Y. Micoogullari, Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease. *Am. J. Pathol.*, 2019, **189**, 94.
- [12] R. Fontes, J. M. Ribeiro, A. Sillero, Inhibition and activation of enzymes. The effect of a modifier on the reaction rate and on kinetic parameters. *Acta Biochim. Pol.*, 2000, **47**, 233.
- [13] A. Geronikaki, Recent Trends in Enzyme Inhibition and Activation in Drug Design. *Molecules.*, 2020, **26**, 17.
- [14] M. Merski, C. Moreira, R.M. Abreu, M.J. Ramos, P.A. Fernandes, L.M. Martins, P. Pereira, S. Macedo-Ribeiro, Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. *Cell Death Dis*, 2017, **8**, 3119.
- [15] A.K. Iyer, Y. Rojanasakul, N. Azad, Nitrosothiol signaling and protein nitrosation in cell death. *Nitric oxide.*, 2014, **42**, 9.
- [16] E. Vuorinen, S. Valtonen, N. Hassan, R. Mahran, H. Habib, M. Malakoutikhah, K. Kopra, H. Härmä, Protease Substrate-Independent Universal Assay for Monitoring Digestion of Native Unmodified Proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 6362.

- [17] M. Poreba, R. Solberg, W. Rut, N.N. Lunde, P. Kasperkiewicz, S. J. Snipas, M. Mihelic, D. Turk, B. Turk, G. S. Salvesen, M. Drag, Counter Selection Substrate Library Strategy for Developing Specific Protease Substrates and Probes. *Cell Chem. Biol.*, 2016, **23**, 1023.
- [18] K. Hojo, M. Maeda, S. Iguchi, T. Smith, H. Okamoto, K. Kawasaki, Amino acids and peptides. XXXV. Facile preparation of p-nitroanilide analogs by the solid-phase method. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2000, **48**, 1740.
- [19] M. Wysocka, B. Spichalska, A. Lesner, M. Jaros, K. Brzozowski, A. Łęgowska, K. Rolka, Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 5504.
- [20] A. Lesner, M. Wysocka, K. Guzew, W. Wicz, A. Legowska, K. Rolka, Development of sensitive cathepsin G fluorogenic substrate using combinatorial chemistry methods. *Anal. Biochem.*, 2008, **375**, 306.
- [21] M. Wysocka, N. Gruba, A. Miecznikowska, J. Popow-Stellmaszyk, M. Gütschow, M. Stimberg, N. Furtmann, J. Bajorath, A. Lesner, K. Rolka, Substrate specificity of human matriptase-2. *Biochimie.*, 2014, **97**, 121.
- [22] X. Tian, L.C. Murfin, L. Wu, S.E. Lewis, T.D. James, Fluorescent small organic probes for biosensing. *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 3406.
- [23] C.R. Drake, D.C. Miller, E. F. Jones, Activatable Optical Probes for the Detection of Enzymes. *Curr. Org. Synth.*, 2011, **8**, 498.
- [24] L. Wu, C. Huang, B.P. Emery, A.C. Sedgwick, S.D. Bull, H.P. He, H. Tian, J. Yoon, J.L. Sessler, T. D. James, Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents. *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 5110.
- [25] N. Gruba, E. Bielecka, M. Wysocka, A. Wojtysiak, M. Brzezińska-Bodal, K. Sychowska, M. Kalińska, M. Magoch, A. Pęczak, K. Falkowski, M. Wiśniewska, L. Sądziadek, K. Płaza, E. Kroll, A. Pejkovska, M. Rehders, K. Brix, G. Dubin, T. Kantyka, J. Potempa, A. Lesner, Development of Chemical Tools to Monitor Human Kallikrein 13 (KLK13) Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 1557.
- [26] S.S. Cotrin, L. Puzer, W.A. de Souza Judice, L. Juliano, A.K. Carmona, M.A. Juliano, Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. *Anal. Biochem.*, 2004, **335**, 244.
- [27] C. Seoane Prado, Síntesis combinatoria: una nueva metodología en química médica [Combinatorial synthesis: an important methodology in medicinal chemistry]. *Anales RANM*, 2005, **122**, 723.
- [28] T. Mavromoustakos, S. Durdagi, C. Koukoulitsa, M. Simcic, M.G. Papadopoulos, M. Hodoscek, S.G. Grdadolnik, Strategies in the rational drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2011, **18**, 2517.
- [29] J. Popow-Stellmaszyk, M. Wysocka, A. Lesner, B. Korkmaz, K. Rolka, A new proteinase 3 substrate with improved selectivity over human neutrophil elastase. *Anal. Biochem.*, 2013, **442**, 75.
- [30] M. Łęgowska, Y. Hamon, A. Wojtysiak, R. Grzywa, M. Sieńczyk, T. Burster, B. Korkmaz, A. Lesner, Development of the first internally-quenched fluorescent substrates of human cathepsin C: The application in the enzyme detection in biological samples. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2016, **612**, 91.
- [31] N. Gruba, M. Wysocka, M. Brzezińska, D. Debowski, K. Rolka, N. I. Martin, A. Lesner, Novel internally quenched substrate of the trypsin-like subunit of 20S eukaryotic proteasome. *Anal. Biochem.*, 2016, **508**, 38.
- [32] M. Wysocka, N. Gruba, R. Grzywa, A. Giełdoń, R. Bączor, K. Brzozowski, M. Sieńczyk, J. Dieter, Z. Szewczuk, K. Rolka, A. Lesner, PEGylated substrates of NSP4 protease: A tool to study protease specificity. *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 22856.

- [33] M. Maślanka, A. Mucha, Recent Developments in Peptidyl Diaryl Phosphonates as Inhibitors and Activity-Based Probes for Serine Proteases. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 2019, **12**, 86.
- [34] H. Fang, B. Peng, S. Y. Ong, Q. Wu, L. Li, S.Q. Yao, Recent advances in activity-based probes (ABPs) and affinity-based probes (AIBPs) for profiling of enzymes. *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 8288.
- [35] D. W. Grainger, D. G. Castner, M. Dubey, K. Emoto, H. Takahashi, Affinity-based Protein Surface Pattern Formation by Ligand Self-Selection from Mixed Protein Solutions. *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 3046.
- [36] F. McNab, K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, A. O'Garra, Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, **15**, 87.
- [37] N. Gruba, J. I. Rodriguez Martinez, R. Grzywa, M. Wysocka, M. Skoreński, M. Burmistrz, M. Łęcka, A. Lesner, M. Sieńczyk, K. Pyrc, Substrate profiling of Zika virus NS2B-NS3 protease. *FEBS Lett.*, 2016, **590**, 3459.
- [38] N. Gruba, J. Martinez, R. Grzywa, M. Wysocka, M. Skoreński, A. Dabrowska, M. Łęcka, P. Suder, M. Sieńczyk, K. Pyrc, A. Lesner, One Step Beyond: Design of Substrates Spanning Primed Positions of Zika Virus NS2B-NS3 Protease. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2018, **9**, 1025.
- [39] N. Gruba, M. Wysocka, M. Brzezińska, D. Dębowski, M. Sieńczyk, E. Gorodkiewicz, T. Guszcz, C. Czapplewski, K. Rolka, A. Lesner, Bladder cancer detection using a peptide substrate of the 20S proteasome. *FEBS J.*, 2016, **283**, 2929.
- [40] M. Wysocka, A. Romanowska, N. Gruba, M. Michalska, A. Giełdoń, A. Lesner, A Peptidomimetic Fluorescent Probe to Detect the Trypsin β 2 Subunit of the Human 20S Proteasome. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 2396.
- [41] N. Gruba, P. Rachubik, A. Piwkowska, A. Lesner, Analysis of urinary kallikrein-related peptidase 13 for monitoring bladder cancer. *Biomarkers.*, 2021, **26**, 770.
- [42] N. Gruba, L. Stachurski, A. Lesner, Elastolytic activity is associated with inflammation in bladder cancer. *J. Biochem.*, 2021, **170**, 547.
- [43] N. Gruba, L. Stachurski, A. Lesner, Chemical tools to monitor bladder cancer progression. *Biomarkers.*, 2022, 1. Advance online publication
- [44] I. Audzeyenka, P. Rachubik, D. Rogacka, M. Typiak, T. Kulesza, S. Angielski, M. Rychłowski, M. Wysocka, N. Gruba, A. Lesner, M. A. Saleem, A. Piwkowska, Cathepsin C is a novel mediator of podocyte and renal injury induced by hyperglycemia. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2020, **1867**, 118723.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 maja 2022 r.

