



Uniwersytet Gdański

Wydział Chemii

Katedra Chemii Biomedycznej

Honorata Sikora

**Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 jako czynnika
predykcyjnego rozwoju nefropatii cukrzycowej**

Promotor: dr hab. Magdalena Wysocka, prof. UG

Promotor pomocniczy: dr Natalia Gruba

Gdańsk 2025

Praca realizowana była w ramach projektu NCN OPUS 15
pt. „Rola białek klotho i NPP1 w regulacji funkcji komórki podocytarnej”
(umowa nr 2018/29/B/NZ4/02074)

Kierownik projektu: prof. dr hab. Agnieszka Piwkowska, IMDiK, PAN,

Partner w konsorcjum: prof. dr hab. Adam Lesner, UG



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi dr hab. Magdalenie Wysockiej, prof. UG za szeroko pojętą opiekę naukową, przekazaną wiedzę i wsparcie merytoryczne.

Dziękuję również dr Natalii Gruba za okazane wsparcie, cenne rady oraz wszechstronną pomoc podczas powstawania niniejszej pracy.

Również chciałabym podziękować rodzinie a szczególnie mężowi, za niesłabnącą motywację, ogromną dozę cierpliwości, wsparcia i zrozumienia.

Spis treści

Streszczenie	9
Abstract	11
Wykaz stosowanych skrótów	13
I Wprowadzenie teoretyczne	14
1 Rodzina białek dezintegryny i metaloproteazy. Budowa, funkcje biologiczne oraz wpływ na rozwój chorób	15
2 Enzym dezintegryny i metaloproteazy 17	19
2.1 Budowa enzymu ADAM 17	19
2.2 Substraty enzymu ADAM 17 oraz wpływ ich procesowania na komórki organizmu	25
2.3 Choroby wywołane zmianami aktywności enzymu ADAM 17	31
2.4 Inhibitory enzymu ADAM 17	37
3 Cukrzyca	41
4 Nefropatia cukrzycowa	44
4.1 Klasyfikacja	44
4.2 Diagnostyka	46
4.3 Potencjalne metody leczenia	49
4.3.1 Inhibitory stresu oksydacyjnego	50
4.3.2 Inhibitory odpowiedzialne za właściwą kontrolę glikemiczną	50
4.3.3 Pozostałe inhibitory stosowane w terapii DN	51
4.4 Patogeneza nefropatii cukrzycowej, ze szczególnym uwzględnieniem enzymów proteolitycznych	52
5 Nefron – podstawowa jednostka budulcowa układu wydalniczego	56
5.1 Funkcje elementów strukturalnych odpowiedzialnych za filtrację kłębuszkową	56
5.2 Zmiany zachodzące w kłębuszkach nerkowych podczas rozwoju nefropatii cukrzycowej	59
5.3 Wpływ hiperglikemii na podocyty w modelu komórkowym	60
5.4 Znaczenie białka Klotho w komórkach nerek	61
II Metody	65
1 Chemia kombinatoryczna	66
2 Synteza peptydów	68
2.1 Nośnik stały	68
2.2 Pochodne aminokwasów i ich grupy ochronne	70
2.3 Automatyzacja procesu syntezy peptydów	71
2.4 Stosowane aktywatory	72
3 Metody analizy aktywności proteolitycznej enzymów	72
3.1 Substraty chromogeniczne	72
3.2 Substraty fluorogeniczne	73
3.3 Substraty fluorogeniczne wykorzystujące wewnątrzcząsteczkowy transfer energii wzbudzenia elektronowego	75
3.4 Notacja Schechtera i Bergera	79
4 Wyznaczanie parametrów kinetycznych substratów	79

III	Cel pracy	82
IV	Badania własne	85
1	Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X ₁	86
2	Określenie specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X ₄	88
3	Określenie specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X ₃	89
3.1	Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki	89
3.2	Synteza tetrapeptydowej biblioteki o sekwencji ABZ-Asn-X ₃ -X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	91
3.3	Przyłączanie do żywicy chromoforu ANB	91
3.4	Wprowadzenie do sekwencji reszty aminokwasowej alaniny w pozycji P ₁ biblioteki	92
3.5	Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X ₂ biblioteki	92
3.6	Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X ₃ biblioteki	93
3.7	Wprowadzenie do sekwencji reszty aminokwasowej Fmoc-Asn(Trt)-OH w pozycji X ₄ biblioteki	93
3.8	Wprowadzenie kwasu 2-aminobenzoesowego (ABZ) do sekwencji biblioteki	93
3.9	Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych o sekwencji ABZ-Asn-X ₃ -X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	94
3.10	Analiza jonu masowego podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₃	94
4	Dekonwolucja tetrapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-X ₃ -X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	96
5	Synteza związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	96
5.1	Etapy syntezy	96
5.2	Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych pochodnych tetrapeptydowych o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	97
5.3	Analiza jonu masowego związków o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	98
6	Dekonwolucja pozycji X ₂ 19 związków o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-X ₂ -Ala-ANB-NH ₂	98
7	Synteza heptapeptydowej biblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X ₁ '-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	98
7.1	Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy heptapeptydowej biblioteki	99
7.2	Reakcja przyłączania chromofora Fmoc-L-Tyr(3-NO ₂)-OH do żywicy	99
7.3	Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X ₃ ' biblioteki	100
7.4	Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X ₂ ' biblioteki	100
7.5	Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X ₁ ' biblioteki	100
7.6	Przyłączanie do 19 podbibliotek sekwencji: Fmoc-Tyr(tBu)-Met-Ala-OH	101
7.7	Przyłączanie do 19 podbibliotek sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH	101
7.7.1	Synteza dipeptydomimetyku Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH	101

7.7.1.1	Osadzanie reszty aminokwasowej na żywicy	101
7.7.1.2	Oznaczanie stopnia osadzenia peptydylożywicy	102
7.7.1.3	Przyłączanie Boc-ABZ-OH	102
7.7.1.4	Usuwanie dipeptydomimetyku Boc-ABZ-Asn(Trt)- OH z nośnika stałego	102
7.7.2	Przyłączanie sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH	103
7.8	Usuwanie z nośnika stałego podbibliotek heptapeptydowych o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X ₁ '-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	103
7.9	Analiza jonu masowego podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₁ '	103
8	Dekonwolucja pozycji X ₁ ' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X ₁ '-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	105
9	Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej otrzymanych związków	105
10	Synteza heptapeptydowej biblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	106
10.1	Etapy syntezy biblioteki peptydowej o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	106
10.2	Usuwanie z nośnika stałego podbibliotek o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	107
10.3	Analiza jonu masowego ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₂ '	108
11	Dekonwolucja pozycji X ₂ ' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	109
12	Synteza związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	109
12.1	Etapy syntezy związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	109
12.2	Usuwanie z nośnika stałego związków o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	110
12.3	Analiza jonu masowego związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	111
13	Dekonwolucja pozycji X ₃ ' w związkach o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	111
14	Modyfikacje substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	112
14.1	Strategia syntezy modyfikowanych substratów z zastosowaniem automatycznego syntezyzatora mikrofalowego	113
14.2	Strategia syntezy modyfikowanych substratów o numerach 2-4 metodą hybrydową	114
14.3	Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych analogów	114
15	Ocena wydajności hydrolizy modyfikowanych substratów fluorogenicznych	114

16	Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla substratów 1, 5 oraz 9	115
17	Hamowanie aktywności enzymu ADAM 17 inhibitorem TAPI-0	117
18	Hydrolyza substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH ₂ przez wybrane proteazy	118
19	Badania aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w materiale biologicznym	118
19.1	Materiał biologiczny wykorzystany do badań <i>in vitro</i> wraz z zastosowanymi modyfikacjami	118
19.2	Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w lizatach linii komórkowej ludzkich podocytów	120
19.3	Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w medium zewnątrzkomórkowym linii komórkowych ludzkich podocytów	121
19.4	Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu szczurów z indukowaną cukrzycą	121
19.5	Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu pacjentów chorych na cukrzycę	122
V	Wyniki i dyskusja	123
1	Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₁	124
2	Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₄	126
3	Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₃	127
4	Dekonwolucja dziewiętnastu związków ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₂	128
5	Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₁ '	130
6	Analiza podbiblioteki o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X ₂ '-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej	131
7	Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₂ '	134
8	Analiza podbiblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X ₃ '-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej	135
9	Dekonwolucja dziewiętnastu związków ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X ₃ '	137
10	Analiza związku o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej	138
11	Ocena wydajności hydrolyzy pochodnych substratu fluorogenicznego w obecności enzymu ADAM 17	142
12	Parametry kinetyczne wybranych substratów	144
13	Wyniki badania wpływu inhibitora TAPI-0 na aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17	148
14	Ocena selektywności substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH ₂ w obecności wybranych proteaz	149

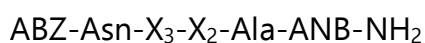
15	Badania biologiczne	150
15.1	Wpływ modyfikacji wprowadzonych na etapie hodowli komórek podocytów ludzkich na aktywność enzymu ADAM 17	150
15.2	Wyniki aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu szczurów z indukowaną cukrzycą	154
15.3	Wyniki aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu pacjentów chorych na cukrzycę	155
VI	Podsumowanie i wnioski	158
VII	Dorobek naukowy	161
VIII	Wykaz rycin	164
IX	Wykaz tabel	171
X	Bibliografia	172

Streszczenie

Enzym Dezintegryny i Metaloproteazy 17 (ang. A Disintegrin And Metalloprotease, ADAM 17) to transmembranowa proteaza multidomenowa, która uczestniczy w procesach uwalniania cytokin z powierzchni komórki. Enzym ten zaangażowany jest w hydrolizę wielu substratów białkowych, dlatego wszelkie zmiany w jego aktywności mogą prowadzić do zaburzeń w homeostazie enzymatycznej, co skutkuje rozwojem patologicznych zmian w organizmie. Wiele badań dowodzi, że ADAM 17 jest między innymi powiązany z patogenezą nefropatii cukrzycowej.

Nefropatia cukrzycowa (DN), znana również jako cukrzycowa choroba nerek, jest poważnym powikłaniem cukrzycy. Diagnozowanie tej choroby jest bardzo skomplikowane i obecnie opiera się na badaniu obecności białka w moczu (mikroalbuminuria). Niestety, objaw ten pojawia się dopiero w trzecim stadium choroby, kiedy zmiany w strukturze kłębuszków nerkowych stają się nieodwracalne. Dodatkowo, podwyższone stężenie białka jest charakterystyczne dla wielu innych chorób nerek. Dokładny mechanizm rozwoju tej choroby nie jest wciąż w pełni poznany. Badania wykazują korelację między rozwojem DN a zwiększoną aktywnością specyficznych proteaz, takich jak metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej oraz enzymów z rodziny ADAM w tym ADAM 17.

Aktywność ADAM 17 można monitorować za pomocą substratów fluorogenicznych. W niniejszej pracy sekwencja substratu została wyselekcjonowana przy zastosowaniu metod chemii kombinatorycznej (porcjowania i łączenia). W tym celu wykonałam syntezę dwóch bibliotek peptydowych o wzorach ogólnych:



Gdzie: X₃, X₂ – reszty aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy (donor fluorescencji)

ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (akceptor fluorescencji)

ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Gdzie: X₃', X₂', X₁' - reszty aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny

Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amid 3-nitro-L-tyrozyny (akceptor fluorescencji)

Dekonwolucję wobec ADAM 17 wykonałam metodą iteracyjną. W efekcie otrzymałam związek o sekwencji:

ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂

W późniejszych etapach badań analizowałam wpływ modyfikacji w obrębie C-końca substratu na tempo jego hydrolizy. Na podstawie parametrów kinetycznych określiłam sekwencję najefektywniej hydrolizowanego substratu:

ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂

Gdzie: Lys(DNP)-NH₂ – amid N-ε-2,4-dinitrofenylolizyny (akceptor fluorescencji)

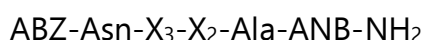
W ramach niniejszej pracy przeprowadziłam również analizę selektywności otrzymanego substratu względem kilku proteaz i udowodniłam, że substrat wykazuje dużą selektywność wobec ADAM 17. Dodatkowo przeprowadziłam pomiary aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w materiale biologicznym. Na ich podstawie określiłam aktywność badanego enzymu w medium zewnątrzkomórkowym oraz lizatach ludzkich podocytów. Ponadto przeprowadziłam badania próbek moczu szczurów z indukowaną cukrzycą, gdzie zaobserwowałam znaczący wzrost aktywności badanego enzymu. Wykazałam również, że w moczu pacjentów z cukrzycą obserwuje się zwiększoną aktywność tego enzymu.

Abstract

The enzyme Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM 17) is a transmembrane multidomain protease that participates in the processes of cytokine release from the cell surface. This enzyme is involved in the hydrolysis of many protein substrates, so any changes in its activity can lead to disturbances in enzymatic homeostasis, resulting in pathological changes in the body. Many studies show that ADAM 17 is, among other things, associated with the pathogenesis of diabetic nephropathy.

Diabetic nephropathy (DN), also known as diabetic kidney disease, is a serious complication of diabetes. Diagnosing this disease is very complex and currently relies on testing for the presence of protein in urine (microalbuminuria). Unfortunately, this symptom appears only in the third stage of the disease, when changes in the structure of the glomeruli become irreversible. Additionally, elevated protein levels are characteristic of many other kidney diseases. The exact mechanism behind the development of this disease is still not fully understood. Studies show a correlation between the development of DN and increased activity of specific proteases, such as extracellular matrix metalloproteinases and enzymes from the ADAM family, including ADAM 17.

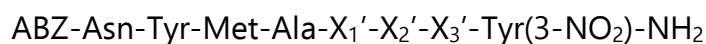
ADAM 17 activity can be monitored using fluorogenic substrates. In this study, the substrate sequence was selected using combinatorial chemistry methods (partitioning and linking). For this purpose, I synthesized two peptide libraries with the general formulas:



Where: X_3, X_2 – protein amino acid residues except cysteine

ABZ – 2-aminobenzoic acid (fluorescence donor)

ANB-NH₂ – amide of 5-amino-2-nitrobenzoic acid (fluorescence acceptor)



Where: X₃', X₂', X₁' – protein amino acid residues except cysteine

Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amide of 3-nitro-L-tyrosine (fluorescence acceptor)

The deconvolution against ADAM 17 was performed using an iterative method. As a result, a compound with the sequence was obtained:



In the later stages of the study, I analyzed the effect of modifications at the C-terminal end of the substrate on the rate of its hydrolysis. Based on the kinetic parameters, the sequence of the most efficiently hydrolyzed substrate was determined:



Where: Lys(DNP)-NH₂ – amide of N-ε-2,4-dinitrophenyllysine (fluorescence acceptor)

In this work, I also conducted an analysis of the selectivity of the obtained substrate towards several proteases and demonstrated that the substrate shows high selectivity for ADAM 17. Additionally, proteolytic activity measurements of ADAM 17 enzyme in biological material were carried out. Based on these measurements, I determined the activity of the studied enzyme in the extracellular medium and human podocyte lysates. Furthermore, studies were conducted on urine samples from rats with induced diabetes, where a significant increase in the enzyme's activity was observed. It was also shown that in the urine of diabetic patients, increased activity of this enzyme is observed.

Wykaz stosowanych skrótów

Wykorzystywane w treści symbole oraz skróty reszt aminokwasowych, ich pochodnych oraz grup osłonowych są zgodne z ustaleniami Komisji Nomenklatury Biochemicznej Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej oraz Międzynarodowej Unii Biochemicznej IUPAC -IUB¹⁻⁴.

Większość stosowanych oznaczeń nieobjętych powyższymi postanowieniami została rozwinięta w tekście. Pozostałe skróty podane są poniżej:

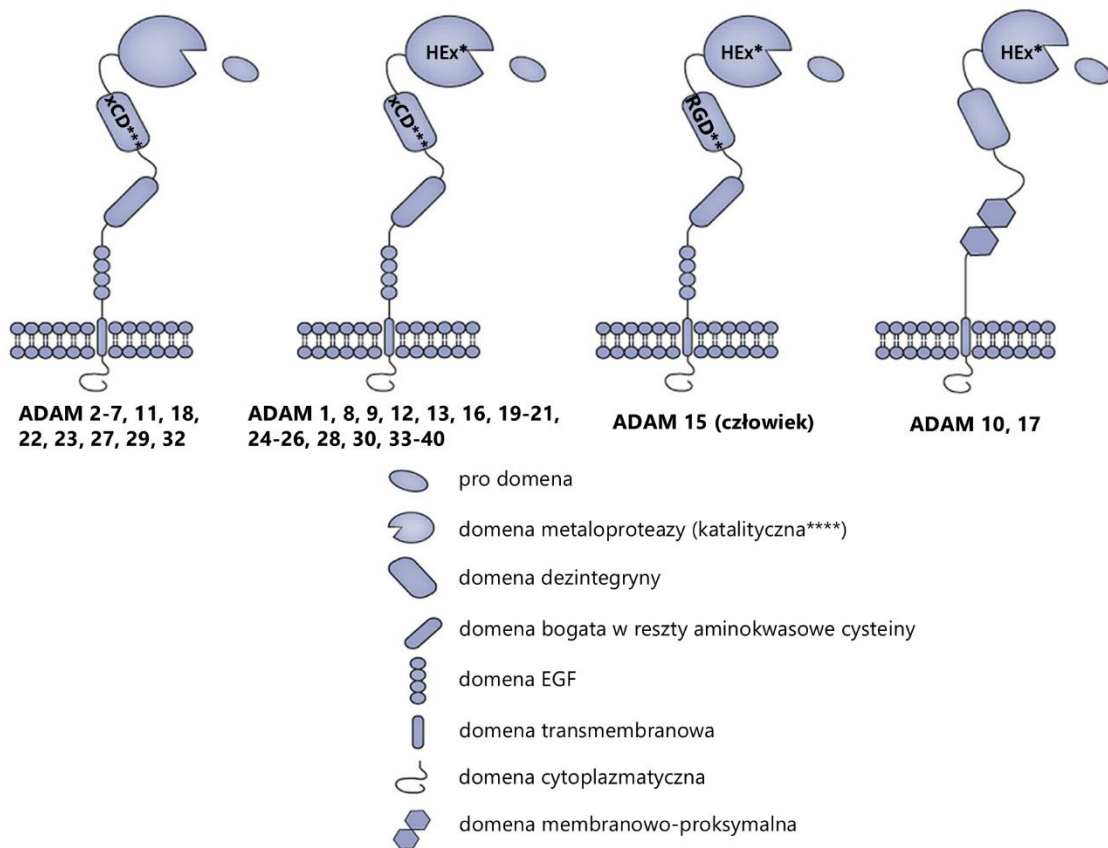
ACN	Acetonitryl
AcOH	Kwas etanowy
Brij-35	Eter laurylopolietylenoglikolowy
EtOH	Etanol
NMP	<i>N</i> -metylo-2-pirolidon
OXYMA	Cyjano(hydroksyimino)octan etylu
PBS	Sól fizjologiczna w buforze fosforanowym
TIPS	Triizopropylosilan
TRIS-HCl	Chlorowodorek 2-amino(2-hydroksymetylo)propano-1,3-diolu

WPROWADZENIE TEORETYCZNE

1. Rodzina białek dezintegryny i metaloproteazy. Budowa, funkcje biologiczne oraz wpływ na rozwój chorób

Rodzina białek dezintegryny i metaloproteazy (ang. A Disintegrin And Metalloproteinases, ADAM) to grupa kilkudziesięciu przedstawicieli związków, w tym enzymów proteolitycznych, które łączą podobieństwa strukturalne. Każde z białek należących do rodziny koordynuje jon cynku. Białka te składają się z wielu domen takich, jak: pro domena, domena metaloproteazy (zwana domeną katalityczną dla przedstawicieli będących enzymami), domena dezintegryny, domena membranowo-proksymalna (inaczej domena bogata w reszty aminokwasowe cysteiny), domena naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor, EGF), domena transmembranowa oraz domena cytoplazmatyczna. Każdy przedstawiciel należy do grupy białek transmembranowych, jednakże część z nich może występować również w formie rozpuszczalnej⁵.

Podział białek należących do rodziny ADAM odbywa się na podstawie różnic w ich budowie. Aktywne proteolitycznie białka ADAM w domenie katalitycznej posiadają fragment o ogólnej sekwencji aminokwasowej: His-Glu-aa-Gly-His-aa-aa-Gly-aa-aa-His-Asp (ang. HEx sequence). W obrębie domeny dezintegryny wyróżnia się motywy odpowiedzialne za oddziaływania z innymi białkami, których sekwencja to: aa-Cys-Glu (xCD), bądź: Arg-Gly-Glu (RGD). Klasyfikacja białek z uwzględnieniem różnic w budowie została przedstawiona graficznie na Rycinie 1.



Rycina 1. Schemat budowy przedstawicieli białek z rodziny ADAM. HEX* - sekwencja aminokwasowa charakterystyczna dla białek aktywnych proteolitycznie, RGD** - sekwencja Arg-Gly-Glu, xCD*** – sekwencja aa-Cys-Glu, **** - domena metaloproteazy określana jest domeną katalityczną dla przedstawicieli aktywnych enzymatycznie. Rysunek wykonany na podstawie literatury^{6,7}.

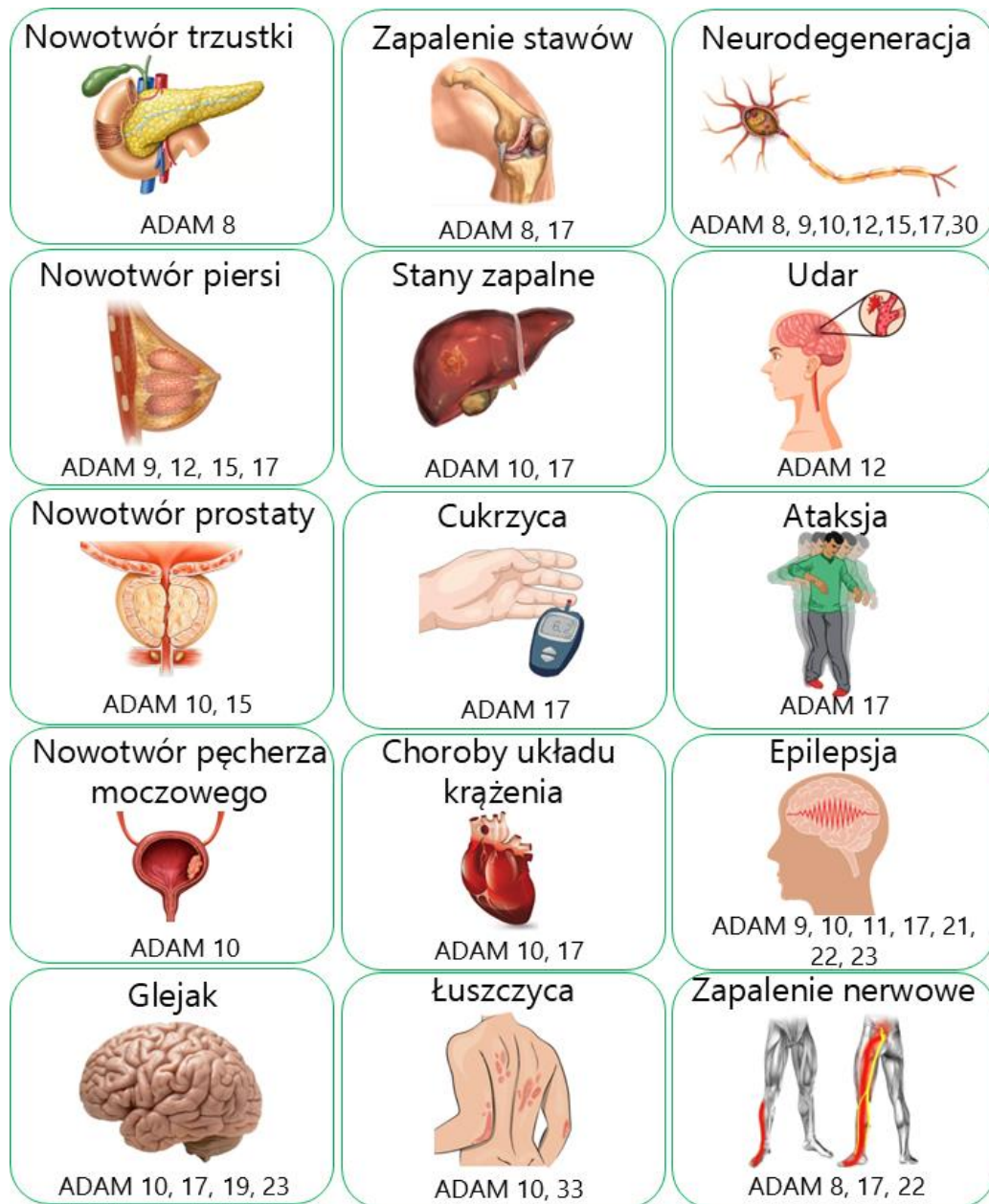
Początkowo w prowadzonych badaniach koncentrowano się na sprawdzeniu funkcji białek ADAM, w których potwierdzono ich zdolność do tworzenia oddziaływań z integrzynami. Interakcje te wpływały na adhezję komórek i były zależne od szerokiej grupy integrzyn. Stwierdzono również, że wybrana integryna może oddziaływać z kilkoma przedstawicielami tej rodziny, w zależności od typu komórki, np. integryna $\alpha_5\beta_3$ wiąże się zarówno z ADAM 15 jak i ADAM 23⁸.

Pierwszym poznany enzym z rodziny ADAM, był ADAM 10. W 1989 roku A. Chantry wraz ze współpracownikami zaobserwowali degradację

preparatów otoczki mielinowej mózgu. W dalszych badaniach potwierdzono, że do hydrolizy białka meliny dochodzi w wyniku aktywności enzymatycznej ADAM 10⁹.

Enzymy proteolityczne z rodziny ADAM aktywują szlaki sygnalizacyjne zarówno w obrębie jednej komórki, jak i międzykomórkowo. Do aktywacji tych szlaków dochodzi poprzez hydrolizę ligandów bądź receptorów transmembranowych. Proces ten może występować na powierzchni tej samej komórki, na której zlokalizowany jest enzym, ale również pomiędzy dwoma sąsiednimi komórkami¹⁰.

Zmiany w poziomie aktywności proteolitycznej enzymów z rodziny ADAM są kluczowym czynnikiem w rozwoju wielu chorób (Rycina 2). Enzymy te są zaangażowane w rozwój nowotworów, stanów zapalnych, zaburzeń sercowo-naczyniowych czy też neurologicznych. Poszczególne enzymy biorą udział w patogenezie nowotworów: trzustki (ADAM 8), piersi (ADAM 9, 12, 15, 17), prostaty (ADAM 10 i 15), pęcherza moczowego (ADAM 10), czy też glejaków (ADAM 10, 17, 19, 23). Biorą także udział między innymi w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów (ADAM 8, 17), stanach zapalnych (ADAM 10, 17), chorobie Alzheimera (ADAM 10), reakcjach alergicznych (ADAM 10), cukrzycy (ADAM 17), chorobach układu krążenia (ADAM 10, 17) oraz łuszczycy (ADAM 10, ADAM 33)¹¹ Wielu z przedstawicieli rodziny jest także zaangażowanych w choroby układu nerwowego.



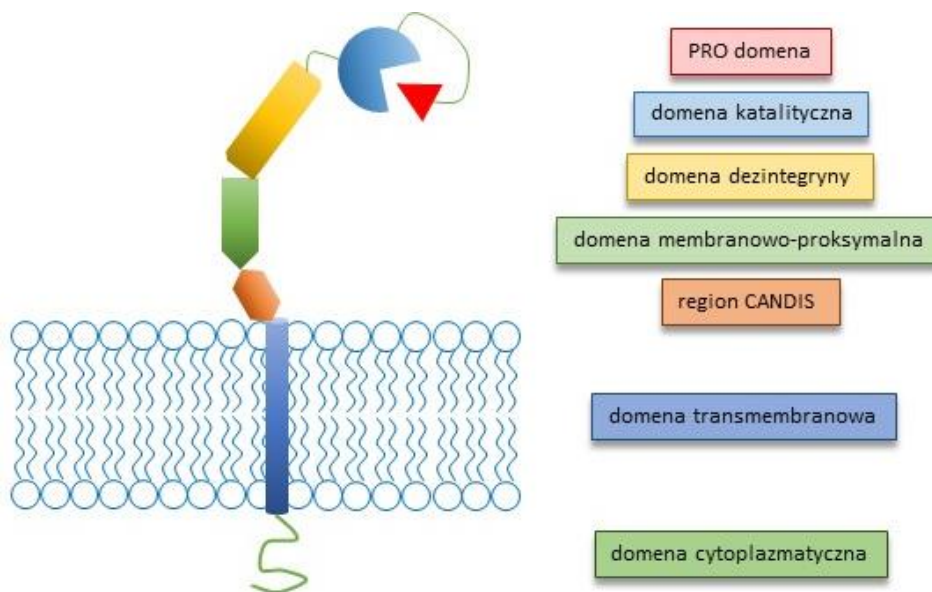
Rycina 2. Udział enzymów należących do rodziny ADAM w wybranych stanach patofizjologicznych człowieka. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹².

2. Enzym dezintegryny i metaloproteazy 17

2.1 Budowa enzymu ADAM 17

Enzym Dezintegryny i Metaloproteazy 17 (ang. A Disintegrin And Metalloprotease 17, ADAM 17), znany jest również pod nazwą TACE (ang. TNF-Alpha Converting Enzyme). Odkrycia enzymu dokonano w 1997 roku równolegle przez dwie niezależne grupy badawcze. W obu pracach stwierdzono uwalnianie czynnika martwicy nowotworu z powierzchni błony komórkowej, przez omawianą proteazę^{13,14}.

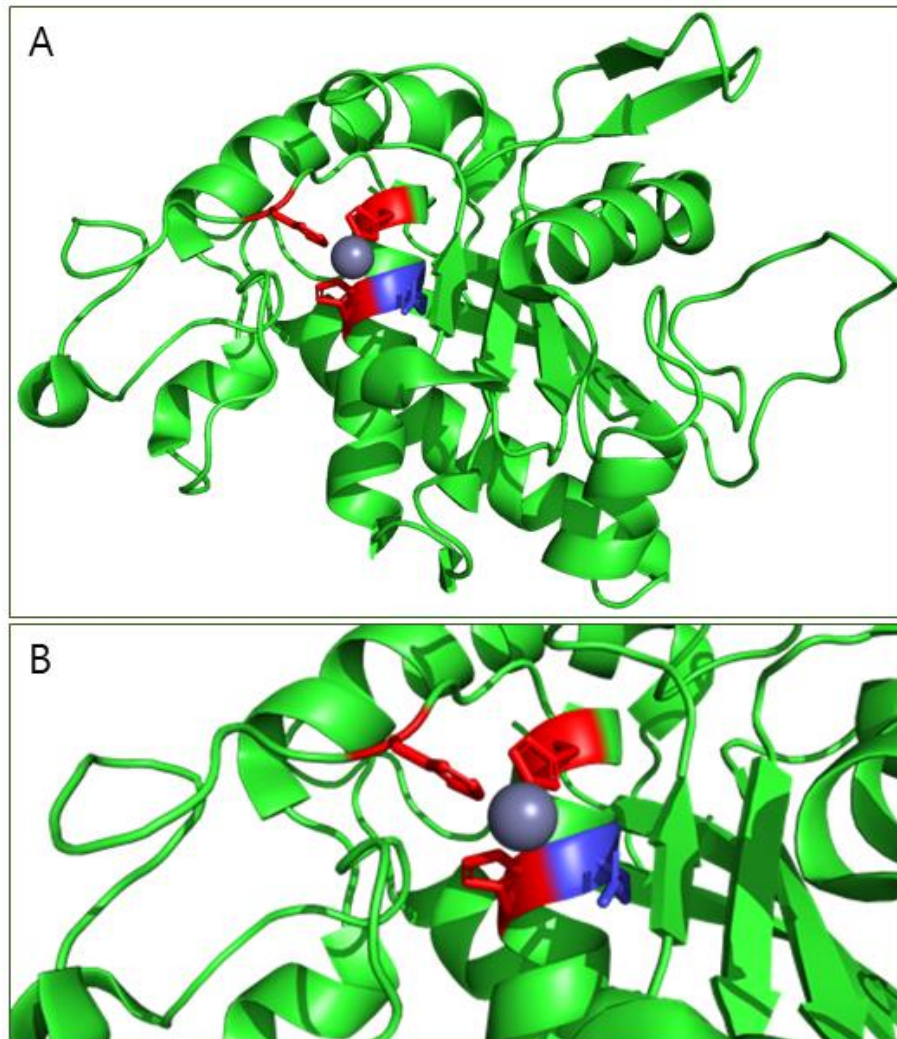
Enzym ten jest multidomenową endopeptydazą transmembranową ($M_{\text{aktywnej formy}} = 85 \text{ kDa}$), której aktywność proteolityczna jest zależna od obecności jonów cynku¹⁵. Enzym ADAM 17 zbudowany jest z następujących podjednostek (Rycina 3).



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie struktury enzymu ADAM 17. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁶.

- Pro-domena (ang. pro-domain) – fragment peptydowy zdolny do oddziaływać z centrum katalitycznym enzymu, powodując zablokowanie aktywności katalitycznej. Hydroliza pro domeny zachodzi w aparacie Golgiego i katalizowana jest przez furynę. Mutacje w obrębie struktury tej domeny, skutkowały powstawaniem białek nieaktywnych proteolitycznie.

- Domena katalityczna (ang. catalytic domain) – zdolna do hydrolizy wiązań peptydowych w substratach białkowych. Centrum aktywne koordynuje jon cynku poprzez trzy atomy azotu, znajdujące się w pierścieniach imidazolowych reszt histydyn (His405, His409, His415), oraz grupę karboksylową kwasu glutaminowego (Glu406). Cząsteczka wody, która jest odpowiedzialna za atak nukleofilowy na węgiel karbonylowy substratu peptydowego, zlokalizowana jest pomiędzy grupą karboksylową (Glu406) a jodem cynku (Rycina 4). Zgodnie z nomenklaturą Schechtera i Bergera hydroliza wiązania peptydowego zachodzi pomiędzy pozycjami P₁ a P₁' substratu. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano preferencję enzymu ADAM 17 do hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy hydrofobowymi, alifatycznymi resztami aminokwasowymi, ze szczególnym uwzględnieniem reszty alaniny w pozycji P₁ oraz reszty waliny w pozycji P₁'.

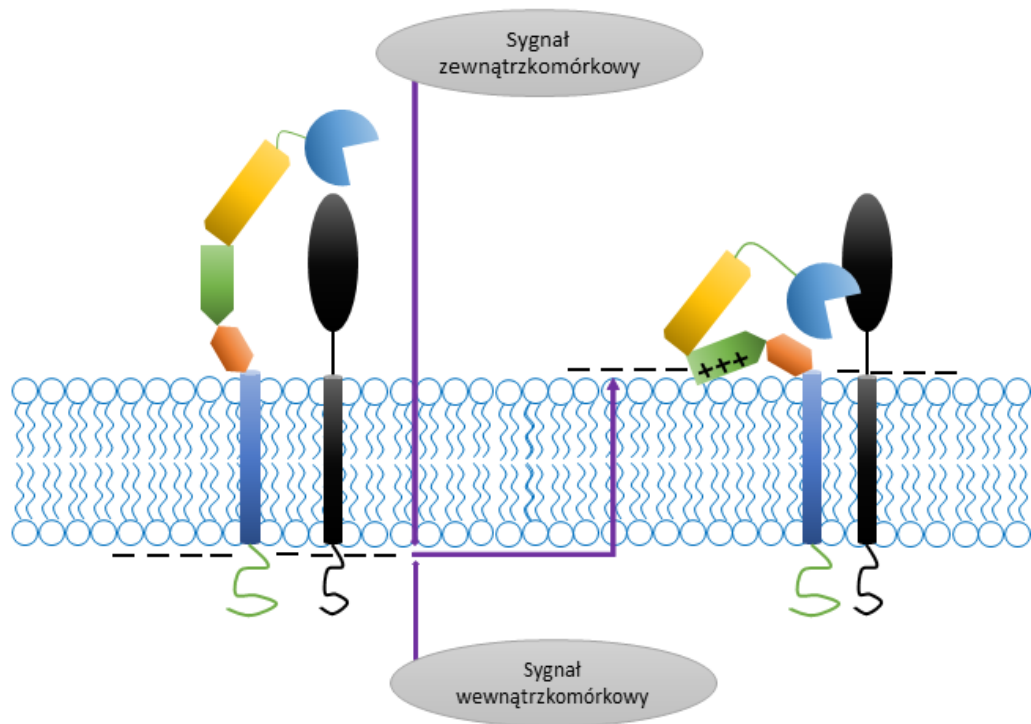


Rycina 4. A) Struktura krystaliczna domeny katalitycznej enzymu ADAM 17. Kolorem czerwonym oznaczono reszty aminokwasowe histydyn, natomiast kolorem niebieskim resztę aminokwasową kwasu glutaminowego, pełniących rolę w koordynowaniu jonu cynku; B) zbliżenie centrum katalitycznego enzymu ADAM 17¹⁷.

- Domena dezintegryny (ang. disintegrin domain) – zaangażowana w adhezję białka do błony komórkowej. Wykazuje powinowactwo do oddziaływań z receptorami transmembranowymi komórek zwierzęcych – integrzynami. Enzym ADAM 17 tworzy oddziaływania wyłącznie z integrzyną $\alpha_5\beta_1$. Obserwowane oddziaływania pomiędzy nią a enzymem ADAM 17, mogą występować na tej samej komórce, jak i między dwiema

komórkami. Obserwowane interakcje blokują aktywność proteolityczną enzymu.

- Domena membranowo-proksymalna (ang. Membrane Proximal Domain, MPD). Dodatkowo naładowany fragment domeny o sekwencji: Arg625-Lys626-Gly627-Lys628 oddziałuje z ujemnie naładowaną fosfatydylseryną zlokalizowaną na powierzchni komórki, prowadząc do zmian konformacyjnych w obrębie enzymu tym samym zbliżając domenę katalityczną ADAM 17 do miejsc hydrolizy substratów transmembranowych (Rycina 5). Analiza strukturalna domeny MPD wykazywała istnienie dwóch form konformacyjnych: otwartej - elastycznej oraz zamkniętej - sztywnej. Obie formy różnią się topologią mostków disulfidowych - odpowiednio Cys600-Cys630 oraz Cys635-Cys641 dla formy otwartej i Cys600-Cys635 oraz Cys630-Cys641 dla formy zamkniętej. W wyniku przekształcenia domeny MPD z formy otwartej do formy zamkniętej dochodzi do dezaktywacji enzymu. Badanie przeprowadzone przez grupę badawczą I. Lorenzen potwierdziły zdolność do tworzenia kompleksów, pomiędzy sekwencją fragmentu domeny MPD z wybranymi substratami enzymu ADAM 17. Wyniki te wskazują, że domena ta jest kluczowym czynnikiem w rozpoznaniu wybranych związków hydrolizowanych przez enzym.

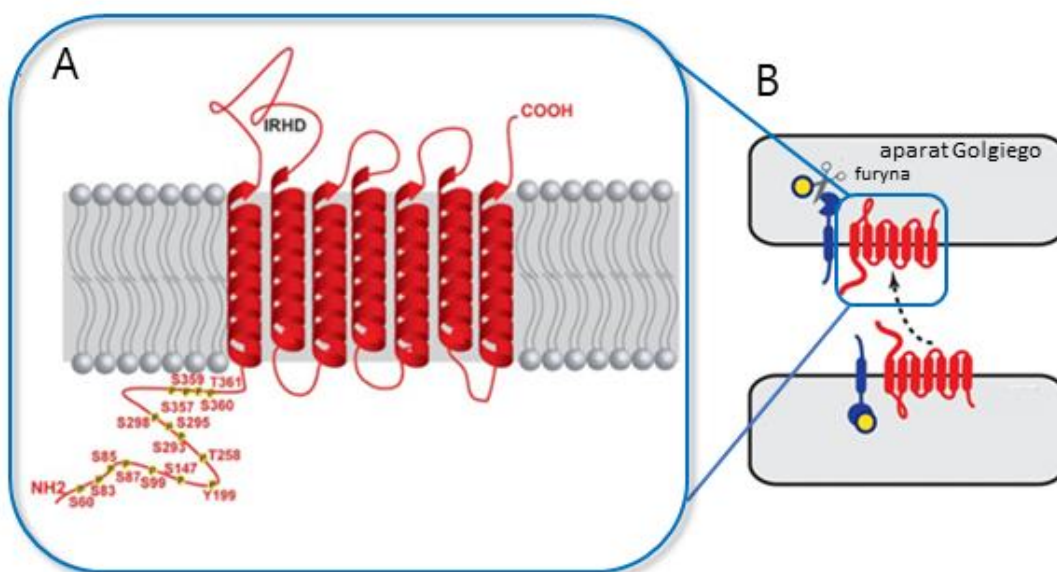


Rycina 5. Aktywacja enzymu ADAM 17 poprzez oddziaływanie domeny MPD z powierzchnią błony komórkowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁸.

- Region CANDIS (ang. Conserved Adam sevenNteen Dinamic Interaction Sequence, CANDIS) tworzy amfipatyczną helisę, zdolną do oddziaływań z błoną komórkową. Oddziaływanie to nasila się w obecności fosfatydyloseryny, z kolei wysokie stężenie cholesterolu w błonie komórkowej blokuje wiązanie fragmentu CANDIS z dwuwarstwą lipidową. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano podwyższoną aktywność enzymu ADAM 17 wobec innych białek transmembranowych przy niskim stężeniu cholesterolu w komórkach. Ponadto fragment CANDIS jest zdolny do oddziaływań oraz wiązania substratów enzymu ADAM 17. Istotnym czynnikiem determinującym występowanie omawianych oddziaływań jest opisana powyżej domena MPD, która musi występować w formie otwartej.

- Domena transmembranowa (ang. transmembrane domain) – posiada strukturę pojedynczej helisy. Odpowiada za umiejscowienie enzymu w dwuwarstwie lipidowej.
- Domena cytoplazmatyczna (ang. cytoplasmic domain) – odgrywa kluczową rolę w regulowaniu aktywności proteazy w odpowiedzi na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Domena ta może indukować dimeryzację ADAM 17 na powierzchni komórki, przyczyniając się do dezaktywacji enzymu¹³⁻²².

Enzym ADAM 17 ulega ekspresji we wszystkich komórkach organizmu. Za transport na powierzchnię komórek odpowiedzialne są nieaktywne homologi proteaz romboidalnych (ang. inactive homologs of Rhooid proteases, iRhom). Regulator iRhom 2 ulega ekspresji głównie w komórkach odpornościowych, takich jak neutrofile oraz makrofagi, z kolei iRhom 1 w pozostałych komórkach organizmu³⁰. Białko iRhom 1 ma kluczowe znaczenie w dojrzewaniu ADAM 17 w komórkach mózgu. Badania wskazują, że oba związki są również kluczowymi regulatorami innych białek między innymi receptora trifosforanu inozytolu pełniącego funkcję kanału wapniowego. Oprócz opisanych właściwości, oba homologi pełnią istotną rolę w procesie dojrzewania enzymu³¹(Rycina 6). Badania przeprowadzone przez A. Rossello i współpracowników na modelu zwierzęcym wykazały, iż zastosowanie inhibitorów selektywnych wobec iRhom1 oraz iRhom 2, znacząco obniżyło ekspresję enzymu ADAM 17. Co więcej wszelkie genetyczne mutacje tych regulatorów wpływają bezpośrednio na aktywność oraz ekspresję enzymu. U pacjentów z nowotworem przełyku zaobserwowano mutacje w obrębie *N*-końcowego fragmentu iRhom 2, co wpływało na zwiększoną aktywność proteolityczną ADAM 17 wobec wybranych substratów, potęgując stan zapalny w komórkach³².



Rycina 6. Schematy A) lokalizacji aktywatora iRhom 2 w dwuwarstwie lipidowej; B) aktywacja enzymu ADAM 17; IRHD (ang. iRhom Homology Domain)³³.

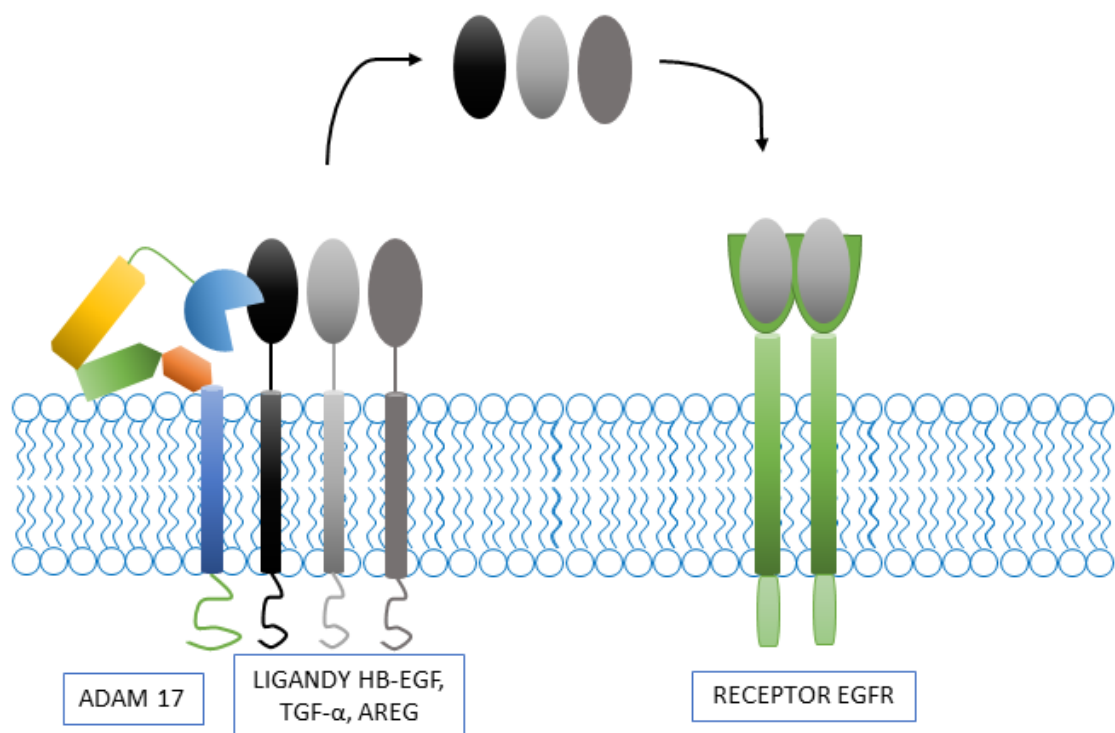
2.2 Substraty enzymu ADAM 17 oraz wpływ ich procesowania na komórki organizmu

Jednym z najszerzej opisanych substratów enzymu ADAM 17 jest czynnik martwicy nowotworu (ang. Tumor Necrosis Factor, TNF- α). Należy do grupy cytokin, której prekursor ulokowany jest na powierzchni błony komórkowej w formie nieaktywnej. Aktywowanie TNF- α zachodzi poprzez hydrolizę enzymatyczną i uwolnienie trimerycznej rozpuszczalnej formy do przestrzeni międzykomórkowej³⁴. Enzym ADAM 17 hydrolizuje wiązanie peptydowe pomiędzy Ala76 a Val77³⁵. TNF- α to cytokina prozapalna pełniąca kluczową rolę w odpowiedzi na infekcje. Aktywowanie cytokiny prowadzi do uszkodzenia tkanek w chorobach autoimmunologicznych. TNF- α wiąże się z receptorami (ang. Tumor Necrosis Factor Receptor 1, TNF-R1 oraz ang. Tumor Necrosis Factor Receptor 2, TNF-R2), znajdującymi się we wszystkich tkankach organizmu, indukując stany zapalne a nawet śmierć komórki³⁶.

Ważnym substratem enzymu ADAM 17 jest receptor interleukiny 6 (ang. Interleukin 6 Receptor, Il-6R), będący białkiem transmembranowym, zlokalizowanym na powierzchni neutrofilii. Hydroliza katalizowana przez enzym ADAM 17 ma miejsce pomiędzy resztą aminokwasową Gln357 a Asp358²¹. Uwolniona rozpuszczalna forma Il-6R wiąże się z interleukiną 6 (ang. Interleukin 6, Il-6) tworząc aktywny kompleks zdolny do wiązania się z receptorem gp130 (ang. glycoprotein 130 – glikoproteina 130 (wykazujący wysoką specyficzność względem cytokin)), indukując stany zapalne komórek. Proces ten nazywany jest transsygnalizacją. Receptor Il-6R zlokalizowany na powierzchni komórki również wiąże się z Il-6, inicjując działanie przeciwzapalne. Z uwagi na te oddziaływania aktywność enzymatyczna ADAM 17 jest kluczowa w indukowaniu stanów zapalnych wywołanych Il-6³⁷.

Enzym ADAM 17 odpowiedzialny jest również za procesowanie ligandów zdolnych do wiązania się z receptorem naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) i uznaje się go za kluczowy regulator szlaków sygnalizacyjnych EGFR (Rycina 7). Wśród istotnych ligandów wyróżnia się, naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę (ang. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor, HB-EGF), transformujący czynnik wzrostu – alfa (ang. Transforming growth factor - alpha, TGF- α) oraz amfiregulinę (ang. Amphiregulin, AREG)³⁸. Według badań L. Rao i współpracowników aktywacja szlaków sygnalizacyjnych komórek poprzez tworzenie kompleksu HB-EGF z EGFR jest zaangażowana w angiogenezę szpiku kostnego³⁹. TGF- α to białko transmembranowe, które po hydrolizie z powierzchni błony komórkowej, zachodzącej za pomocą enzymu ADAM 17 wiąże się z receptorem EGFR. Badania dowodzą, że aktywny kompleks pośredniczy w rozwoju chorób nerek⁴⁰. AREG syntezowany jest jako transmembranowa glikoproteina. Hydroliza wiązania peptydowego uwalniająca rozpuszczalną formę zachodzi głównie poprzez aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17⁴¹. Ligand AREG wykazuje mniejsze powinowactwo do receptora EGFR

niż wcześniej opisywany TGF- α . W komórkach jest odpowiedzialny za indukowanie proliferacji komórek nabłonka dróg oddechowych oraz bierze udział w mechanizmach odpowiedzialnych za występowanie stanów zapalnych oraz zwłóknienia w komórkach płuc. Dotychczasowe badania wskazują również, że przewlekłe uwalnianie rozpuszczalnej formy AREG jest odpowiedzialne za zmiany w tkankach płuc u pacjentów z mukowiscydozą⁴².



Rycina 7. Schemat procesowania ligandów wiążących się do receptora EGFR. Rysunek wykonany na podstawie literatury⁴³.

Transmembranowy receptor Notch1 to kolejny znany substrat enzymu ADAM 17. Jest odpowiedzialny za regulację cyklu życia komórek, poprzez stymulowanie proliferacji oraz indukowanie apoptozy komórek. Zaburzenia w szlakach sygnalizacyjnych z udziałem tego białka zaobserwowano w trakcie rozwoju chorób zwłóknienia płuc, nerek, skóry oraz serca⁴⁴. Badania przeprowadzone przez grupę badawczą M. I. Saad wykazały, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu szlaków, w których zaangażowany jest receptor Notch1, mają

wpływ na rozwój nowotworów złośliwych. Proteolityczna hydroliza receptora Notch1 może być powodowana zarówno przez enzym ADAM 10 jak i ADAM 17. Wykazano, że w przypadku enzymu ADAM 10 hydroliza zachodzi wyłącznie wobec receptora związanego z ligandem. W przypadku enzymu ADAM 17 zachodzi niezależnie od formy kompleksu receptor-ligand⁴⁵.

Enzym ADAM 17 bierze również udział w aktywacji innych enzymów np. konwertazy angiotensyny 2 (ang. Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE2). ACE2 to transmembranowa metaloproteaza koordynująca jon cynku, która wykazuje aktywność enzymatyczną w formie rozpuszczalnej. Uwalnianie formy rozpuszczalnej z powierzchni komórki zachodzi poprzez hydrolizę proteolityczną z udziałem enzymu ADAM 17⁴⁶. Enzym ten w komórkach odpowiada za przekształcanie angiotensyny I oraz angiotensyny II odpowiednio w angiotensynę (1-9) oraz angiotensynę (1-7). Angiotensyna I jest prekursorem angiotensyny II, która odpowiedzialna jest za regulację ciśnienia krwi. Również angiotensyna (1-9) pełni funkcje regulatora ciśnienia krwi. Z kolei angiotensyna (1-7) wykazuje właściwości przeciwzapalne oraz przeciwutleniające⁴⁷. W badaniach przeprowadzonych przez grupę G. Y. Oudit zaproponowano leczenie rekombinowanym ludzkim ACE2 myszy chorych na nefropatię cukrzycową. Otrzymane wyniki wskazują na znaczące zmniejszenie się białkomoczu oraz spowolnienie postępu choroby⁴⁸.

Białko Klotho jest znanym enzymem hydrolizowanym przez ADAM 17. Transmembranowe białko Klotho uwalniane jest do formy rozpuszczalnej w przestrzeni cytoplazmatycznej szczególnie w komórkach dystalnego kanałika krętego oraz komórkach splotu naczyniówkowego mózgu. Rozpuszczalna forma białka jest obecna w płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu jak i w surowicy. Poznaną funkcją białka Klotho w moczu jest regulacja działania kanałów wapniowych⁴⁹. Wśród najważniejszych funkcji wyróżnia się hamowanie

zwłóknienia nerek, płuc, tętnic oraz serca. Przeprowadzone badania dowodzą również działanie przeciwnowotworowe oraz znacznie zmniejszoną ekspresję tego białka u pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami przełyku, trzustki, piersi, jelita grubego, szyjki macicy oraz glejakach⁵⁰.

Badania przeprowadzone z zastosowaniem spektrometrii mas dowodzą, że forma transmembranowa kolagenu typu XVII również jest uwalniana do formy rozpuszczalnej poprzez aktywność enzymu ADAM 17⁵¹. Kolagen typu XVII odpowiedzialny jest za adhezję naskórka poprzez wiązanie się z pozakomórkowymi elementami strukturalnymi komórek. Dotychczasowe badania nie wskazują bezpośredniej roli rozpuszczalnej formy kolagenu typu XVII w funkcjonowaniu komórek. Przeprowadzono jednak badania, w których zaobserwowano zmniejszenie ruchliwości komórek pod wpływem nadmiernego uwalniania kolagenu typu XVII z powierzchni komórki⁵².

Kolagen typu IV to główny składnik błony podstawnej, w której odpowiada za adhezję komórek. Dane literaturowe wskazują, że za degradację kolagenu typu IV odpowiada między innymi ADAM 17⁵³. W zależności od miejsca hydrolizy powstałe produkty reakcji mogą mieć właściwości patogenne jak i ochronne wobec komórek. Ze względu na mnogość metaloproteaz zdolnych do hydrolizy kolagenu typu IV oraz wielu potencjalnych produktów, zbadanie wpływu enzymu ADAM 17 jest obecnie wyzwaniem dla nauki⁵⁴.

Opisane powyżej substraty hydrolizowane przez enzym ADAM 17 to zaledwie część spośród zdefiniowanej puli 90 związków (Tabela 1). Wynika z tego, że enzym ten jest zaangażowany w wiele odrębnych procesów biologicznych, zarówno pełniąc funkcje fizjologiczne jak i przyczyniając się do stanów patologicznych⁵⁵.

Tabela 1. Podział znanych substratów enzymu ADAM 17⁴⁸.

Cytokiny	Szlaki sygnalizacyjne komórek	Receptory	Przyleganie komórek	Transport	Enzymy	Inne
TNF α	Amfiregulina	Axl	ALCAM	SCRB1	ACE-2	APP
CSF-1	HB-EGF	CD16	CD44	LRP-1	Hydrolaza węglowa 9	APLP-2
KL-1	TGF α	CD163	L-selektyna	LDL-R	Klotho	Białko prionowe
KL-2	Epigen	CD30 (TNFRSF8)	Kolagen XVII	SORCS-1	NPR1	Vasorin
Limfotoksyna α	Epiregulina	CD40 (TNFRSF5)	Desmogleina-2	SORCS-3		PMEL-17
RANKL	NRG-1	CD89	EpCAM	SORL-1		Sydecan-1
CX3CL1	Białko Jagged	EPCR	GP-1ba	SORT-1		Sydecan-4
IL-8	DLL-1	ErbB-4	GP-5	TREM-2		Preadipocyt
	PD-L1	receptor GHRH	GP-6	IGF-2R		Kolagen IV
	ICOS-L	M-CSFR	ICAM-1			PCPE-1
	IL-15R	Notch-1	JAM-A			Cystatyna C
	IL-1R2	NRP-1	L1-CAM			Glikoproteina wirusa Ebola
	IL-6R	PTK7	LYPD3			
	LAG-3	PTPRZ	MUC-1			
	MIC-A	PTPRF	NCAM			
	MIC-B	SEMA-4D	Nectin-4			
	TIM-1	TNF-R1	SynCAM-1			
	TIM-3	TNF-R2	VACM-1			
	TIM-4	NTRK1	Trombospodyna-4			
		VEGF-R2				

CSF-1 Colony Stimulating Factor 1, KL-1– Stem Cell Factor 1, KL-2 – Stem Cell Factor 2, RANKL - Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand, CX3CL1 - chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, IL-8 – interleukin 8, NRG 1 – Neuregulin 1, DLL-1 - Delta Like Canonical Notch Ligand 1, PD-L1 - Programmed death-ligand 1, ICOS-L - Inducible T Cell Costimulator Ligand, IL-15R – Interleukin 15 Receptor, IL-1R2 – Interleukin 1 Receptor Type 2, LAG-3 - Lymphocyte-activation gene 3, MIC-A - MHC class I chain-related gene A, MIC-B - MHC class I chain-related gene B, TIM-1 - T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain Containing 1, TIM-3 – T-cell immunoglobulin and mucin domain 3, TIM-4 - T Cell

Immunoglobulin and Mucin Domain Containing 4, AXL - Receptor Tyrosine Kinase, CD 16 - Cluster of Differentiation 16, CD 163 - Cluster of Differentiation 163, CD 30 - Cluster of Differentiation 30, CD 40 - Cluster of Differentiation 40, CD 89 - Cluster of Differentiation 89, EPCR - Endothelial Protein C Receptor, ERBB4 - Receptor tyrosine-protein kinase, GHRH - Growth-Hormone-Releasing Hormone, M-CSFR - Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor, NRP-1 - Neuropilin-1, PTK7 - Tyrosine-Protein Kinase-like 7, PTPRZ - Protein Tyrosine Phosphatase Receptor, type Z, PTPRF - Protein Tyrosine Phosphatase Receptor, type F, SEMA-4D - Semaphorin-4D, TNF-R1 - Tumor Necrosis Factor Receptor 1, TNF-R2 - Tumor Necrosis Factor Receptor 2, NTRK1 - Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1, VEGF-R2 - Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, ALCAM - Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule, CD-44 - Cluster of Differentiation 44, EpCAM - Epithelial Cell Adhesion Molecule, GP-1ba - Glycoprotein Ib Platelet subunit alpha, GP-5 - Glycoprotein 5, GP-6 - Glycoprotein 6, ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule 1, JAM-A - Junctional Adhesion Molecule A, L1-CAM - L1 - Cell Adhesion Molecule, LYPD3 - Ly6/PLAUR Domain Containing 3, MUC-1 - Mucin 1, NCAM - Neural Cell Adhesion Molecule, SynCAM-1 - Synaptic Cell Adhesion Molecule type 1, VACM-1 - Vascular Cell Adhesion Molecule 1, SCRB1 - Scavenger Receptor Class B 1, LRP-1 - low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1, LDL-R - low-density Lipoprotein Receptor, SORCS-1 - Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 1, SORCS-3 - Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 3, SORL-1 - Sortilin Related Receptor 1, SORT-1 - Sortilin 1, TREM-2 - Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2, IGF-2R - Insulin like Growth Factor 2 Receptor, NPR1 - Natriuretic Peptide Receptor A, APP - Amyloid-beta Precursor Protein, APLP-2 - Amyloid-like Protein 2, PMEL-17 - Melanocyte Protein, PCPE-1 - Procollagen C-Proteinase Enhancer 1

2.3 Choroby wywołane zmianami aktywności enzymu ADAM 17

Znaczna ilość substratów hydrolizowanych przez omawiany enzym proteolityczny, powoduje, że wszelkie zmiany w aktywności mogą prowadzić do zaburzenia homeostazy enzymatycznej, co skutkuje rozwojem zmian patologicznych organizmu. Szczególnie szeroko prowadzone są badania dotyczące chorób nowotworowych, stanów zapalnych oraz chorób nerek.

Badania grupy N. Hedemann przeprowadzono z wykorzystaniem hodowli 3D linii komórkowych nowotworu jajnika: HEY, Igrov-1, SKOV-3 oraz OVCAR-8. W eksperymentach zastosowano terapię łączoną z syntetycznym inhibitorem ADAM 17 – GW280246X oraz cisplatyną. Badacze odnotowali znaczący spadek żywotności komórek nowotworowych (niezależnie od zastosowanej linii komórkowej), po zastosowaniu obu związków. Ponadto udowodniono znacznie mniejszą skuteczność monoterapii w której stosowano wyłącznie cisplatynę. W wynikach obserwowano również zwiększoną aktywność kaspaz w badanych układach terapii łączonej względem monoterapii. Zwiększenie ekspresji tej grupy enzymów, przyczynia się do apoptozy komórek nowotworowych⁵⁶.

F. Caiazza wraz z współpracownikami w 2015 roku zbadali wpływ przeciwciała monoklonalnego (D1(A12)) jako inhibitora ADAM 17. Przeciwciało poprzez oddziaływanie jednocześnie z domeną katalityczną oraz domeną

dezintegryny blokuje aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17. W wynikach wykazano zmniejszenie zdolności migracyjnych oraz zwiększoną apoptozę komórek nowotworowych piersi (HCC1937 oraz HCC1143). W niniejszych badaniach zaobserwowano również zaburzenia w szlakach sygnalizacyjnych komórek, wynikających z upośledzenia działania receptora EGFR⁵⁷.

W badaniach przeprowadzonych w 2018 roku poddano analizie tkankę błony śluzowej okrężnicy pobieranej od myszy u których występował nowotwór okrężnicy. U części osobników zablokowano ekspresję enzymu ADAM 17 poprzez wprowadzenie mutacji genetycznych. Ograniczenie ekspresji enzymu ADAM 17 znacząco zmniejszyło szybkość rozwoju nowotworu, jednak nie uchroniło ich przed zachorowaniem. Wyniki te zestawiono z badaniami przeprowadzonymi *in vitro* wobec ludzkich komórek nowotworowych okrężnicy linii HCT116 oraz HT29. W trakcie hodowli zastosowano farmakologiczne hamowanie aktywności enzymu ADAM 17, poprzez zastosowanie inhibitora INCB3619, który odpowiedzialny jest za blokowanie szlaków sygnałowych wykorzystujących receptor EGFR. W rezultacie zaobserwowano znaczny spadek proliferacji komórek nowotworowych względem kontroli, co potwierdza kluczową rolę enzymu ADAM 17 w rozwoju nowotworu okrężnicy⁵⁸.

Grupa badawcza M. I. Saad przeprowadziła badania z wykorzystaniem myszy u których występował gruczolak płuc. U osobników zastosowano mutacje genetyczne w celu zahamowania ekspresji enzymu ADAM 17, w wyniku czego obserwowano znaczne zmniejszenie tempa rozwoju nowotworu w odniesieniu do próby kontrolnej. Badania przeprowadzone na różnych etapach rozwoju choroby potwierdziły zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz obniżony stan zapalny u osobników z wprowadzoną mutacją. W omawianym opracowaniu sprawdzono również wpływ inhibitorów enzymu ADAM 17 na rozwój ludzkich linii komórkowych gruczolaka płuca A549, NCI-H23 oraz NCI-H2228. Potwierdzono

działanie onkogenne proteazy, wobec tego nowotworu, wykazując wzmożoną proliferację oraz żywotność komórek⁵⁹.

Poziom ekspresji enzymu ADAM 17 może wpływać także na rozwój nowotworu żołądka. W 2020 roku przeprowadzono analizę danych 1757 pacjentów z nowotworem żołądka, u których oznaczono poziom ekspresji enzymu ADAM 17 metodami immunohistochemicznymi. Zwiększoną ekspresję enzymu ADAM 17 obserwowano u pacjentów z wyższym stadium rozwoju choroby, obecnością przerzutów do innych narządów oraz czasem trwania choroby. W przeprowadzonej analizie nie zaobserwowano korelacji pomiędzy poziomem stężenia omawianego enzymu a płcią pacjentów⁶⁰.

Onkogeneza gruczolaka przewodowego trzustki może zależeć od prawidłowego funkcjonowania szlaków sygnalizacyjnych zależnych od aktywności enzymu ADAM 17. Grupa badawcza M. Lesina przeprowadziła badania z wykorzystaniem gatunku myszy z nowotworem trzustki. Badania wstępne przeprowadzono na wyizolowanych liniach komórkowych z guza pierwotnego i zaobserwowano istotny wpływ transsygnalizacji międzykomórkowej zależnej od Il-6, na rozwój choroby. W następnym etapie genetycznie zmodyfikowano osobniki ograniczając ekspresję Il-6. U badanych zwierząt obserwowano zahamowanie rozwoju gruczolaka i znaczne opóźnienie występowania powikłań, w odniesieniu do osobników bez zablokowanej ekspresji. Dodatkowo wykonano badania u pacjentów ze zdiagnozowanym gruczolakiem przewodowym trzustki, sprawdzając stężenie Il-6 w surowicy. Zaobserwowano znacząco większe stężenie badanego białka u pacjentów chorych względem grupy kontrolnej. Jak opisano w podrozdziale „*Substraty enzymu ADAM 17 oraz wpływ ich procesowania na komórki organizmu*”, transsygnalizacja z udziałem Il-6 zachodzi przy udziale enzymu ADAM 17, którego aktywność może być zaangażowana w patogenezę choroby⁶¹.

Przeprowadzono również badania wpływu aktywności proteazy ADAM 17 na rozwój chorób, niebędących chorobami nowotworowymi.

Nadmierna aktywność enzymu ADAM 17 w indukcji szlaków sygnalizacyjnych komórek, może przyczyniać się do rozwoju i progresji chorób sercowo-naczyniowych. X. Wang wraz z współpracownikami przeprowadzili badania *in vivo* wykorzystując gatunek myszy z rozwijającym się przerostem mięśnia sercowego oraz szczurów z wrodzonym nadciśnieniem. U wybranych osobników obu gatunków ograniczono ekspresję enzymu ADAM 17 poprzez wprowadzenie mutacji w obrębie genu kodującego białko. W wynikach obserwowano opóźniony rozwój nadciśnienia u osobników z ograniczoną ekspresją enzymu ADAM 17, jednakże efekt ten był przejściowy i po dłuższym czasie obserwowano zwiększone ciśnienie krwi u zwierząt. Zarówno w przypadku przerostu jak i zwłóknienia serca obserwowano znaczne spowolnienie rozwoju chorób u osobników z ograniczoną ekspresją badanego enzymu. Według autorów kluczowymi czynnikami w tych chorobach są cytokiny, których nadmiar promuje patogenezę niniejszych chorób⁶².

Zmiany w aktywności enzymu ADAM 17 w komórkach mają wpływ także na rozwój miażdżycy. W przeprowadzonych w 2016 badaniach przez grupę badawczą A. Nicolaou wyhodowano gatunek myszy z miażdżycą oraz z ograniczoną ekspresją enzymu ADAM 17. Zwierzęta te rozwinęły bardziej zaawansowane stany miażdżycowe, niż osobniki kontrolne. Niedobór enzymu ADAM 17 promował proliferację makrofagów oraz hamował apoptozę. Nadmiar komórek makrofagów akumuluje się w zmianach miażdżycowych na wczesnym etapie rozwoju choroby, prowadząc do powstawania blaszek miażdżycowych. Ponadto zbadano właściwości adhezyjne makrofagów, które były znacząco wyższe u osobników z niedoborem enzymu ADAM 17, co również ma wpływ na tempo rozwoju choroby⁶³.

Aktywność enzymu ADAM 17 ma wpływ na rozwój przewlekłej obturacyjnej choroby płuc u pacjentów palących papierosy, co potwierdziła grupa badawcza M. Stolarczyk. W ramach badań wyizolowano komórki nabłonka dróg oddechowych pacjentów, po resekcji nowotworu płuc. Następnie komórki poddawano ekspozycji na dym papierosowy. W przeprowadzonych eksperymentach mierzono stężenie uwalnianych substratów enzymu – Il-6R oraz AREG. Po inkubacji komórek w obecności dymu papierosowego, obserwowano znaczący wzrost stężenia obu substratów w medium zewnątrzkomórkowym, pochodzącym z hodowli komórek pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą, względem próby kontrolnej. Dodatkowo sprawdzono wpływ inhibitora enzymu ADAM 17 (TMI-2 – ((2R,3S)-2-[[[4-(2-butynyloksy)fenylo]sulfonylo]amino)-N,3-dihydroksybutanoamid) na stężenie Il-6R oraz AREG, gdzie obserwowano znaczny spadek stężenia substratów, co potwierdza uwalnianie ich z powierzchni komórek przez badany enzym⁶⁴.

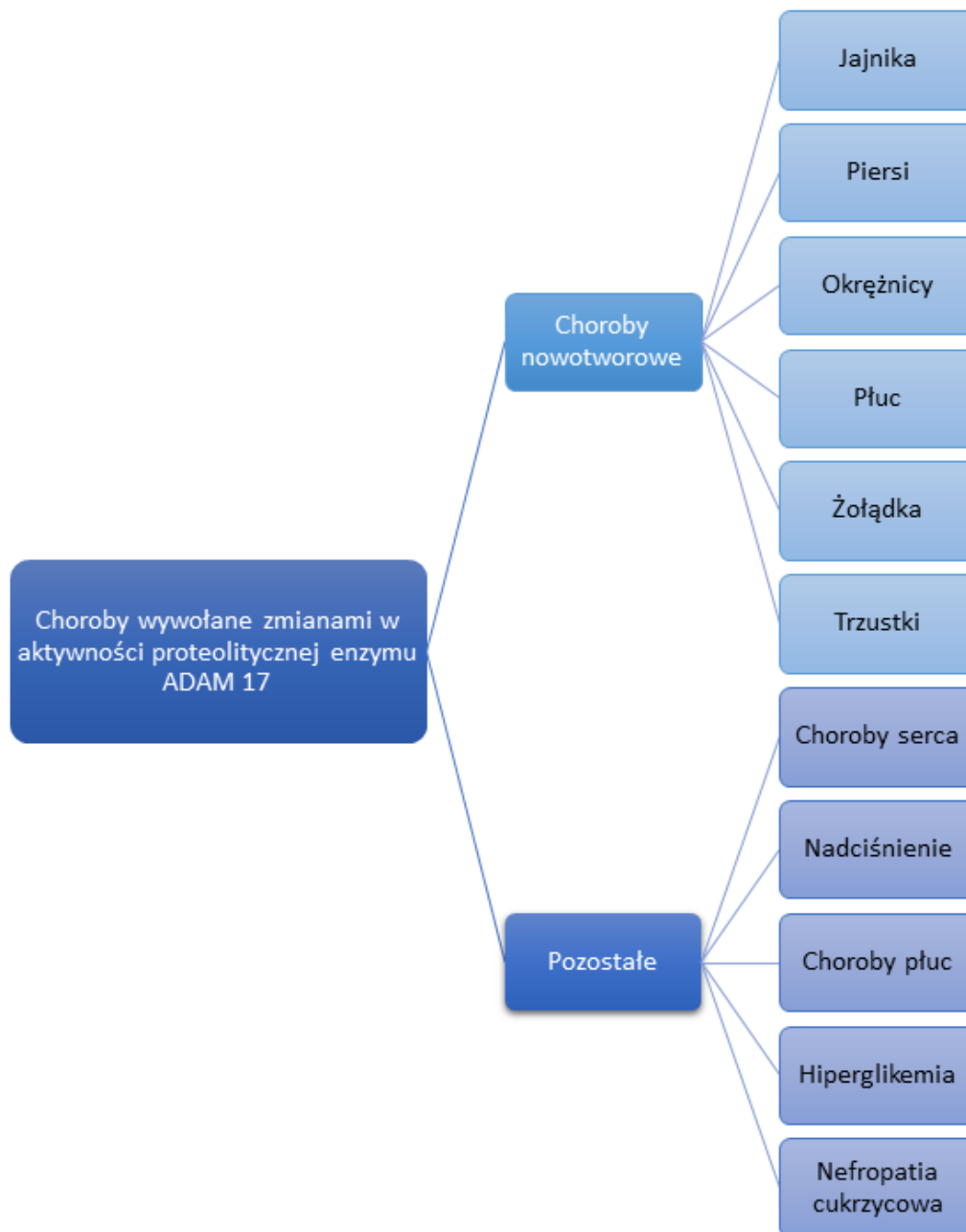
W badaniach przeprowadzonych przez grupę badawczą L. Fiorentino oceniono wpływ dysfunkcji metabolicznych na aktywność enzymatyczną w kontroli hiperglikemicznej organizmu. W tym celu w badaniach *in vitro* wykorzystano trzy linie komórkowe – preadipocyty 3T3-F442A, miocyty C2C12 oraz hepatocyty SV40. Wszystkie linie komórkowe poddawano ekspozycji na wysokie stężenie liposacharydów, kwasu palmitynowego, glukozy oraz insuliny, indukując zaburzenia metaboliczne. W wynikach obserwowano znaczny wzrost aktywności enzymu ADAM 17 we wszystkich badanych wariantach. Dodatkowo przeprowadzono badania *in vitro* z udziałem myszy z zahamowaną ekspresją naturalnego inhibitora tkankowego metaloproteinaz - 3 (ang. Tissue Inhibitor of MetalloProteinases – 3, TIMP-3), enzymu ADAM 17. Osobniki spożywały pokarm bogaty w lipidy. Po upływie 20 tygodni zaobserwowano zwiększone stężenie glukozy oraz insuliny we krwi względem osobników niemodyfikowanych genetycznie. Przeprowadzona analiza histopatologiczna wątroby potwierdziła

zaawansowane stadium zapalenia wątroby u osobników z zahamowaną ekspresją inhibitora TIMP-3 w odniesieniu do zdrowych myszy⁶⁵.

W 2014 przeprowadzono badania *in vivo* na myszach, ze zmianami metabolicznymi obserwowanymi w rozwoju cukrzycy typu 1. Po 10 tygodniach hodowli część osobników poddano leczeniu insuliną. Obserwowano u nich spadek stężenia glukozy we krwi oraz znaczne zahamowanie postępu choroby. Następnie zbadano stężenie enzymu ADAM 17 zarówno w lizatach komórkowych nerek jak i moczu. W efekcie odnotowano zmniejszone stężenie enzymu ADAM 17 u osobników poddanych leczeniu insuliną. Równolegle badano stężenie ACE2, enzymu będącego substratem ADAM 17 we wskazanych modelach. Profile ekspresji obu białek były identyczne, co wskazuje na silną korelację pomiędzy aktywnością obu związków, a zachodzącymi zmianami metabolicznymi w trakcie rozwoju cukrzycy typu 1⁶⁶.

Doniesienia literaturowe na temat wpływu enzymu ADAM 17 na rozwój chorób nerek dowodzą, że enzym ten aktywuje szlaki prowadzące do zwłóknienia nerek, które pojawia się w nefropatii cukrzycowej⁶⁷. W badaniach przeprowadzonych przez grupę badawczą R. Li na komórkach podocytów wyizolowanych od szczurów obserwowano znaczący wzrost aktywności ADAM 17 po inkubacji w pożywce zawierającej wysokie stężenie glukozy (30 mM) względem próby kontrolnej, inkubowanej w pożywce zawierającej standardowe stężenie glukozy (5,6 mM)⁶⁸.

Przedstawione powyżej dane literaturowe obrazują jak aktywność proteolityczna enzymów, ze szczególnym uwzględnieniem ADAM 17, wywiera wpływ na rozwój chorób (Rycina 8).



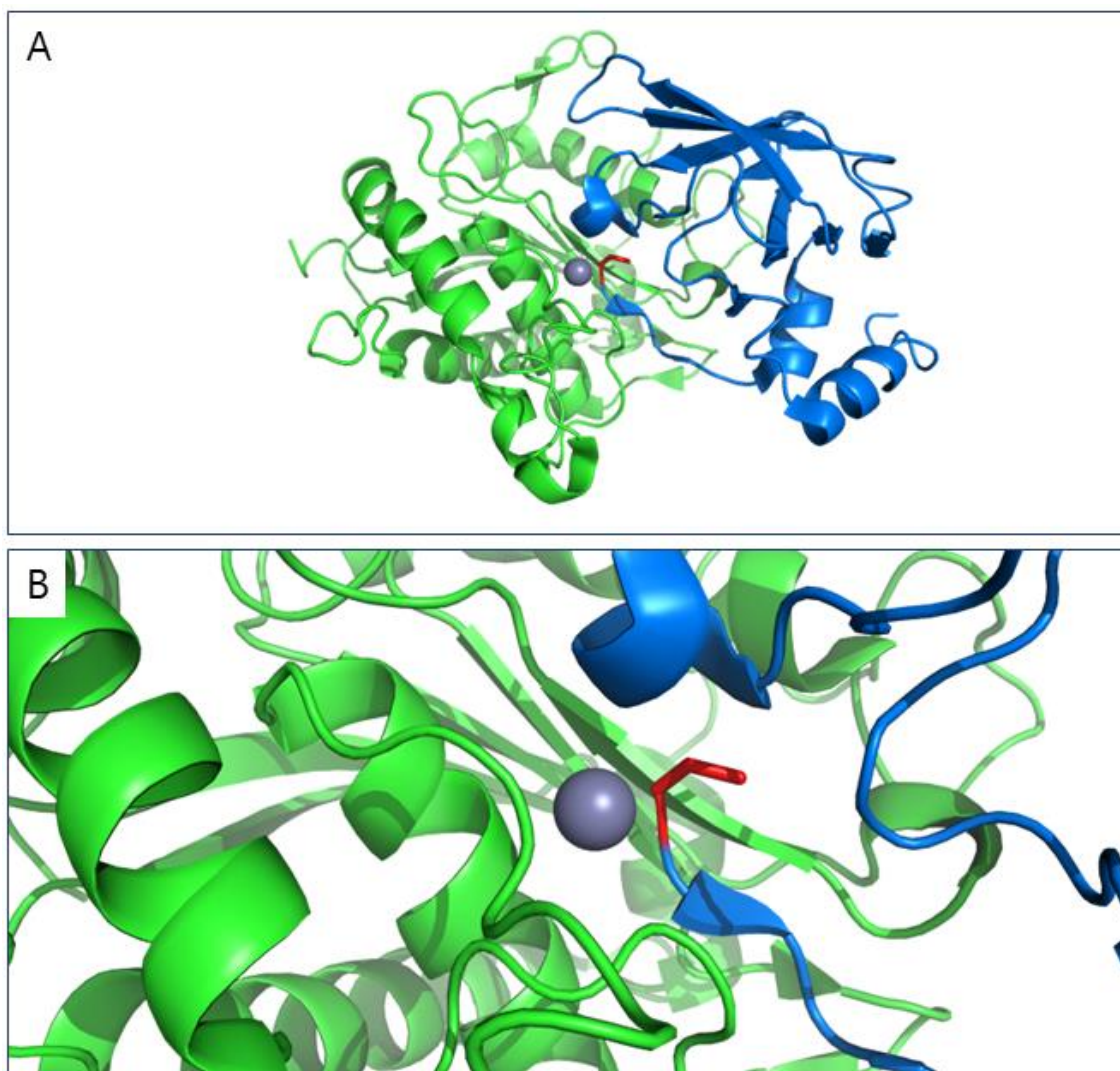
Rycina 8. Schemat obrazujący rolę enzymu ADAM 17 w patogenezie wybranych chorób.

2.4 Inhibitory enzymu ADAM 17

Wysoki stopień homologii strukturalnej pomiędzy centrami aktywnymi enzymów proteolitycznych jest przyczyną ograniczeń w projektowaniu selektywnych drobnocząsteczkowych inhibitorów. Naturalnym inhibitorem enzymu ADAM 17 jest TIMP-3 (ang. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3),

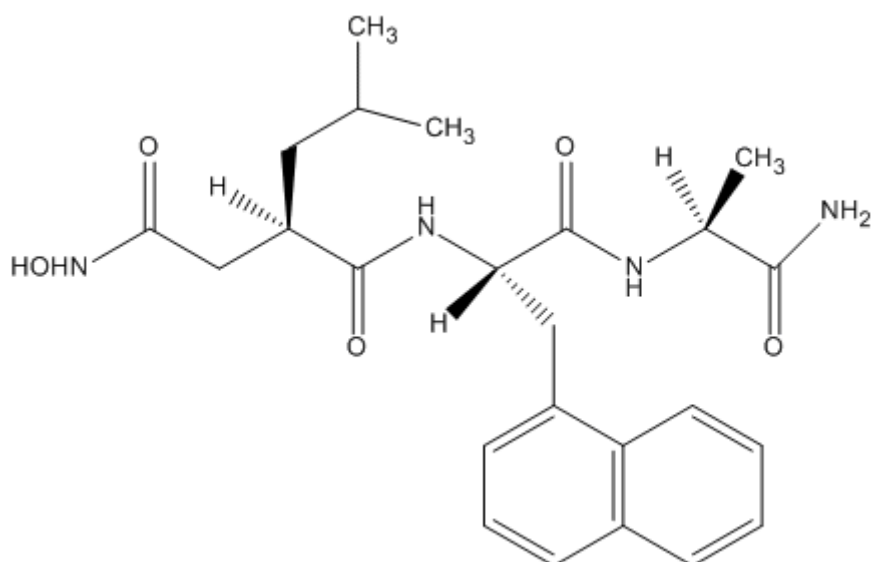
który wiąże się z centrum aktywnym enzymu z zachowaniem stechiometrii 1:1⁶⁹. Natywne białko TIMP-3 ma masę około 24 kDa. Struktura drugorzędowa zbudowana jest z dwóch α -helis oraz ośmiu nici β -kartek, stabilizowanych przez sześć wiązań disulfidowych. N-końcowy fragment inhibitora zawiera miejsce glikozylacji w pozycji Asn184⁷⁰.

N-końcowy fragment białka TIMP-3 jest zaangażowany w hamowanie aktywności proteolitycznej ADAM 17. Cysteina w pozycji 1 poprzez grupę α -aminową oraz karbonylowy atom tlenu grupy α -karboksylowej konkurencyjnie koordynuje jon cynku. Grupa α -karboksylowa kwasu glutaminowego (Glu406) enzymu, która dotychczas zaangażowana była w koordynowanie jonu cynku, tworzy międzycząsteczkowe wiązanie wodorowe z grupą karbonylową seryny (Ser66). Łańcuch boczny treoniny (Thr2) oddziałuje z kieszenią katalityczną S_1' , natomiast łańcuch boczny seryny (Ser4) wpasowuje się w kieszeń S_3' enzymu. Kolejne dwie reszty aminokwasowe w sekwencji inhibitora - prolina (Pro5) oraz seryna (Ser6), tworzą kilka stabilizujących całość oddziaływań Van der Waalsa odpowiednio z izoleucyną (Ile438) oraz tyrozyną (Tyr390). Kluczowym dla stabilności kompleksu TACE-TIMP-3 jest oddziaływanie pomiędzy hydrofobowym fragmentem enzymu bogatym w reszty tyrozyny, waliny oraz leucyny (Tyr352, Val353, Tyr369 oraz Leu380), a pętlą sA-sB inhibitora o sekwencji Glu31-Gly32-Pro33-Phe34-Gly35-Thr36⁷¹ (Rycina 9).



Rycina 9. A) Struktura krystaliczna kompleksu domeny katalitycznej enzymu ADAM 17 (kolor zielony) z naturalnym inhibitorem TIMP-3 (kolor niebieski). Czerwonym kolorem oznaczono resztę aminokwasową cysteiny w pozycji 1 inhibitora, pełniącą kluczową rolę w blokowaniu aktywności proteolitycznej; B) zbliżenie struktury krystalicznej kompleksu ADAM 17-TIMP-3⁷².

Wydajnym inhibitorem syntetycznym, selektywnym wobec enzymu ADAM 17 jest inhibitor przetwarzania TNF- α (ang. Tumor necrosis factor - Alpha Processing Inhibitor - 0, TAPI-0) (Rycina 10).



Rycina 10. Wzór półstrukturalny inhibitora syntetycznego TAPI-0.

Grupa K. Kagawa zaobserwowała znaczący spadek aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17, przy zastosowaniu TAPI-0 w linii komórkowej szpiczaka mnogiego (RPMI 8226). Wykonane eksperymenty wykazały brak cytotoxycznosci tego inhibitora względem zdrowych komórek⁷³. Grupa hydroksyloamonowa inhibitora konkurencyjnie wiąże się z jonem cynku, blokując aktywność katalityczną enzymu⁷⁴.

3. Cukrzyca

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną wywołowaną zaburzeniami w produkcji i podaży insuliny. Insulina stabilizuje poziom glukozy we krwi, poprzez między innymi hamowanie jej produkcji w wątrobie. Wyróżniamy dwie podjednostki chorobowe:

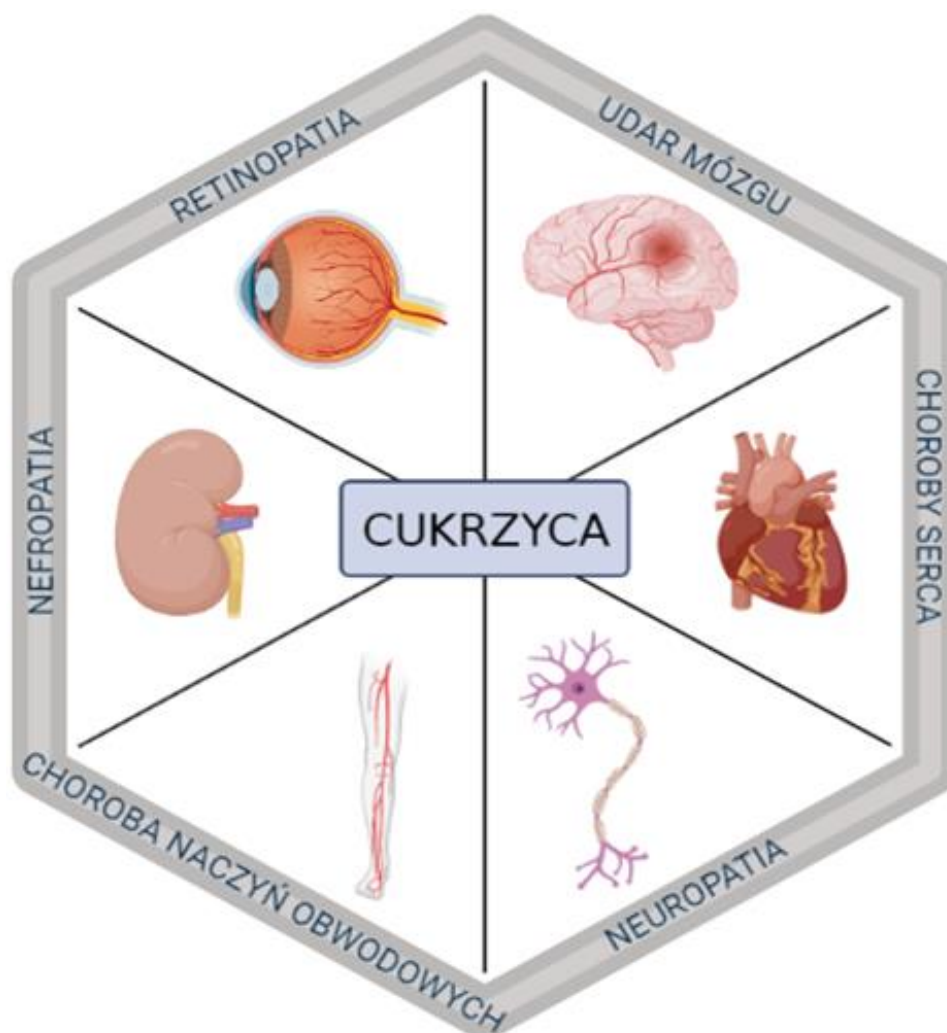
- cukrzycę typu 1 - jest to choroba autoimmunologiczna w której dochodzi do niszczenia komórek β -trzustki, produkujących insulinę, poprzez własny układ odpornościowy.
- cukrzycę typu 2 - przejawiająca się brakiem reakcji organizmu na zmiany w stężeniu glukozy we krwi⁷⁵.

Ponadto cukrzyca może pojawiać się u kobiet w ciąży (cukrzyca ciążowa) oraz u osób obciążonych genetycznie. Występuje także w trakcie trwania infekcji, jak i może być konsekwencją długotrwałego przyjmowania leków (cukrzyca wtórna)⁷⁶.

Według danych z raportu Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) na świecie w 2014 roku z cukrzycą żyło 422 milionów ludzi, a od 1980 roku procent populacji z tą chorobą wzrósł z 4,7% do 8,5%. Według najnowszych danych w 2022 roku na świecie żyło 830 milionów osób chorych na cukrzycę. Największy przyrost przypadków obserwowano w krajach słabo i średnio rozwiniętych co wynika z uwarunkowań kulturowych, trybu życia, dostępu do służby zdrowia oraz świadomości społecznej. Według najnowszych danych 95% przypadków to pacjenci z cukrzycą typu 2^{77,78}.

W trakcie rozwoju cukrzycy występują powikłania groźne dla organizmu człowieka, powodując znaczny wzrost ryzyka śmierci pacjenta. Niezależnie od typu cukrzycy, może ona powodować rozwój następujących jednostek chorobowych⁷⁹ (Rycina 11):

- retinopatia – powikłanie nerwowo-naczyniowe powodujące między innymi ślepotę, jaskrę oraz zaćmę⁸⁰;
- nefropatia – przejawia się zaburzeniami w pracy kłębuszków nerkowych, prowadzącymi do niewydolności nerek⁸¹;
- neuropatia – zapalenie nerwów obwodowych spowodowane między innymi powstającymi reaktywnymi formami tlenu⁸²;
- udar mózgu;
- choroby serca;
- choroba naczyń obwodowych;



Rycina 11. Powikłania pojawiające się u pacjentów chorujących na cukrzycę. Rysunek wykonany na podstawie literatury⁸³.

Według danych literaturowych w populacji zamieszkującej Stany Zjednoczone Ameryki w latach 2009-2015 przyrost hospitalizacji pacjentów z cukrzycą wzrósł o 73%. Obserwowano również 55% wzrost liczby zgonów, z których większość dotyczyło zawałów serca oraz niewydolności nerek spowodowanych rozwojem nefropatii cukrzycowej, co czyni te powikłania najgroźniejszymi spośród wymienionych⁸⁴. Szacuje się, że liczba zgonów w 2012 roku wyniosła 1,5 miliona pacjentów. Według danych liczba ta odpowiada 12,8% wszystkich zgonów na świecie. Wśród przyczyn śmierci ponownie najczęściej występowały niewydolność nerek oraz choroby serca⁸⁵. Zgodnie z najnowszymi danymi Międzynarodowej Federacji Diabetyków, liczba zgonów pacjentów w 2021 roku wywołana powikłaniami cukrzycy, wyniosła 6,7 milionów ludzi⁸⁶.

4. Nefropatia cukrzycowa

4.1. Klasyfikacja

Nefropatia cukrzycowa (ang. Diabetic Nephropathy, DN) jest powikłaniem mikronaczyniowym prowadzącym do przewlekłej niewydolności nerek. W trakcie trwania choroby obserwuje się objawy takie, jak obecność białka w moczu oraz zwiększenie ciśnienia tętniczego. DN rozwija się u pacjentów niezależnie od typu cukrzycy⁸⁷.

W trakcie rozwoju choroby obserwuje się zmiany w morfologii nerki obejmujące pogrubienie błony podstawnej komórek podocytów, przerost kanalików proksymalnych oraz zwiększenie mezangium. Badania przeprowadzone przez grupę badawczą P. Bjornstad dowiodły, że w modelu zwierzęcym z indukowaną cukrzycą, po 50 dniach obserwowano 67% przyrost masy nerek⁸⁸.

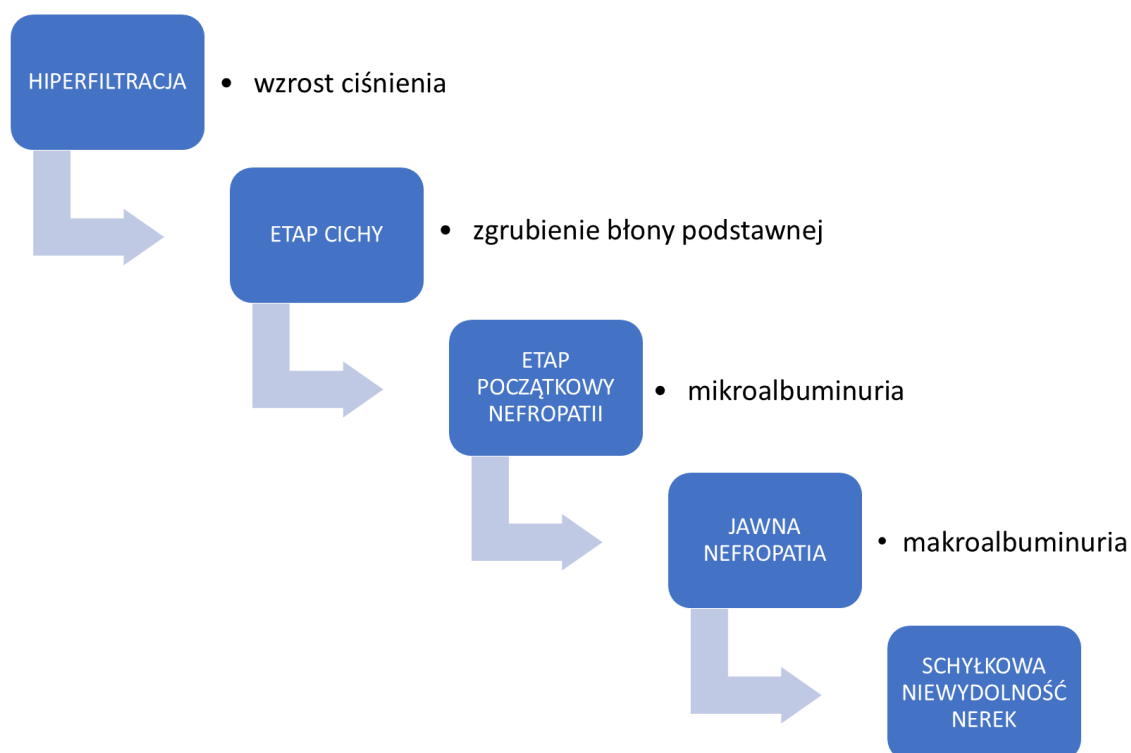
Tempo rozwoju DN zależy od takich czynników, jak uwarunkowania genetyczne, rasa czy przynależność do grupy etnicznej⁸⁹. Istotny jest również styl życia pacjenta. Przeprowadzone badania dowodzą, że istnieje ścisły związek pomiędzy paleniem papierosów a rozwojem DN. Palacze są bardziej narażeni na zachorowania, a ryzyko to rośnie wraz z zwiększaniem przyjmowanej dawki tytoniu⁹⁰. Zaobserwowano również zależność pomiędzy zwiększonym ryzykiem zachorowania a podeszłym wiekiem, otyłością, wysokim poziomem cholesterolu czy też wcześniejszym zdiagnozowaniem innych powikłań, takich jak retinopatia. K. Tziomalos i współpracownicy w swoich pracach wskazują również, że mężczyźni mają większą skłonność do zachorowania na DN⁹¹. Jednakże najważniejszym i najszerszej opisanym w literaturze czynnikiem ryzyka jest hiperglikemia. Nieodpowiednia kontrola hiperglikemii przyczynia się do rozwoju i progresji DN. Ścisła kontrola, polegająca na utrzymaniu poziomu glukozy w stężeniu fizjologicznym spowodowała znaczną regresję w rozwoju DN zarówno u

pacjentów z cukrzycą typu 1 jak i 2⁹². Badania przeprowadzone na grupie pacjentów z cukrzycą typu 1 wykazały zmniejszenie występowania mikroalbuminurii i albuminurii o odpowiednio 39% i 54%, z kolei u pacjentów z niepoprawnie kontrolowaną hiperglikemią obserwowano wyraźne pogorszenie wyników klinicznych oraz diagnozowano pierwsze stadia DN⁹³.

Zidentyfikowano pięć stadiów choroby pojawiających się w trakcie rozwoju DN (Rycina 12). Klasyfikacji dokonano na podstawie zmian w wartościach współczynnika filtracji kłębuszkowej (ang. Glomerular Filtration Rate, GFR) oraz ciśnienia tętniczego⁹⁴.

- I – Hiperfiltracja – faza początkowa, w której dochodzi do wzrostu GFR oraz wzrostu ciśnienia naczyń włosowatych.
- II – Etap cichy – w fazie tej obserwuje się pierwsze zmiany na poziomie morfologii nerki w tym zgrubienie błony podstawnej. Występuje również nasilona ekspansja macierzy mezangium. Czynnik GFR jest w normie z tendencją do nieznacznego wzrostu.
- III – Etap początkowy nefropatii – pojawia się mikroalbuminuria, dochodzi do nieodwracalnych zmian w kłębuszkach nerkowych, jednak nie zachodzą trwałe zaburzenia w funkcjonowaniu nerek. Wartość GFR może być zarówno w normie jak i podwyższona. Najnowsze badania wykazały zdolność do cofnięcia się zmian w nerkach pacjentów, u których etap ten trwał krótko.
- IV – Jawna nefropatia – objawia się makroalbuminurią oraz zwiększonym ciśnieniem tętniczym a wartość GFR maleje. Prawidłowe leczenie na tym etapie jest kluczowe dla podtrzymania czynności nerek.
- V – Schyłkowa niewydolność nerek – wartość GFR jest bardzo niska, dochodzi do trwałego uszkodzenia nerek. W etapie tym niezbędna jest

dializa. Jedyną możliwością wyleczenia jest przeszczep nerki, który czasami wykonywany jest razem z przeszczepem trzustki ^{95,96,97}.



Rycina 12. Etapy nefropatii cukrzycowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury⁹⁸.

4.2. Diagnostyka

W diagnostyce DN, najbardziej rozpowszechnionym badaniem jest analiza obecności albumin w moczu. Wynik wykraczający poza normy nie jest jednoznaczny z postawieniem diagnozy, ze względu na występowanie odchyłeń od wartości referencyjnych obserwowanych również w innych chorobach układu wydalniczego. W przypadku stwierdzenia odchyłeń od normy, pacjent wykonuje dalsze badania w odpowiednich odstępach czasowych, a pełen okres diagnostyczny trwa około sześć miesięcy. Równoległe u pacjenta wykonuje się badanie oceny wartości współczynnika filtracji kłębuszkowej, którego zmiany towarzyszą rozwojowi DN⁹⁹. Obecna droga diagnostyczna jest bardzo długa oraz skomplikowana, a przez występowanie objawów niespecyficznych, poszukuje się

nowych biomarkerów, które jednoznacznie będą wskazywać na DN, we wczesnych stadiach choroby¹⁰⁰. Dane literaturowe opisują wiele biomarkerów różnego pochodzenia. Najczęściej pojawiającymi się są:

- Mikro RNA – krótkie niekodujące fragmenty RNA odpowiedzialne za ekspresję genów. Ich zaletą diagnostyczną jest wysoka stabilność w płynach ustrojowych. Analizowane są poprzez sekwencjonowanie oraz ilościowy test PCR. Metoda ta jest czuła i precyzyjna a niektóre dane dowodzą występowania korelacji pomiędzy obecnością wybranych fragmentów mikro RNA, a stopniem rozwoju DN¹⁰¹;
- Transferyna – to białko, którego zwiększone stężenie w moczu obserwowano u pacjentów z cukrzycą typu 2. Dowiedziono, że diabetycy z wysokim poziomem transferyny w moczu szybciej zachorują na DN, niż pacjenci z prawidłowym poziomem tego białka¹⁰²;
- Angiotensynogen – białko, którego stężenie w moczu u pacjentów z cukrzycą typu 1 jest podwyższone, przed pojawieniem się mikroalbuminurii. Z kolei u pacjentów z cukrzycą typu 2 wyższe stężenie tego białka obserwowano dopiero w sytuacji wystąpienia makroalbuminurii gdzie we wcześniejszych stadiach choroby jego stężenie było prawidłowe¹⁰³;
- Kolagen typu IV – składnik macierzy mezangialnej, którego stężenie powyżej normy obserwuje się w moczu pacjentów z cukrzycą typu 2 i stwierdzoną DN. Niestety u 1/3 pacjentów obserwuje się brak zmian stężenia kolagenu typu IV, pomimo stwierdzonej mikroalbuminurii¹⁰⁴;
- α -1-mikroglobulina – to niewielka glikoproteina, która z łatwością pokonuje barierę krew/mocz w kłębuszkach nerkowych, po czym zostaje wchłonięta w kanalikach proksymalnych. Przeprowadzone badania wykazują korelację pomiędzy zwiększonym stężeniem tej glikoproteiny a stadium rozwoju DN. Badania grupy Ching-Ye Hong przeprowadzone na

próbkach moczu pacjentów z cukrzycą typu 2 wskazują, że wyniki pomiaru stężenia α -1-mikroglobuliny mogą mieć charakter diagnostyczny dla wczesnego wykrywania DN¹⁰⁵.

- Cystatyna C – jest to białko pełniące funkcje inhibitora proteaz cysteinowych. Zaobserwowano istotnie zwiększone poziomy stężenia w próbkach moczu osób z mikroalbuminurią. Analiza danych literaturowych wykonana przez T. Fiseha, potwierdza wykorzystanie cystatyny C jako biomarkera DN. Między innymi zaobserwowano jednoczesny wzrost stężenia tego białka, wraz ze wzrostem stężenia albuminy w moczu. Wciąż trwają badania nad klinicznym zastosowaniem cystatyny C jako markera DN¹⁰⁶.
- Lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii (ang. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin, NGAL) – to niewielkie białko uwalniane między innymi przez komórki kanalików nerkowych, jako odpowiedź na uszkodzenia tych struktur. Zaobserwowano podwyższone stężenie NGAL u pacjentów z cukrzycą w odniesieniu do grupy kontrolnej. U pacjentów z cukrzycą, ale bez mikroalbuminurii zanotowano podwyższony poziom NGAL w moczu, co wskazuje na wczesne uszkodzenie kanalików. Badania dowodzą, że NGAL może być biomarkerem wczesnego wykrywania DN¹⁰⁷.
- Czynniki martwicy nowotworów TNF- α – to wcześniej omawiana cytokina indukująca procesy zapalne, której zwiększone stężenie obserwuje się u pacjentów z DN¹⁰⁸. Bierze udział w homeostazie mediatorów odpowiedzialnych za rozszerzanie i zwężanie naczyń krwionośnych oraz jest cytotoksyczna wobec komórek kłębuszków, prowadząc do ich uszkodzenia¹⁰⁹.
- 8-hydroksy-2-deoksyguanozyna (8-OHdG) – powstaje w wyniku reakcji enzymatycznej z udziałem reaktywnych form tlenu. Nie ulega degradacji

w komórkach, a usuwana jest z organizmu wraz z moczem. Zwiększone stężenia 8OHdG zaobserwowano u pacjentów z cukrzycą typu 2¹¹⁰. U pacjentów z makroalbuminurią poziom 8-OHdG był znacznie wyższy niż u pacjentów z noralbuminurią. 8OHdG jest ogólnoustrojowym markerem stresu oksydacyjnego, więc jego zmiany w stężeniu w moczu są niejednoznaczne z rozwojem DN¹¹¹.

- Sercowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (ang. Heart-type Fatty Acid-Binding Protein, H-FABP) – białko wykorzystywane jako marker ostrego uszkodzenia nerek. Zaobserwowano stopniowy wzrost stężenia tego białka w moczu wraz z rozwojem DN, co korelowało ze wzrostem stężenia albuminy¹¹².
- Końcowe produkty glikolizacji (ang. Advanced Glycation End products, AGE) – powstają w wyniku nieenzymatycznych reakcji glikozylacji białek. Nadmierna ilość tych związków w organizmie powoduje stres oksydacyjny w komórkach¹¹³. AGE stymuluje również produkcję cytokin, co wpływa na powstawanie stanów zapalnych. Hiperglikemia przyczynia się do samorzutnych reakcji powodujących produkcję AGE. W badaniach zaobserwowano znaczny wzrost stężenia AGE w moczu u pacjentów z DN¹¹⁴.

Biopsja jest metodą diagnostyczną, która bezpośrednio wskazuje na występowanie DN. Niestety jest ona bardzo inwazyjna, powodując 3% ryzyko wystąpienia poważnych powikłań. Dodatkowo ten zabieg diagnostyczny jest kosztowny, co wyklucza go z powszechnego stosowania u pacjentów¹¹⁵.

4.3. Potencjalne metody leczenia

Różnorodne przyczyny DN wymuszają stosowanie szeregu odmiennych metod terapeutycznych jako monoterapii lub terapii łączonej. Czynnikiem ryzyka DN są między innymi podwyższone stężenie glukozy oraz podwyższone ciśnienie

krwi. W leczeniu tych chorób i tym samym prewencji DN stosowane są między innymi inhibitory stresu oksydacyjnego oraz leki przeciwzapalne^{116,117}.

4.3.1 Inhibitory stresu oksydacyjnego

- APX-115 (ang. Isuzinaxib) jest jednym z inhibitorów odpowiedzialnych za hamowanie produkcji reaktywnych form tlenu. Związek ten blokuje ekspresję enzymów: Nox-1, Nox-2, Nox-4 oraz Nox-5 w komórkach nerek. Badania *in vivo* potwierdzają ochronne działanie tego inhibitora, poprzez zmniejszenie ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego. U zwierząt z indukowaną DN obserwowano zahamowanie rozwoju procesów zapalnych oraz niższe stężenia albuminy w moczu w odniesieniu do próby kontrolnej. Stosowanie tego związku usprawnia działanie szlaków sygnalizacyjnych komórek odpowiedzialnych za właściwą reakcję na insulinę^{118,119}.
- L. Kishore ze współpracownikami przebadali inhibitory reduktazy aldozowej, mające potencjalne działanie antyoksydacyjne. Wśród inhibitorów tego enzymu wyróżnia się naturalnie występujący w ziarnach soi stigmasterol. Przeprowadzone badania *in vitro* potwierdziły skuteczne działanie inhibitora, poprzez zmniejszenie ilości produkowanych końcowych produktów glikacji względem próby referencyjnej. Analiza histopatologiczna potwierdziła prewencyjną aktywność inhibitorów reduktazy aldozowej wobec komórek objętych DN¹²⁰.

4.3.2 Inhibitory odpowiedzialne za właściwą kontrolę glikemiczną

- Floryzyna jest jednym ze stosowanych związków aktywnych w lekach kontrolujących hiperglikemię. Jest to bioflawonoid naturalnie znajdujący się w miększu jabłek, odpowiedzialny za inhibicję modulatorów glukozy-sodowych (ang. Sodium-Glucose Cotransporter, SGLT). W przeprowadzonych badaniach *in vivo* stosowanie inhibitora SGLT

zapobiegało trwałej hiperglikemii, białkomoczu oraz hiperfiltracji kłębuszkowej. U zwierząt niewykazujących białkomoczu, mimo zastosowania inhibitora obserwowano znaczną diurezę oraz cukromocz¹²¹.

- Inhibitory dipeptydylo peptydazy-4 (ang. Dipeptidyl-Peptidase-4, DPP-4) zwane gliptynami, wspierają kontrolę glikemiczną w organizmie. W przeprowadzonych badaniach zredukowano białkomocz u pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz DN, stosując inhibitor DPP-4 - sitagliptynę. Podobne działanie obserwowano również po zastosowaniu linagliptyny. Najczęściej stosuje się gliptyny jako elementy terapii łączonej wobec zahamowania rozwoju DN¹²². Długoterminowe stosowanie u pacjentów alogliptyny jako inhibitora DPP-4 u pacjentów z cukrzycą typu 2 potwierdziło nie tylko poprawę i stabilizację stężenia glukozy we krwi, ale także wykazano brak negatywnych skutków tego leku na pozostałe narządy¹²³.

4.3.3 Pozostałe inhibitory stosowane w terapii DN

- Inhibitory układu Renina-Angiotensyna (ang. Renin-Angiotensin System, RAS), to szeroko przebadana grupa związków, stosowana w leczeniu pacjentów z cukrzycą. Opracowane dotychczas inhibitory blokują aktywność reniny oraz konwertaz angiotensyny¹²⁴. Jednym z powszechnie stosowanych inhibitorów jest kapropryl, którego efektem działania jest zmniejszenie ciśnienia tętniczego. Badania wykazały, że stosowanie inhibitorów RAS u pacjentów z cukrzycą typu 1 prowadziło do istotnego zmniejszenia białkomoczu, wraz z unormowaniem wskaźnika GFR¹²⁵.
- Blokada receptora interleukiny 6, Il-6R. U pacjentów z DN zaobserwowano nadprodukcję cytokin prozapalnych, co więcej stężenie Il-6R jest wyższe u pacjentów z DN niż u pacjentów z cukrzycą bez

stwierdzonej nefropatii¹²⁶. Zastosowanie inhibitora receptora Il-6R (tocilizumab) w modelu mysim z indukowaną cukrzycą, spowodowało zmniejszenie białkomoczu oraz agregacji macierzy pozakomórkowej. Blokowanie receptora Il-6R prowadzi do zahamowania wydzielanych cytokin prozapalnych, co przyczynia się do złagodzenia skutków rozwoju DN¹²⁷.

4.4 Patogeneza nefropatii cukrzycowej, ze szczególnym uwzględnieniem enzymów proteolitycznych

Dotychczasowe badania mające na celu zidentyfikowanie uniwersalnego szlaku odpowiedzialnego za rozwój DN wykazały, że w proces ten zaangażowane są różne szlaki sygnałowe, aktywujące odmienne mechanizmy. Dodatkowo zaobserwowano wzajemne oddziaływania pomiędzy poszczególnymi ścieżkami, które determinują udział w rozwoju choroby kilku mechanizmów jednocześnie¹²⁸.

Dane literaturowe opisujące ścieżki rozwoju DN wskazują na indukowanie choroby trwałą hiperglikemią, która towarzyszy pacjentom z cukrzycą. Hiperglikemia ma istotny wpływ na stres oksydacyjny, powstawanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji, czy też wzmożoną aktywację szlaków sygnałowych. Zaburzenia te prowadzą do powstawania prozapalnych mediatorów, co w sprzężeniu ze zmianami hemodynamicznymi skutkuje trwałym uszkodzeniem nerek¹²⁹.

Kluczowa w rozwoju DN jest również aktywność enzymatyczna. Enzymy, to wielkocząsteczkowe głównie białkowe związki o właściwościach katalitycznych. Ich zadaniem jest obniżanie energii aktywacji specyficznych reakcji¹³⁰.

Od wielu lat prowadzone są badania dotyczące genezy oraz rozwoju DN zależnego od aktywności proteaz. W przeprowadzonych badaniach wykazano znaczące różnice w aktywności enzymów i wynikającej z niej zawartości peptydów w próbkach moczu, pomiędzy pacjentami zdrowymi a pacjentami chorującymi na

DN. W analizie tej potwierdzono zmiany w aktywności siedemnastu proteaz w tym metaloproteaz macierzy pozakomórkowej (MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13), katepsyny D, katepsyny K, kalikreiny 4 oraz konwertaz probiałkowych (Tabela 2)¹³¹. W przypadku nefropatii cukrzycowej analizę może komplikować pojawiająca się albuminuria. Na podstawie omawianych badań można założyć, że zachodzące zmiany w składzie i aktywności peptydów znajdujących się w moczu mogą wskazywać na wcześniejsze zaburzenia na poziomie tkankowym¹³².

Tabela 2. Enzymy proteolityczne zaangażowane w rozwój nefropatii cukrzycowej.

ENZYM	FUNKCJA	STADIUM CHOROBY W KTÓRYM OBSERWUJE SIĘ ZMIANY AKTYWNOŚCI
Konwertaza angiotensyny	przekształcenie angiotensyny I w angiotensynę II ¹³³	II
Konwertaza angiotensyny 2	przekształcenie angiotensyny I w angiotensynę (1-9) oraz angiotensyny II w angiotensynę (1-7) ¹³⁴	II
Renina	przekształcenie angiotensynogenu w angiotensynę I ¹³⁵	III
MMP-2	degradacja kolagenu IV, V oraz zdenaturowanego kolagenu I ¹³⁶	II
MMP-3	degradacja kolagenów typu: II, IV, V. Hydroliza TV-C, lamininy oraz fibronektyny ¹³⁷	III
MMP-7	degradacja kolagenu IV, fibronektyny, lamininy oraz entaktyny ¹³⁸	III
MMP-8	degradacja kolagenów typu: I, II, III, VII oraz X ¹³⁹	II
MMP-9	degradacja kolagenów typu IV oraz V, proteoglikanów oraz elastyny ¹⁴⁰	III
MMP-12	degradacja elastyny, fibronektyny, lamininy, witronektyny oraz kolagenu typu IV ¹⁴¹	brak danych
MMP-13	degradacja kolagenów typu: I, II, III, IV, X, XIV oraz fibronektyny ¹⁴²	brak danych
ADAM 10	proteoliza cytokin oraz chemokin ¹⁴³	II
ADAM 17	procesowanie czynnika wzrostu TNF- α ¹⁴⁴	III
ADAMTS 13	proteoliza czynnika ULvWF ¹⁴⁵	II
Aminopeptydaza N	degradacja macierzy pozakomórkowej ¹⁴⁶	III
Chymaza	przekształcenie angiotensyny I w angiotensynę II ¹⁴⁷	III
Dipeptydylo peptydaza 4	degradacja macierzy pozakomórkowej ¹⁴⁸	II
Karnozynaza	hydroliza karnozyny ¹⁴⁹	III
Kaspazy	aktywacja szeregu reakcji prowadzących do apoptozy komórki ¹⁵⁰	IV
Katepsyna C	aktywacja proteaz serynowych ¹⁵¹	brak danych
Katepsyna D	degradacja aktyny, miozyny, aktywacja enzymów (katepsyna B, katepsyna L) ¹⁵²	III
Katepsyna K	degradacja kolagenu typu I, endostatyny oraz osteonektyny	brak danych
Katepsyna L	rozpad białek w lizosomach, hydroliza dynaminy oraz synaptopodiny ¹⁵³	III
Kalikreina 4	degradacja fibrynogenu, kolagenów typu I oraz IV ¹⁵⁴	brak danych
Trombina	homeostaza krzepnięcia krwi, przekształcenie fibrynogenu w fibrynę ¹⁵⁵	III

Spośród przedstawionych powyżej enzymów proteolitycznych, szczególną uwagę chciałabym zwrócić na dwa enzymy, których zaangażowanie w rozwój nefropatii cukrzycowej jest szeroko opisane w literaturze.

Pierwszym z nich jest ADAM 10, który znany jest również pod nazwą Kuzbanina. Znajduje się we wszystkich komórkach organizmu a jego zadaniem jest proteolityczne rozszczepianie substratów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wśród których znajdują się cytokiny, chemokiny oraz prekursorzy czynników wzrostu¹⁵⁶. Grupa badawcza P. Gutwein przeprowadziła eksperymenty z wykorzystaniem materiału biologicznego (mocz), który pochodził od pacjentów ze zdiagnozowanymi chorobami nerek (toczniowe zapalenie nerek, zapalenie nerek, nefropatia cukrzycowa). W analizowanych próbkach sprawdzono stężenie enzymu ADAM 10, a wartości porównano z materiałem biologicznym zdrowych ochotników. W rezultatach u wszystkich chorych pacjentów zaobserwowano podwyższone stężenie enzymu ADAM 10, względem zdrowych osób. Dodatkowo wykorzystując technikę western blot potwierdzili, że w komórkach podocytów dochodzi do ekspresji enzymu ADAM 10¹⁵⁷.

Kolejnym enzymem szeroko opisanym w literaturze jest ADAM 17. Jego budowa oraz specyficzność substratowa zostały omówione w rozdziale 2. *Enzym dezintegryny i metaloproteazy 17*. W 2021 roku przeprowadzono badania na myszach z indukowaną cukrzycą wywołaną przez podanie streptozotocyny. Naukowcy u wybranych osobników zahamowali ekspresję enzymu ADAM 17 poprzez modyfikacje genetyczne. U osobników z indukowaną cukrzycą i zahamowaniem ekspresji enzymu ADAM 17 obserwowano zmniejszony przerost nerek, względem próby kontrolnej. Sprawdzono również wpływ ograniczenia ekspresji badanej proteazy na apoptozę komórek podocytów, która zachodziła wolniej. W obu przypadkach sprawdzono również stężenia markerów odpowiedzialnych za zwłóknienie nerek (np. HB-EGF, TGF- α , TGF- β). U wszystkich

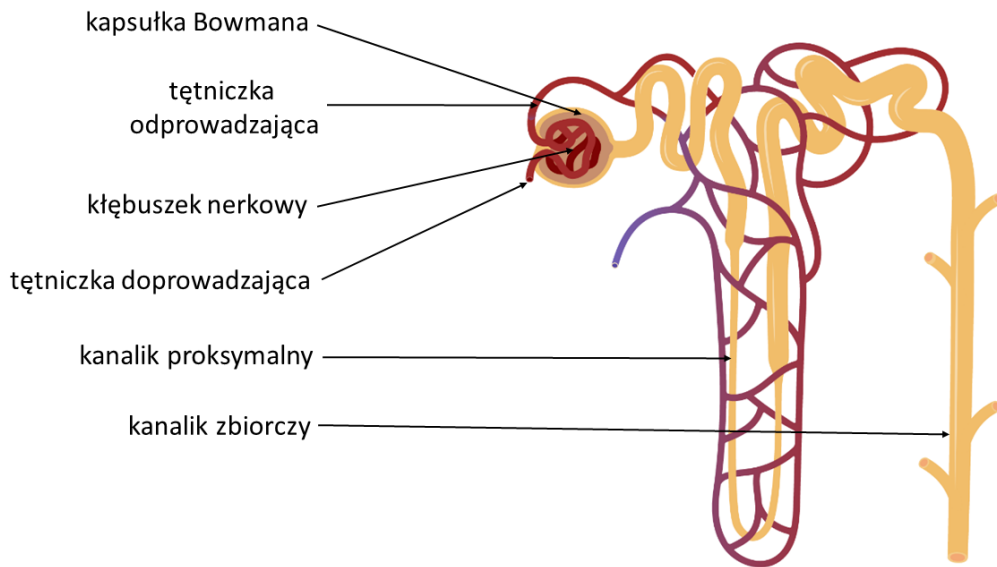
osobników z indukowaną cukrzycą zaobserwowano zwiększoną ekspresję analizowanych markerów w odniesieniu do zwierząt zdrowych. U myszy bez zahamowanej ekspresji enzymu ADAM 17 zaobserwowano znacznie wyższe stężenie omawianych markerów¹⁵⁸.

Niewątpliwie wszelkie zmiany zachodzące w organizmie, które prowadzą do zaburzenia stężenia oraz aktywności enzymów proteolitycznych mogą wywoływać reakcję łańcuchową, przyczyniając się do dalszej progresji choroby. To właśnie z tych powodów badania nad rozpoznaniem nefropatii cukrzycowej są tak bardzo istotne dla rozwoju zarówno diagnostyki jak i leczenia choroby. Pogłębienie wiedzy w tej tematyce może być kluczowe dla zdrowia całej populacji.

5. Nefron – podstawowa jednostka budulcowa układu wydalniczego

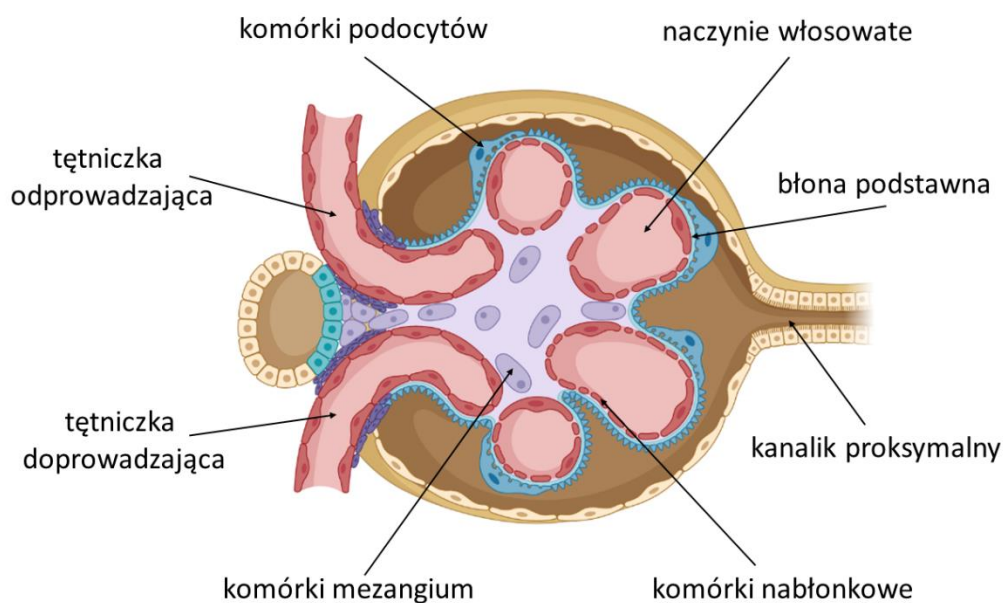
5.1 Funkcje elementów strukturalnych odpowiedzialnych za filtrację kłębuszkową

Nerki to organy, których główną funkcją jest wydalanie produktów przemiany materii. Ponadto odpowiadają za utrzymanie prawidłowej gospodarki wodno-elektrolitowej. Podstawową jednostką funkcjonalną nerek jest nefron (Rycina 13). Badania autopsyjne nerek przeprowadzone u ludzi na przestrzeni lat, wykazały, że liczba nefronów wynosi od 210 000 do 2 700 000, a ich liczebność spada wraz z wiekiem. Grupa badawcza J. R. Charlton przedstawiła badania, w których udowodniono spadek ilości nefronów u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Prawdopodobnie przyczyną obumierania nefronów jest niedokrwienie kłębuszków nerkowych, które prowadzi do ich stwardnienia a w konsekwencji do zaniku kanalików. Dokładny mechanizm nie został jednak poznany. W analizie rozważono także wpływ płci oraz rasy na ilość nefronów, jednak nie wykryto znaczących zależności¹⁵⁹.



Rycina 13. Schemat budowy nefronu. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁶⁰.

Kłębuszek nerkowy jest elementem nerki odpowiadającym za filtrowanie krwi (Rycina 14). Osocze filtrowane jest do kapsuły Bowmana. Pokonywanie bariery krew-mocz jest możliwe dzięki stosunkowo mniejszej średnicy tętniczki odprowadzającej względem tętniczki doprowadzającej. W wyniku tej różnicy powstaje ciśnienie, umożliwiające filtrację krwi¹⁶¹.

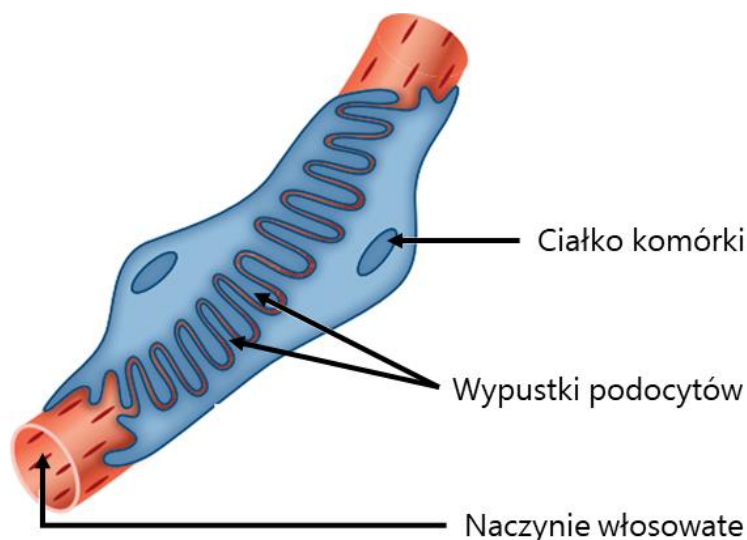


Rycina 14. Przekrój poprzeczny kłębuszka nerkowego. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹³⁵.

Filtrowane produkty przemiany materii, aby przedostać się do moczu muszą pokonać barierę komórek nabłonkowych, błony podstawnej oraz podocytów.

Błona podstawna budowana jest przez lamininy, kolagen typu IV, kolagen typu XVIII jak i proteoglikany. Błona ta oddziela komórki podocytów od komórek nabłonkowych, a jej funkcją jest zwiększenie selektywności filtracyjnej kłębuszków nerkowych¹⁶².

Podocyty wyściełają zewnętrzną powierzchnię błony podstawnej. Komórki te składają się z ciała komórki oraz wypustek szczelnie otaczających naczynia włosowate. Pomiędzy wypustkami znajduje się szczelina filtracyjna, która umożliwia przenikanie produktów przemiany materii (Rycina 15). Funkcje podocytów zależą od prawidłowej sygnalizacji międzykomórkowej, dlatego są one bardzo wrażliwe na wszelkie zmiany¹⁶³.



Rycina 15. Ułożenie komórek podocytów wokół naczyń włosowatych w kłębuszku nerkowym. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁶⁴.

Komórki mezangium ulokowane między naczyniami włosowatymi w kłębuszku nerkowym, zdolne są do kurczenia się, co pozwala na mechaniczną kontrolę ciśnienia w tętniczkach, wpływając na szybkość filtracji krwi. Obszar

mezangium odpowiada za usuwanie złogów filtrowanych makrocząsteczek osadzających się w błonie podstawnej¹⁶⁵.

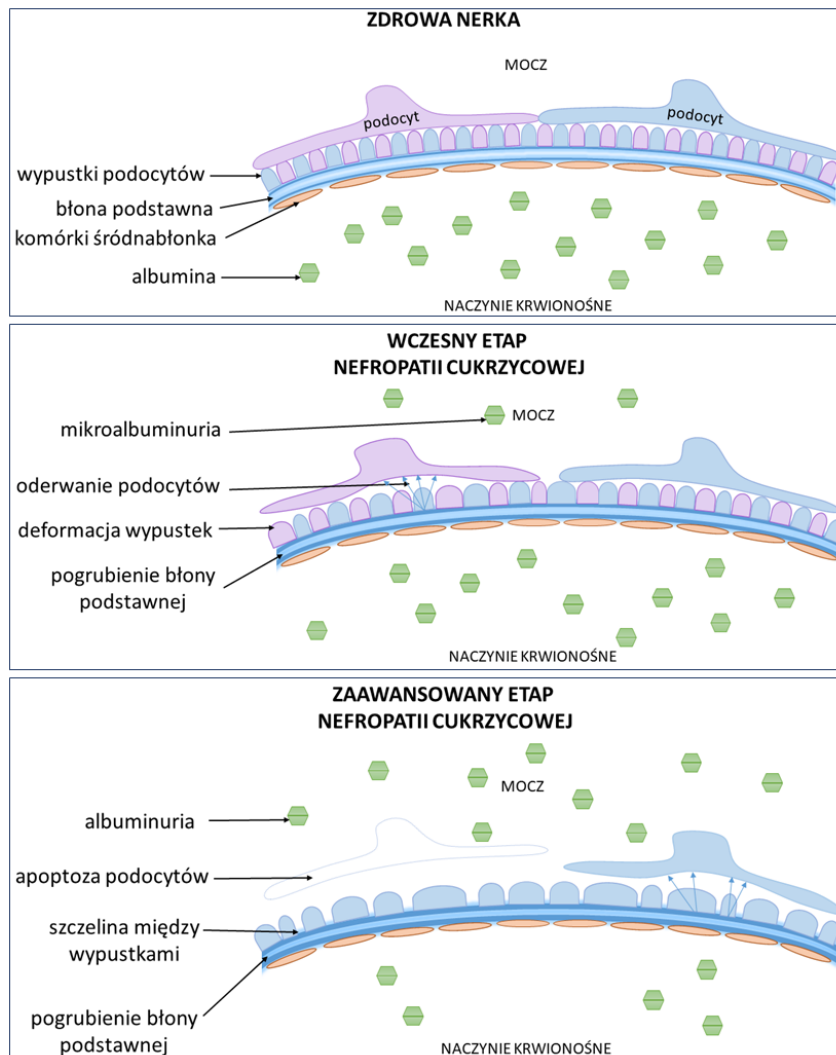
5.2 Zmiany zachodzące w kłębuszkach nerkowych podczas rozwoju nefropatii cukrzycowej

Podczas rozwoju DN obserwuje się wczesne zmiany w obrębie błony podstawnej kłębuszków nerkowych. W początkowych stadiach choroby błona podstawna ulega pogrubieniu. Zmiany w przestrzennej lokalizacji składników błony podstawnej wpływają na funkcjonowanie komórek podocytów oraz proliferację komórek mezangium. Zaobserwowano pogrubienie błony podstawnej u pacjentów z cukrzycą bez towarzyszącej albuminurii, co oznacza, że zmiany w grubości błony nie są przyczyną występowania białka w moczu. Najprawdopodobniej zmiany te są wynikiem wczesnych uszkodzeń podocytów i pojawiają się w celu utrzymania czynności nerek¹⁶⁶.

Zwiększone ciśnienie w tętniczkach przebiegających przez kłębuszek nerkowy, prowadzi do deformacji struktury podocytów. Komórki podocytów są w stanie dostosować się do drobnych zmian. Jednakże długotrwałe zaburzenia prowadzą do trwałych modyfikacji w cytoszkielecie komórek. W podocytach zachodzi ekspresja receptorów cytokin i chemokin, promujących stan zapalny. W omawianych stanach zapalnych komórek podocytów, wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne wpływają na ich funkcje, prowadząc do zaburzeń w ich integralności na powierzchni błony podstawnej. Ponadto w rozwoju DN obserwuje się apoptozę komórek podocytów oraz deformację ich wypustek¹⁶⁷.

Stany zapalne towarzyszące rozwojowi nefropatii cukrzycowej powodują podwyższoną proliferację komórek mezangium, których nadmiar deformuje naczynia krwionośne. Ponadto obserwuje się utratę żywotności komórek, przyczyniając się do zwłóknienia kłębuszków nerkowych. Deformacja naczyń krwionośnych powoduje zwiększenie ciśnienia, które wpływa na proces filtracji

krwi¹⁶⁸. Zmiany zachodzące w strukturze bariery filtracyjnej prowadzą do zaniku selektywności podczas pokonywania bariery krew-mocz (Rycina 16).



Rycina 16. Zmiany w organizacji bariery krew-mocz, obserwowane podczas rozwoju nefropatii cukrzycowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁶⁹.

5.3 Wpływ hiperglikemii na podocyty w modelu komórkowym

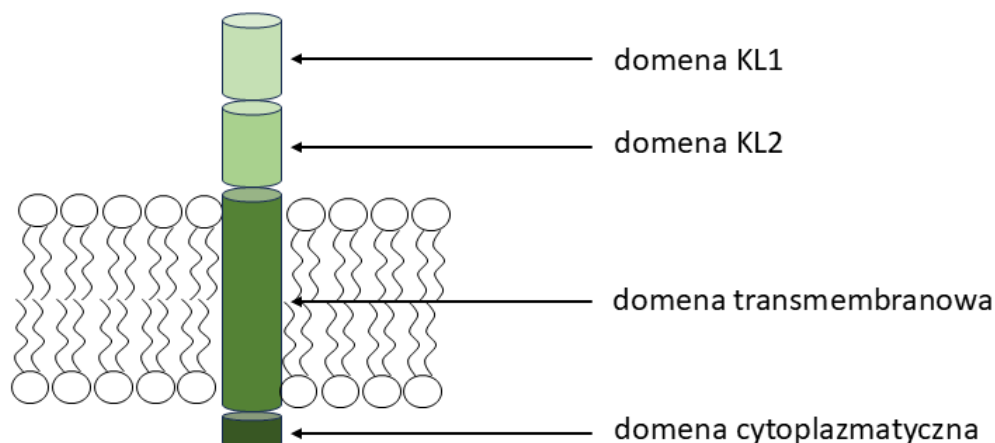
Ekspozycja komórek na hiperglikemii prowadzi do insulinooporności, w wyniku której dochodzi do częściowego zahamowania kontroli glikemicznej zależnej od insuliny. Zjawisko to obserwuje się między innymi w komórkach wyizolowanych podocytów¹⁷⁰.

Inkubacja podocytów w pożywce hodowlanej zawierającej 30 mM stężenie glukozy powoduje zapoczątkowanie zmian patologicznych charakterystycznych dla hiperglikemii, takich jak zaburzenia ich funkcji, czy śmierć komórkowa¹⁷¹.

Wykorzystując mysią linię komórkową podocytów zbadano wpływ ekspozycji komórek na wysokie stężenie glukozy. W badaniach komórki podocytów inkubowano w pożywce RPMI 1640 zawierającą 10% FBS oraz D-glukozę o stężeniu 30 mM. Inkubację prowadzono przez 2 godziny, 1 dzień, 3 dni oraz 5 dni. Wyniki interpretowano w stosunku do podocytów hodowanych przy stężeniu glukozy 5,6 mM i oceniano produkcję reaktywnych form tlenu. W efekcie tego eksperymentu ilość reaktywnych form tlenu (NADP(H) oraz H₂O₂) wzrósł istotnie w każdym punkcie pomiarowym, aby piątego dnia osiągnąć przyrost rzędu 90%. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w pierwszym okresie wzrosła, co wskazuje na ich działanie ochronne. Niestety efekt ten zanikł po 3-5 dniach, przy jednoczesnej zwiększonej ekspresji tych enzymów w komórkach. Świadczy to o patologicznym zablokowaniu komórkowych procesów ochronnych, podczas dłuższej ekspozycji na zwiększoną ilość glukozy, tym samym odzwierciedla proces nefropatii cukrzycowej w organizmie żywym¹⁷².

5.4 Znaczenie białka Klotho w komórkach nerek

Białko Klotho może występować w trzech formach: α -Klotho, które występuje głównie w komórkach mózgu, nerek oraz wątroby, β -klotho którego ekspresja zachodzi głównie w wątrobie, śledzionie oraz w nerkach. Ostatnim przedstawicielem jest γ -Klotho, występujące w komórkach fibroblastów oraz nerek. Główną formą tego białka jest α -Klotho a jego nazwa w literaturze często upraszczana jest do nazwy Klotho. Klotho jest multidomenowym białkiem transmembranowym, którego budowę zaprezentowano na rycinie 17¹⁷³.



Rycina 17. Schematyczna budowa białka Klotho. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁷⁴.

Na powierzchni błony komórkowej Klotho wiąże się z czynnikiem wzrostu fibroblastów – 23 (ang. Fibroblast Growth Factor, FGF-23), przyczyniając się do regulacji (wchłaniania) fosforanów w kanalikach proksymalnych nerek. Dodatkowo białko to aktywuje receptor waniloidowy przejściowego potencjału 5 (ang. Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5, TRPV-5), poprzez usunięcie reszty kwasu sialowego z miejsc *N*-glikozytacji. Proces ten zachodzi dzięki funkcji enzymatycznej, jaką wykazuje białko Klotho, które należy do grupy glikozylaz. Stabilizacja TRPV-5 wpływa na wchłanianie zwrotne jonów wapnia z moczu do krwi, które zachodzi w kanalikach proksymalnych nerek. Około 95-98% wchłanianych jonów wapnia przebiega za pośrednictwem TRPV-5¹⁷⁵.

Poprzez aktywność proteolityczną enzymów ADAM 10 oraz ADAM 17, białko Klotho może ulegać rozszczepieniu w dwóch miejscach. Pierwsze z nich zlokalizowane jest pomiędzy domeną transmembranową a domeną KL2. Produktem hydrolizy jest rozpuszczalna forma Klotho o masie 130 kDa, składająca się z domen KL1 oraz KL2. Drugie miejsce hydrolizy zlokalizowane jest pomiędzy domenami KL1 oraz KL2. Produktem hydrolizy tego wiązania jest domena KL1 o

masie 68 kDa. Uwalnianie rozpuszczalnych form białka do krwioobiegu oraz moczu jest ściśle powiązane z patologią chorób nerek. Grupa badawcza A. Piwkowskiej wykazała wzrost stężenia rozpuszczalnych form białka w surowicy, przy jednoczesnym spadku stężenia białka transmembranowego w komórkach podocytów u szczurów z indukowaną cukrzycą. Wykazano także znaczący wpływ rozpuszczalnych form białka na metabolizm glukozy w komórkach podocytów. Ponadto przeprowadzone badania wobec komórek podocytów odzwierciedlających warunki hiperglikemii wykazały zwiększoną aktywność enzymu ADAM 10, odpowiedzialnego za procesowanie rozpuszczalnych form białka Klotho na powierzchni komórki¹⁷⁶.

U myszy z ostrym uszkodzeniem nerek stwierdzono ochronne działanie rozpuszczalnych form białka Klotho, które hamowały rozwój zwłóknienia tkanek nerek. Działanie to może wynikać z regulacji działania transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$. Rozpuszczalna forma białka Klotho poprzez oddziaływanie z receptorem tej cytokiny blokuje dalsze szlaki sygnalizacyjne, które są odpowiedzialne za wzrost komórek, ich proliferację oraz hamowanie apoptozy. Rozpuszczalna forma białka Klotho może także wiązać się z tratwami lipidowymi, znajdującymi się w błonie komórkowej. Poprzez tę aktywność rozpuszczalna forma białka Klotho blokuje ścieżki sygnałowe zależne od kinazy 3 - fosfatydyloinozytolu, która jest odpowiedzialna za proliferację, różnicowanie oraz dalszą sygnalizację w szlakach komórkowych np. w kontroli ekspresji genów regulujących przebieg apoptozy¹⁷⁷.

Szereg przeprowadzonych badań wykonanych z użyciem komórek nabłonkowych kanalików proksymalnych nerek, komórek śródbłonka naczyń kłębuszków nerkowych oraz komórek mezangialnych kłębuszków nerkowych, wobec których indukowano stany fizjologiczne odpowiadające nefropatii cukrzycowej, wykazały protekcyjne działanie białka Klotho. W badaniach tych

zaobserwowano zmniejszenie stopnia zwłóknienia, spadek reaktywnych form tlenu, złagodzenie stanu zapalnego oraz zahamowanie procesu apoptozy. Wykazano także, że stężenie białka Klotho w komórkach spada wraz z rozwojem cukrzycy (zarówno typu 1 jak i 2), z kolei stężenie form rozpuszczalnych wzrasta. W badaniach klinicznych obserwowano niski poziom rozpuszczalnej formy białka Klotho u osób z niewydolnością nerek. Ponadto wykazano zmniejszenie ekspresji białka Klotho u pacjentów we wczesnych stadiach DN, a wraz z rozwojem choroby odnotowano dalszy spadek¹⁷⁸.

Wpływ rozpuszczalnych form białka Klotho w patogenezie nefropatii cukrzycowej wydaje się istotnym aspektem w określeniu mechanizmów odpowiedzialnych za ochronę komórek nerek przed stanem zapalnym, zwłóknieniem i apoptozą.

METODY

1. Chemia kombinatoryczna

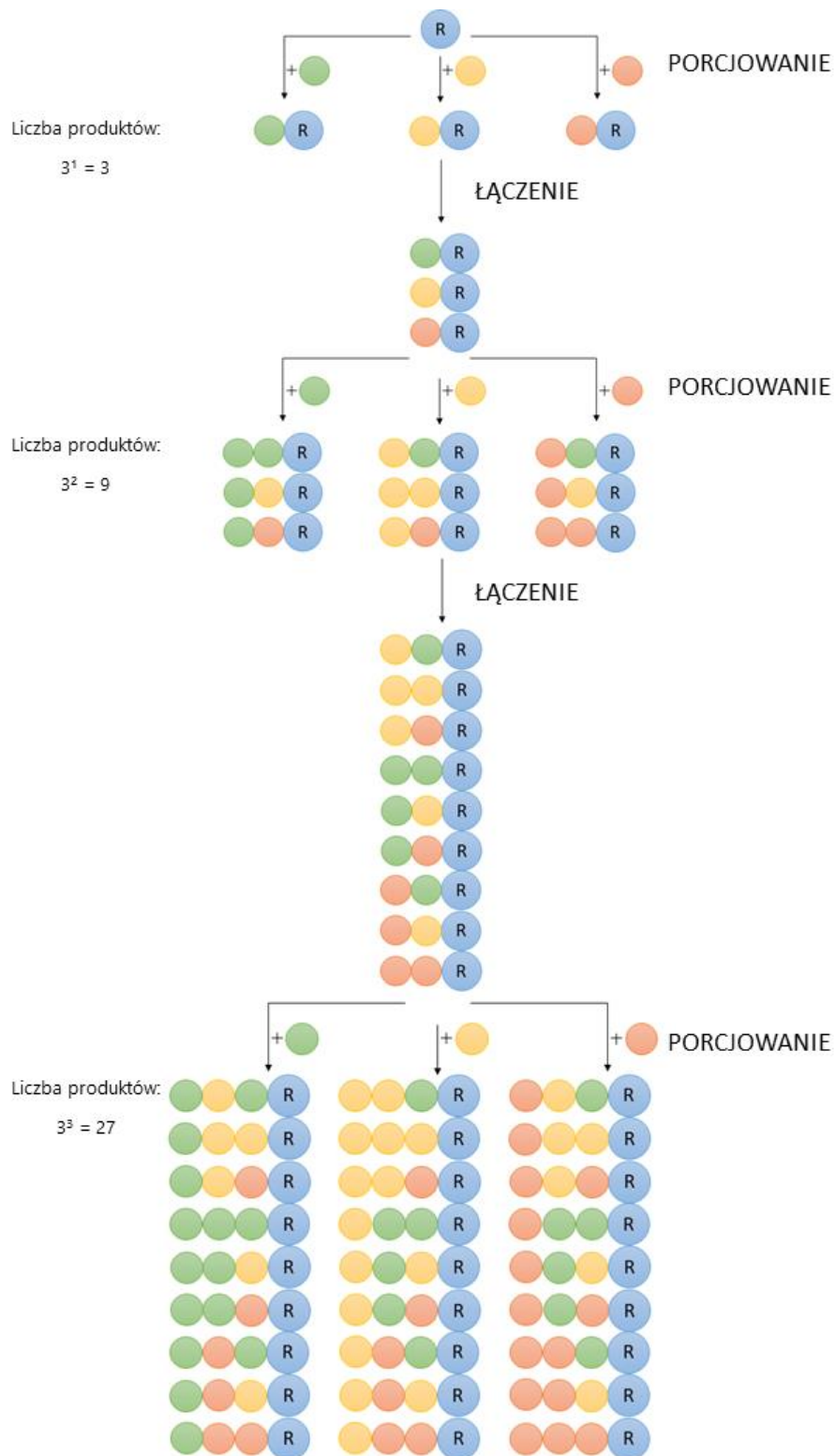
Pierwsze metody chemii kombinatorycznej, zostały opracowane w połowie lat osiemdziesiątych dwudziestego wieku, ograniczając się do syntezy bibliotek z wykorzystaniem układów biologicznych: fagów, plazmidów, drożdży czy bakterii. Strategia syntezy została szeroko rozwinięta i obecnie znajduje zastosowanie w odkrywaniu oraz optymalizacji leków jak i w diagnostyce chorób. Metoda ta generuje dużą liczbę związków w niewielu krokach syntezy, umożliwiając wykonanie szybkich badań przesiewowych. Algorytm rozwiązywania otrzymanych na drodze syntezy bibliotek peptydowych pozwala spośród miliona związków wyselekcjonować strukturę jednego selektywnego wobec wybranego czynnika¹⁷⁹. Technika syntezy porcjowania i łączenia (ang. mix and split) została zaproponowana w 1988 roku do generowania dużych bibliotek peptydów. Metodę stosuje się z wykorzystaniem syntezy na nośniku stałym. W technice tej nośnik dzielony jest na „n” części i poddawany reakcji z „x” reagentami. W następnym kroku całość nośnika łączy się w jednym naczyniu i ponownie dzieli na poszczególne naczynia reakcyjne. Ilość powtarzalnych kroków zależy od ilości dołączanych reagentów. Zaletami tej metody jest niewielka ilość naczyń reakcyjnych niezbędna do syntezy wielu związków oraz możliwość syntezy dużych bibliotek. Liczba produktów otrzymanych z wykorzystaniem tej syntezy rośnie wykładniczo, zgodnie ze wzorem¹⁸⁰:

$$K = x^n$$

gdzie: K – liczba produktów

x – liczba stosowanych modyfikacji

n – liczba pozycji z wprowadzanymi modyfikacjami



Rycina 18. Schemat tworzenia biblioteki peptydowej metodą chemii kombinatorycznej „porcjowania i łączenia”. Niebieska kulka odpowiada ziarnu żywicy, pozostałe resztom aminokwasowym. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁸¹.

Na powyższej rycinie 18 zobrazowano syntezę biblioteki peptydowej, składającej się z trzech reszt aminokwasowych. Zastosowanie metody „porcjowania i łączenia” pozwala otrzymać wszystkie możliwe kombinacje w trzech krokach syntezy.

Proces dekonwolucji polega na wyselekcjonowaniu spośród mieszaniny otrzymanych sekwencji aktywnego biologicznie związku¹⁸². Do metod pozwalających określić strukturę biologicznie aktywnego związku zalicza się metodę iteracyjną oraz skanowanie pozycyjne. Metoda iteracyjna polega na analizie każdej z pozycji substratu, wobec badanego enzymu proteolitycznego. Identyfikację prowadzi się stosując resynteze wszystkich pozycji biblioteki. Skanowanie pozycyjne polega na syntezie mniejszych podbibliotek zawierających stałą sekwencję w określonych pozycjach reszt aminokwasowych. W metodzie tej nie wykonuje się resyntezy. Na podstawie analizy wyników wybiera się sekwencję substratu, wobec którego enzym wykazuje największą aktywność w każdej podbibliotece¹⁸³.

2. Synteza peptydów

Zastosowanie odpowiedniej taktyki w trakcie syntezy peptydów to niezbędny element do otrzymywania bibliotek peptydowych. Ze względu na wysoką wydajność oraz łatwość w dzieleniu i łączeniu na poszczególnych etapach syntezy, wykorzystuje się syntezę na nośniku stałym (ang. Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)) z zastosowaniem strategii Fmoc/tBu.

2.1 Nośnik stały

W zależności od oczekiwanego produktu, do syntezy peptydów wykorzystuje się różne nośniki stałe. Nośnik taki składa się z rdzenia (najczęściej polistyrenowego bądź polietylenoglikolowego), który może być dodatkowo funkcjonalizowany linkerami. Najistotniejszymi parametrami żywic są: średnica

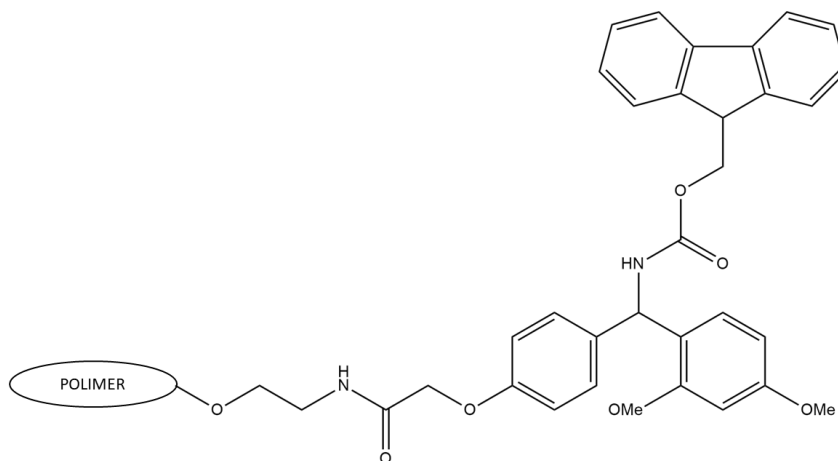
ziaren, stopień sieciowania oraz stopień osadzenia. Wybierając żywicę do syntezy zwraca się szczególną uwagę na:

- kompatybilność żywicy z warunkami prowadzenia reakcji
- rozmiar ziaren oraz stopień sieciowania, które decydują o łatwości dyfuzji rozpuszczalnika oraz reagentów
- stopień osadzenia żywicy, który powinien być odpowiednio dobrany do długości sekwencji syntezowanych peptydów

W ramach wykonywanych badań stosowane były dwa rodzaje nośników stałych:

- ŻYWICA TENTA GEL SRAM

Żywica ta charakteryzuje się wysokim stopniem pęcznienia w rozpuszczalnikach niepolarnych oraz niskim stopniem w rozpuszczalnikach polarnych. Funkcjonalizowana jest linkerem, zawierającym aktywną grupę aminową i należy do grupy żywic amidowych (Rycina 19)¹⁸⁴.

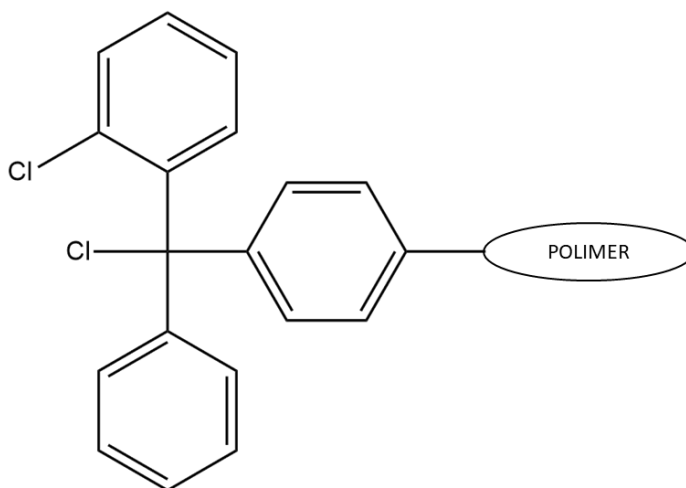


Rycina 19. Wzór półstrukturalny linkera przyłączonego do żywicy TENTA GEL SRAM. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁸⁵.

- ŻYWICA 2-CHLORO-CHLOROTRITYLOWA

Funkcjonalizowana jest linkerem zawierającym dwa atomy chloru, w czym jeden zlokalizowany jest poza ugrupowaniem aromatycznym, który pełni rolę grupy odchodzącej w reakcji sprzęgania. Żywica ta jest szczególnie wrażliwa na

warunki kwasowe, alkohole oraz fenole. Stosowanie łagodnych warunków w trakcie odszczepiania peptydu z nośnika, pozwala na zachowanie grup ochronnych w łańcuchach bocznych reszt aminokwasowych. W przeciwieństwie do żywicy Tenta Gel SRAM, produkt posiada wolną grupę α -karboksylową na C-końcu peptydu (Rycina 20)¹⁸⁶.



Rycina 20. Wzór półstrukturalny linkera przyłączonego do żywicy 2-chloro-chlorotrytylowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁸⁷.

2.2 Pochodne aminokwasów i ich grupy ochronne

Wszystkie aminokwasy w stosowanej syntezie (z wyjątkiem glicyny) posiadały konfigurację względną L. Grupa alfa-aminowa posiadała osłonę 9-fluorenylometoksykarbonyl – Fmoc, która wykluczała niepożądane reakcje uboczne. Zastosowana grupa protekcyjna jest stabilna w warunkach acylowania. Aminokwasy zawierające grupy funkcyjne w łańcuchu bocznym posiadały dodatkowe grupy ochronne¹⁸⁸. Aminokwasy stosowane do syntezy, to:

- Fmoc-Ala-OH
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH
- Fmoc-Asn(Trt)-OH
- Fmoc-Phe-OH
- Fmoc-Gly-OH
- Fmoc-Gln(Trt)-OH

- Fmoc-His(Trt)-OH
- Fmoc-Ile-OH
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH
- Fmoc-Leu-OH
- Fmoc-Lys(BOC)-OH
- Fmoc-Met-OH
- Fmoc-Pro-OH
- Fmoc-Ser(tBu)-OH
- Fmoc-Thr(tBu)-OH
- Fmoc-Trp(BOC)-OH
- Fmoc-Tyr(tBu)-OH
- Fmoc-Val-OH

2.3 Automatyzacja procesu syntezy peptydów

Syntezę peptydów można prowadzić zarówno manualnie jak i przy użyciu metod automatycznych. Synteza mikrofalowa pozwala na znaczne skrócenie czasu syntezy peptydu. Zastosowanie w trakcie syntezy specjalnego, obojętnego chemicznie reaktora sprawia, że promieniowanie mikrofalowe jednorodnie ogrzewa próbkę. Aby zapewnić mieszanie reagentów w naczyniu reakcyjnym stosuje się gazowy azot lub mieszanie magnetyczne, z czego druga forma nie jest zalecana ze względu na ryzyko uszkodzenia żywicy. W trakcie syntezy stosuje się standardowe odczynniki sprzęgające oraz DMF jako rozpuszczalnik ze względu na swoje właściwości przekazywania energii cieplnej. Wzrost temperatury mieszaniny reakcyjnej do 60°C prowadzi do około 50-krotnego wzrostu szybkości reakcji. Zastosowanie automatycznej syntezy mikrofalowej prowadzi do otrzymania w krótkim czasie peptydów o wysokiej czystości¹⁸⁹.

2.4 Stosowane aktywatory

Do prawidłowego przebiegu reakcji tworzenia wiązania peptydowego, niezbędna jest aktywacja grupy karboksylowej. Często wykorzystywanymi czynnikami aktywującymi są TBTU, HBTU oraz HATU, które przekształcają grupę karboksylową w aktywny ester uroniowy. W reakcji wykorzystuje się również trzeciorzędową aminę np. DIPEA, która ma za zadanie wytworzenie karboksylanu. W przypadku stosowania tej strategii niezwykle istotne jest, aby najpierw wytworzyć karboksylan i dopiero w następnym kroku dodać do mieszaniny reakcyjnej aktywatory. Zapobiega to zajściu reakcji ubocznych z wolną grupą aminową. Można także zastosować łagodniejsze warunki reakcji, wykorzystując związki karboimidowe¹⁹⁰. Aktywne pochodne można uzyskać również przekształcając grupę karboksylową w azydek bądź chlorek, jednak wiąże się to z dużym prawdopodobieństwem racemizacji.

3. Metody analizy aktywności proteolitycznej enzymów

Aktywność proteolityczną enzymów można analizować z wykorzystaniem substratów peptydowych^{191,192}:

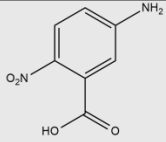
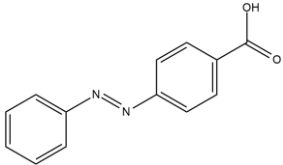
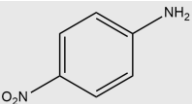
- substraty chromogeniczne;
- substraty fluorogeniczne;
- substraty wykorzystujące wewnątrzcząsteczkowy transfer energii wzbudzenia elektronowego.

3.1 Substraty chromogeniczne

Związki te w sekwencji oprócz fragmentu peptydowego posiadają chromofor wykazujący absorpcję w zakresie długości fal UV-VIS. W wyniku reakcji hydrolizy obserwujemy przesunięcie maksimum absorpcji produktu względem substratu. Metoda ta polega na pomiarze stężenia uwalnianego chromofora w czasie rzeczywistym, co pozwala na monitorowanie przebiegu reakcji hydrolizy. W celu zweryfikowania obecnych produktów hydrolizy stosowane są metody

chromatograficzne bądź spektrometria mas. Przykładowe chromofory wykorzystywane do syntezy substratów zestawiono w tabeli 3^{193,194}.

Tabela 3. Przykłady związków, wykorzystywanych do syntezy substratów chromogenicznych.

Nazwa związku	Długość fali absorpcyjnej	Wzór półstrukturalny
ANB kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy	410 nm	
PAZ kwas 4-(fenyloazo)benzoesowy	320 nm	
p-NA p-nitroanilina	400 nm	

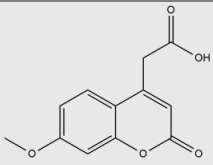
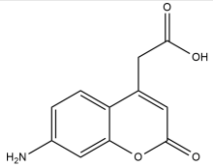
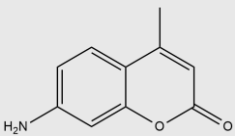
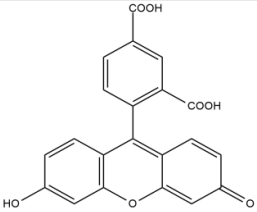
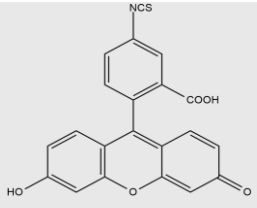
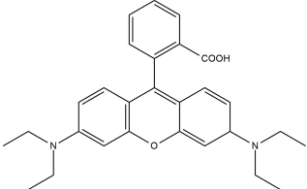
3.2 Substraty fluorogeniczne

Substraty fluorescencyjne w sekwencji posiadają fluorofor, który zostaje uwolniony z sekwencji w wyniku reakcji enzymatycznej. Fluorofor wykazuje zjawisko fluorescencji, którym jest emitowanie światła przez wzbudzoną cząsteczkę w wyższym stanie elektronowym, podczas przechodzenia do stanu podstawowego. Emitowane fotony wykazują niższą energię od tych, którymi wzbudzono cząsteczkę, zatem obserwowana fluorescencja występuje przy większych długościach fali względem pasm wzbudzenia. Różnica ta określana jest mianem przesunięcia Stokesa, a wielkość przesunięcia zależy od zastosowanego fluorofora oraz jego otoczenia¹⁹⁵.

Z zastosowaniem tej metody obecność enzymu można określić zarówno jakościowo jak i ilościowo. Przyrost intensywności fluorescencji można mierzyć w

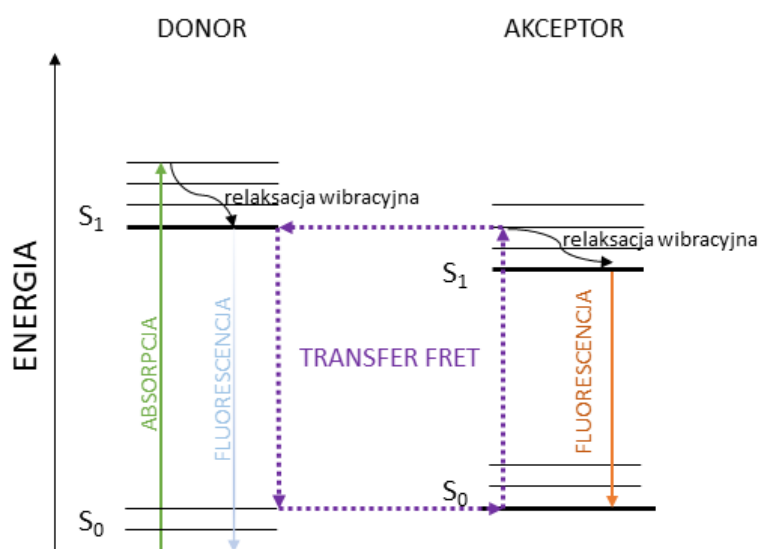
czasie rzeczywistym, co odpowiada aktywności proteolitycznej enzymu. Substraty fluorescencyjne są najczęściej stosowane w przypadku określania aktywności egzoptydaz. Produkty hydrolizy są możliwe do scharakteryzowania poprzez metody chromatograficzne bądź spektrometrię mas. Przykładowe fluorofory zostały przedstawione w tabeli 4^{196,197}.

Tabela 4. Przykłady związków, wykorzystywanych do syntezy substratów fluorescencyjnych.

Nazwa związku	Długość fali wzbudzenia	Długość fali emisji	Wzór półstrukturalny
<i>MCA</i> kwas (7-metoksy-4-kumarylo)octowy	322 nm	381 nm	
<i>ACC</i> 7-amino-4-karbamoylometylokumaryna	325 nm	400 nm	
<i>AMC</i> 7-amino-4 metylokumaryna	341 nm	441 nm	
<i>5-FAM</i> 5-karboksy fluoresceina	492 nm	517 nm	
<i>FITC</i> izotiocyjanian fluoresceiny	498 nm	517 nm	
<i>RODAMINA B</i>	553 nm	627 nm	

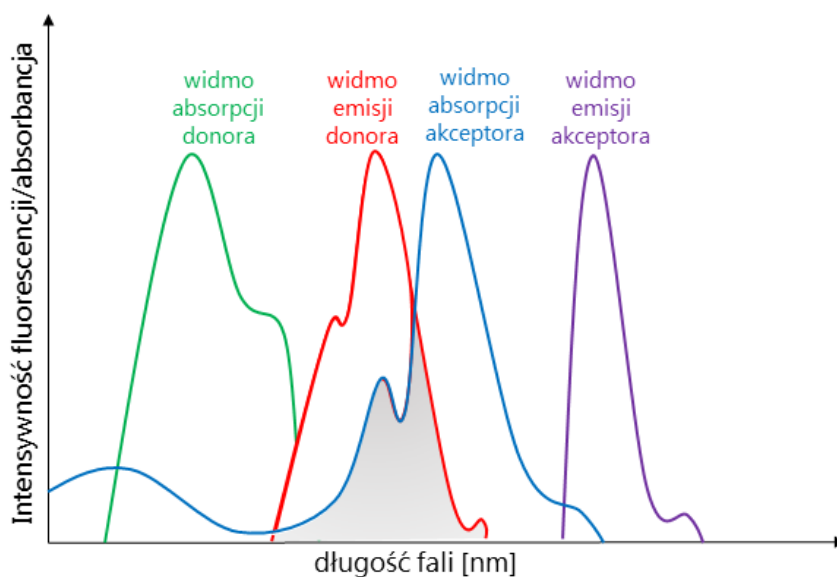
3.3 Substraty fluorogeniczne wykorzystujące wewnątrzcząsteczkowy transfer energii wzbudzenia elektronowego

Wewnątrzcząsteczkowy transfer przeniesienia elektronu (ang. Förster Resonance Energy Transfer (FRET)) występuje między dwoma cząsteczkami znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie. Procesy absorpcji i emisji energii obserwowane pomiędzy donorem a akceptorem fluorescencji opisywane są przez diagram Jabłońskiego, przedstawiony na rycinie 21.



Rycina 21. Diagram Jabłońskiego ilustrujący przejścia energetyczne obserwowane pomiędzy donorem a akceptorem, wykazującymi zjawisko FRET. S_0 – podstawowy stan energetyczny, S_1 – wzbudzony stan energetyczny. Rysunek wykonany na podstawie literatury¹⁹⁸.

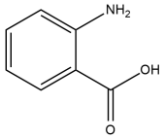
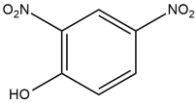
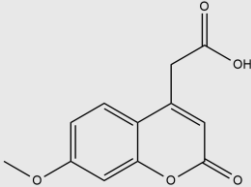
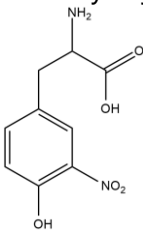
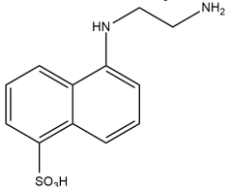
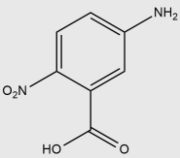
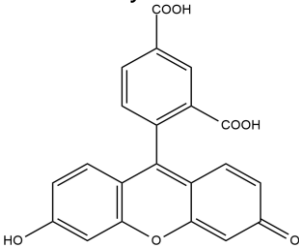
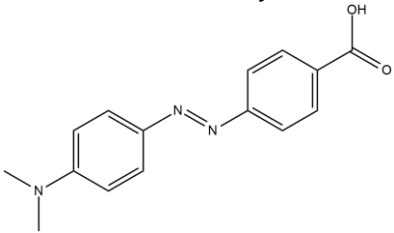
Wybrane pary muszą spełniać warunek nakładania się widma emisyjnego donora z widmem absorpcyjnym akceptora fluorescencji. Obszar ten został zaznaczony na rycinie 22 szarym kolorem¹⁹⁹.



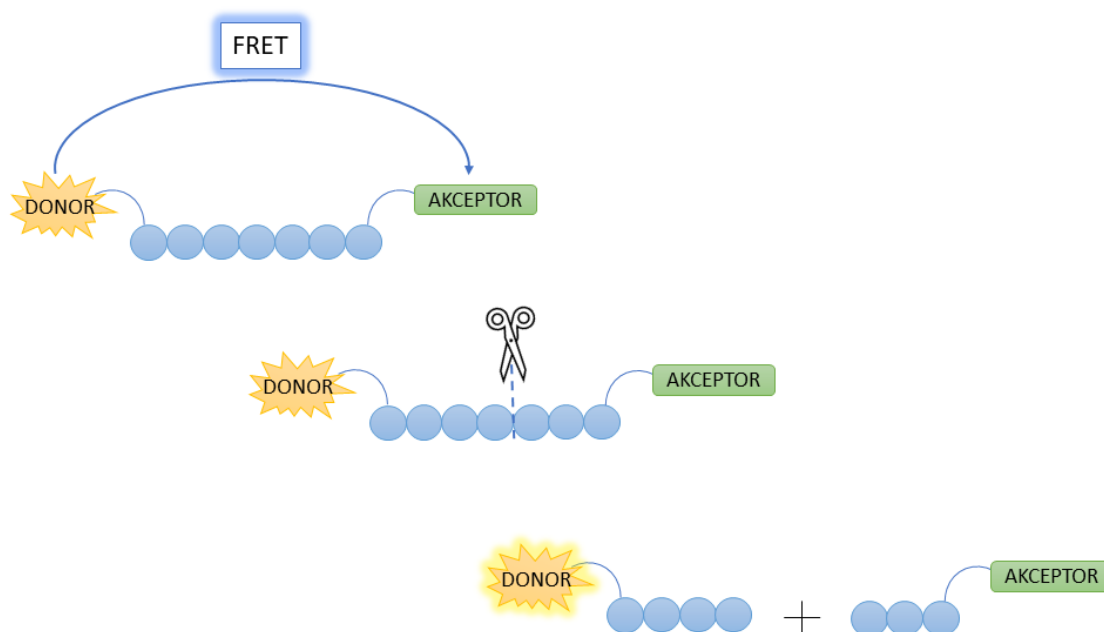
Rycina 22. Zależność widm wzbudzenia oraz emisji dla donora i akceptora, tworzących parę FRET. Rysunek wykonany na podstawie literatury²⁰⁰.

Im większy zakres nakładania się omawianych widm, tym lepsza wydajność FRET. W badaniach biologicznych istotną cechą jest odległość w łańcuchu peptydowym pomiędzy donorem a akceptorem, w obrębie której obserwuje się omawiane zjawisko i wynosi od 20 do 100 Å. Przykładowe pary donor-akceptor przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Przykłady par donor-akceptor stosowanych do syntezy substratów FRET.

DONOR	AKCEPTOR
<i>Nazwa związku</i>	<i>Nazwa związku</i>
<i>Wzór półstrukturalny</i>	<i>Wzór półstrukturalny</i>
<p>ABZ ($\lambda_{wz} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$) kwas 2-aminobenzoesowy</p> 	<p>DNP ($\lambda_{ab} = 380$) 2,4-dinitrofenol</p> 
<p>MCA ($\lambda_{wz} = 322 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 381 \text{ nm}$) kwas (7-metoksy-4-kumarylo)octowy</p> 	<p>Tyr(3-NO₂) ($\lambda_{ab} = 420 \text{ nm}$) 3-nitro-L-tyrozyna</p> 
<p>EDANS ($\lambda_{wz} = 342 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$) kwas 5-[(2-aminoetylo)amino]naftalen-1-sulfonowy</p> 	<p>ANB ($\lambda_{ab} = 410 \text{ nm}$) kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy</p> 
<p>5-FAM ($\lambda_{wz} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$) 5-karboksy fluoresceina</p> 	<p>DABCYL ($\lambda_{ab} = 463 \text{ nm}$) kwas 4-(4'-dimetyloaminofenyloazo)-benzoesowy</p> 

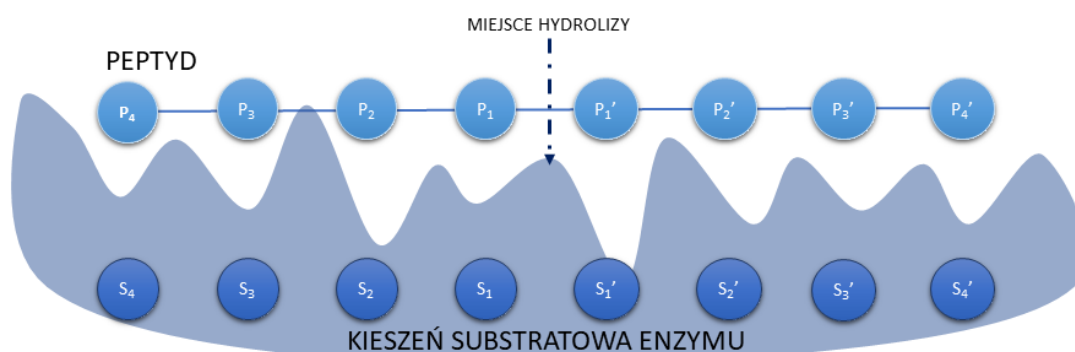
Omawiana metoda znajduje szerokie zastosowanie w analizie interakcji związków biologicznie czynnych, badaniu regulacji procesów komórkowych oraz aktywności enzymatycznej. Ogromną zaletą jest możliwość zastosowania tej techniki w czasie rzeczywistym, na żywych komórkach. Ponadto obecnie znanych jest wiele różnych par donor-akceptor, co daje wiele możliwości dostosowania parametrów do konkretnego typu badań²⁰¹. Substraty FRET, to krótkie związki zawierające szkielet peptydowy oraz donor i akceptor fluorescencji w końcowych fragmentach związku. Bliska obecność donora i akceptora pozwala na zachowanie transferu energii i nie obserwuje się zmian w intensywności fluorescencji. Obecny w roztworze enzym proteolityczny, który hydrolizuje wiązanie peptydowe w substracie, powoduje oddalenie się w przestrzeni donora i akceptora fluorescencji, przez co transfer FRET jest niemożliwy (Rycina 23). W omawianej sytuacji obserwuje się przyrost intensywności fluorescencji pochodzącej od donora, w czasie trwania reakcji enzymatycznej. Analizowany wzrost fluorescencji jest wprost proporcjonalny do aktywności enzymu²⁰².



Rycina 23. Schemat hydrolizy enzymatycznej substratu peptydowego wykazującego zjawisko FRET. Rysunek wykonany na podstawie literatury²⁰³.

3.4 Notacja Schechtera i Bergera

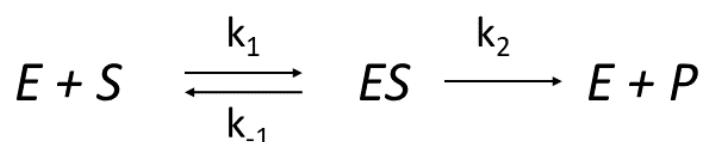
Zgodnie z nomenklaturą wprowadzoną przez Schechtera i Bergera, łańcuchy boczne reszt aminokwasowych oddziałują z kieszeniami centrum aktywnego enzymu. Reszty aminokwasowe w pozycjach nieprimowanych znajdują się po *N*-końcowej stronie hydrolizowanego wiązania peptydowego, z kolei pozycje primowane w *C*-końcowej części. Główne założenie tej nomenklatury definiuje pozycję hydrolizowanego wiązania peptydowego, znajdującego się zawsze pomiędzy resztami aminokwasowymi w pozycjach P₁ a P₁' substratu (Rycina 24)²⁰⁴.



Rycina 24. Schematyczne przedstawienie miejsca aktywnego enzymu według nomenklatury Schechtera i Bergera. Rysunek wykonany na podstawie literatury²⁰⁵.

4. Wyznaczanie parametrów kinetycznych substratów

Wzór ogólny przedstawiający przekształcenie substratu (S) w produkt (P) w reakcji katalizowanej przez enzym (E) określa równanie:



Zgodnie z przedstawionym równaniem powstający na drodze reakcji kompleks ES może rozpadać się na dwa sposoby – poprzez dysocjację na E i S ze

stałą szybkości k_{-1} bądź ulega przekształceniu z utworzeniem produktu, ze stałą szybkości k_2 ²⁰⁶.

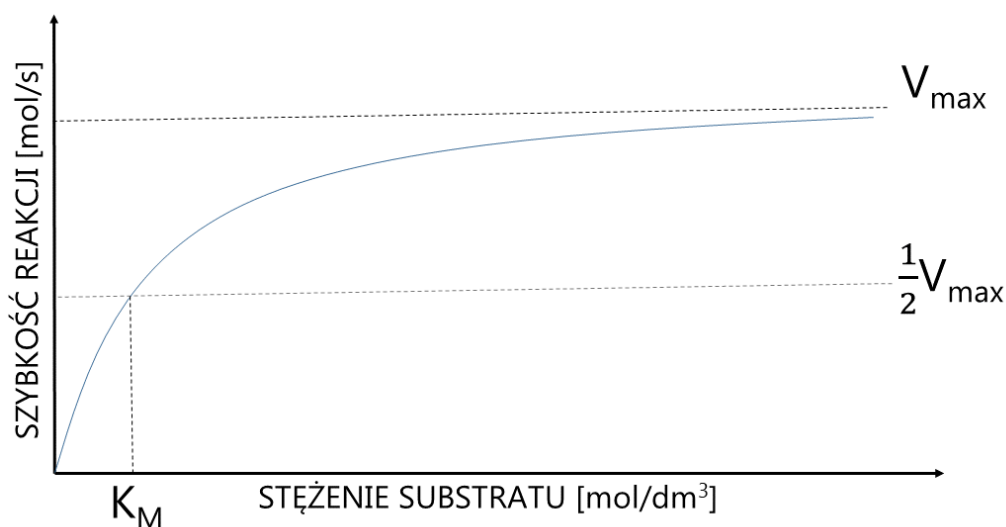
Szybkość początkowa reakcji zależy zarówno od szybkości rozpadu kompleksu, jak i od szybkości jego tworzenia, dlatego stała równowagi tworzącego się kompleksu nazywana stałą Michaelisa [K_M], określa się wzorem:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E] \times [S]}{[ES]}$$

Szybkość reakcji enzymatycznej silnie zależy od stężenia substratu. Przy wyższych stężeniach substratu, szybkość reakcji zbliża się do maksimum [V_{max}], wynikającego z całkowitego wysycenia miejsc reaktywnych enzymu. Dalsze zwiększanie stężenia substratu nie wpływa na szybkość reakcji enzymatycznej. Zależność ta została opisana równaniem Michaelisa-Menten:

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Rozwiązaniem omawianego równania jest krzywa Michaelisa-Menten (Rycina 25)²⁰⁷.



Rycina 25. Wykres zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu. Rysunek wykonany na podstawie literatury²⁰⁸.

Na podstawie omówionych danych można wyznaczyć następujące parametry kinetyczne enzymu:

- V_{\max} – maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej, dla której dalsze zwiększanie stężenia substratu nie wpływa na jej wartość;
- K_M – stała Michaelisa – określa stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej wynosi połowę maksymalnej szybkości. Określa powinowactwo do substratu a im mniejsza wartość, tym powinowactwo jest większe;
- k_{cat} – stała katalityczna – określa liczbę cząsteczek substratu, które zostały zhydrolizowane przez cząsteczkę enzymu, w przeliczeniu na jedną sekundę;
- k_{cat}/K_M – miara wydajności katalitycznej enzymu. Informuje o efektywności enzymatycznej względem badanego substratu. Większa wartość stałej wskazuje na większą preferencję enzymu względem danego substratu.

Wyznaczenie parametrów kinetycznych pozwala na określenie efektywności hydrolizy proteolitycznej enzymów. Analizowane wyniki pomiarów, mogą różnić się między sobą w zależności od warunków pomiarowych, takich jak pH, temperatura, obecność inhibitora bądź aktywatora²⁰⁹.

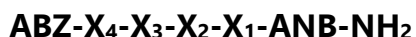
CEL PRACY

Enzymy proteolityczne to grupa specyficznych białek wykazujących zdolność do katalizowania rozpadu wiązania peptydowego. Zmiany w ich aktywności są przyczyną wielu chorób.

Głównym celem niniejszej pracy było otrzymanie metodami chemii kombinatorycznej selektywnego substratu fluorogenicznego względem enzymu ADAM 17. Enzym ADAM 17 odgrywa istotną rolę w biologii komórek. Proteaza ta bierze udział w wielu procesach biologicznych, a jej zwiększona aktywność przyczynia się do rozwoju stanów zapalnych, chorób nowotworowych, chorób układu krążenia, nefropatii cukrzycowej oraz innych chorób układu wydalniczego. Poznanie właściwości enzymu ADAM 17 oraz funkcji jakie pełni w organizmie są wciąż wyzwaniem nauki.

W ramach głównego celu rozprawy doktorskiej zaplanowałam realizację celów szczegółowych:

➤ Dekonwolucję tetrapeptydowej biblioteki substratów chromogenicznych wobec enzymu ADAM 17, o wzorze ogólnym:

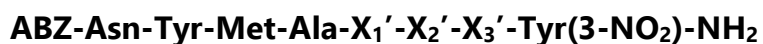


Gdzie: X_4, X_3, X_2, X_1 - aminokwasy białkowe z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy

ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego

➤ Dekonwolucję heptapeptydowej biblioteki substratów fluorescencyjnych wobec enzymu ADAM 17, o wzorze ogólnym:



Gdzie: X_3', X_2', X_1' - reszty aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy

Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amid 3-nitro-L-tyrozyny

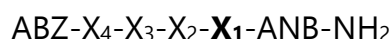
➤ Określenie wpływu modyfikacji C-końcowego ugrupowania na szybkość hydrolizy substratu.

- Wyznaczenie parametrów kinetycznych: stałej Michaelisa (K_M), szybkości maksymalnej (V_{MAX}), stałej katalitycznej (k_{cat}) oraz stałej specyficzności (k_{cat}/K_M) dla najefektywniej hydrolizowanych substratów.
- Określenie tendencji zmian w aktywności enzymu ADAM 17 w materiale biologicznym (lizaty komórkowe, medium zewnątrzkomórkowe).
- Próba wyznaczenia zależności między aktywnością enzymu w moczu a cukrzycą i jej powikłaniami.

BADANIA WŁASNE

1. **Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁**

Wykorzystując dziewiętnaście bibliotek peptydowych ze znaną pozycją X₁ (zsyntezowane w zespole badawczym dr hab. Magdaleny Wysockiej, prof. UG), określiłam specyficzność pierwszorzędową (w pozycji X₁) enzymu ADAM 17. Wzór ogólny bibliotek przedstawiłam poniżej:

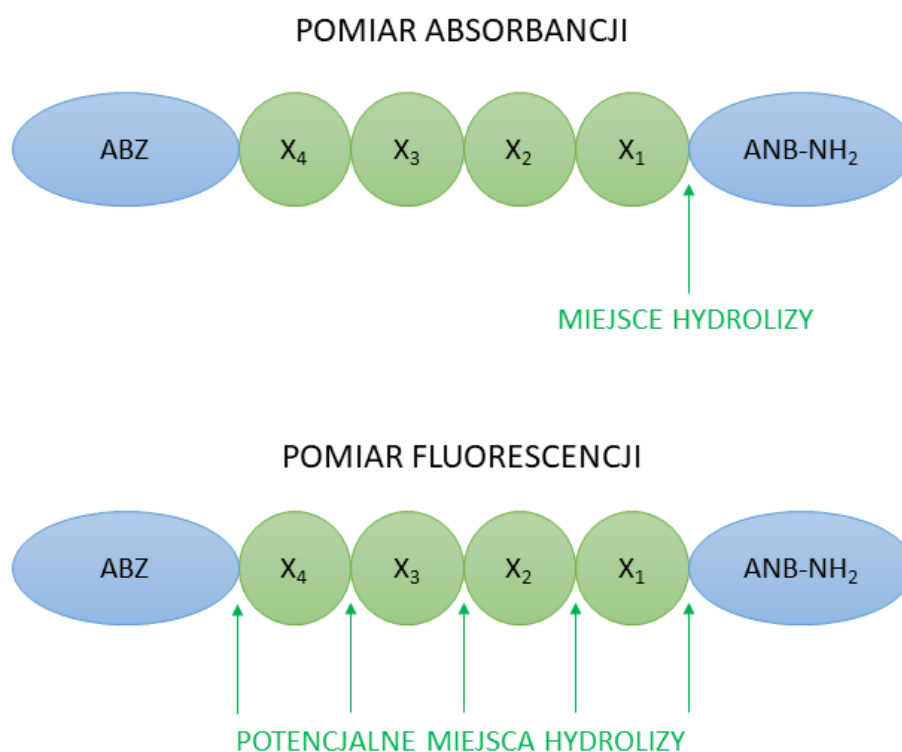


Gdzie: X₄, X₃, X₂, X₁ - aminokwasy białkowe z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy

ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego

W wyniku hydrolizy wiązania amidowego pomiędzy resztą aminokwasową w pozycji X₁ a amidem kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego obserwowałam wzrost absorbancji w czasie. Hydroliza pozostałych wiązań peptydowych w bibliotekach nie powodowała uwolnienia chromoforu (ANB-NH₂) i w tym przypadku nie obserwowałam zmiany. Podsumowując, wzrost absorbancji podczas inkubacji biblioteki z enzymem wynika wyłącznie z hydrolizy wiązania peptydowego zlokalizowanego pomiędzy resztą aminokwasową w pozycji X₁ a chromoforem (Rycina 26).



Rycina 26. Zestawienie potencjalnych miejsc hydrolizy w stosowanym substracie w trakcie pomiaru przyrostu absorbancji oraz fluorescencji.

Pomiary przyrostu absorbancji wykonałam przy użyciu czytnika mikropłytek Spectrostar Nano firmy BMG Labtech, Niemcy, w trybie ciągłego pomiaru absorbancji przy długości fali 410 nm. Otrzymane wyniki opracowałam w formie wykresów, wykorzystując program GraphPad Prism, obrazujących przyrost absorbancji w czasie trwania reakcji.

Naważkę 5 mg wybranej biblioteki rozpuściłam w 1 mL DMSO. Następnie roztwór rozcieńczyłam 10-krotnie buforem pomiarowym zawierającym: 25 mM TRIS-HCl, 2,5 μ M chlorku cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C.

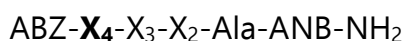
Do studni pomiarowych bezbarwnej płytki 96-dołkowej dodawałam po 20 μ L wybranego roztworu biblioteki. Następnie do każdej ze studni dodawałam mieszaninę enzymu oraz buforu pomiarowego. Stężenie enzymu ADAM 17 w dołku pomiarowym wynosiło $9,65 \times 10^{-9}$ M. W celu wykluczenia autohydrolizy podbibliotek przygotowałam układy odniesienia w których znajdowały się

wyłącznie wybrane roztwory podbibliotek oraz bufor pomiarowy. Każdy pomiar wykonywałam w trzech powtórzeniach.

2. Określenie specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₄

W kolejnym etapie dekonwolucji określiłam resztę aminokwasową w pozycji X₄. Wykorzystałam 19 podbibliotek z resztą aminokwasową Ala w pozycji X₁ (wynik otrzymany w ramach realizacji punktu 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*).

Wzór ogólny biblioteki:



Gdzie: X₄, X₃, X₂ - aminokwasy białkowe z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy

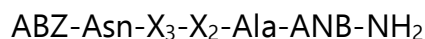
ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego

W eksperymencie poddałam analizie 19 podbibliotek, ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₄, które w pozycjach X₃ i X₂ zawierały wszystkie możliwe kombinacje.

Dekonwolucję 19 podbibliotek wykonałam analogicznie do procedury opisanej w punkcie 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*. Stężenie końcowe enzymu ADAM 17 wynosiło $9,65 \times 10^{-9}$ M.

3. Określenie specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₃

W oparciu o wyniki otrzymane w ramach realizacji punktów 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁* oraz 2. *Określenie specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₄*, zsyntezowałam bibliotekę o wzorze ogólnym:



Gdzie: X₃, X₂ - aminokwasy białkowe z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy

ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego

3.1 Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki

- Cykle przemywań żywicy

W trakcie prowadzenia syntezy biblioteki peptydowej, wykonywałam cykle przemywań zgodnie z następującymi krokami:

- z użyciem DMF połączone z wytrząsaniem (wytrząsarka laboratoryjna mechaniczna - typ 358A, firmy ELPIN+, Polska), czas trwania 2 minuty. Etap powtarzany trzykrotnie;
- z użyciem izopropanolu połączone z wytrząsaniem, czas trwania 2 minuty. Etap powtarzany trzykrotnie;
- z użyciem DCM połączone z wytrząsaniem, czas trwania 2 minuty. Etap powtarzany trzykrotnie.
- Wykonywanie barwnego testu chloranilowego

Test barwny wykonywałam w celu określenia obecności wolnej grupy aminowej. Niewielką porcję żywicy wprowadziłam do szklanej probówki testowej. Kolejno dodałam 100 µL roztworu chloranilu w toluenie oraz 100 µL acetaldehydu. Następnie mieszaninę pozostawiłam na osiem minut, po czym obserwowałam

wybarwienie ziaren peptydylożywicy. Analizując wynik testu obserwuje się zielone ziarna żywicy, co świadczy o obecności wolnej grupy aminowej. Wynik w postaci bezbarwnych ziaren peptydylożywicy, świadczy o braku wolnych grup aminowych.

- Deprotekcja grupy osłonowej Fmoc z wykorzystywanych do syntezy reszt aminokwasowych

Deprotekcję grupy osłonowej Fmoc przeprowadzałam zgodnie z następującym schematem:

- 20 % roztwór piperydyny w NMP 3 minuty wytrząsania
- Płukanie przy użyciu DMF 2 minuty wytrząsania
- 20 % roztwór piperydyny w NMP 8 minut wytrząsania
- Płukanie przy użyciu DMF 2 minuty wytrząsania
- 20 % roztwór piperydyny w NMP 8 minuty wytrząsania

Po każdej wykonanej deprotekcji przeprowadzałam cykl przemywań oraz barwny test chloranilowy.

- Reakcja acylowania z wykorzystaniem HBTU, TBTU oraz HATU jako aktywatorów

Peptydylożywicę zawierającą wolną grupę aminową poddawałam trzykrotnie reakcji acylowania. Stosunki molowe reagentów wynosiły odpowiednio: aminokwas:OXYMA:DIPEA:czynnik sprzęgający, 3:3:6:3 w stosunku do osadzenia peptydylożywicy. Stosowane czynniki sprzęgające to HBTU, TBTU lub HATU. Reagenty rozpuszczałam w mieszaninie DMF:DCM:NMP w stosunku objętościowym 1:1:1. Reakcję acylowania prowadziłam maksymalnie 24 godziny, stosując wytrząsanie przy użyciu mechanicznej wytrząsarki laboratoryjnej. Po zakończeniu każdej z reakcji wykonywałam cykl przemywań.

3.2 Synteza tetrapeptydowej biblioteki o sekwencji ABZ-Asn-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂

Syntezę biblioteki tetrapeptydowej wykonałam z zastosowaniem żywicy Tenta Gel SRAM o osadzeniu 0,25 mmol/g.

W pierwszym etapie 17,1 g żywicy umieściłam w naczyniu Merrifield'a. Następnie wykonałam deprotekcję grupy osłonowej Fmoc zgodnie z procedurą opisaną w poprzednim podrozdziale.

Żywicę z wolną grupą aminową poddałam cyklowi przemywań:

- 5% roztwór *N*-metylomorfoliny w DMF 5 minut wytrząsania
- Płukanie przy użyciu DMF 2 minuty wytrząsania
- 5% roztwór *N*-metylomorfoliny w DMF 5 minut wytrząsania
- Trzykrotne płukanie przy użyciu DMF 2 minuty wytrząsania

3.3 Przyłączanie do żywicy chromoforu ANB

Drugim etapem syntezy było dołączenie do peptydydożywicy chromoforu ANB. Do naczynia Merrifield'a wprowadziłam mieszaninę reagentów ANB:TBTU:DMAP:DIPEA, w stosunku molowym 3:3:2:6 względem osadzenia żywicy²¹⁰. Reagenty rozpuściłam w DMF. Reakcję prowadziłam 3 godz. z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej. Następnie odsączyłam mieszaninę poreakcyjną i przeprowadziłam cykl przemywań: 5 % roztworem *N*-metylomorfoliny w DMF; 3 × DMF. Ponownie przeprowadziłam reakcję acylowania, stosując HBTU jako aktywator (czas trwania reakcji 3 godz.). Po zakończonej reakcji ponownie wykonałam cykl przemywań, płukanie *N*-metylomorfoliną oraz przygotowałam reagenty do ponownego przeprowadzenia reakcji acylowania z zastosowaniem aktywatora HATU. Reakcję prowadziłam przez 3 godziny, na koniec wykonując cykl przemywań.

3.4 Wprowadzenie do sekwencji reszty aminokwasowej alaniny w pozycji P₁ biblioteki

W kolejnym kroku syntezy biblioteki tetrapeptydowej, dołączyłam do chromoforu resztę aminokwasową w pozycji P₁ = Fmoc-Ala-OH. Stosunek molowy zastosowanych reagentów Fmoc-Ala-OH:POCl₃ wynosił 9:9 względem osadzenia żywicy²¹⁰. Nośnik stały umieściłam w kolbie okrągłodennej. Resztę aminokwasową rozpuściłam w bezwodnej pirydynie stosując 10 mL pirydyny na 1 g peptydylożywicy. Rozpuszczoną Fmoc-Ala-OH dodałam do peptydylożywicy, umieściłam na mieszadle magnetycznym a następnie schłodziłam mieszaninę do temperatury -15 °C (łaźnia lodowa z dodatkiem soli: NH₄Cl oraz NaNO₃). Po uzyskaniu żądanej temperatury do mieszaniny dodałam POCl₃. Reakcję prowadziłam przez 20 minut utrzymując temperaturę -15 °C, a następnie 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolejno umieściłam kolbę reakcyjną w łaźni olejowej o temperaturze 40 °C. Po upływie 6 godzin odsączyłam mieszaninę reakcyjną, przepłukałam peptydylożywicę dwukrotnie metanolem i pozostawiłam do wysuszenia.

3.5 Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₂ biblioteki

W celu wprowadzenia pozycji X₂ do sekwencji, osuszoną peptydylożywicę podzieliłam na 19 części i umieściłam w strzykawkach o objętości 25 mL zakończonych spiekami szklanym, wykorzystywanych do syntezy peptydów. Dla wszystkich porcji nośnika stałego wykonałam deprotekcję grupy osłonowej Fmoc, następnie cykl przemywań, po czym potwierdziłam obecność wolnej grupy aminowej testem chloranilowym. Do każdej z 19 porcji peptydylożywicy przyłączyłam konkretną resztę aminokwasową, zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki*, przeprowadzając cykl przemywań po każdym acylowaniu. Następnie z każdej porcji peptydylożywicy odłożyłam 0,5 g do dalszej dekonwolucji. W kolejnym

etapie pozostałe porcje połączyłam w kolbie okrągłodennej oraz wymieszałam w roztworze DCM i DMF.

Otrzymaną peptydylożywicę wysuszyłam i ponownie podzieliłam na 19 porcji i umieściłam w strzykawkach o objętości 12 mL.

3.6 Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₃ biblioteki

Przyłączanie 19 reszt aminokwasowych w pozycję X₃ biblioteki wykonałam w taki sposób, jak opisano w punkcie 3.5 *Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₂ biblioteki*.

3.7 Wprowadzenie do sekwencji reszty aminokwasowej Fmoc-Asn(Trt)-OH w pozycji X₄ biblioteki

Zgodnie z wynikami badań wstępnych w pozycję X₄ wszystkich 19 syntezowanych podbibliotek wprowadziłam resztę aminokwasową Fmoc-Asn(Trt)-OH.

3.8 Wprowadzenie kwasu 2-aminobenzoesowego (ABZ) do sekwencji biblioteki

W ostatnim etapie syntezy, po odszczepieniu grupy osłonowej Fmoc, do wszystkich porcji peptydylożywicy przyłączyłam pochodną Boc-ABZ-OH wykorzystując następujące mieszaniny reakcyjne:

- Boc-ABZ-OH:HBTU:DIPEA:OXYMA, stosunki molowe 3:3:6:3 w stosunku do osadzenia żywicy;
- Boc-ABZ-OH:DIC:OXYMA, stosunki molowe 2:2:2 w stosunku do osadzenia żywicy;
- Boc-ABZ-OH:TBTU:DIPEA:OXYMA, stosunki molowe 1:1:2:1 w stosunku do osadzenia żywicy.

Każda z przedstawionych reakcji trwała 3 godziny.

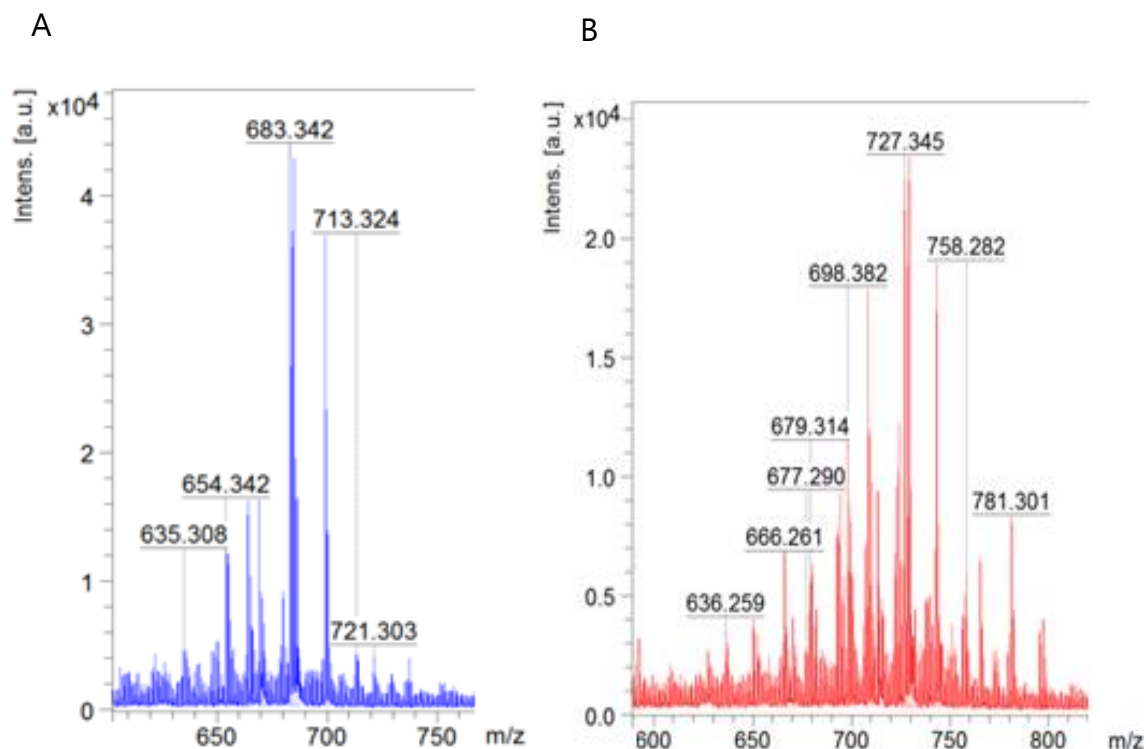
3.9 Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych o sekwencji ABZ-Asn-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂

19 podbibliotek tetrapeptydowych poddałam reakcji usuwania z nośnika stałego. Reakcja ta jednocześnie prowadzi do usunięcia wszystkich stosowanych osłon grup bocznych reszt aminokwasowych. Każdą porcję peptydylożywicy wprowadziłam do kolby po czym dodałam mieszaninę ściągającą o składzie: TFA:fenol:woda:TIPS, 88:5:5:2 (v/v/v/v). Na 1 g peptydylożywicy stosowałam 10 mL mieszaniny ściągającej. Reakcję prowadziłam przez 3 godziny, z wykorzystaniem mieszania magnetycznego. Po zakończeniu reakcji przesączyłam mieszaninę reakcyjną pod zmniejszonym ciśnieniem z zastosowaniem lejka Schotta. Do otrzymanego przesączu dodawałam schłodzonego (-20°C) eteru dietylowego w celu wytrącenia podbibliotek. Osad odwirowałam w probówkach typu falcon w wirówce Centrifuge 5430R firmy Eppendorf, Niemcy. Parametry wirowania: 7830 obrotów/minutę, czas wirowania 15 minut, temperatura 4°. Roztwór zdekantowałam znad osadu, po czym osad rozpuściłam w wodzie. W ostatnim kroku otrzymany roztwór wymroziłam w ciekłym azocie oraz poddałam procesowi liofilizacji.

3.10 Analiza jonu masowego podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₃

W sekcji Pomiarów Fizyko-Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, otrzymane podbiblioteki poddałam analizie mas MALDI-TOF-TOF. Związkami wykorzystywanymi jako matryce do pomiarów były kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CCA) lub kwas 2,5-dihydroksybenzoowy (DHB). Otrzymane wyniki analizowałam metodą Furlonga zaproponowaną w 2002 roku, polegającą na porównaniu najbardziej intensywnych sygnałów z widm²¹¹. Różnica mas wybranych sygnałów, odpowiadała różnicy mas reszt aminokwasowych w

znanej pozycji (X_3), co potwierdza poprawne wykonanie syntezy biblioteki (Tabela 6). Otrzymane widma zamieściłam na rycinie 27.



Rycina 27. Widma analizy jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Gly- X_2 -Ala-ANB-NH₂, B) ABZ-Asn-Thr- X_2 -Ala-ANB-NH₂.

Tabela 6. Analiza widm mas podbibliotek: ABZ-Asn-Gly- X_2 -Ala-ANB-NH₂ oraz ABZ-Asn-Thr- X_2 -Ala-ANB-NH₂.

	BIBLIOTEKA		Różnica mas
	$X_3 = \text{Gly}$	$X_3 = \text{Thr}$	
Sygnał o największej intensywności	683,342	727,345	44,003
Masa molowa reszty aminokwasowej w pozycji X_3	75,067	119,119	44,052

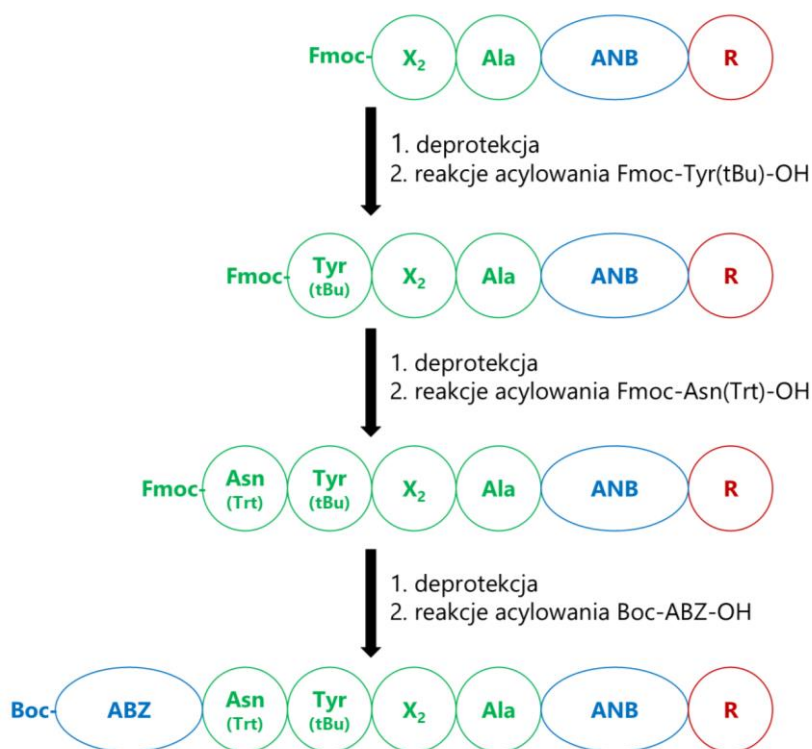
4. Dekonwolucja tetrapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂

Dekonwolucję pozycji X₃ biblioteki ABZ-Asn-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂, wykonałam według schematu opisanego w punkcie 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*. Stężenie końcowe enzymu ADAM 17 wynosiło 6,45×10⁻⁹ M. W wyniku dekonwolucji podbiblioteka o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂ najwydajniej ulegała hydrolizie w obecności enzymu ADAM 17.

5. Synteza związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂

5.1 Etapy syntezy

Wykorzystując porcje peptydylożywicy odłożone do dekonwolucji w trakcie syntezy tetrapeptydowej biblioteki (etap syntezy opisany w podpunkcie 3.5 *Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₂ biblioteki*), przeprowadziłam syntezę końcowych sekwencji związków. Każda z 19 porcji peptydylożywicy posiadała przyłączoną sekwencję: Fmoc-X₂-Ala-ANB-nośnik, gdzie w pozycji X₂ znajdowały się określone reszty aminokwasowe. Kolejne reszty aminokwasowe wprowadzałam zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 28, wykorzystując metody opisane w podrozdziale 3.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki*.



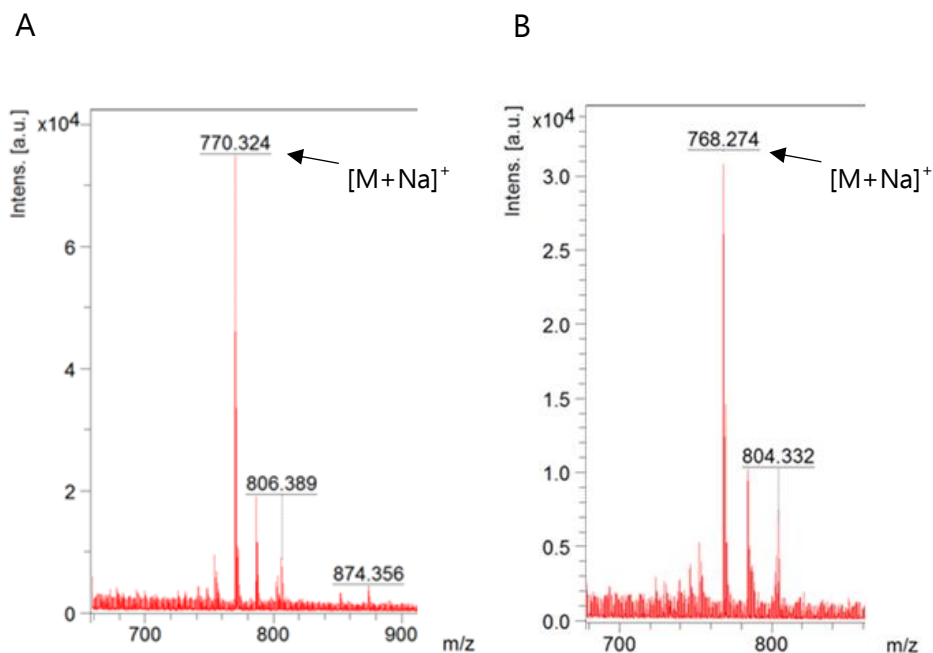
Rycina 28. Etapy syntezy związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂. X₂ – 19 reszt aminokwasowych z wyjątkiem cysteiny, ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy, ANB – kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy, R – żywica.

5.2 Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych pochodnych tetrapeptydowych o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂

Otrzymane związki poddałam reakcji usuwania z nośnika stałego, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.9 *Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych*.

5.3 Analiza jonu masowego związków o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂

Otrzymane produkty poddałam analizie mas MALDI-TOF-TOF (rycina 29).



Rycina 29. Widma analizy jonu masowego pochodnych o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Val-Ala-ANB-NH₂ [M = 747 g/mol]; B) ABZ-Asn-Tyr-Pro-Ala-ANB-NH₂ [M = 745 g/mol].

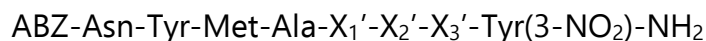
6. Dekonwolucja pozycji X₂ 19 związków o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂

Dekonwolucję pozycji X₂ w związkach przeprowadziłam analogicznie do procedury opisanej w punkcie 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*. Stężenie końcowe enzymu ADAM 17 wynosiło $6,45 \times 10^{-9}$ M. W wyniku dekonwolucji substrat o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-ANB-NH₂ najwydajniej ulegał hydrolizie w obecności enzymu ADAM 17.

7. Synteza heptapeptydowej biblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Ilość reszt aminokwasowych w sekwencji substratowej ma istotny wpływ na tworzenie oraz stabilizację kompleksu enzym-substrat w trakcie trwania reakcji hydrolizy enzymatycznej²⁰⁴. Zgodnie z omawianą w podrozdziale 3.4 *Notacja*

Schechtera i Bergera, części Metody numeracją, dotyczącą miejsca aktywnego enzymu, postanowiłam wydłużyć sekwencję substratu o pozycje primowane, projektując bibliotekę o wzorze ogólnym:



Gdzie: X₃', *X₂'*, *X₁'* - reszty aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy

Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amid 3-nitro-L-tyrozyny

7.1 Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy heptapeptydowej biblioteki

W podrozdziale 3.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki*, zostały opisane czynności, które również wykorzystywałam podczas syntezy heptapeptydowej biblioteki. Dotyczyły one wykonywania: cykli przemywań żywicy, barwnego testu chloranilowego oraz deprotekcji grupy osłonowej Fmoc z wykorzystywanych do syntezy reszt aminokwasowych.

Wszystkie reakcje przyłączania reszt aminokwasowych wykonałam z wykorzystaniem środka sprzęgającego DIC. Stosunki molowe stosowanych reagentów wynosiły: aminokwas:OXYMA:DIC, 2:2:2 w stosunku do osadzenia żywicy. Reagenty rozpuszczałam w mieszaninie DMF:DCM:NMP w stosunku objętościowym 1:1:1. Reakcję prowadziłam przez 3 godziny, a następnie przeprowadzałam cykl przemywań.

7.2 Reakcja przyłączania chromofora Fmoc-L-Tyr(3-NO₂)-OH do żywicy

Naważkę 17,1 g żywicy TentaGel SRAM o osadzeniu 0,23 mmol/g umieściłam w naczyniu Merrifield'a. W kolejnym kroku wykonałam deprotekcję grupy osłonowej Fmoc zgodnie z procedurą opisaną podrozdziale 3.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki*.

Następnie do żywicy przyłączałam pochodną Fmoc-L-Tyr(3-NO₂)-OH. Do naczynia reakcyjnego wprowadziłam mieszaninę reagentów zawierającą aminokwas:OXYMA:DIC 2:2:2 w stosunku molowym do osadzenia żywicy. Reakcję prowadziłam przez 3 godz. w mieszaninie rozpuszczalników DMF:DCM:NMP w stosunku objętościowym 1:1:1. Po jej zakończeniu wykonywałam cykl przemywań. Omawiany schemat powtórzyłam trzykrotnie.

7.3 Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₃' biblioteki

Osuszoną peptydylożywicę z osadzonym chromoforem podzieliłam na 19 porcji, a następnie wykonałam deprotekcję grupy osłonowej Fmoc oraz cykl reakcji acylowania z wykorzystaniem DIC (rozdziały odpowiednio 3.1 oraz 7.1). Następnie, każdą porcję peptydylożywicy wysuszyłam i odłożyłam po 0,3 g do dalszej dekonwolucji. Pozostałą część połączyłam w kolbie okrągłodennej a następnie dodałam mieszaninę DCM i DMF (1:1, v/v) i wymieszałam w czasie pięciu minut. Otrzymaną mieszaninę odsączyłam pod zmniejszonym ciśnieniem i ponownie pozostawiłam do wysuszenia.

7.4 Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₂' biblioteki

W kolejnym etapie syntezy biblioteki ponownie peptydylożywicę podzieliłam na 19 porcji. Kolejne etapy syntezy wykonałam analogicznie do opisanych w podrozdziale 7.3 *Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₃' biblioteki*. W końcowym etapie otrzymane porcje peptydylożywicy wysuszyłam i odłożyłam po 0,3 g do dalszej dekonwolucji. Pozostałą żywicę (0,3g z każdej porcji) wykorzystałam do dalszych etapów syntezy.

7.5 Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₁' biblioteki

Wprowadzenie do sekwencji biblioteki 19 reszt aminokwasowych w pozycję X₁' przeprowadziłam zgodnie z procedurami syntezy opisanymi w podrozdziale 7.3 *Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₃' biblioteki*.

Otrzymaną peptydylożywicę pozostawiłam w naczyniach reakcyjnych, aby wykonać dalsze etapy syntezy.

7.6 Przyłączanie do 19 podbibliotek sekwencji: Fmoc-Tyr(tBu)-Met-Ala-OH

Zgodnie z wynikami badań otrzymanymi w procesie dekonwolucji biblioteki tetrapeptydowej, w kolejnych etapach wprowadziłam sekwencję Fmoc-Tyr(tBu)-Met-Ala-OH. Stosowałam naprzemiennie cykle deprotekcji oraz acylowania, wykorzystując DIC jako aktywator (szczegółowe warunki opisane w podrozdziale 7.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy heptapeptydowej biblioteki*).

7.7 Przyłączanie do 19 podbibliotek sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH

Dwie ostatnie pozycje biblioteki heptapeptydowej wprowadziłam jako dipeptydomimetyk o sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH.

7.7.1 Synteza dipeptydomimetyku Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH

7.7.1.1 Osadzanie reszty aminokwasowej na żywicy

Syntezę dipeptydomimetyku wykonałam na 15 g żywicy 2-chloro-chlorotrytylowej. Bezwodną resztę aminokwasową Fmoc-Asn(Trt)-OH (4 mmole/2 g żywicy), rozpuściłam w DCM (20 mL/2 g żywicy). Następnie dodałam równomolową ilość DIPEA, a w kolejnym etapie żywicę. Całość umieściłam na mieszadle magnetycznym na 2 godziny. W celu zablokowania nieprzereagowanych miejsc reaktywnych na żywicy, po zakończeniu reakcji dodałam do mieszaniny metanol, mieszając roztwór przez kolejne piętnaście minut. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną odsączyłam na lejku Schotta i pozostawiłam żywicę do wysuszenia.

7.7.1.2 Oznaczanie stopnia osadzenia peptydyżywicy

10 mg suchego nośnika z osadzoną resztą aminokwasową umieściłam w kolbie miarowej o objętości 50 mL, po czym dodałam 1,3 mL 30% roztworu piperydyny w DMF i pozostawiłam na 30 minut. Następnie kolbę dopełniłam absolutnym EtOH. W kolejnym kroku wykonałam pomiary absorbancji uwalnianego dibenzofulwenu ($\lambda = 300$ nm). Odnośnik stanowił roztwór niezawierający peptydyżywicy. Pomiar absorbancji wykonywałam z wykorzystaniem sprzętu Spectrostar Nano firmy BMG Labtech.

7.7.1.3 Przyłączanie Boc-ABZ-OH

W kolejnym etapie przeprowadziłam standardową deprotekcję grupy Fmoc oraz barwny test chloranilowy. Następnie przeprowadziłam trzykrotnie reakcję przyłączania Boc-ABZ-OH, stosując mieszaninę o składzie: Boc-ABZ-OH: OXYMA: DIC (proporcje molowe w stosunku do osadzenia żywicy 2:2:2). Reagenty rozpuszczałam w mieszaninie DMF:DCM:NMP, stosunek objętościowy 1:1:1. Reakcję prowadziłam przez dwie godziny, wykonując pomiędzy powtórzeniami standardowe cykle przemywań.

7.7.1.4 Usuwanie dipeptydomimetyku Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH z nośnika stałego

W ostatnim etapie usunęłam dipeptydomimetyk z żywicy z zachowaniem grup osłonowych. W tym celu żywicę umieściłam w kolbie okrągłodennej i dodałam mieszaninę ściągającą o składzie: AcOH:TFE:DCM (2:2:6, v/v/v). Stosowałam 10 mL mieszaniny/1 g peptydyżywicy. Reakcję prowadziłam na mieszadle magnetycznym przez 2 godziny. Żywicę odsączyłam i trzykrotnie przemyłam mieszaniną ściągającą. Do otrzymanego przesącza dodawałam porcjami heksan (1:10,

$V_{\text{przesącza}}/V_{\text{heksanu}}$) i odparowywałam próżniowo uzyskaną mieszaninę azeotropową. Otrzymany osad rozpuściłam w t-BuOH i poddałam liofilizacji.

7.7.2 Przyłączanie sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH

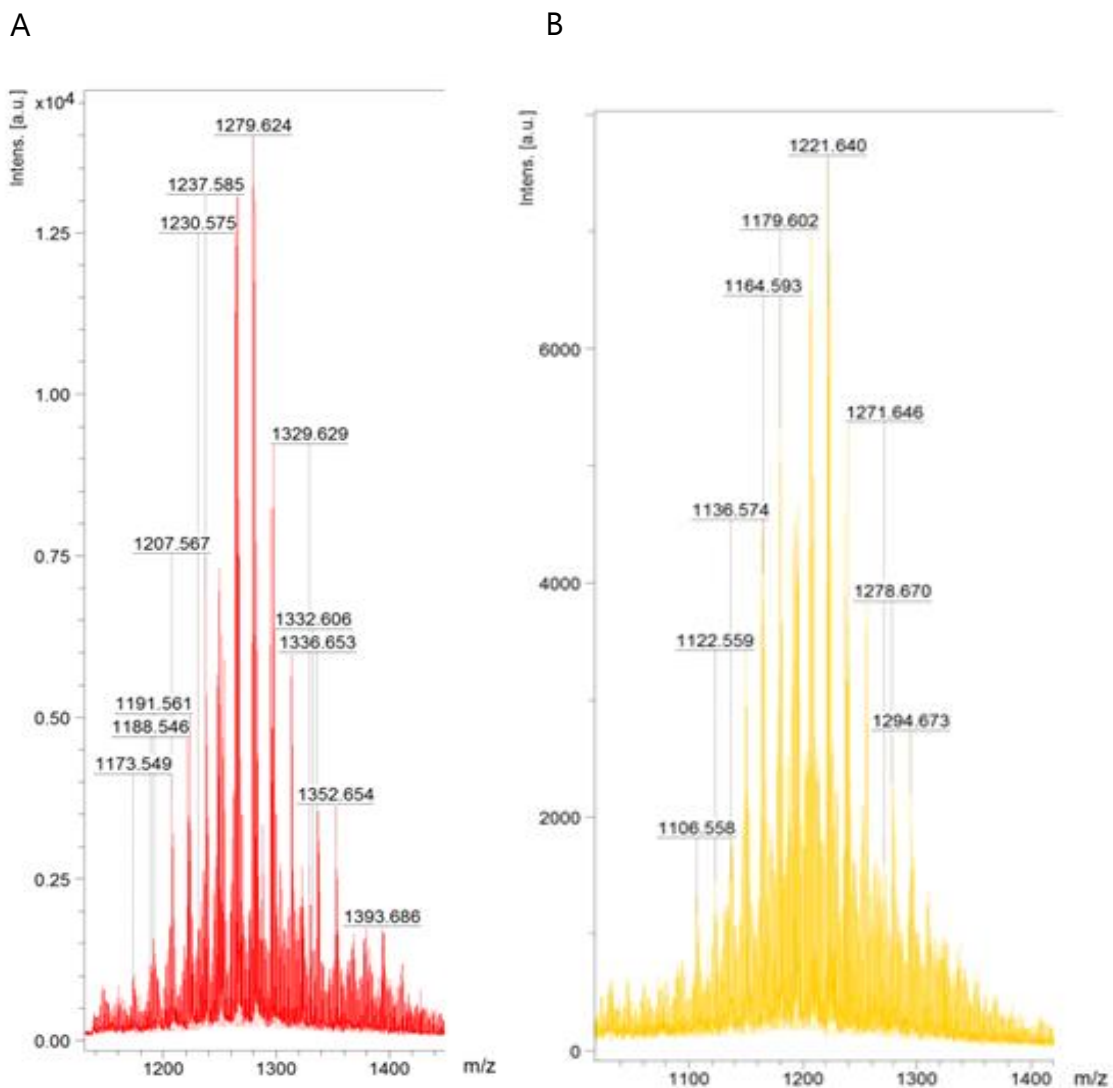
Otrzymany peptydomimetyk wykorzystałam do przyłączenia do 19 porcji peptydydożywicy zawierających sekwencje: Fmoc-Tyr(tBu)-Met-Ala- X_1' - X_2' - X_3' -Tyr(3-NO₂)-nośnik. W tym celu dla każdej z porcji peptydydożywicy wykonałam deprotekcję grupy Fmoc (przebieg opisany w podrozdziale 3.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy biblioteki*). Następnie dodałam mieszaninę reagentów: Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH:OXYMA:DIC (proporcje molowe w stosunku do osadzenia żywicy 2:2:2), rozpuszczone w mieszaninie DMF:DCM:NMP (1:1:1, v/v/v). Reakcję prowadziłam przez 24 godziny, po czym wykonywałam cykl przemywań. Etap acylowania powtarzałam, aż do momentu obserwowania bezbarwnych ziaren peptydydożywicy po wykonanym teście chloranilowym.

7.8 Usuwanie z nośnika stałego podbibliotek heptapeptydowych o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala- X_1' - X_2' - X_3' -Tyr(3-NO₂)-NH₂

Po zakończeniu syntezy otrzymane 19 podbibliotek poddałam reakcji usuwania z nośnika stałego. Schemat postępowania został omówiony w podrozdziale 3.9 *Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych*.

7.9 Analiza jonu masowego podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X_1'

Podbiblioteki poddałam analizie mas MALDI-TOF-TOF. Otrzymane widma zamieściłam na rycinie 30. Sygnały na widmie masowym porównałam z różnicą mas molowych reszt aminokwasowych w znanej pozycji X_1' (Tabela 7).



Rycina 30. Widma analizy jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Trp-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Lys-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Tabela 7. Analiza widm mas podbibliotek: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Trp-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ oraz ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Lys-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

	BIBLIOTEKA		Różnica mas
	X ₁ ' = Trp	X ₁ ' = Lys	
Sygnal o największej intensywności	1279,624	1221,640	57,984
Masa molowa reszty aminokwasowej w pozycji X₁'	204,225	146,188	58,037

8. Dekonwolucja pozycji X₁' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

W każdym etapie dekonwolucji, biblioteki o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ wykonywałam pomiar przyrostu fluorescencji w czasie uwalnianego przez enzym ADAM 17 fragmentu biblioteki o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH. Eksperymenty wykonywałam z wykorzystaniem czarnej płytki 96-dołkowej i czytnika mikroplętek Clariostar firmy BMG Labtech ($\lambda_{wz} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$). Każda seria została powtórzona trzykrotnie. Procedura przygotowania próbek oraz przeprowadzonego pomiaru, została wykonana analogicznie do opisanej w rozdziale 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*. Stężenie końcowe enzymu wynosiło $1,29 \times 10^{-8} \text{ M}$. W wyniku dekonwolucji podbiblioteka o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ najwydajniej ulegała hydrolizie w obecności enzymu ADAM 17. W celu potwierdzenia miejsca hydrolizy w powyższej podbibliotece wykonałam analizy HPLC zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale 9. *Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej otrzymanych związków*. Chromatogramy będące wynikiem analiz przedstawiłam w rozdziale 6. *Analiza podbiblioteki o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, części Wyniki i dyskusja.

9. Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej otrzymanych związków

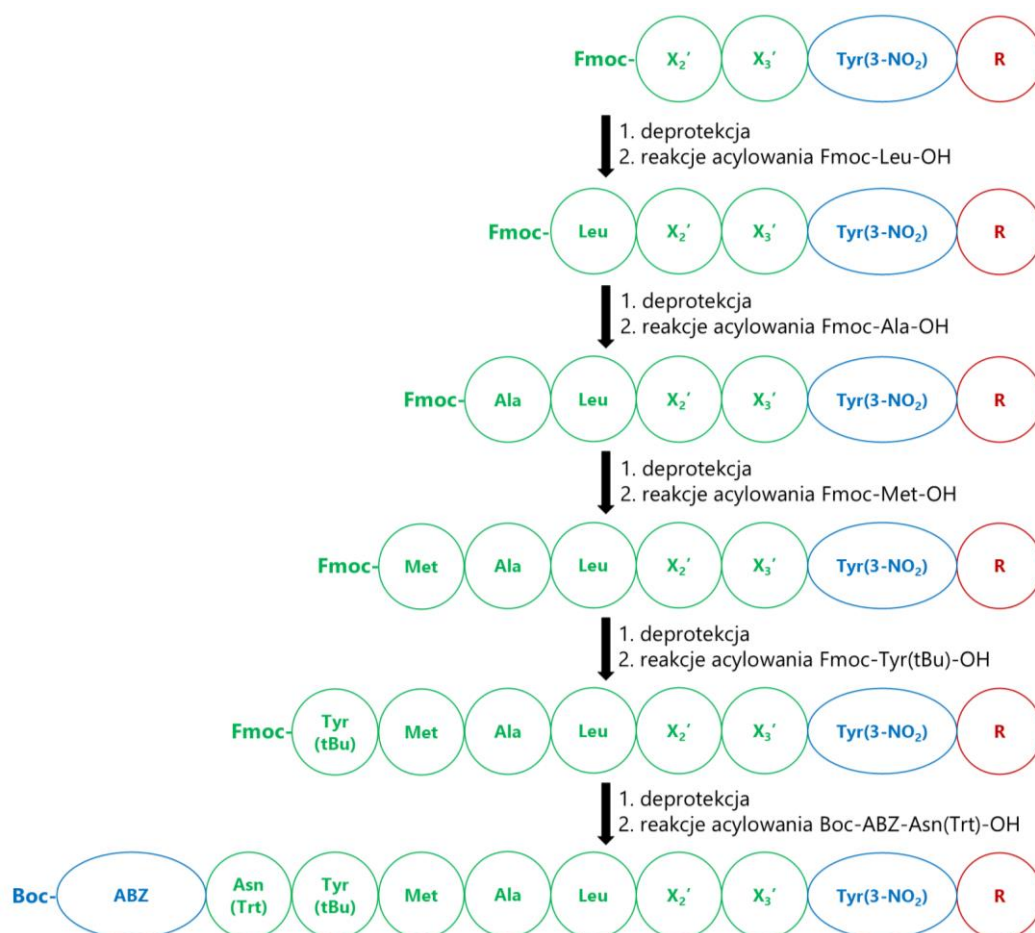
Biblioteki peptydowe oraz pojedyncze związki poddałam analizie z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Analizy wykonałam za pomocą chromatografu ChromNAV firmy JASCO, stosując układ faz odwróconych.

Stosowany układ rozpuszczalników zawierał fazę (A) 0,1 % roztwór TFA w wodzie oraz fazę (B) 80% roztwór ACN w roztworze fazy (A). Rozdział prowadziłam na kolumnie Aeris Widepore ze złożem C18, o wymiarach 100 × 4,6 mm, firmy PHENOMENEX. Zastosowałam gradient liniowy 10-90% fazy B w czasie 43 minut z detekcją UV przy $\lambda = 226$ nm, oraz detekcją fluorescencyjną $\lambda_{wz} = 320$ nm i $\lambda_{em} = 450$ nm.

10. Synteza heptapeptydowej biblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

10.1 Etapy syntezy biblioteki peptydowej o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Porcje peptydyłożywicy odłożone do dekonwolucji (podrozdział 7.4 *Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₂' biblioteki*), zawierające sekwencje Fmoc-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-nośnik, poddałam cyklicznym reakcjom deprotekcji i acylowania. Etapy syntezy wykonałam zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 31, wykorzystując procedury opisane w podrozdziałach 7.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy heptapeptydowej biblioteki*, oraz 7.7.2 *Przyłączanie sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH*.



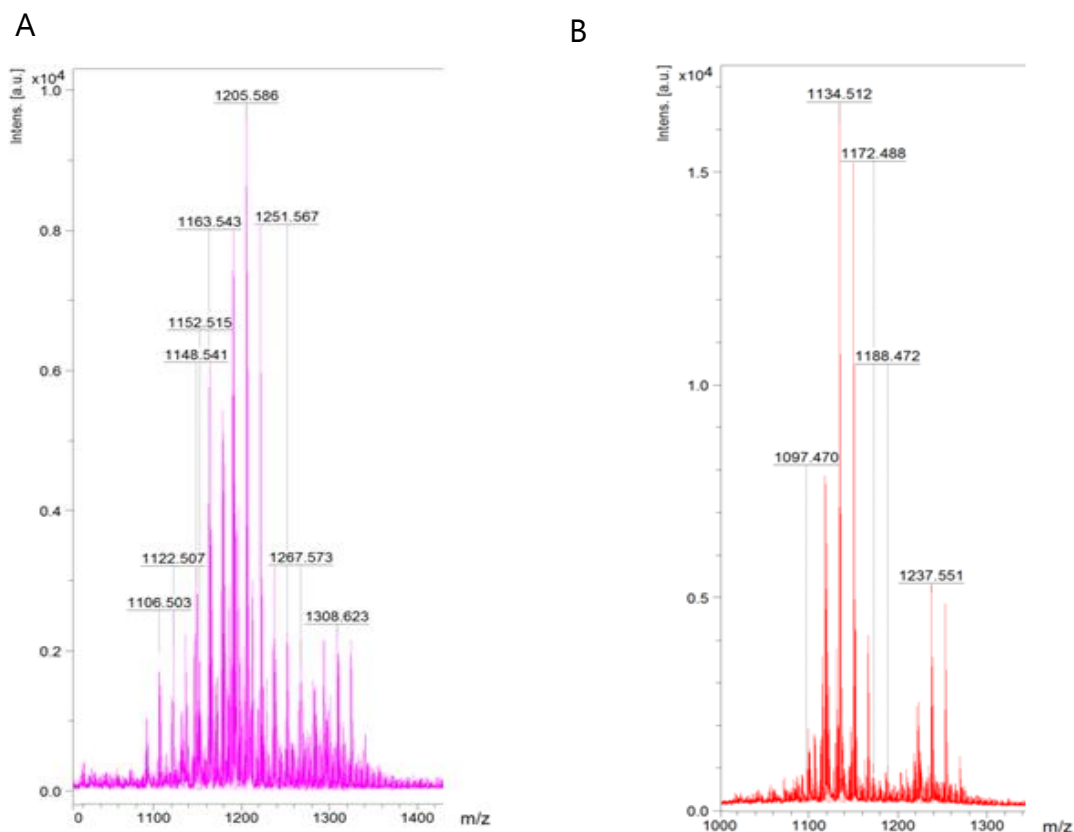
Rycina 31. Etapy syntezy heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. X₂', X₃' – 19 reszt aminokwasowych z wyjątkiem cysteiny, ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy, Tyr(3-NO₂) – 3-nitro-L-tyrozyna, R – żywica.

10.2 Usuwanie z nośnika stałego podbibliotek o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

W kolejnym etapie 19 podbibliotek usunęłam z nośnika stałego według reakcji opisanej w podrozdziale 3.9 *Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych*.

10.3 Analiza jonu masowego ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₂'

Otrzymane podbiblioteki przebadalam metodą MALDI-TOF-TOF. Widma zamieściłam na rycinie 32, natomiast analizę metodą Furlonga pozycji X₂' przedstawiłam w tabeli 8.



Rycina 32. Widma analizy jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Gly-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Lys-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Tabela 8. Analiza jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Gly-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ oraz ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Lys-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

	BIBLIOTEKA		Różnica mas
	X ₂ ' = Gly	X ₂ ' = Lys	
Sygnal o największej intensywności	1134,512	1205,588	71,076
Masa molowa reszty aminokwasowej w pozycji X₂'	75,067	146,188	71,121

11. Dekonwolucja pozycji X₂' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Dekonwolucję pozycji X₂' oraz analizę HPLC wykonałam analogicznie do opisów zawartych odpowiednio w rozdziale 8. *Dekonwolucja pozycji X₁' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂* oraz rozdziale 9. *Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej otrzymanych związków*. Stężenie końcowe enzymu wynosiło $9,70 \times 10^{-9}$ M. W wyniku dekonwolucji najefektywniej hydrolizowana przez enzym ADAM 17 podbiblioteka posiadała sekwencję ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

12. Synteza związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

12.1 Etapy syntezy związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

19 porcji peptydylożywicy odłożonej do dekonwolucji (podrozdział 7.3 *Wydłużanie łańcucha peptydowego o pozycję X₃' biblioteki*), zawierającej sekwencję Fmoc-X₃'-Tyr(3-NO₂)-nośnik, poddałam etapom syntezy przedstawionym na rycinie 33. Przebieg reakcji szczegółowo opisałam w podrozdziałach 7.1 *Podstawowe procedury stosowane w trakcie syntezy heptapeptydowej biblioteki*, oraz 7.7.2 *Przyłączanie sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH*.



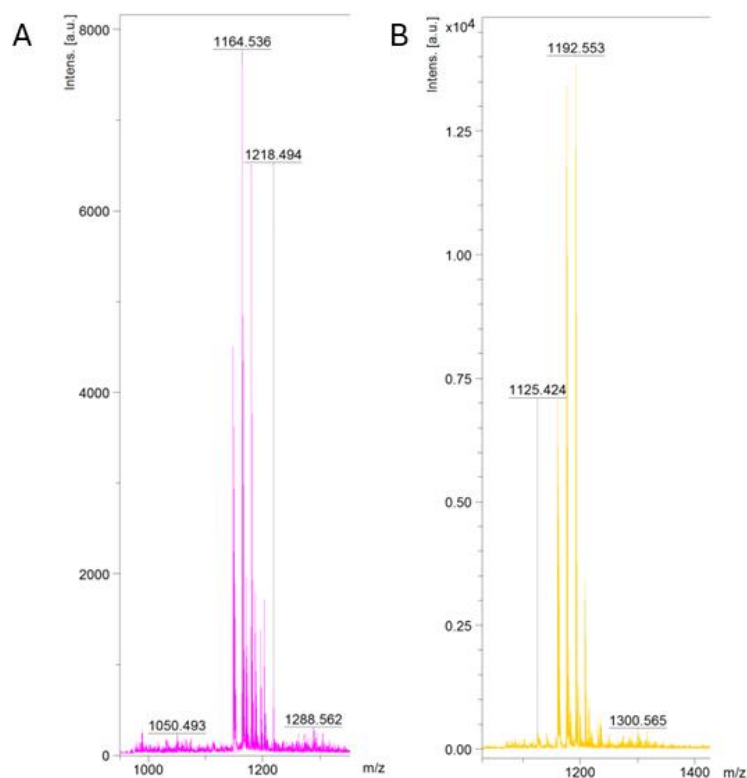
Rycina 33. Etapy syntezy heptapeptydowych związków o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. X₃' - reszty aminokwasowe z wyjątkiem cysteiny, ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy, Tyr(3-NO₂) – 3-nitro-L-tyrozyna, R – żywica.

12.2 Usuwanie z nośnika stałego związków o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

19 związków zsyntezowanych w ramach realizacji poprzedniego punktu usunęłam z nośnika stałego (opis reakcji w podrozdziale 3.9 *Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych*).

12.3 Analiza jonu masowego związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Produkty syntezy poddałam analizie mas MALDI-TOF-TOF. Otrzymane widma zamieściłam na rycinie 34.



Rycina 34. Widma analizy jonu masowego związków o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Ser-Tyr(3-NO₂)-NH₂ [M = 1180 g/mol]; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Val-Tyr(3-NO₂)-NH₂ [M = 1192 g/mol].

13. Dekonwolucja pozycji X₃' w związkach o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Dekonwolucję pozycji X₃' oraz analizę HPLC wykonałam analogicznie do opisów zawartych odpowiednio w rozdziale 8. *Dekonwolucja pozycji X₁' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂* oraz rozdziale 9. *Analiza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej otrzymanych związków.* Stężenie końcowe enzymu wynosiło $1,60 \times 10^{-9}$ M. W wyniku dekonwolucji najefektywniej hydrolizowana

przez enzym ADAM 17 podbiblioteka posiadała sekwencję ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

14. Modyfikacje substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂

Cząsteczkę otrzymanego substratu modyfikowałam na dwa sposoby. Pierwszy polegał na wymianie C-końcowego chromofora, z kolei drugi na zmianie długości łańcucha peptydowego. Sekwencje zaprojektowanych substratów przedstawiłam w tabeli 9.

Tabela 9. Sekwencje zaprojektowanych substratów.

NUMER SUBSTRATU	SEKWENCJA SUBSTRATU
1*	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂
2	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂
3	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂
4	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂
5	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH ₂
6	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Lys(DNP)-NH ₂
7	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Lys(DNP)-NH ₂
8	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Lys(DNP)-NH ₂
9	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Dap(DNP)-NH ₂
10	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Dap(DNP)-NH ₂
11	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Dap(DNP)-NH ₂
12	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Dap(DNP)-NH ₂

Gdzie: ABZ – kwas 2-aminobenzoowy, Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amid 3-nitro-L-tyrozyny, Lys(DNP)-NH₂ – amid *N*-ε-2,4-dinitrofenylo-L-lizyny, Dap(DNP)-NH₂ – amid kwasu (*N*-β-2,4-dinitrofenylo)-L-2,3-diaminopropionowego; * - sekwencja substratu wyjściowego.

Substraty (2)-(4) syntezowałam hybrydowo stosując zarówno syntezy automatyczny oraz syntezę manualną, z kolei substraty (5)-(12) wykorzystując wyłącznie syntezę automatyczną.

14.1 Strategia syntezy modyfikowanych substratów z zastosowaniem automatycznego syntezyatora mikrofalowego

Substraty (5)-(12) syntezowałam stosując syntezyator mikrofalowy Liberty Blue firmy CEM. Synteza przebiegała zgodnie ze standardowym protokołem, w oparciu o strategię Fmoc/tBu. Stężenia reagentów zestawiałam w tabeli 10.

Tabela 10. Odczynniki wykorzystywane w trakcie syntezy automatycznej.

L.P.	ODCZYNNIK	STĘŻENIE	ROZPUSZCZALNIK
1	Pochodna aminokwasowa	0,2 M	DMF
2	OXYMA	1,0 M	DMF
3	DIC	0,5 M	DMF
4	Piperydyna	20%	DMF

Syntezę każdego analogu wykonywałam w skali 0,1 mmola, wykorzystując 0,435 g żywicy Tenta Gel SRAM, o osadzeniu 0,23 mmol/g. Poszczególne etapy oraz czas ich trwania umieściłam w tabeli 11.

Tabela 11. Etapy jednego cyklu przyłączania pochodnej aminokwasowej.

L.P.	ETAP SYNTEZY	OBJĘTOŚĆ ODCZYNNIKÓW	CZAS TRWANIA
1.	Spulchnianie żywicy	15 mL DMF	300 s
2*.	Deprotekcja	2 × 4 mL 20% piperydyny w DMF	2 × 5 s
3*.	Płukanie	4 × 4 mL DMF	4 × 5 s
4*.	Sprzęganie	2,5 mL pochodnej aminokwasowej 1 mL DIC 0,5 mL OXYMA 2 mL DMF	30 s
5*.	Płukanie	4 × 4 mL DMF	3 × 5 s
6*.	Sprzęganie	2,5 mL pochodnej aminokwasowej 1 mL DIC 0,5 mL OXYMA 2 mL DMF	30 s
7*.	Płukanie	3 × 4 mL DMF	3 × 5 s
8.	Końcowe płukanie	4 × 4 mL DMF	4 × 5 s

* - etapy powtarzane cyklicznie dla wszystkich reszt aminokwasowych, chromofora jak i donora fluorescencji w sekwencji.

14.2 Strategia syntezy modyfikowanych substratów o numerach 2-4 metodą hybrydową

Syntezę substratów (2)-(4) prowadzoną hybrydowo wykonałam z wykorzystaniem syntezy mikrofalowej do pozycji aminokwasowej Tyr. Dalszy etap przyłączania dipeptydomimetyku Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH wykonywałam manualnie (opis przebiegu w podrozdziale 7.7.2 *Przyłączenie sekwencji Boc-ABZ-Asn(Trt)-OH*).

14.3 Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych analogów

11 otrzymanych analogów usunęłam z nośnika stałego zgodnie z etapami przedstawionymi w podrozdziale 3.9 *Reakcja usuwania z nośnika stałego otrzymanych podbibliotek tetrapeptydowych*.

15. Ocena wydajności hydrolizy modyfikowanych substratów fluorogenicznych

W kolejnym etapie prowadzonych badań dla zsyntezowanych związków wykonałam pomiar przyrostu intensywności fluorescencji w czasie trwania reakcji hydrolizy enzymatycznej, zgodnie z procedurą przedstawioną w rozdziale 8. *Dekonwolucja pozycji X₁' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂*. Zakres stężeń substratów oraz enzymu przedstawiłam w tabeli 12.

Tabela 12. Końcowe stężenia substratów i enzymu.

Nr	SEKWENCJA SUBSTRATU	STĘŻENIE SUBSTRATU [M]	STĘŻENIE ENZYMU [M]
4	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	6,03 × 10 ⁻⁵	
8	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Lys(DNP)-NH ₂	5,49 × 10 ⁻⁵	1,61 × 10 ⁻⁸
12	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Dap(DNP)-NH ₂	5,76 × 10 ⁻⁵	
3	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	5,33 × 10 ⁻⁵	
7	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Lys(DNP)-NH ₂	4,89 × 10 ⁻⁵	4,84 × 10 ⁻⁹

11	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Dap(DNP)-NH ₂	5,09×10 ⁻⁵	
2	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	4,57×10 ⁻⁵	
6	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Lys(DNP)-NH ₂	4,24×10 ⁻⁵	3,87×10 ⁻⁹
10	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Dap(DNP)-NH ₂	4,39×10 ⁻⁵	
1	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO ₂)-NH ₂	4,00×10 ⁻⁵	
5	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH ₂	3,74×10 ⁻⁵	3,22×10 ⁻¹⁰
9	ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Dap(DNP)-NH ₂	3,87×10 ⁻⁵	

16. Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla substratów 1, 5 oraz 9

Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla wszystkich substratów wykonywałam według etapów opisanych poniżej.

ETAP I – hydroliza substratu w różnych zakresach stężeń w obecności enzymu ADAM 17.

W pierwszym kroku przygotowałam rozcieńczenia substratu w buforze pomiarowym zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*. Otrzymane stężenia substratów zestawiałam w tabeli 13.

Tabela 13. Zakres stężeń substratów w studni pomiarowej.

STĘŻENIE SUBSTRATU			
L.P.	(1)	(5)	(9)
1	4,00×10 ⁻⁴ M	3,74×10 ⁻⁴ M	3,87×10 ⁻⁴ M
2	2,00×10 ⁻⁴ M	1,87×10 ⁻⁴ M	1,94×10 ⁻⁴ M
3	1,00×10 ⁻⁴ M	9,35×10 ⁻⁵ M	9,68×10 ⁻⁵ M
4	6,67×10 ⁻⁵ M	6,23×10 ⁻⁵ M	6,45×10 ⁻⁵ M
5	5,71×10 ⁻⁵ M	5,34×10 ⁻⁵ M	5,53×10 ⁻⁵ M
6	5,00×10 ⁻⁵ M	4,68×10 ⁻⁵ M	4,84×10 ⁻⁵ M
7	4,44×10 ⁻⁵ M	4,16×10 ⁻⁵ M	4,30×10 ⁻⁵ M
8	4,00×10 ⁻⁵ M	3,74×10 ⁻⁵ M	3,87×10 ⁻⁵ M
9	2,00×10 ⁻⁵ M	1,87×10 ⁻⁵ M	1,94×10 ⁻⁵ M
10	1,33×10 ⁻⁵ M	1,25×10 ⁻⁵ M	1,29×10 ⁻⁵ M
11	1,00×10 ⁻⁵ M	9,35×10 ⁻⁶ M	9,68×10 ⁻⁶ M
12	8,00×10 ⁻⁶ M	7,48×10 ⁻⁶ M	7,74×10 ⁻⁶ M

13	$6,67 \times 10^{-6}$ M	$6,23 \times 10^{-6}$ M	$6,45 \times 10^{-6}$ M
14	$5,71 \times 10^{-6}$ M	$5,34 \times 10^{-6}$ M	$5,53 \times 10^{-6}$ M
15	$4,44 \times 10^{-6}$ M	$4,16 \times 10^{-6}$ M	$4,30 \times 10^{-6}$ M
16	$4,00 \times 10^{-6}$ M	$3,74 \times 10^{-6}$ M	$3,87 \times 10^{-6}$ M
17	$2,00 \times 10^{-6}$ M	$1,87 \times 10^{-6}$ M	$1,94 \times 10^{-6}$ M

Następnie wykorzystując płytkę 96-dołkową do pomiarów fluorescencji, wykonałam pomiary przyrostu intensywności fluorescencji w czasie trwania reakcji hydrolizy. W każdym dołku pomiarowym znajdował się substrat o określonym stężeniu, bufor pomiarowy (skład buforu: 25 mM TRIS-HCl, 2,5 μ M chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C) oraz enzym ADAM 17. Dodatkowo dla każdego z rozcieńczeń substratu przygotowałam odnośnik zawierający wyłącznie substrat oraz bufor. Wyznaczanie parametrów kinetycznych wykonałam w dwóch powtórzeniach.

ETAP II – wyznaczenie krzywej wzorcowej uwalnianego fragmentu fluorescencyjnego ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH

W celu wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowałam serię rozcieńczeń fragmentu związku o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH ($C_{\text{początkowe}} = 8,10 \times 10^{-3}$ M w DMSO) (tabela 14). W kolejnym etapie wykorzystując czarną płytkę 96-dołkową wykonałam pomiar intensywności fluorescencji w punkcie przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{wz}} = 320$ nm, oraz emisji $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm. Dla każdego analizowanego substratu wykonywałam oddzielną krzywą wzorcową.

Tabela 14. Końcowe stężenie ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH.

L.P.	STĘŻENIE ZWIĄZKU
1	$1,62 \times 10^{-4}$ M
2	$1,62 \times 10^{-5}$ M
3	$3,24 \times 10^{-6}$ M
4	$1,62 \times 10^{-6}$ M
5	$3,24 \times 10^{-7}$ M
6	$1,62 \times 10^{-7}$ M

7	$3,24 \times 10^{-8}$ M
8	$1,62 \times 10^{-8}$ M
9	$3,24 \times 10^{-9}$ M
10	$1,62 \times 10^{-9}$ M

ETAP III – wykreślenie krzywej Michaelisa-Menten

W celu wykreślenia krzywej Michaelisa-Menten wartości przyrostu intensywności fluorescencji z etapu I (wyrażone w jednostce intensywności fluorescencji/s), przeliczyłam na szybkość hydrolizy enzymatycznej (wyrażonej w jednostce mol/s). Obliczenia te przeprowadziłam w oparciu o krzywą wzorcową fragmentu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH, otrzymaną w etapie II. Krzywe Michaelisa-Menten wykreśliłam w programie GraphPad Prism.

Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczyłam parametry kinetyczne takie, jak szybkość maksymalna (V_{max}), stała Michaelisa (K_M), stała katalityczna (k_{cat}) oraz stała specyficzności (k_{cat}/K_M).

17. Hamowanie aktywności enzymu ADAM 17 inhibitorem TAPI-0

W celu potwierdzenia, że obserwowana hydroliza substratu w materiale biologicznym wynika z aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17, wykorzystałam selektywny inhibitor enzymu ADAM 17 – TAPI-0. W eksperymencie wykorzystałam substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**). Do dołka płytki pomiarowej wprowadzałam inhibitor TAPI-0 ($C_{końcowe} = 1\mu\text{M}$), bufor pomiarowy (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μM chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C) oraz enzym ADAM 17 ($C_{końcowe} = 3,22 \times 10^{-9}$ M). Próbkę inkubowałam 30 minut w temperaturze pokojowej. Odnośnik stanowiły studzienki zawierające enzym ADAM 17 w buforze pomiarowym. Po zakończeniu inkubacji do wszystkich studni dodałam substrat ($C_{końcowe} = 1,87 \times 10^{-5}$ M), a następnie wykonałam pomiar przyrostu fluorescencji w czasie.

18. Hydroliza substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ przez wybrane proteazy

Substrat o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (5) dodałam do studni pomiarowych czarnej płytki 96-dołkowej ($C_{\text{końcowe}} = 3,74 \times 10^{-5}$ M). Następnie dodawałam wybrany enzym (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, ADAM 10, ADAM 15, ADAM 17, kalikreinę 1, kalikreinę 2, kalikreinę 3, kalikreinę 8, kalikreinę 13, katepsynę X, katepsynę L, katepsynę S, katepsynę D, katepsynę H oraz katepsynę B), oraz bufor pomiarowy o składzie: 25 mM TRIS-HCl, 2,5 μ M chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 (pH 9,0 w 37°C). Stężenie końcowe każdego z enzymów wynosiło 1,25 nM. Równolegle przygotowałam układy odniesienia zawierające wyłącznie substrat oraz bufor pomiarowy. W eksperymencie wykonywałam pomiary przyrostu fluorescencji w czasie. Eksperyment powtórzyłam trzykrotnie.

19. Badania aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w materiale biologicznym

Eksperymenty wykonałam wykorzystując czytnik mikroplatek Clariostar firmy GMB Labtech oraz czarne płytki 96-dołkowe. Pomiary prowadziłam przy długości fal wzbudzenia $\lambda_{\text{wz}} = 320$ nm oraz emisji $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm. W badaniach mierzyłam przyrost intensywności fluorescencji w czasie, a każdy eksperyment powtarzałam trzykrotnie. Bufor stosowany w pomiarach zawierał 25 mM TRIS-HCl, 2,5 μ M chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C.

19.1 Materiał biologiczny wykorzystany do badań *in vitro* wraz z zastosowanymi modyfikacjami

Materiał biologiczny (lizaty oraz medium zewnątrzkomórkowe znad linii komórkowej ludzkich podocytów, wyizolowanych przez grupę badawczą Moin A. Saleem²¹²) otrzymałam z zespołu prof. dr hab. Agnieszki Piwkowskiej z Pracowni Molekularnej i Komórkowej Nefrologii, IMDiK, PAN. Proliferacja komórek

odbywała się w 33°C w 5% CO₂, w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 100 U/mL penicyliny i 100 µg/mL streptomycyny. Następnie w celu zróżnicowania hodowano je przez 10-14 dni (w temperaturze 37°C oraz 5% CO₂ w pożywce RPMI 1640, zawierającej 10% FBS, 100 U/mL penicyliny i 100 µg/mL streptomycyny). W kolejnym kroku hodowli wprowadzono następujące modyfikacje, mające na celu wymuszenie konkretnych zmian w funkcjonowaniu:

Grupa kontrolna (symbol **SG**, ang. Standard Glucose) – pięciodniowa inkubacja komórek w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 100 U/mL penicyliny, 100 µg/mL streptomycyny oraz glukozę (C = 11 mM);

System I (symbol **HG**, ang. High Glucose) – pięciodniowa inkubacja komórek w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 100 U/mL penicyliny, 100 µg/mL streptomycyny oraz glukozę (C = 30 mM);

System II (symbol **SG+Klotho**) – pięciodniowa inkubacja komórek w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 100 U/mL penicyliny, 100 µg/mL streptomycyny oraz glukozę (C = 11 mM). Następnie inkubacja 24 godziny w powyższej pożywce zawierającej 0,5 nM stężenie białka Klotho;

System III (symbol **HG+Klotho**) – pięciodniowa inkubacja komórek w pożywce RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 100 U/mL penicyliny, 100 µg/mL streptomycyny oraz glukozę (C = 30 mM). Następnie inkubacja 24 godziny w powyższej pożywce zawierającej 0,5 nM stężenie białka Klotho;

System IV (symbol **SG kontrola**) – próba kontrolna do systemu V oraz VI. W systemie IV do linii komórkowej ludzkich podocytów wprowadzono niewyciszające lentiwirusowe shRNA (GIPZ non-silencing lentiviral shRNA control, Horizon). Na etapie wzrostu komórek wykorzystywano pożywkę RPMI 1640 zawierającą 10% FBS, 100 U/mL penicyliny oraz 100 µg/mL streptomycyny. Przez ostatnie pięć dni do stosowanej pożywki dodawano glukozę (C = 11 mM);

System V (symbol **SG shKlotho**) – linia komórkowa ludzkich podocytów z wyciszoną ekspresją białka Klotho (GIPZ Lentiviral Human KL shRNA, Horizon). Na etapach wzrostu komórek wykorzystywano pożywkę RPMI 1640 zawierającą 10% FBS, 100 U/mL penicyliny oraz 100 µg/mL streptomycyny. Przez ostatnie pięć dni do pożywki dodawano glukozę (C = 11 mM);

System VI (symbol **SG shADAM 17**) oraz VII (symbol **HG shADAM 17**) – do linii komórkowych wprowadzono lentiwirusowe shRNA wyciszające gen kodujący ADAM 17 (GIPZ Lentiviral Human ADAM 17 shRNA, Horizon). Na etapach wzrostu komórek wykorzystywano pożywkę RPMI 1640 zawierającą 10% FBS, 100 U/mL penicyliny oraz 100 µg/mL streptomycyny. Przez ostatnie pięć dni do pożywki dodawano glukozę o stężeniu C = 11 mM, dla SG shADAM 17 (system VI) oraz o stężeniu C = 30 mM, dla HG shADAM 17 (system VII).

System VIII (symbol **HG kontrola**) - próba kontrolna do systemu VII. W systemie tym do linii komórkowej ludzkich podocytów wprowadzono niewyciszające lentiwirusowe shRNA (GIPZ non-silencing lentiviral shRNA control, Horizon). Na etapie wzrostu komórek wykorzystywano pożywkę RPMI 1640 zawierającą 10% FBS, 100 U/mL penicyliny oraz 100 µg/mL streptomycyny. Przez ostatnie pięć dni do stosowanej pożywki dodawano glukozę (C = 30 mM);

19.2 Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w lizatach linii komórkowej ludzkich podocytów

Do studni pomiarowej dodawałam 10 µL lizatu oraz 110 µL mieszaniny zawierającej: 10 µL inhibitora TAPI-0 ($C_{\text{końcowe}} = 1 \mu\text{M}$) oraz 100 µL buforu pomiarowego. Układy odniesienia składały się z: 10 µL lizatu, 10 µL DMSO oraz 100 µL buforu pomiarowego. Dla każdego systemu przygotowałam po trzy powtórzenia. Płytkę inkubowałam 30 minut (w temperaturze 23°C), po czym dodałam 80 µL mieszaniny zawierającej substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**) ($C_{\text{końcowe}} = 1,87 \times 10^{-5} \text{ M}$), w buforze

pomiarowym. Następnie wykonywałam pomiar przyrostu intensywności fluorescencji w czasie.

19.3 Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w medium zewnątrzkomórkowym linii komórkowych ludzkich podocytów

W wykonywanych eksperymentach do studni pomiarowej dodawałam 20 μL medium zewnątrzkomórkowego*, 10 μL DMSO oraz 90 μL buforu pomiarowego. W pomiarze zastosowałam układy odniesienia o składzie: 20 μL medium zewnątrzkomórkowego oraz 100 μL mieszaniny zawierającej: 10 μL inhibitora TAPI-0 ($C_{\text{końcowe}} = 1 \mu\text{M}$) i 90 μL buforu pomiarowego. Dla każdego systemu przygotowałam po trzy powtórzenia. Płytkę inkubowałam 30 minut (w temperaturze 23°C), a następnie dodałam 80 μL mieszaniny zawierającej substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**) ($C_{\text{końcowe}} = 1,87 \times 10^{-5} \text{ M}$), oraz bufor. Następnie wykonywałam pomiar przyrostu intensywności fluorescencji w czasie.

* - Na etapie przygotowania próbek przeprowadziłam dodatkowe zagęszczenie analitów za pomocą probówek wirówkowych typu AMICON 3 kDa, firmy Milipore.

19.4 Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu szczurów z indukowaną cukrzycą

Doświadczenie przeprowadziłam na próbkach moczu szczurów rasy Wistar w wieku 7 tygodni. Próbki moczu otrzymano w ramach współpracy z prof. dr hab. Agnieszką Piwkowską z Pracowni Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK, PAN. Zwierzęta karmiono standardową dietą i hodowano w trybie 12 godz./12 godz. cyklu światło/ciemność. W eksperymencie wykorzystano mocz pochodzący od czterech samców szczurów, którym wykonywano iniekcję streptozotocyną [80 mg/kg] w celu eksperymentalnego wywołania cukrzycy u zwierząt (tzw. cukrzycy streptozotocynowej) Streptozotocyna jest inhibitorem replikacji DNA, który blokuje ekspresję w komórkach β -trzustki, przyczyniając się do ich dysfunkcji²¹³. W trzecim dniu po wykonanej iniekcji zbadano stężenie

glukozy we krwi które wynosiło >250 mg/dL, co potwierdziło obecność stanu cukrzycy u osobników. Dodatkowo pobierano materiał biologiczny od czterech samców szczurów kontrolnych, którym podczas iniekcji podawano bufor cytrynianowy.

Do płytki 96-dołkowej dodawałam 5 μL zagęszczonego moczu* oraz 115 μL buforu. Dla każdego systemu przygotowałam po trzy powtórzenia. W kolejnym etapie do każdej studni dodawałam substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**), ($C_{\text{końcowe}} = 1,87 \times 10^{-5} \text{ M}$), w buforze pomiarowym. Następnie wykonywałam pomiar przyrostu intensywności fluorescencji w czasie.

* z wykorzystaniem próbek wirówkowych typu AMICON 10 kDa, firmy Millipore

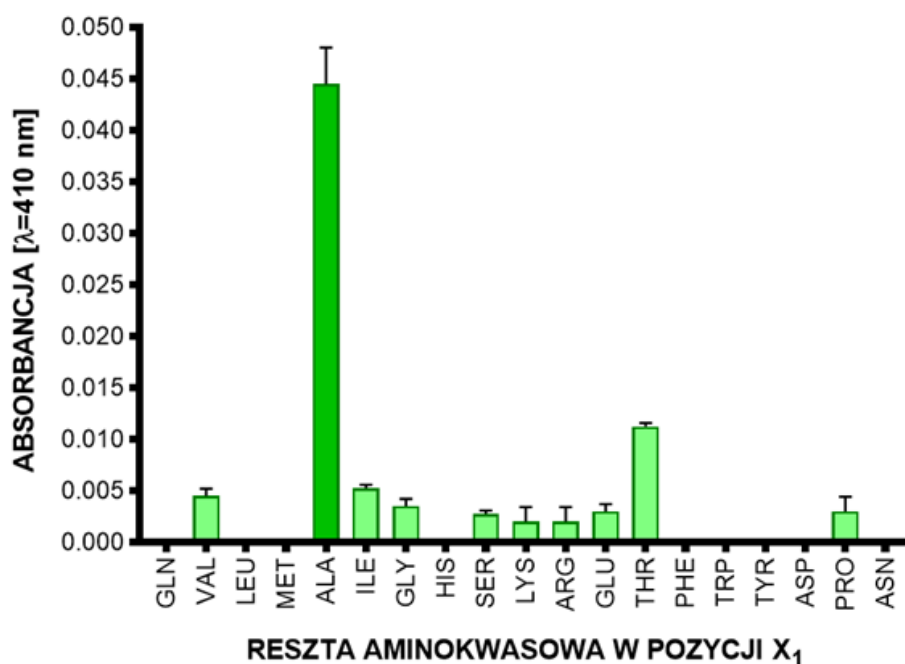
19.5 Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu pacjentów chorych na cukrzycę

Próbki moczu pochodzące od pacjentów chorych na cukrzycę oraz zdrowych ochotników, zostały pobrane w szpitalu miejskim im. Św. Wincentego a Paulo w Gdyni. Procedura została wykonana zgodnie z Deklaracją Helsińską Światowego Stowarzyszenia Lekarzy. W pierwszym eksperymencie wykonałam pomiar dla wszystkich próbek moczu (zdrowych ochotników i chorych pacjentów). Do dołka płytki 96-dołkowej wprowadziłam 80 μL moczu, 100 μL buforu oraz substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**) ($C_{\text{końcowe}} = 3,74 \times 10^{-5} \text{ M}$). W próbkach moczu pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą dodatkowo postanowiłam zahamować aktywność enzymu ADAM 17. Układy pomiarowe zawierały: 80 μL moczu, 90 μL buforu oraz inhibitor TAPI-0 ($C_{\text{końcowe}} = 1 \text{ }\mu\text{M}$). Próby odniesienia zamiast inhibitora zawierały DMSO. Dla każdego systemu przygotowałam po trzy powtórzenia. Po upływie inkubacji (30 minut) do każdej studni dodawałam substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**) ($C_{\text{końcowe}} = 3,74 \times 10^{-5} \text{ M}$).

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₁

Wyniki otrzymane w ramach realizacji punktu 1. *Określenie pierwszorzędowej specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₁*, rozdział Badania własne, przedstawiłam na rycinie 35.



Rycina 35. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₁ (wzór ogólny: ABZ-X₄-X₃-X₂-X₁-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Analizując otrzymane wyniki jednoznacznie określiłam, że podbiblioteka zawierająca w pozycji X₁ resztę aminokwasową alaniny, była najefektywniej hydrolizowana przez enzym ADAM 17. Podbiblioteka zawierająca resztę aminokwasową treoniny w badanej pozycji sekwencji, również ulegała hydrolizie, jednakże znacznie mniej wydajnie. W tabeli 15 zestawiono przykładowe substraty enzymu ADAM 17.

Tabela 15. Sekwencje substratów enzymu ADAM 17.

L.P.	SEKWENCJA SUBSTRATU																LIT.	
	P ₉	P ₈	P ₇	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '	P ₆ '	P ₇ '		P ₈ '
1			DABCYL	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Lys(5-FAM)-NH ₂			214	
2				Mca	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Dap(DNP)	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg-NH ₂	215	
3			5-FAM	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Lys	TAMRA	216
4			DABCYL	Pro	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	hPhe*	Thr	Ser	Pro	Lys(5-FAM)-NH ₂			217	
5					Mca	Lys	Pro	Leu	Gly	Leu	Dap(DNP)	Ala	Arg-NH ₂			218		
6			Mca	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Lys(DNP)-NH ₂	219	
7	Mca	Ser	Ser	Met	Ala	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Arg	Ser	Ser	Ser	Lys(DNP)-NH ₂		219	
8					ABZ	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Dap(DNP)	220	
9					ABZ	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Dap(DNP)	220	
10				DABCYL	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Arg	EDANS	221
11				DABCYL	Leu	Ala	Gln	Ala	hPhe*	Arg	Ser	Lys(5-FAM)-NH ₂			221			

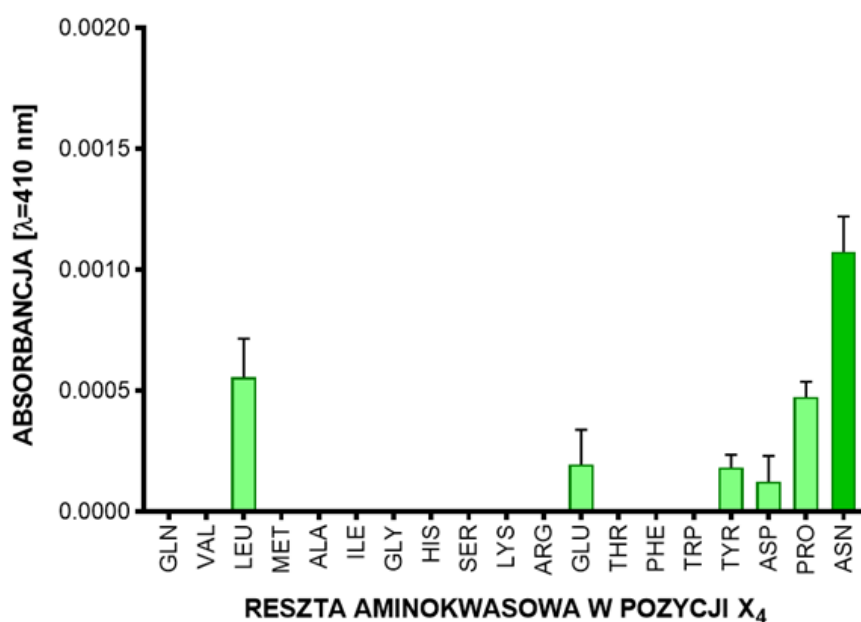
* - homofenyloalanina; kolorem zielonym oznaczono miejsce hydrolizy substratu pomiędzy resztami aminokwasowymi w pozycjach P₁-P₁'.

W pozycji P₁ sekwencji substratowych umieszczonych w tabeli 15 najczęściej występuje reszta aminokwasowa Ala (z wyjątkiem substratu 5: P₁ = Gly oraz substratu 7: P₁ = Thr).

Dane literaturowe są zgodne z otrzymanymi w moich eksperymentach, według których podbiblioteka z resztą aminokwasową alaniny w pozycji X₁, jest najefektywniej hydrolizowana.

2. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₄

W ramach realizacji punktu 2. *Określenie specyficzności substratowej enzymu ADAM 17 w pozycji X₄* rozdziału Badania własne, otrzymałam wyniki, które przedstawiłam na rycinie 36.



Rycina 36. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₄ (wzór ogólny: ABZ-X₄-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

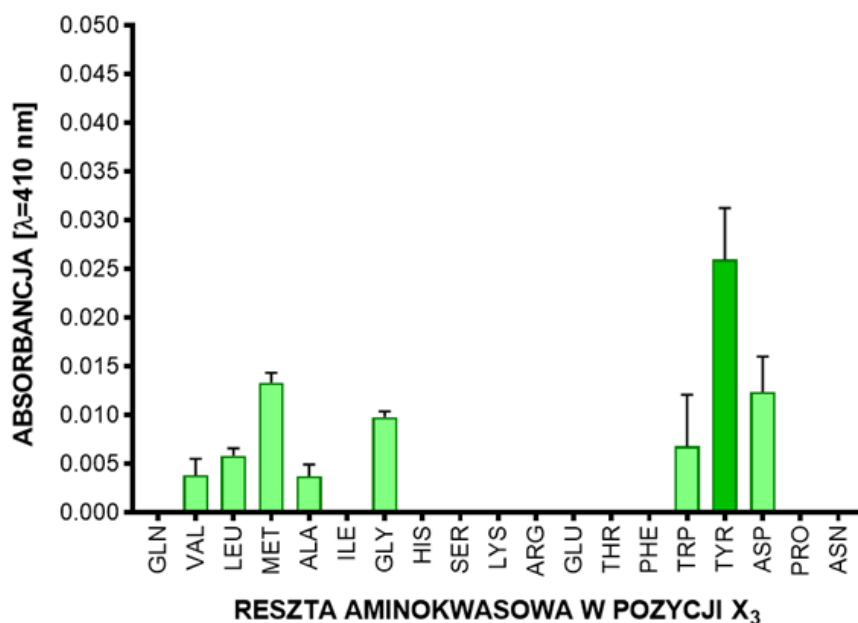
Na podstawie otrzymanych wyników ustaliłam, że podbiblioteka z resztą aminokwasową asparaginy najwydajniej ulega hydrolizie przez badany enzym.

Wydajnej hydrolizie enzymatycznej ulegały również podbiblioteki z resztami aminokwasowymi proliny oraz leucyny w pozycji X₄ (50% względem podbiblioteki z asparaginą).

W sekwencji aminokwasowej większości substratów umieszczonych w tabeli 15 w pozycji P₄ występuje Leu. W substratach 4, 5 oraz 7 obserwujemy odpowiednio: Arg, Lys lub Gln. Spośród wymienionych, wyłącznie podbiblioteka zawierająca resztę aminokwasową leucyny, znajdującą się w pozycji X₄ wydajnie ulegała hydrolizie przez enzym ADAM 17 w przeprowadzonym przez mnie eksperymencie.

3. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₃

Rycina 37 przedstawia wyniki otrzymane w ramach realizacji punktu 4. *Dekonwolucja tetrapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂*, rozdziału Badanie własne.



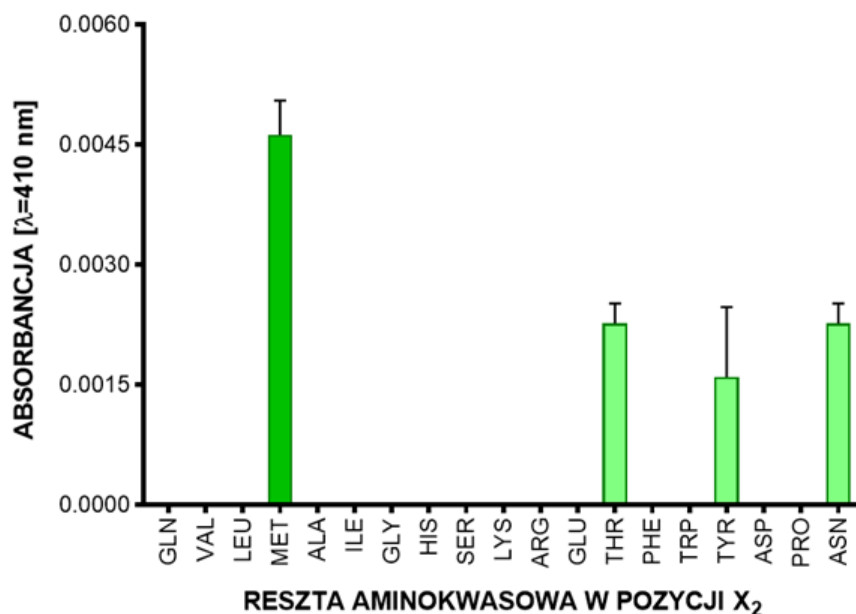
Rycina 37. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₃ (wzór ogólny: ABZ-Asn-X₃-X₂-Ala-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Wysokie wartości przyrostu absorbancji w czasie obserwowałam dla podbibliotek zawierających w pozycji X₃ reszty aminokwasowe metioniny, kwasu asparaginowego oraz tyrozyny. Najwyższą wartość przyrostu absorbancji obserwowałam dla podbiblioteki o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂).

Analizując dane w tabeli 15 można zauważyć, że w pozycji P₃ substratu najczęściej obecna jest reszta aminokwasowa alaniny. Wyjątek stanowiły substraty 5 oraz 7, które w wybranej pozycji miały reszty aminokwasowe odpowiednio proliny oraz treoniny. W wykonanym przeze mnie eksperymencie dla podbiblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Ala-X₂-Ala-ANB-NH₂ obserwowałam przyrost absorbancji w czasie, jednak był on znacznie niższy niż otrzymany dla innych podbibliotek. W dekonwolucji biblioteki kierowałam się najwyższą wartością przyrostu absorbancji w czasie, dlatego do dalszych badań w pozycji X₃ wybrałam resztę aminokwasową tyrozyny.

4. Dekonwolucja dziewiętnastu związków ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₂

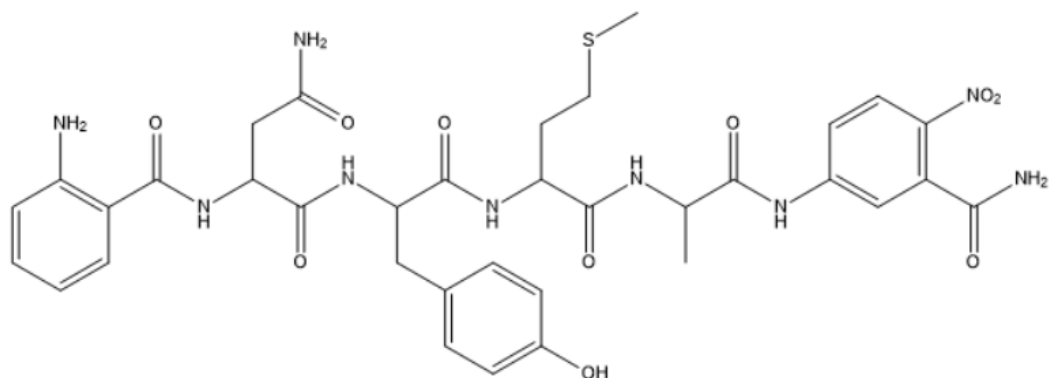
Wyniki eksperymentu opisanego w punkcie 6. *Dekonwolucja pozycji X₂ 19 związków o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂*, rozdziału Badania własne przedstawiłam na rycinie 38.



Rycina 38. Dekonwolucja dziewiętnastu związków ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₂ (wzór ogólny: ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Spośród 19 związków proteolizie ulegały wyłącznie te, które zawierały reszty aminokwasowe metioniny, treoniny, tyrozyny lub asparaginy w pozycji X₂, ulegały proteolizie.

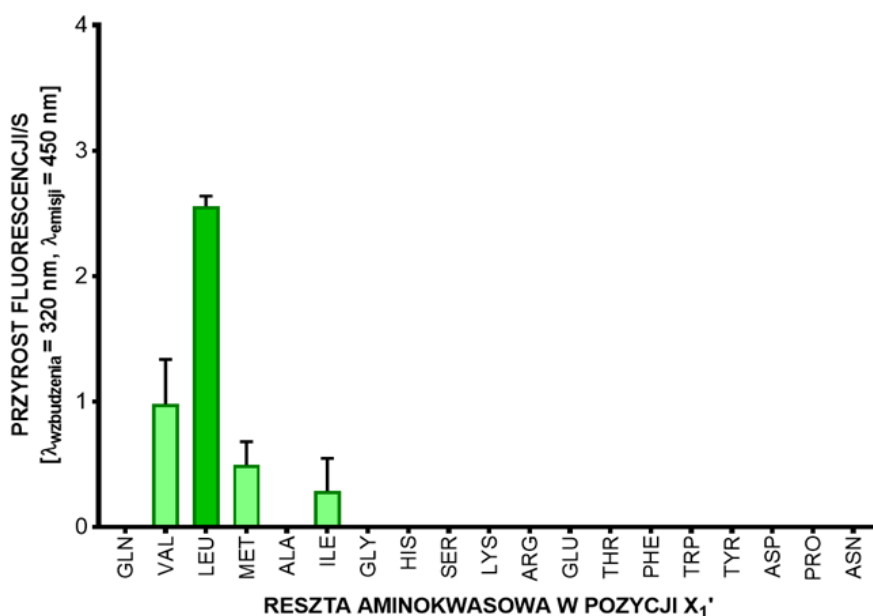
Analiza informacji zamieszczonych w tabeli 15 wskazuje, że w pozycji P₂ dotychczas opracowanych substratów fluorogenicznych najczęściej występuje reszta aminokwasowa glutaminy. Wyjątek stanowią substraty 4, 5 oraz 7, w których pojawiają się alanina oraz leucyna. Do dalszych etapów badań wybrałam związek o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-ANB-NH₂ (Rycina 39).



Rycina 39. Struktura substratu o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-ANB-NH₂.

5. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₁'

Rycina 40 prezentuje wyniki otrzymane w ramach realizacji punktu 8. Dekonwolucja pozycji X₁' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂, rozdziału Badania własne.



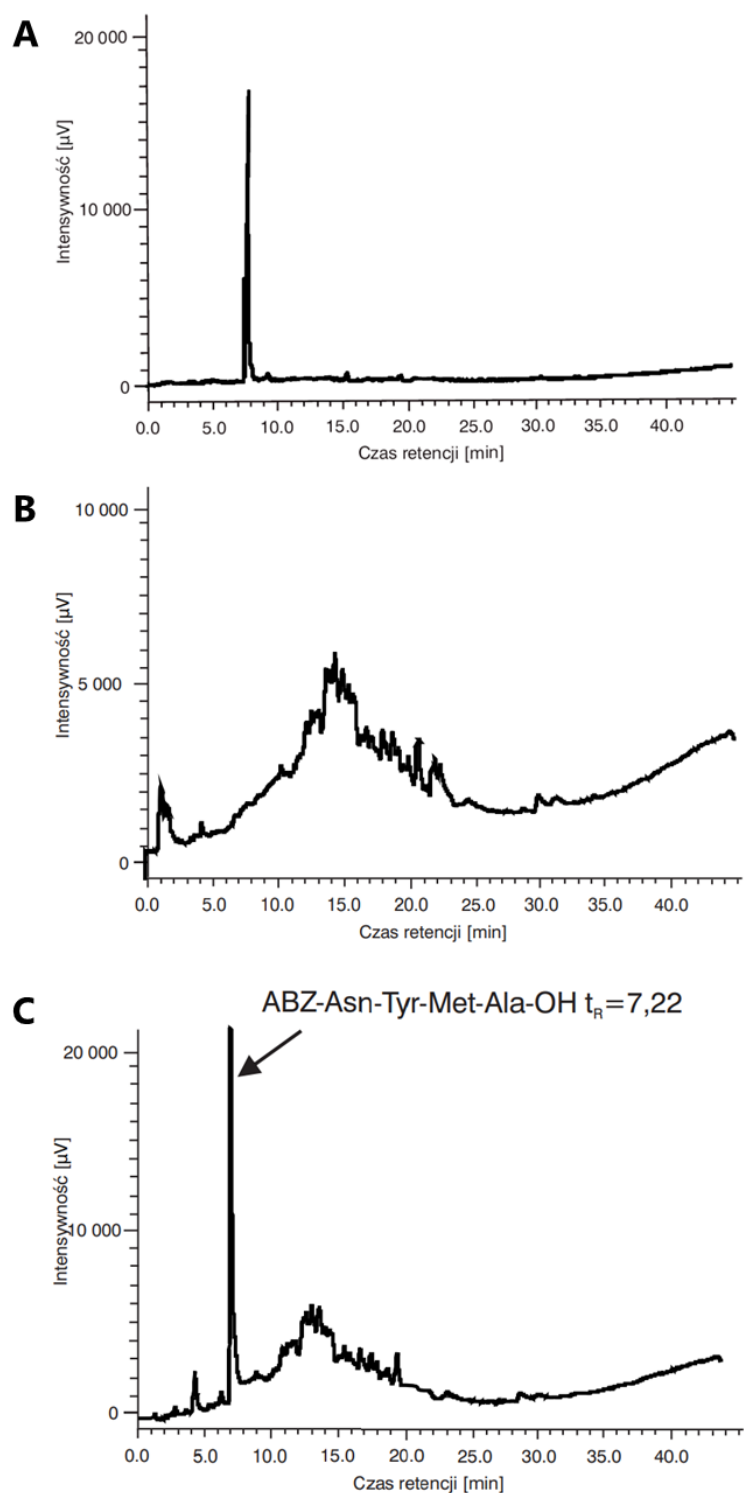
Rycina 40. Dekonwolucja pozycji X₁' dziewiętnastu podbibliotek o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-X₁'-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Tylko podbiblioteki zawierające w pozycji X₁' reszty aminokwasowe waliny, leucyny, metioniny oraz izoleucyny ulegały proteolizie. Najwydajniejsza hydroliza zachodziła dla podbiblioteki zawierającej resztę aminokwasową leucyny.

W pozycji P₁' sekwencji substratowych zamieszczonych w tabeli 15 najczęściej występują reszty aminokwasowe leucyny oraz waliny, natomiast w substratach 4 oraz 11 w omawianej pozycji znajduje się homofenyloalanina. Grupa badawcza G. Jin w 2002 roku, przeprowadziła analizę wpływu reszt aminokwasowych w pozycjach P₁ oraz P₁' na wydajność proteolityczną enzymu ADAM 17. Szczególnie dwa substraty o sekwencjach: ABZ-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Dap(DNP) oraz ABZ-Leu-Ala-Gln-Ala-Leu-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Dap(DNP) ulegały proteolizie, odpowiednio w 90% i 92%²²⁰. Wyniki te korelują z wykresem dekonwolucji przedstawionym na rycinie 40.

6. Analiza podbiblioteki o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

W celu potwierdzenia miejsca hydrolizy enzymatycznej pomiędzy resztami aminokwasowymi Ala-Leu (odpowiednio pozycje P₁-P₁'), wykonałam analizy z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wyniki porównałam z próbą kontrolną. Otrzymane chromatogramy zamieściłam na rycinie 41.



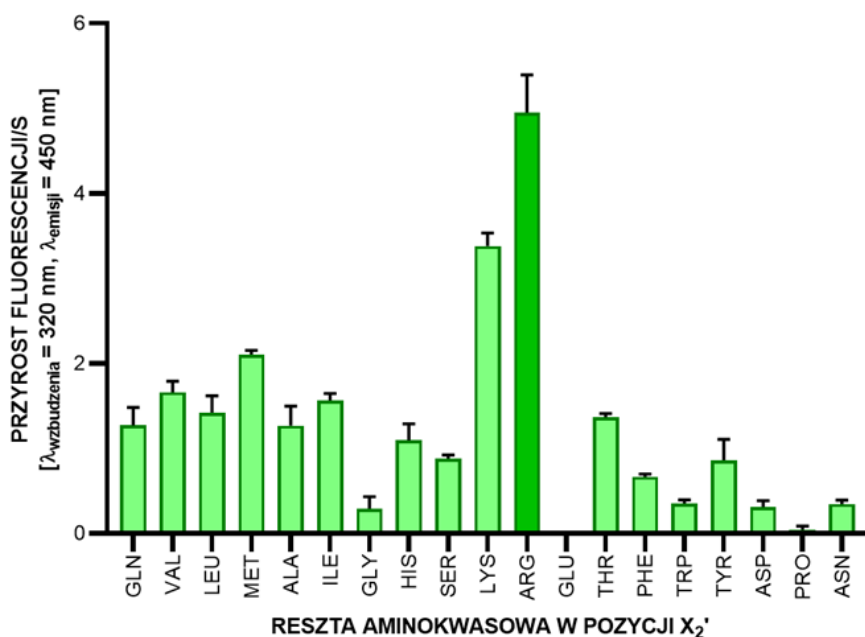
Rycina 41. Chromatogramy HPLC A) próba kontrolna: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH; B) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w buforze z Brij-35 (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μM chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C); C) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ po inkubacji z enzymem ADAM 17.

W danych otrzymanych z przeprowadzonej dekonwolucji największy przyrost intensywności fluorescencji w czasie obserwowałam dla podbiblioteki zawierającej resztę aminokwasową leucyny. Analiza HPLC podbiblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂, inkubowanej w obecności enzymu ADAM 17 potwierdziła hydrolizę zachodzącą pomiędzy resztami aminokwasowymi w pozycjach P₁-P₁'. Na podstawie otrzymanych wyników wybrałam resztę aminokwasową leucyny do dalszych etapów badań.

Na podstawie otrzymanych wyników jednoznacznie wskazałam podbibliotekę zawierającą w pozycji X₁' resztę aminokwasową leucyny jako najefektywniej hydrolizowaną. Udział w tworzeniu kompleksu enzym-substrat mają łańcuchy boczne reszt aminokwasowych, tworzących oddziaływania z kieszeniami enzymu. Badania przeprowadzone przez U. Neumann wraz ze współpracownikami, polegały na optymalizacji sekwencji znanego w literaturze substratu fluorogenicznego (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(DNP)-Ala-Arg-NH₂), który został opracowany w 1992 roku przez grupę badawczą C. G. Knight²²². W wyniku przeprowadzonych badań zespół otrzymał substrat o sekwencji: Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(DNP)-Ala-Arg-NH₂, który był wydajnie hydrolizowany przez enzym ADAM 17 pomiędzy resztami aminokwasowymi glicyny oraz leucyny. Dodatkowo autorzy przeprowadzili badania z wykorzystaniem dwóch dodatkowych substratów o sekwencjach: Mca-Pro-Leu-Gln-Ala-Val-Dpa-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂, oraz Dabcyl-Leu-Gln-Ala-Val-Dpa-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-EDANS, w których hydroliza wiązania peptydowego zachodziła pomiędzy resztami aminokwasowymi alaniny oraz waliny²²³. Substraty wydajnie hydrolizowane przez enzym ADAM 17 zawierają w pozycji X₁' resztę aminokwasową o niepolarnym i alifatycznym łańcuchu bocznym.

7. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₂'

Wyniki otrzymane w ramach realizacji punktu 11. *Dekonwolucja pozycji X₂' heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂* rozdziału Badania własne zostały przedstawione na rycinie 42.



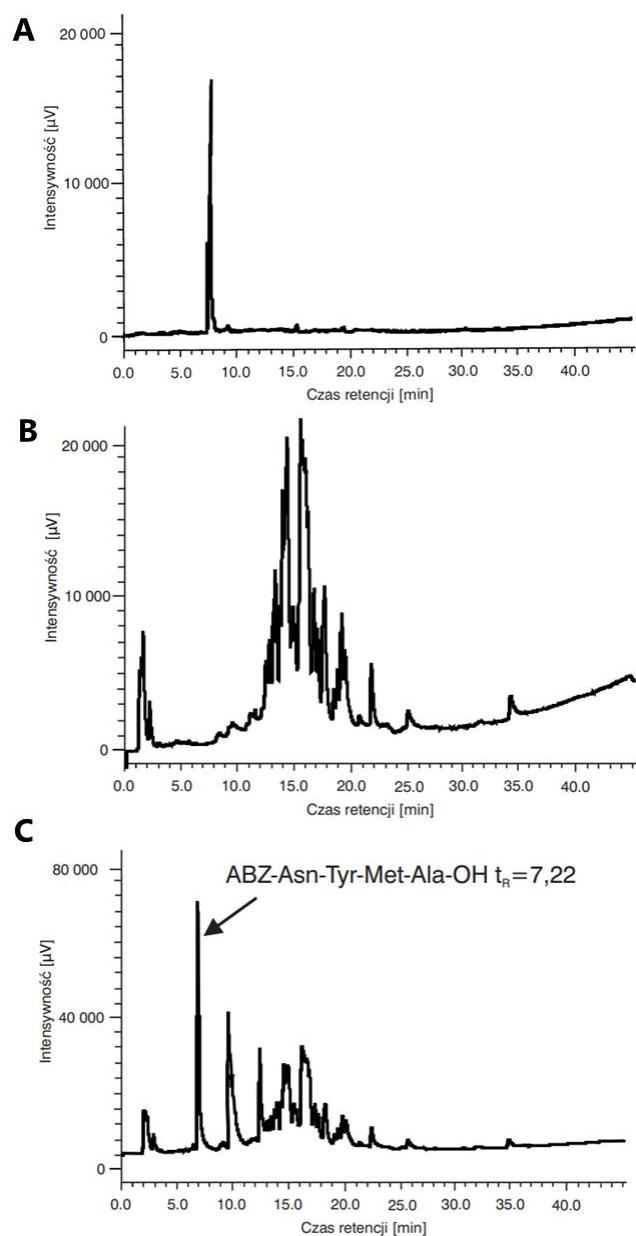
Rycina 42. Dekonwolucja pozycji X₂' biblioteki peptydowej o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Podbiblioteki zawierające w pozycji X₂' zasadowe reszty aminokwasowe lizyny lub argininy najwydajniej ulegały proteolizie. Pozostałe badane podbiblioteki (z wyjątkiem sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Glu-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂) ulegały częściowej hydrolizie. Reszta aminokwasowa argininy najczęściej powtarza się w pozycji X₂' substratów przedstawionych w tabeli 15. Substraty 2 oraz 5 w omawianej pozycji zawierają resztę Dap(DNP), natomiast substrat 4 – resztę aminokwasową treoniny.

Grupa badawcza C. I. Caescu w 2010 roku przeprowadziła dekonwolucję biblioteki o wzorze ogólnym: Ac-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-NH₂ (gdzie X – równomolowa mieszanina dziewiętnastu reszt aminokwasowych z wyjątkiem cysteiny). Biblioteka została zsyntezowana metodą skaningu pozycyjnego. Podbiblioteki zawierające w pozycji P₂' reszty aminokwasowe Lys, Val lub Ile najwydajniej ulegały proteolizie²²⁴. Z kolei w badaniach przeprowadzonych w 2005 roku, przez grupę badawczą M. H. Lambert analizowano wpływ kombinacji reszt aminokwasowych w pozycjach P₁'-P₂' na aktywność enzymu ADAM 17. Wyjściowa sekwencja: Biotyna-Leu-Ala-Gln-Ala-P₁'-P₂'-Ser-Ser-Lys(DNP)-NH₂ stanowiła fragment naturalnego substratu badanego enzymu - TNF- α . Zaprojektowana biblioteka zawierała w pozycjach P₁'-P₂' aminokwasy białkowe i niebiałkowe (odpowiednio 50 i 20 zmiennych), które wyselekcjonowano z wykorzystaniem metod modelowania molekularnego. Następnie najbardziej obiecujące związki zsyntezowano i poddano inkubacji z enzymem ADAM 17. Do analizy jakościowej oraz ilościowej produktów reakcji enzymatycznej wykorzystano metodę LC-MS. W rezultacie najlepsze oddziaływanie enzym-substrat obserwowano dla kombinacji zawierającej zasadowe reszty aminokwasów białkowych w pozycji P₂'. Zdecydowanie najefektywniejszą parą reszt aminokwasowych okazała się Leu-Arg (odpowiednio P₁'-P₂')²²⁵.

8. Analiza podbiblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Analogicznie do punktu 6. *Analiza podbiblioteki o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, przeprowadziłam analizę HPLC dla podbiblioteki o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂, a jej wyniki zamieściłam na rycinie 43.

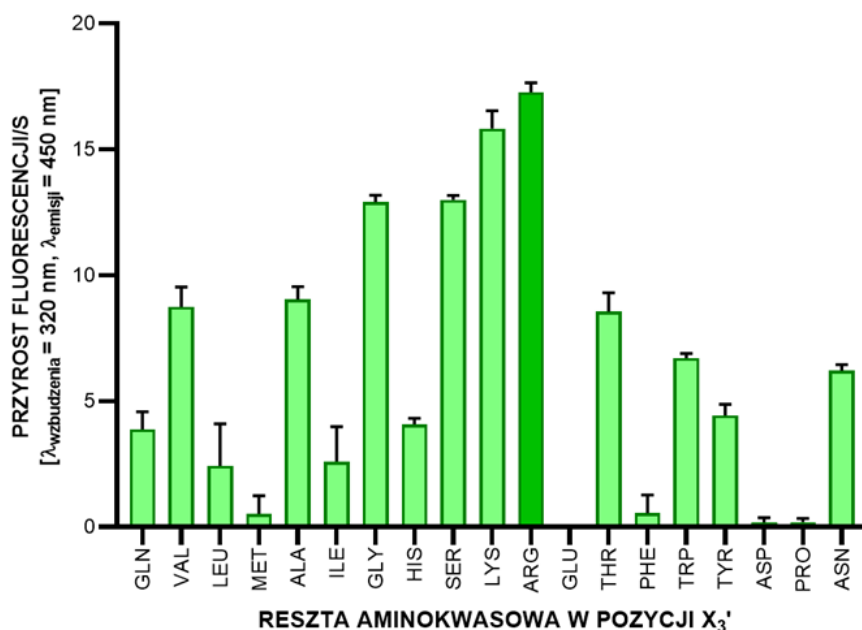


Rycina 43. Chromatogramy HPLC A) próba kontrolna: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH; B) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w buforze z Brij-35 (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μ M chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C); C) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ po inkubacji z enzymem ADAM 17.

W wyniku przeprowadzonej hydrolizy enzymatycznej obserwowałam na chromatogramach HPLC uwalnianie fragmentu fluorescencyjnego o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH, $t_R = 7,22$ minuty. Do dalszych etapów syntezy wybrałam resztę aminokwasową arginy.

9. Dekonwolucja dziewiętnastu związków ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X₃'

Przedstawione na rycinie 44 wyniki otrzymane zostały w ramach realizacji badań opisanych w punkcie 13. *Dekonwolucja pozycji X₃' w związkach o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂*, rozdziału Badania własne.

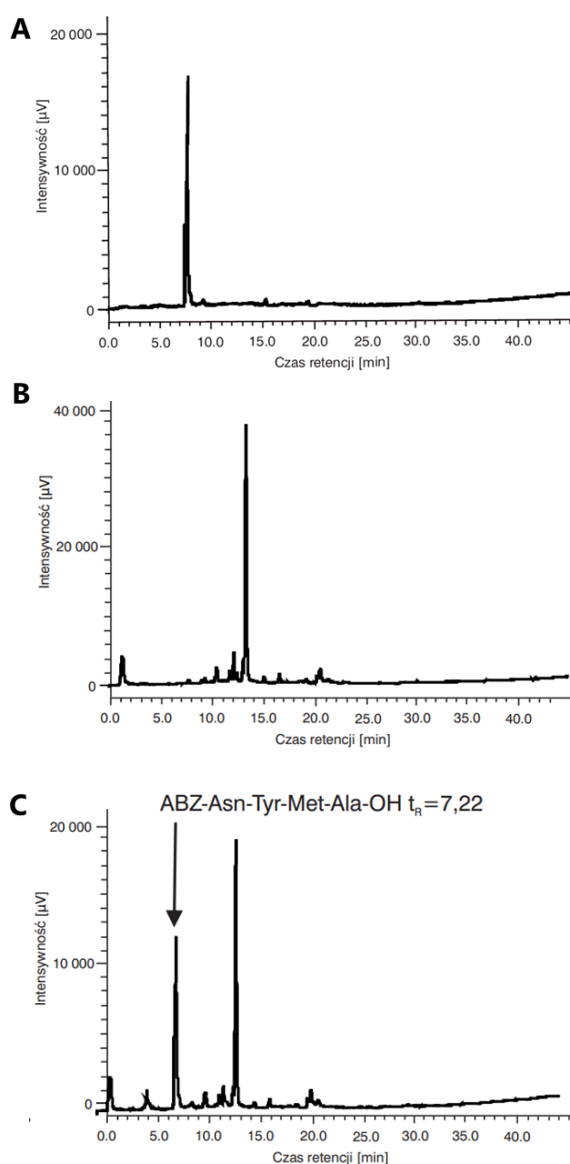


Rycina 44. Dekonwolucja pozycji X₃' związków o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Najwyższą aktywność enzymatyczną obserwowałam wobec substratów zawierających w pozycji X₃' następujące reszty aminokwasowe: Arg>Lys>Ser=Gly. Pozostałe związki (z wyjątkiem: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Glu-Tyr(3-NO₂)-NH₂), również ulegały proteolizie, jednak w znacznie mniejszym stopniu. W sekwencjach substratów zebranych w tabeli 15 w pozycji P₃' występują reszty aminokwasowe seryny (substraty: 1, 3, 4, 6-11), arginy (substrat 2) oraz alaniny (substrat 5).

10. Analiza związku o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

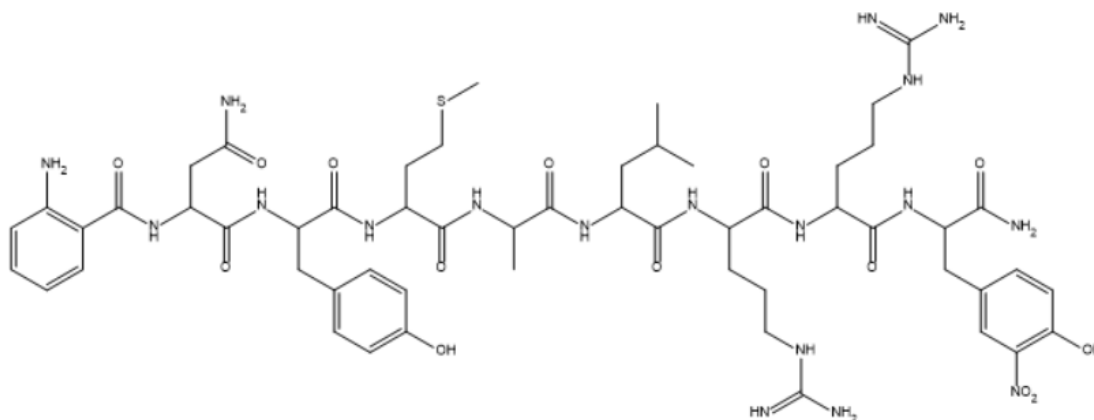
Analogicznie do punktu 6 wykonałam analizę HPLC związku o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (Rycina 45).



Rycina 45. Chromatogramy HPLC A) próba kontrolna: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w buforze z Brij-35 (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μM chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C); C) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ po inkubacji z enzymem ADAM 17.

Chromatogramy zamieszczone na rycinie 45 potwierdzają miejsce hydrolizy w substracie o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂, pomiędzy resztami aminokwasowymi Ala-Leu (odpowiednio P₁-P₁').

W wyniku dekonwolucji pozycji X₃' wyselekcjonowałam substrat o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (Rycina 46).



Rycina 46. Struktura wyselekcjonowanego substratu o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Znanych jest wiele naturalnych substratów enzymu ADAM 17, których sekwencję w pozycjach P₄-P₃' przedstawiłam w tabeli 16.

Tabela 16. Zestawienie sekwencji substratów syntetycznych (1-11) oraz naturalnych (12-26) enzymu ADAM 17, zestawione z sekwencją wyselekcjonowanego w ramach niniejszej pracy substratu fluorogenicznego (27).

L.P.	Substrat enzymu ADAM 17	Reszta aminokwasowa w wyznaczonej pozycji						
		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
1	Dabcył-Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Lys(5-FAM)-NH ₂	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser
2	Mca-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(DNP)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH ₂	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Dap(DNP)	Arg
3	5-FAM-Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys-TAMRA	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser
4	Dabcył-Pro-Arg-Ala-Ala-Ala-hPhe-Thr-Ser-Pro-Lys(5-FAM)-NH ₂	Arg	Ala	Ala	Ala	hPhe	Thr	Ser
5	Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(DNP)-Ala-Arg-NH ₂	Lys	Pro	Leu	Gly	Leu	Dap(DNP)	Ala
6	Mca-Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys(DNP)-NH ₂	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser
7	Mca-Ser-Ser-Met-Ala-Gln-Thr-Leu-Thr-Leu-Arg-Ser-Ser-Ser-Lys(DNP)-NH ₂	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Arg	Ser
8	ABZ-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Dap(DNP)	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser
9	ABZ-Leu-Ala-Gln-Ala-Leu-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Dap(DNP)	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Arg	Ser
10	Dabcył-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Ala-Arg-EDANS	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser
11	Dabcył-Leu-Ala-Gln-Ala-hPhe-Arg-Ser-Lys(5-FAM)-NH ₂	Leu	Ala	Gln	Ala	hPhe	Arg	Ser
12	TNF- α	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser
13	TGF- α^*	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ser

14	TGF- α^*	Asp	Leu	Leu	Ala	Val	Val	Ala
15	IL-6R	Leu	Pro	Val	Gln	Asp	Ser	Ser
16	HB-EGF	Leu	Thr	Leu	Pro	Val	Glu	Ans
17	Notch 1	Lys	Ile	Glu	Ala	Val	Lys	Ser
18	Kolagen XVII	Glu	Lys	Asp	Arg	Leu	Gln	Gly
19	L-selektyna	Glu	Thr	Asn	Arg	Ser	Phe	Ser
20	GHRH	Gln	Met	Ser	Pro	Phe	Thr	Cys
21	Glikoproteina wirusa Ebola	Thr	Ile	Pro	Asp	Gln	Gly	Asp
22	PTPRZ	Ile	Ala	Glu	Glu	Ile	Glu	Ser
23	APP	His	His	Gln	Lys	Ile	Val	Phe
24	Białko prionowe*	Asn	Met	Lys	His	Met	Ala	Gly
25	Białko prionowe*	Thr	Asn	Met	Lys	His	Met	Ala
26	PMEL-17	Val	Ser	Thr	Gln	Ile	Ile	Met
27	WYSELEKCYJONOWANY SUBSTRAT	Asn	Tyr	Met	Ala	Leu	Arg	Arg

* - związki z dwoma miejscami hydrolizy

Kluczowymi czynnikami stabilizującymi oddziaływanie enzym-substrat są reszty aminokwasowe zarówno substratu białkowego jak i enzymu, znajdujące się w pobliżu centrum katalitycznego proteiny.

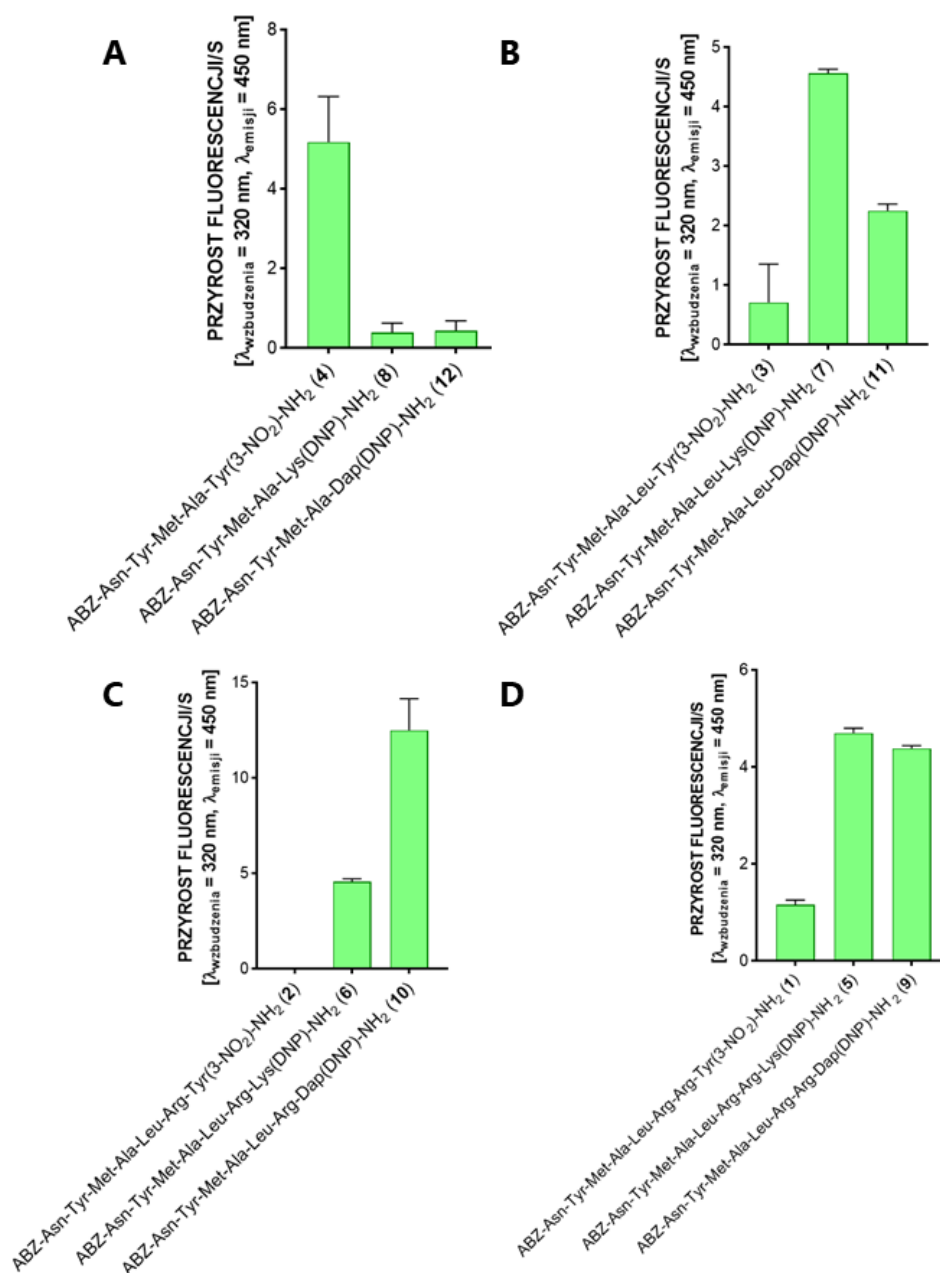
Sekwencje substratów 1-11 zostały wywiedzione z naturalnego substratu enzymu ADAM 17 – TNF- α . Dla wielu z nich reszty aminokwasowe powtarzają się w wybranych pozycjach. Znaczące modyfikacje występują tylko w substratach **4**, **5** oraz **7**. W substratach białkowych obserwujemy zdecydowanie mniejszą selektywność substratową enzymu ADAM 17. Wymagania strukturalne enzymu ADAM 17 w pozycjach P₄-P₁ substratów białkowych są bardzo zróżnicowane. W konkretnej pozycji tego fragmentu występują reszty aminokwasowe zarówno hydrofobowe jak i hydrofilowe a często nawet o różnym charakterze (kwasowym oraz zasadowym). Brak ściśle określonego charakteru reszt aminokwasowych w pozycjach P₄-P₁ naturalnych substratów utrudnia projektowanie substratów syntetycznych.

Natomiast w pozycji P₁' białkowych substratów enzymu bardzo często występują alifatyczne reszty aminokwasowe, co znalazło potwierdzenie podczas dekonwolucji pozycji X₁' (rycina 40). W wyniku dekonwolucji biblioteki ze znaną pozycją X₂' (Rycina 42) najwydajniej hydrolizie ulegały podbiblioteki: P₂' = Arg, Lys, Val lub Met. Wymienione reszty aminokwasowe występują w substratach 1, 3, 6-14, 17, 23 oraz 25. W pozycji X₃' w większości wymienionych w tabeli 15 substratów występują polarne reszty aminokwasowe, co koreluje z wynikami dekonwolucji (P₃' = Arg, Lys lub Ser), zamieszczonymi na rycinie 44.

11. Ocena wydajności hydrolizy pochodnych substratu fluorogenicznego w obecności enzymu ADAM 17

W wyniku realizacji punktu 14. *Ocena wydajności hydrolizy modyfikowanych substratów fluorogenicznych* rozdziału *Badania własne*, otrzymałam wyniki przedstawione na rycinie 47. Stężenie enzymu ADAM 17

zostało dobrane odpowiednio do długości łańcucha peptydowego substratów i zostało zestawione w tabeli 12 w części Badania własne.



Rycina 47. Wpływ modyfikacji substratu fluorogenicznego w obrębie C-końca na aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Spośród substratów zawierających cztery reszty aminokwasowe w sekwencji (4, 8 oraz 12), najwyższy stopień hydrolizy obserwowałam dla tego, który w C-końcowym fragmencie posiadał Tyr(3-NO₂) (Rycina 47 A). Pozostałe

związki z tej grupy ulegały proteolizie znacznie mniej wydajnie. Wprowadzenie do sekwencji dodatkowej reszty aminokwasowej na C-końcu substratu całkowicie zmieniło tę zależność (substraty **3**, **7** oraz **11**). Najefektywniej hydrolizie ulegał substrat zawierający Lys(DNP), następnie Dap(DNP) a najmniejszą wydajność obserwowałam dla Tyr(3-NO₂) (Rycina 47 B). W grupie substratów zawierających sześć reszt aminokwasowych (**2**, **6** oraz **10**) w sekwencji najwyższy stopień hydrolizy odnotowałam dla Dap(DNP), znacznie niższy dla Lys(DNP) a substrat zawierający Tyr(3-NO₂) nie ulegał hydrolizie (Rycina 47 C). Dla substratów **1**, **5** oraz **9** efektywna hydroliza zachodziła dla związków zawierających Dap(DNP) lub Lys(DNP). Z kolei substrat zawierający Tyr(3-NO₂) ulegał hydrolizie w niewielkim stopniu w stosunku do pozostałych związków (Rycina 47 D). Zmiany w obrębie C-końca substratu, obejmujące zarówno długość fragmentu peptydowego jak i akceptor fluorescencji, mają znaczący wpływ na oddziaływanie enzym-substrat, co przekłada się na obserwowaną aktywność enzymatyczną.

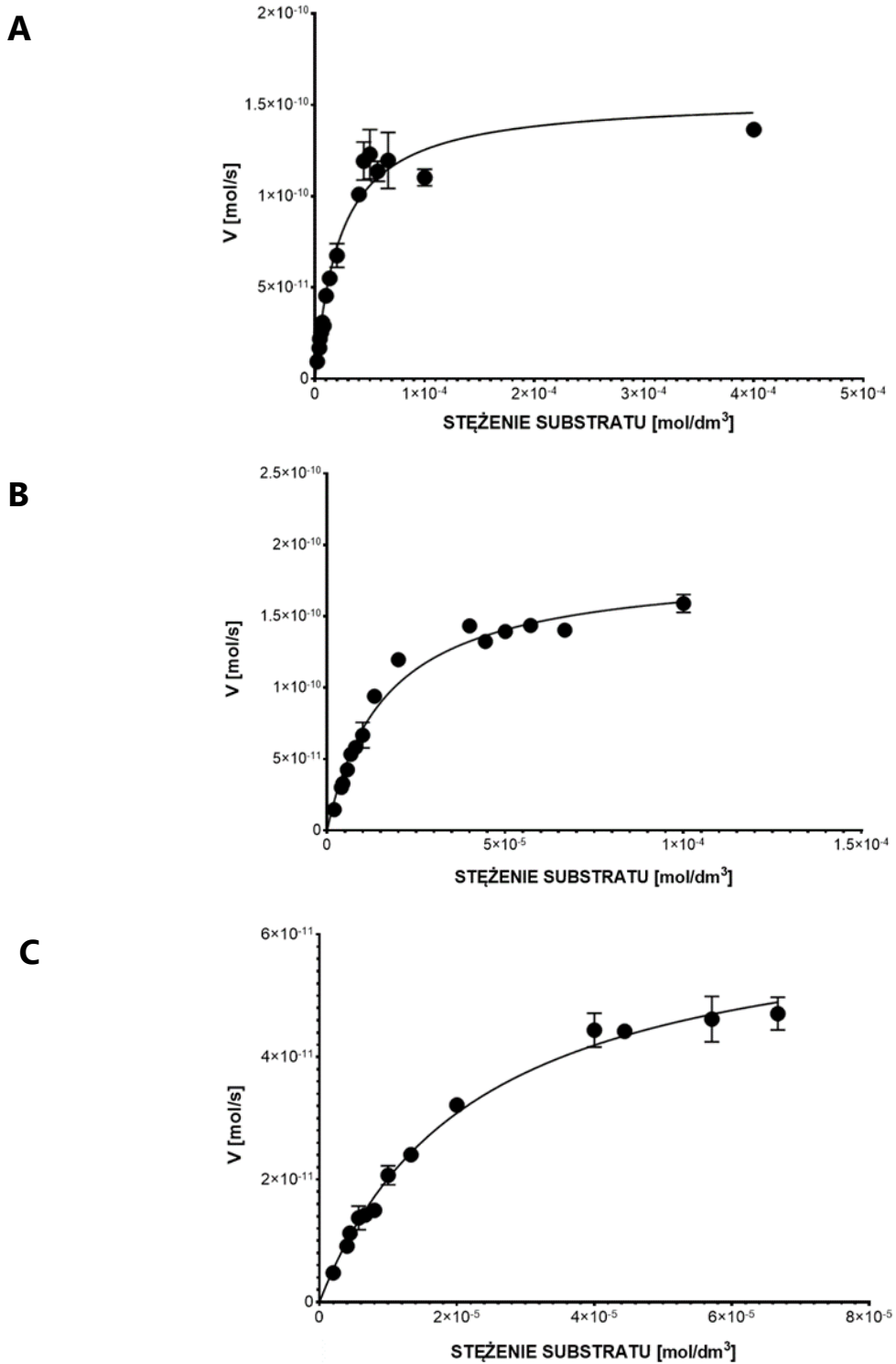
Poniżej przedstawiłam sekwencje najwydajniej hydrolizowanych związków:

- ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**)
- ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**)
- ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Dap(DNP)-NH₂ (**9**)

12. Parametry kinetyczne wybranych substratów

Wyznaczanie parametrów kinetycznych zostało podzielone na trzy etapy i wykonane zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 16. *Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla substratów 1, 5 oraz 9* części Badania własne.

Otrzymane wartości po przeliczeniu początkowych szybkości reakcji hydrolizy substratów wyrażonych w jednostkach [intensywność fluorescencji/s] na jednostki [mol/s] wykorzystałam do wykreślenia krzywych Michaelisa-Menten zaprezentowanych na rycinie 48.



Rycina 48. Wykresy krzywych Michaelisa-Menten dla substratów: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**); B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**); C) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Dap(DNP)-NH₂ (**9**). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczyłam parametry kinetyczne: V_{MAX} , K_M , k_{cat} oraz k_{cat}/K_M . Otrzymane wyniki zostały zestawione w tabeli 17.

Tabela 17. Parametry kinetyczne substratów.

NUMER SUBSTRATU	V_{max} [mol \times s $^{-1}$] $\times 10^{-10}$	K_M [μ M]	k_{cat} [s $^{-1}$]	k_{cat}/K_M [M $^{-1}$ \times s $^{-1}$] $\times 10^3$
1	1,540 \pm 0,054	22,670 \pm 2,196	0,096 \pm 0,003	4,245 \pm 0,028
5	1,859 \pm 0,045	16,120 \pm 1,119	0,577 \pm 0,014	35,794 \pm 0,016
9	0,654 \pm 0,017	22,350 \pm 1,393	0,203 \pm 0,005	9,082 \pm 0,034

Kolorem zielonym oznaczono parametry kinetyczne substratu o najwyższej stałej specyficzności.

Substrat 5 o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ o stałej specyficzności $k_{cat}/K_M = 35\,794 \pm 16\text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, był najwydajniej hydrolizowany przez enzym ADAM 17.

Parametry kinetyczne znanych substratów enzymu ADAM 17 opublikowane przez szereg grup badawczych przedstawiłam w tabeli 18²²¹.

Tabela 18. Wartości stałych specyficzności substratów wyznaczonych wobec enzymu ADAM 17.

SEKWENCJA SUBSTRATU FLUOROGENICZNEGO	k_{cat}/K_M [M $^{-1}$ \times s $^{-1}$]	Lit.
Mca-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(DNP)-Arg-Ser-Ser-Ser-Ala-Arg-NH ₂	363 800	215
Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(DNP)-Ala-Arg-NH ₂	778 400	218
Mca-Ser-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Lys(DNP)-NH ₂	3 500	219
Mca-Ser-Ser-Met-Ala-Gln-Thr-Leu-Thr-Leu-Arg-Ser-Ser-Ser-Lys(DNP)-NH ₂	130 000	219
Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Ser-Ala-Arg-EDANS	466 300	221
Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-hPhe*-Arg-Ser-Lys(5-FAM)-NH ₂	430 000	221
Dabcyl-Pro-Cha**-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(5-FAM)-NH ₂	6 800	221
ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH ₂	35 794	-

* - hPhe - homofenyloalanina ** - Cha - cykloheksyloalanina

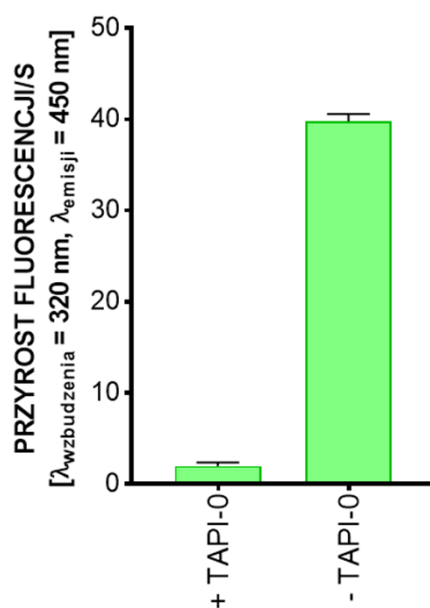
Wyższe wartości stałej specyficzności, oznaczają wydajniejszą hydrolizę danego substratu. Stała k_{cat}/K_M otrzymana dla substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-

Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**) jest o rząd wielkości niższa od pozostałych omawianych związków. Należy jednak zwrócić uwagę, że w substratach tych występują inne pary donor-akceptor, co ma wpływ na omawianą wartość. Parametry kinetyczne wyznaczone dla substratów (**1**), (**5**) i (**9**), (różnią się wyłącznie akceptorem fluorescencji) potwierdzają zmianę wartości stałej k_{cat}/K_M nawet o rząd wielkości.

Wysoka wartość stałej specyficzności nie jest parametrem krytycznym w wyborze substratu do potencjalnego zastosowania jako marker enzymu. Bardzo istotna jest jego selektywność, wobec pozostałych enzymów proteolitycznych. Badania przeprowadzone przez grupę U. Neumann wykazały, że substrat o sekwencji Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(DNP)-Ala-Arg-NH₂, wykazujący najwyższą wartość stałej specyficzności dla ADAM 17 spośród przytoczonych, charakteryzuje się bardzo niską selektywnością. W opracowaniu tym przedstawiono wysokie wartości tej stałej względem wielu przedstawicieli enzymów z rodziny MMP. Na szczególną uwagę zasługują enzymy MMP-13 oraz MMP-14, wobec których wyznaczona stała specyficzności substratu była wyższa niż w obecności enzymu ADAM 17²²³. Z kolei w opracowaniu przygotowanym przez G. B. Fields określono selektywność substratów fluorogenicznych wykorzystywanych do oceny aktywności proteolitycznej wybranych enzymów z rodzin MMP oraz ADAM. Substrat o sekwencji Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-hPhe-Arg-Ser-Lys(5-FAM)-NH₂ był wydajnie hydrolizowany przez szereg enzymów: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13, ADAM 8 oraz ADAM 10, co świadczy o jego bardzo niskiej selektywności²²¹.

13. Wyniki badania wpływu inhibitora TAPI-0 na aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17

Wyniki otrzymane w ramach realizacji punktu 17. *Hamowanie aktywności enzymu ADAM 17 inhibitorem TAPI-0*, rozdziału Badania własne przedstawiłam na rycinie 49.

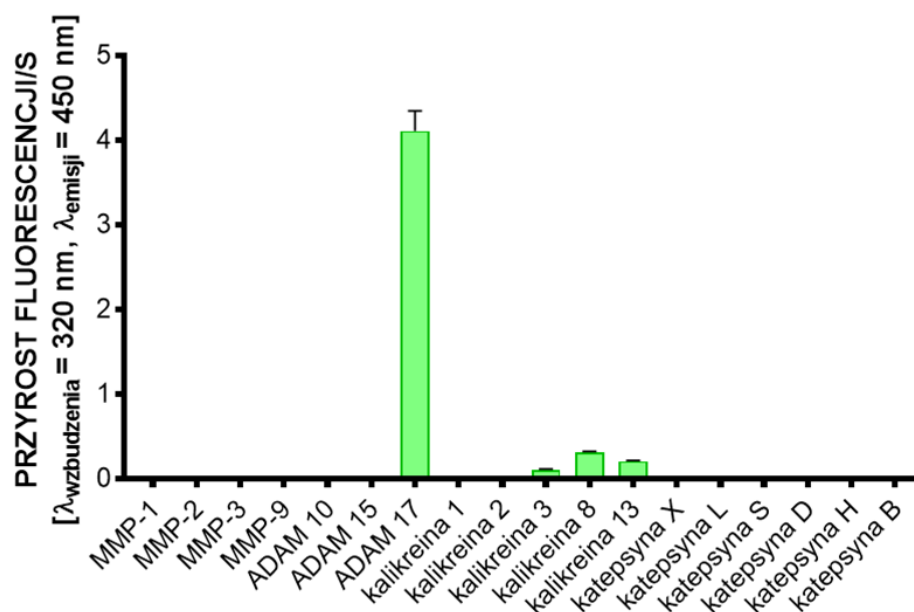


Rycina 49. Hamowanie aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 przez inhibitor TAPI-0. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Otrzymane wyniki potwierdziły skuteczną inhibicję enzymu ADAM 17 przez inhibitor TAPI-0. Aktywność proteolityczna została zahamowana w 95% w odniesieniu do próby kontrolnej zawierającej takie samo stężenie enzymu. Wynik ten koreluje z badaniami grupy E. J. Lee z roku 2014, podczas których przetestowano skuteczność czterech różnych inhibitorów metaloproteaz (TAPI-0, NNGH, M8I oraz M9I), wobec enzymu ADAM 17. Inhibitor TAPI-0 efektywnie hamował aktywność enzymu ADAM 17 przy stężeniu 1×10^{-7} M²²⁶.

14. Ocena selektywności substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ w obecności wybranych proteaz

Przedstawione na rycinie 50 wyniki, otrzymałam w ramach realizacji punktu 18. *Hydroliza substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ przez wybrane proteazy, rozdziału Badanie własne.*



Rycina 50. Selektywność substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂. Aktywność wybranych enzymów z rodzin: metaloproteaz (MMP-1, MMP-2, MMP-3 oraz MMP-9), dezintegryn i metaloproteaz (ADAM 10, ADAM 15, ADAM 17), kalikrein (kalikreina 1, kalikreina 2, kalikreina 3, kalikreina 8, kalikreina 13), oraz katepsyn (katepsyna X, katepsyna L, katepsyna S, katepsyna D, katepsyna H oraz katepsyna B). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

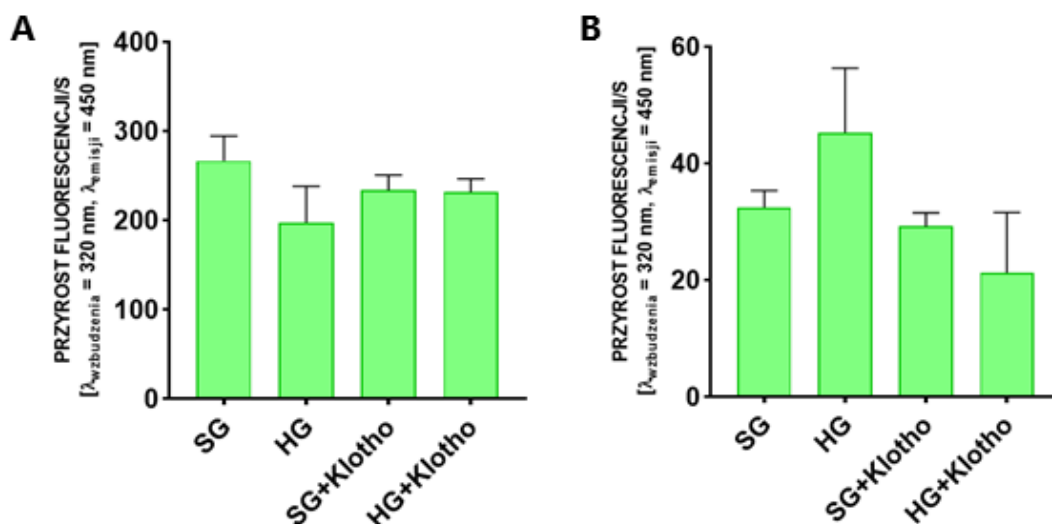
Badania zostały przeprowadzone w takich warunkach w jakich hydrolizie ulegał substrat ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**) w obecności enzymu ADAM 17. Eksperyment miał na celu zweryfikowanie selektywności otrzymanego substratu. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdziłam, że system zawierający ADAM 17 wykazywał najwyższy przyrost intensywności fluorescencji w czasie. Część wykorzystanych enzymów należących

do rodziny kalikrein wykazywało nieznaczną zdolność do hydrolizy substratu (10% względem enzymu ADAM 17). W przypadku pozostałych enzymów nie obserwowalam wzrostu fluorescencji w warunkach przeprowadzonego eksperymentu. Podobne badania przeprowadzono wobec innych substratów i tak grupa M. Moss w 2007 roku przetestowała substrat o sekwencji Dabcyl-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(5-FAM)-NH₂, który ulegał hydrolizie przez enzymy: MMP-1 MMP-2, MMP-9, MMP-13, MMP-14, ADAM 8, ADAM 10, ADAM 12 oraz ADAM 17²²⁷. Badania innego dostępnego komercyjnie substratu o sekwencji: Mca-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(DNP)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂, zostały przeprowadzone przez grupę D. M. Bennion w 2016 roku. Otrzymane wyniki wskazują na jego hydrolizę przez enzymy MMP-3, MMP-7, MMP-12, MMP-17, oraz ADAM 17²²⁸. Oba eksperymenty oznaczają, że substraty te charakteryzują się niską selektywnością wobec enzymu ADAM 17.

15. Badania biologiczne

15.1 Wpływ modyfikacji wprowadzonych na etapie hodowli komórek podocytów ludzkich na aktywność enzymu ADAM 17

W ramach przeprowadzonych eksperymentów opisanych w podrozdziałach 19.2 *Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w lizatach linii komórkowej ludzkich podocytów* oraz 19.3 *Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w medium zewnątrzkomórkowym linii komórkowych ludzkich podocytów*, części Badania własne, otrzymałam wyniki przedstawione na rycinach 51-53.



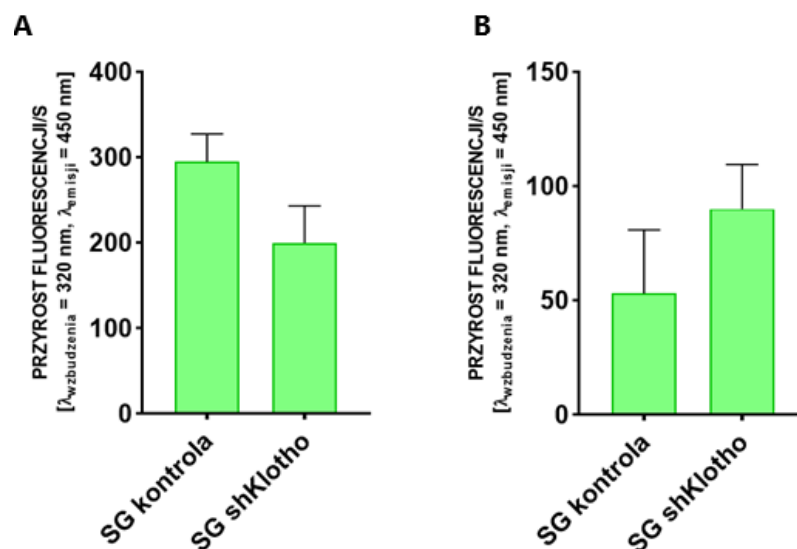
Rycina 51. Aktywność enzymu ADAM 17 A) w lizatach komórkowych; B) w medium zewnątrzkomórkowym, ludzkich podocytów. SG - warunki odzwierciedlające fizjologiczny poziom glukozy, HG - warunki poziomu glukozy indukujące cukrzycę, SG+Klotho, HG+Klotho – działanie protekcyjne białka Klotho w stosunku do linii komórek podocytów. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

W próbkach lizatów komórkowych obserwowałam wyższą aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17 w przypadku linii komórkowych podocytów inkubowanych w pożywce zawierającej fizjologiczne stężenie glukozy (SG) (Rycina 51 A). Z kolei w medium zewnątrzkomórkowego wyższą aktywność enzym ADAM 17 wykazywał w przypadku hodowli komórek prowadzonej w pożywce zawierającej podwyższone stężenie glukozy (HG) (Rycina 51 B). Wyniki te pokrywają się z doniesieniami literaturowymi grupy badawczej V. Palau, w których zaobserwowano zwiększoną ekspresję enzymu ADAM 17 w panelu różnych komórek nerek (śródbłonna kłębuszków nerkowych, mezangialnych, nabłonna kanalików bliższych oraz podocytów) w stanach cukrzycowych²²⁹.

Wprowadzenie do hodowli na etapie wzrostu komórek białka Klotho, spowodowało znaczące zmiany w aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17. W lizatach linii komórkowych (zarówno komórek inkubowanych w pożywce

zawierającej 30 mM (HG) jak i 11 mM (SG) stężenie glukozy) nie obserwowałam różnicy w aktywności proteolitycznej enzymu. Ponadto poziom aktywności enzymu ADAM 17 dla linii inkubowanych z białkiem Klotho był porównywalny dla obu systemów (SG i HG) (Rycina 51 A). Z kolei aktywność enzymu ADAM 17 w medium zewnątrzkomórkowym była niższa w obu układach w obecności białka Klotho (SG+Klotho, HG+Klotho) (Rycina 51 B), Ponadto w medium zewnątrzkomórkowym znad linii komórkowych hodowanych w pożywce zawierającej 30 mM stężenie glukozy, obserwowałam znacznie większą aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17 w odniesieniu do medium uzyskanego znad linii komórkowych inkubowanych w pożywce zawierającej fizjologiczne stężenie glukozy.

Powyzsze wyniki wskazują na zwiększoną ekspresję enzymu ADAM 17 w układzie zawierającym podwyższone stężenie glukozy. Dodatkowo, inkubacja linii komórkowej ludzkich podocytów w pożywce zawierającej 30 mM stężenie glukozy w obecności białka Klotho wskazuje na jego prewencyjne działanie.

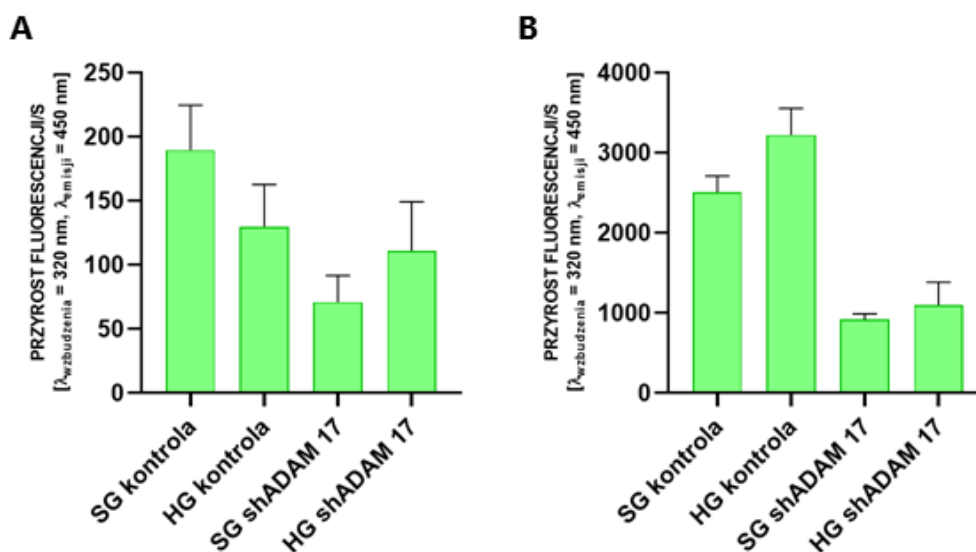


Rycina 52. Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 A) w lizatach komórkowych; B) w medium zewnątrzkomórkowym, ludzkich podocytów z wyciszoną ekspresją białka Klotho. SG kontrola – warunki fizjologiczne komórek podocytów, SG shKlotho – warunki fizjologiczne komórek podocytów z

zahamowaną biosyntezą białka Klotho. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Zahamowanie biosyntezy białka Klotho w linii komórkowej podocytów inkubowanych w pożywce zawierającej standardowe stężenie glukozy zmieniło aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17 (Rycina 52). Tendencja zmian obserwowana zarówno dla lizatów jak i medium zewnątrzkomórkowego wykazywała podobieństwo do tych, które obserwowałam w linii komórkowej podocytów w pożywce zawierającej 30 mM stężenie glukozy (Rycina 51).

Wyniki te wskazują, że zablokowanie ekspresji białka Klotho w komórkach podocytów prawdopodobnie prowadzi do zaburzenia w przekazywaniu sygnałów w szlakach sygnalizacyjnych, zależnych od enzymu ADAM 17. W znanej mi literaturze nie spotkałam analogicznych badań, które mogłabym przedyskutować.



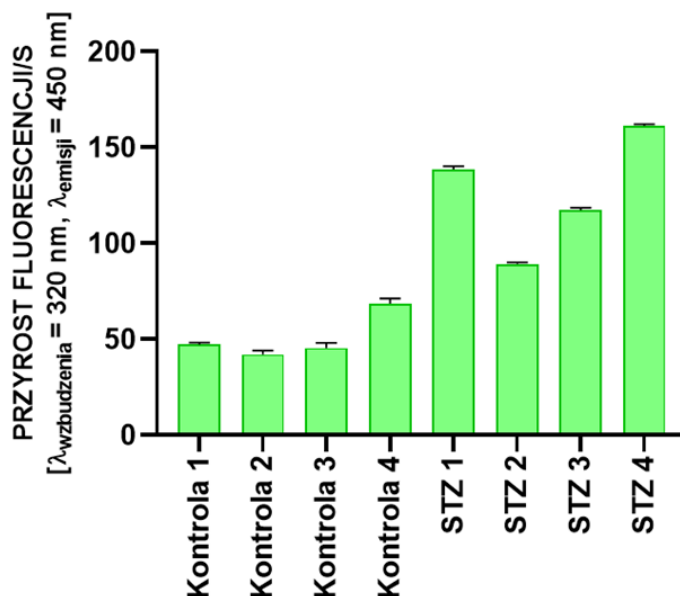
Rycina 53. Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 A) w lizatach komórkowych; B) w medium zewnątrzkomórkowym, ludzkich podocytów z wyciszoną ekspresją enzymu ADAM 17. SG kontrola – warunki fizjologiczne komórek podocytów, HG kontrola - warunki poziomu glukozy indukujące cukrzycę, SG shADAM 17 – warunki fizjologiczne komórek podocytów z zahamowaną biosyntezą enzymu ADAM 17, HG shADAM 17 – warunki z indukowaną cukrzycą z zahamowaną biosyntezą enzymu ADAM 17. Słupki błędów

określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Spadek aktywności proteolitycznej ADAM 17 w systemach zawierających shRNA, jednoznacznie wskazuje na efektywne wyciszenie ekspresji genu kodującego enzym ADAM 17. Obserwowany wzrost fluorescencji w omawianych systemach może wynikać z niepełnego wyciszenia genu przez shRNA lub z obecności innej proteazy zdolnej do hydrolizy użytego substratu. Nie wykluczone jest zajście obu tych przypadków, lecz wymaga to bez wątpienia dodatkowych eksperymentów.

15.2 Wyniki aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu szczurów z indukowaną cukrzycą

Wyniki otrzymane w ramach realizacji badań opisanych w podrozdziale 19.4 *Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu szczurów z indukowaną cukrzycą*, części Badania własne, przedstawiłam na rycinie 54.

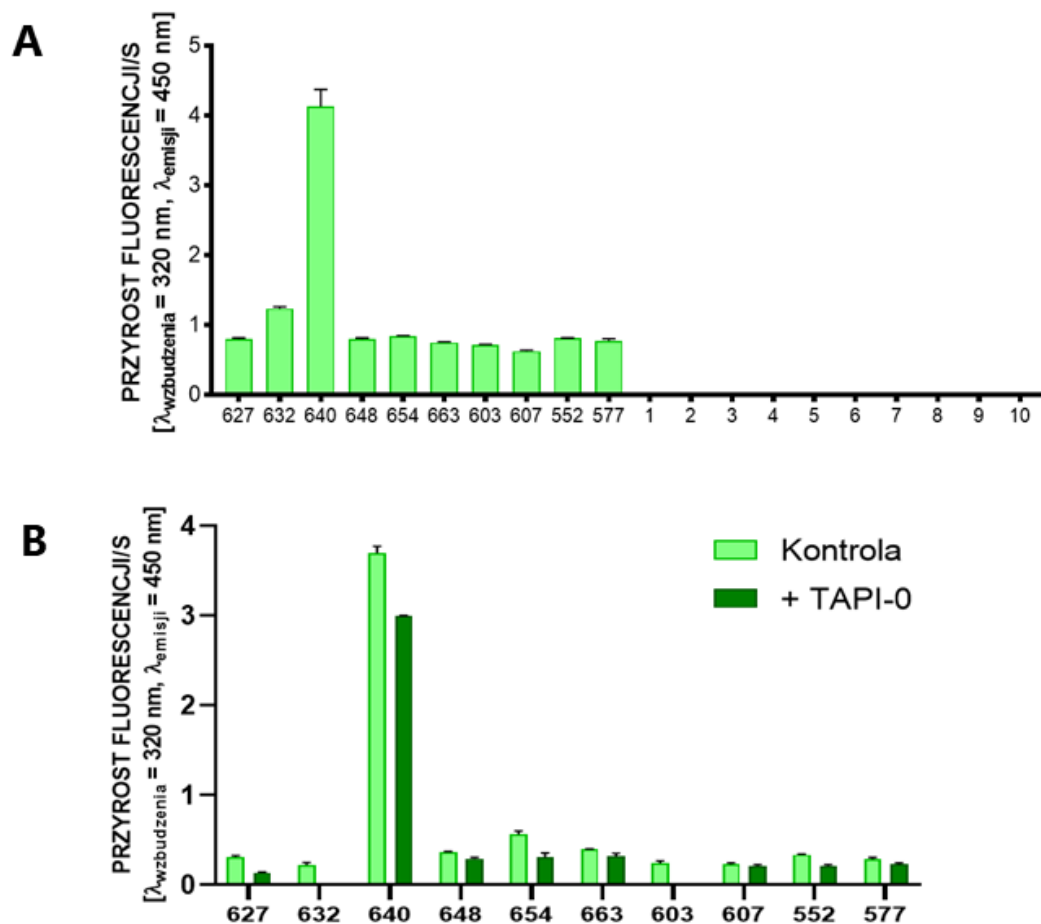


Rycina 54. Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 w moczu szczurów rasy Wistar grupy kontrolnej (Kontrola 1-4; 4 osobniki), oraz z indukowaną cukrzycą (STZ 1-4; 4 osobniki). Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech próbek.

W moczu szczurów z indukowaną cukrzycą obserwowałam znacznie podwyższoną aktywność enzymu ADAM 17 w odniesieniu do próby kontrolnej (wzrost około 200%). Grupa badawcza S. Zhang w roku 2012 udowodniła, że podawanie streptozotocyny szczurom rasy Wistar w fazie ich wzrostu, powoduje zmiany w masie ciała, objętości wydalanego moczu, oraz stężeniu glukozy we krwi. Ponadto zauważono zmiany morfologiczne w kłębuszkach nerkowych, odpowiadające zmianom obserwowanym w nefropatii cukrzycowej. Tym samym potwierdzono indukowanie nefropatii cukrzycowej poprzez streptozotocynę u szczurów rasy Wistar²³⁰. W znanej mi literaturze nie znalazłam bezpośredniego powiązania pomiędzy indukowaniem nefropatii cukrzycowej u szczurów tej rasy a aktywnością enzymu ADAM 17.

15.3 Wyniki aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu pacjentów chorych na cukrzycę

W wyniku realizacji punktu 19.5 *Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w moczu pacjentów chorych na cukrzycę*, rozdziału *Badania własne* otrzymano wyniki, które zostały przedstawione na rycinie 55.



Rycina 55. Proteoliza substratu o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂, A) w próbkach moczu zdrowych ochotników (1-10) oraz pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą (627, 632, 640, 648, 654, 663, 603, 607, 552, 577); B) w próbkach moczu pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą po inkubacji z inhibitorem TAPI-0. Słupki błędów określają wartości błędów standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Otrzymane wyniki jednoznacznie wykazały całkowity brak aktywności proteolitycznej w próbkach moczu zdrowych ochotników (Rycina 55 A). Jednocześnie obserwovałam przyrost intensywności fluorescencji wynikający z aktywności proteolitycznej enzymu w próbkach moczu pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą. Inkubacja próbek z inhibitorem TAPI-0 (Rycina 55 B) spowodowała zmniejszenie obserwowanej aktywności we wszystkich próbkach a dla niektórych z nich (632, 603). obserwovałam całkowity zanik aktywności. W

próbkach biologicznych może dochodzić do niespecyficznego hydrolizy substratu i z tego wynikać może tylko częściowa skuteczność inhibicji enzymu ADAM 17 obserwowana dla większości prób. Ponadto część z pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą chorowało także na inne choroby między innymi pacjent 607 cierpiał na sarkoidozę, która powoduje stan zapalny przyczyniając się do ogólnego wzrostu aktywności enzymatycznej w moczu. Brak dostępu do pełnej historii chorób pacjentów uniemożliwia skorelowania otrzymanych wyników z parametrami takimi jak: czas trwania choroby, typ prezentowanej cukrzycy czy też stadium rozwoju nefropatii cukrzycowej. W związku z tym otrzymane wyniki należy traktować jako wstępne i wymagające dalszych prac.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach badań będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej, otrzymałam wyniki, które podsumowuję:

1. Wykorzystując metodę chemii kombinatorycznej, zsyntezowałam tetrapeptydową bibliotekę, którą poddałam dekonwolucji. W wyniku przeprowadzonych badań wyselekcjonowałam substrat hydrolizowany przez enzym ADAM 17 o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-ANB-NH₂.
2. W kolejnym etapie zaprojektowałam heptapeptydową bibliotekę. W wyniku dekonwolucji wyselekcjonowałam substrat wydajnie hydrolizowany przez enzym ADAM 17, o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**).
3. W wyniku optymalizacji sekwencji substratu w obszarze C-końcowym (wpływ długości fragmentu peptydowego oraz rodzaju akceptora fluorescencji), otrzymałam związek: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**), o wartości $k_{cat}/K_M = 35\,794 \pm 16 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$.
4. Substrat ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂ jest selektywnie hydrolizowany przez enzym ADAM 17.
5. Określiłam aktywność enzymu ADAM 17 w próbkach lizatów oraz medium zewnątrzkomórkowego podocytów. W warunkach wysokiej glukozy, rozumianych jako warunki uszkodzające komórki podocytów dochodzi do obniżenia wewnątrzkomórkowej aktywności ADAM 17. Zwiększoną aktywność tego enzymu obserwujemy na zewnątrz komórki. Jednym z powodów takiego zjawiska może być uszkodzenie błony komórkowej podocytów i w efekcie zwiększenie przepuszczalności składników cytoplazmy.
6. Obecność białka Klotho w analogicznych eksperymentach istotnie zwiększa aktywność wewnątrzkomórkową enzymu dla systemu inkubowanego w podwyższonym stężeniu glukozy. Niezależnie od

stężenia glukozy w pożywce, w której inkubowane były podocyty aktywność enzymu ADAM 17 jest zdecydowanie wyższa dla systemu bez Klotho lub z wyciszonym genem tego białka w medium zewnątrzkomórkowym. Efekt ten może być następstwem protekcyjnego działania białka Klotho wobec komórek, które reguluje wydzielanie rozpuszczalnej formy enzymu ADAM 17. Alternatywnie efekt protekcyjnego działania białka Klotho może powodować zaburzenie szlaku sygnałowego bądź szlaków sygnałowych, w efekcie czego dochodzi do zahamowania wydzielania badanego enzymu. Odpowiedź na to pytanie wymaga jednak poszerzonych badań komórkowych, które nie zostały zaplanowane w niniejszej rozprawie doktorskiej.

7. Wykazałam, że w próbkach moczu szczurów z cukrzycą istnieje statystycznie większa aktywność enzymu ADAM 17 w porównaniu do osobników zdrowych.
8. Analiza moczu pacjentów chorych na cukrzycę wykazała zwiększoną aktywność enzymu ADAM 17, wobec moczu osób zdrowych.
9. Otrzymane związki mogą stanowić element diagnostyki cukrzycy i związanych z nią chorób nerek.

VII Dorobek naukowy

1. Publikacje naukowe

- 1) D. Rogacka, P. Rachubik, M. Typiak, T. Kulesza, I. Audzeyenka, M. A. Saleem, **H. Sikora**, N. Gruba, M. Wysocka, A. Lesner, A. Piwkowska, "Involvement of ADAM17-Klotho crosstalk in high glucose-induced alterations of podocyte function", *International Journal of Molecular Sciences*, Vo. 26, 2025, str. 1-21.
- 2) N. Gruba, **H. Sikora**, J. Ciesielska, W. Rejmak, A. Lesner, „Caspase-like activity is associated with bacterial infection of the urine in urinary tract diseases”, *Analytical Biochemistry*, Vo. 688, 2024, str. 1-7.
- 3) **H. Sikora**, N. Gruba, M. Wysocka, A. Piwkowska, A. Lesner, „Optimization of fluorescent substrates for ADAM17 and their utility in the detection of diabetes”, *Analytical Biochemistry*, Vo. 681, 2023, str. 1-11.
- 4) N. Gruba, A. Romanowska, W. Rejmak, **H. Sikora**, M. Wysocka, A. Lesner, „Monitorowanie aktywności proteolitycznej jako element diagnostyki chorób cywilizacyjnych”, *Wiadomości Chemiczne*, Vo. 76, 2022, str. 335-347.

2. Postery na konferencjach krajowych i zagranicznych

- 1) **H. Sikora**, N. Gruba, A. Lesner, „Aktywność wybranych enzymów proteolitycznych w materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów ze zdiagnozowanym zapaleniem bakteryjnym”, III Kongres Młodej Nauki, 6-8.07.2023, Gdańsk, Polska.
- 2) **H. Sikora**, N. Gruba, A. Piwkowska, A. Lesner, M. Wysocka, „Synthesis of specific substrate for ADAM 17 using combinatorial chemistry methods”, CYSTATINS, 16-18.06.2022, Gdańsk, Polska.

3) **H. Sikora**, M. Wysocka, A. Lesner, „Koniugaty peptydomimetyków z doksorubicyną jako alternatywa dla leczenia chorób nowotworowych”, VI Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, 30.11.2019, Lublin, Polska.

3. Komunikaty ustne na konferencjach krajowych i zagranicznych

1) **H. Sikora**, N. Gruba, A. Lesner, A. Piwkowska, M. Wysocka, „Ocena aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 wobec selektywnie hydrolizowanych substratów fluorogenicznych, różniących się długością fragmentu peptydowego oraz akceptorem fluorescencji”, X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 18-19.05.2023, Łódź, Polska.

2) **H. Sikora**, N. Gruba, A. Lesner, A. Piwkowska, M. Wysocka, „Optimization of specific substrate for ADAM 17 using different fluorescence acceptors”, Baltic Chemistry Conference, 2023, 27-28.05.2023, Online, Polska.

4. Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

1) „Rola białek klotho i NPP1 w regulacji funkcji komórki podocytarnej”, nr UMO-2018/29/B/NZ4/02074 (NCN), OPUS 15, 2019-2022, doktorant stypendysta.

2) „Synteza oraz ocena wydajności hydrolizy selektywnych substratów fluorogenicznych wobec enzymu ADAM 17”, nr 539-T070-B908-21 (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański), Projekt badawczy w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich, 2021, kierownik projektu.

3) „Synteza substratów fluorogenicznych enzymu ADAM 17 zawierających 3-nitro-L-tyrozinę”, nr 539-T070-B034-22 (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański), Projekt badawczy w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich, 2022, kierownik projektu.

4) „Synteza pochodnych selektywnych substratów fluorogenicznych wobec wybranych proteaz serynowych. Ocena wpływu struktury akceptora fluorescencji

na wydajność hydrolizy enzymatycznej”, nr 539-T070-B066-23 (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański), Projekt badawczy w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich, 2023, kierownik projektu.

VIII Wykaz rycin

Rycina 1. Schemat budowy przedstawicieli białek z rodziny ADAM. HEx* - sekwencja aminokwasowa charakterystyczna dla białek aktywnych proteolitycznie, RGD** - sekwencja Arg-Gly-Glu, xCD*** – sekwencja aa-Cys-Glu, **** - domena metaloproteazy określana jest domeną katalityczną dla przedstawicieli aktywnych enzymatycznie. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 2. Udział enzymów należących do rodziny ADAM w wybranych stanach patofizjologicznych człowieka. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 3. Schematyczne przedstawienie struktury enzymu ADAM 17. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 4. A) Struktura krystaliczna domeny katalitycznej enzymu ADAM 17. Kolorem czerwonym oznaczono reszty aminokwasowe histydyn, natomiast kolorem niebieskim resztę aminokwasową kwasu glutaminowego, pełniących rolę w koordynowaniu jonu cynku; B) zbliżenie centrum katalitycznego enzymu ADAM 17.

Rycina 5. Aktywacja enzymu ADAM 17 poprzez oddziaływanie domeny MPD z powierzchnią błony komórkowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 6. Schematy A) lokalizacji aktywatora iRhom 2 w dwuwarstwie lipidowej; B) aktywacja enzymu ADAM 17; IRHD (ang. iRhom Homology Domain).

Rycina 7. Schemat procesowania ligandów wiążących się do receptora EGFR. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 8. Schemat obrazujący rolę enzymu ADAM 17 w patogenezie wybranych chorób.

Rycina 9. A) Struktura krystaliczna kompleksu domeny katalitycznej enzymu ADAM 17 (kolor zielony) z naturalnym inhibitorem TIMP-3 (kolor niebieski). Czerwonym kolorem oznaczono resztę aminokwasową cysteiny w pozycji 1

inhibitora, pełniącą kluczową rolę w blokowaniu aktywności proteolitycznej; B) zbliżenie struktury krystalicznej kompleksu ADAM 17-TIMP-3.

Rycina 10. Wzór półstrukturalny inhibitora syntetycznego TAPI-0.

Rycina 11. Powikłania pojawiające się u pacjentów chorujących na cukrzycę. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 12. Etapy nefropatii cukrzycowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 13. Schemat budowy nefronu. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 14. Przekrój poprzeczny kłębuszka nerkowego. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 15. Ułożenie komórek podocytów wokół naczyń włosowatych w kłębuszku nerkowym. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 16. Zmiany w organizacji bariery krew-mocz, obserwowane podczas rozwoju nefropatii cukrzycowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 17. Schematyczna budowa białka Klotho. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 18. Schemat tworzenia biblioteki peptydowej metodą chemii kombinatorycznej „porcjowania i łączenia”. Niebieska kulka odpowiada ziarnu żywicy, pozostałe resztom aminokwasowym. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 19. Wzór półstrukturalny linkera przyłączonego do żywicy TENTA GEL SRAM. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 20. Wzór półstrukturalny linkera przyłączonego do żywicy 2-chloro-chlorotrylowej. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 21. Diagram Jabłońskiego ilustrujący przejścia energetyczne obserwowane pomiędzy donorem a akceptorem, wykazującymi zjawisko FRET. S_0 – podstawowy stan energetyczny, S_1 – wzbudzony stan energetyczny. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 22. Zależność widm wzbudzenia oraz emisji dla donora i akceptora, tworzących parę FRET. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 23. Schemat hydrolizy enzymatycznej substratu peptydowego wykazującego zjawisko FRET. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 24. Schematyczne przedstawienie miejsca aktywnego enzymu według nomenklatury Schechtera i Bergera. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 25. Wykres zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu. Rysunek wykonany na podstawie literatury.

Rycina 26. Zestawienie potencjalnych miejsc hydrolizy w stosowanym substracie w trakcie pomiaru przyrostu absorbancji oraz fluorescencji.

Rycina 27. Widma analizy jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Gly-X₂-Ala-ANB-NH₂, B) ABZ-Asn-Thr-X₂-Ala-ANB-NH₂.

Rycina 28. Etapy syntezy związków o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-X₂-Ala-ANB-NH₂. X₂ – 19 reszt aminokwasowych z wyjątkiem cysteiny, ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy, ANB – kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy, R – żywica.

Rycina 29. Widma analizy jonu masowego pochodnych o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Val-Ala-ANB-NH₂ [M = 747 g/mol]; B) ABZ-Asn-Tyr-Pro-Ala-ANB-NH₂ [M = 745 g/mol].

Rycina 30. Widma analizy jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Trp-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Lys-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Rycina 31. Etapy syntezy heptapeptydowej biblioteki o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. X₂', X₃' – 19 reszt aminokwasowych z wyjątkiem cysteiny, ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy, Tyr(3-NO₂) – 3-nitro-L-tyrozyna, R – żywica.

Rycina 32. Widma analizy jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Gly-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Lys-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Rycina 33. Etapy syntezy heptapeptydowych związków o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg- X_3' -Tyr(3-NO₂)-NH₂. X_3' - reszty aminokwasowe z wyjątkiem cysteiny, ABZ – kwas 2-aminobenzoesowy, Tyr(3-NO₂) – 3-nitro-L-tyrozyna, R – żywica.

Rycina 34. Widma analizy jonu masowego związków o sekwencjach: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Ser-Tyr(3-NO₂)-NH₂ [M = 1180 g/mol]; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Val-Tyr(3-NO₂)-NH₂ [M = 1192 g/mol].

Rycina 35. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X_1 (wzór ogólny: ABZ- X_4 - X_3 - X_2 - X_1 -ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 36. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X_4 (wzór ogólny: ABZ- X_4 - X_3 - X_2 -Ala-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 37. Dekonwolucja dziewiętnastu podbibliotek ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X_3 (wzór ogólny: ABZ-Asn- X_3 - X_2 -Ala-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 38. Dekonwolucja dziewiętnastu związków ze znaną resztą aminokwasową w pozycji X_2 (wzór ogólny: ABZ-Asn-Tyr- X_2 -Ala-ANB-NH₂). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 39. Struktura substratu o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-ANB-NH₂.

Rycina 40. Dekonwolucja pozycji X_1' dziewiętnastu podbibliotek o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala- X_1' - X_2' - X_3' -Tyr(3-NO₂)-NH₂. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 41. Chromatogramy HPLC A) próba kontrolna: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH; B) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w buforze z Brij-35 (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μM chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C); C) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ po inkubacji z enzymem ADAM 17.

Rycina 42. Dekonwolucja pozycji X₂' biblioteki peptydowej o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 43. Chromatogramy HPLC A) próba kontrolna: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH; B) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w buforze z Brij-35 (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μM chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C); C) podbiblioteka: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ po inkubacji z enzymem ADAM 17.

Rycina 44. Dekonwolucja pozycji X₃' związków o wzorze ogólnym: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 45. Chromatogramy HPLC A) próba kontrolna: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH; B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ w buforze z Brij-35 (25 mM TRIS-HCl, 2,5 μM chlorek cynku oraz 0,005% Brij-35 o pH 9,0 w 37°C); C) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ po inkubacji z enzymem ADAM 17.

Rycina 46. Struktura wyselekcjonowanego substratu o sekwencji: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Rycina 47. Wpływ modyfikacji substratu fluorogenicznego w obrębie C-końca na aktywność proteolityczną enzymu ADAM 17. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 48. Wykresy krzywych Michaelisa-Menten dla substratów: A) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Tyr(3-NO₂)-NH₂ (**1**); B) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-

Arg-Lys(DNP)-NH₂ (**5**); C) ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Dap(DNP)-NH₂ (**9**). Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 49. Hamowanie aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 przez inhibitor TAPI-0. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 50. Selektywność substratu ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂. Aktywność wybranych enzymów z rodzin: metaloproteaz (MMP-1, MMP-2, MMP-3 oraz MMP-9), dezintegryn i metaloproteaz (ADAM 10, ADAM 15, ADAM 17), kalikrein (kalikreina 1, kalikreina 2, kalikreina 3, kalikreina 8, kalikreina 13), oraz katepsyn (katepsyna X, katepsyna L, katepsyna S, katepsyna D, katepsyna H oraz katepsyna B). Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 51. Aktywność enzymu ADAM 17 A) w lizatach komórkowych; B) w medium zewnątrzkomórkowym, ludzkich podocytów. SG - warunki odzwierciedlające fizjologiczny poziom glukozy, HG - warunki poziomu glukozy indukujące cukrzycę, SG+Klotho, HG+Klotho - działanie protekcyjne białka Klotho w stosunku do linii komórek podocytów. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 52. Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 A) w lizatach komórkowych; B) w medium zewnątrzkomórkowym, ludzkich podocytów z wyciszoną ekspresją białka Klotho. SG kontrola - warunki fizjologiczne komórek podocytów, SG shKlotho - warunki fizjologiczne komórek podocytów z zahamowaną biosyntezą białka Klotho. Słupki błędu określają wartości błędu standardowego, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 53. Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 A) w lizatach komórkowych; B) w medium zewnątrzkomórkowym, ludzkich podocytów z wyciszoną ekspresją enzymu ADAM 17. SG kontrola - warunki fizjologiczne

komórek podocytów, HG kontrola - warunki poziomu glukozy indukujące cukrzycę, SG shADAM 17 – warunki fizjologiczne komórek podocytów z zahamowaną biosyntezą enzymu ADAM 17, HG shADAM 17 – warunki z indukowaną cukrzycą z zahamowaną biosyntezą enzymu ADAM 17. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

Rycina 54. Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 w moczu szczurów rasy Wistar grupy kontrolnej (Kontrola 1-4; 4 osobników), oraz z indukowaną cukrzycą (STZ 1-4; 4 osobników). Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech próbek.

Rycina 55. Proteoliza substratu o sekwencji ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Arg-Arg-Lys(DNP)-NH₂, A) w próbkach moczu zdrowych ochotników (1-10) oraz pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą (627, 632, 640, 648, 654, 663, 603, 607, 552, 577); B) w próbkach moczu pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą po inkubacji z inhibitorem TAPI-0. Słupki błędów określają wartości błędów standardowych, wyliczone względem trzech niezależnych próbek.

IX Wykaz tabel

Tabela 1. Podział znanych substratów enzymu ADAM 17.

Tabela 2. Enzymy proteolityczne zaangażowane w rozwój nefropatii cukrzycowej.

Tabela 3. Przykłady związków, wykorzystywanych do syntezy substratów chromogenicznych.

Tabela 4. Przykłady związków, wykorzystywanych do syntezy substratów fluorescencyjnych.

Tabela 5. Przykłady par donor-akceptor stosowanych do syntezy substratów FRET.

Tabela 6. Analiza widm mas podbibliotek: ABZ-Asn-Gly-X₂-Ala-ANB-NH₂ oraz ABZ-Asn-Thr-X₂-Ala-ANB-NH₂.

Tabela 7. Analiza widm mas podbibliotek: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Trp-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ oraz ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Lys-X₂'-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Tabela 8. Analiza jonu masowego podbibliotek o sekwencjach: ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Gly-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂ oraz ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-Leu-Lys-X₃'-Tyr(3-NO₂)-NH₂.

Tabela 9. Sekwencje zaprojektowanych substratów.

Tabela 10. Odczynniki wykorzystywane w trakcie syntezy automatycznej.

Tabela 11. Etapy jednego cyklu przyłączania pochodnej aminokwasowej.

Tabela 12. Końcowe stężenia substratów i enzymu.

Tabela 13. Zakres stężeń substratów w studni pomiarowej.

Tabela 14. Końcowe stężenie ABZ-Asn-Tyr-Met-Ala-OH.

Tabela 15. Sekwencje substratów enzymu ADAM 17.

Tabela 16. Zestawienie sekwencji substratów syntetycznych (1-11) oraz naturalnych (12-26) enzymu ADAM 17, zestawione z sekwencją wyselekcjonowanego w ramach niniejszej pracy substratu fluorogenicznego (27).

Tabela 17. Parametry kinetyczne substratów.

Tabela 18. Wartości stałych specyficzności substratów wyznaczonych wobec enzymu ADAM 17.

X Bibliografia

- ¹ IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *European Journal of Biochemistry*, Vo. 138, 1984, str. 9-37
- ² J. H. Jones, „A short guide to abbreviations and their use in peptide science”, *Journal of Peptide Science*, Vo. 5, 1999, str. 465-471
- ³ J. H. Jones, „A revised guide to abbreviations in peptide science and a plea for conformity”, *Journal of Peptide Science*, Vo. 9, 2003, str. 1-8
- ⁴ J. H. Jones, „Abbreviations and symbols in peptide science: a revised guide and commentary”, *Journal of Peptide Science*, Vo. 12, 2006, str. 1-12
- ⁵ M. Łukaszewicz-Zajac, S. Pączek, B. Mroczko, „A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family – novel biomarkers of selected gastrointestinal (GI) malignancies?”, *Cancers*, Vo. 14, 2022, str. 1-16
- ⁶ N. Giebeler, P. Zigrino, „ A disintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions”, *Toxins*, Vo. 8, 2016, str. 1-14
- ⁷ H. Zhu, J. Wang, W. Nie, I. Armando, F. Han, „ADAMs family in kidney physiology and pathology”, *EBioMedicine*, Vo. 72, 2021, str. 1-9
- ⁸ D. Lu, M. Scully, V. Kakkar, X. Lu, „ADAM-15 disintegrin like domain structure and function”, *Toxins*, Vo. 2, 2010, str. 2411-2427
- ⁹ A. Chantry, N. A. Gregson, P. Glynn, „A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vo. 264, 1989, str. 21603-21607
- ¹⁰ C. P. Blobel, „ADAMs: key components in EGFR signalling and development”, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, Vo. 6, 2005, str. 32-43
- ¹¹ S. Weber, P. Saftig, „Ectodomain shedding and ADAMs in development”, *Development*, Vo. 139, 2012, str. 3693-3709
- ¹² H. Hsia, J. Tüshaus, T. Brummer, Y. Zheng, S. D. Scilabra, S. F. Lichtenthaler, „Functions of A’disintegrin and metalloproteases (ADAMs)’ in the mammalian nervous system”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vo. 76, 2019, str. 3055-3081
- ¹³ R. A. Black, C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, D. P. Cerretti, „A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells”, *Nature*, Vo. 385, 1997, str. 729-733
- ¹⁴ M. L. Moss, S. L. Catherine, M. E. Milla, W. Burkhart, H. L. Carter, W. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. Warner, D. Willard, J. D. Becherer,

„Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor- α “, *Nature*, Vo. 385, 1997, str. 733-736

¹⁵ F. Yuan, D. Li, C. Li, Y. Zhang, H. Song, S. Li, H. Deng, G. F. Gao, A. Zheng, „ADAM 17 is an essential factor for classical swine fever virus“, *PLOS Pathogens*, Vo. 17, 2021, str. 1-18

¹⁶ M. Sisto, D. Ribatti, A. Lisi, „ADAM 17 and epithelial to mesenchymal transition: the evolving story and its link to fibrosis and cancer“, *Journal of Clinical Medicine*, Vo. 10, 2021, str. 1-16

¹⁷ K. Maskos, C. Fernandez-Catalan, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, G. A. Ellestad, P. Reddy, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, R. Davis, H. R. G. Clarke, M. Petersen, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, C. J. March, R. J. Paxton, R. A. Black, W. Bode, „Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor α -converting enzyme, *Biochemistry*, Vo. 95, 1998, str. 3408-3412

¹⁸ J. Grötzinger, I. Lorenzen, S. Düsterhöft, „Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM 17: the role of the extracellular region“, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, Vo. 1864, 2017, str. 2088-2095

¹⁹ I. Lorenzen, A. Trad, J. Grötzinger, „Multimerisation of a disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM 17) is mediated by its EGF-like domain“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vo. 415, 2011, str. 330-336

²⁰ H. Liu, A. H. R. Shim, X. He, „Structural characterization of the Ectodomain of a Disintegrin and Metalloproteinase-22 (ADAM22), a Neural Adhesion Receptor Instead of Metalloproteinase: insights on ADAM function“, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, 2009, str. 29077-29086

²¹ J. Tucher, D. Linke, T. Koudelka, L. Cassidy, C. Tredup, R. Wichert, C. Pietrzik, C. Becker-Paully, A. Tholey, „LC-MS Based Cleavage Site Profiling of the Proteases ADAM 10 and ADAM 17 Using Proteome-Derived Peptide Libraries“, *Journal of proteome research*, Vo. 13, 2014, str. 2205-2214

²² P. Gooz, Y. Dang, S. Higashiyama, W. O. Twal, C. J. Haycraft, M. Gooz, „A Disintegrin and Metalloenzyme (ADAM) 17 Activation Is Regulated by $\alpha 5\beta 1$ Integrin in Kidney Mesangial Cells“, *PloS one*, Vo. 7, 2012, str. e33350-e33359

²³ I. Lorenzen, J. Lokau, S. Düsterhöft, A. Trad, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, J. Grötzinger, „The membran-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM 17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II“, *FEBS Letters*, Vol. 586, 2012, str. 1093-1100

²⁴ A. Sommer, F. Kordowski, J. Büch, T. Maretzky, A. Evers, J. Andrä, S. Düsterhöft, M. Michalek, I. Lorenzen, P. Somasundaram, A. Tholey, F. D. Sönnichsen, K. Kunzelmann, L. Heinbockel, C. Nehls, T. Gutschmann, J. Grötzinger, S. Bhakdi, K. Reiss, „Phosphatidylserine exposure is required for ADAM 17 sheddase function“ *Nature Communications*, Vol. 7, 2016, str. 1-14

-
- ²⁵ S. Düsterhöft, S. Jung, C. W. Hung, A. Tholey, F. D. Sönnichsen, J. Grötzinger, I. Lorenzen, „Membrane-Proximal Domain of a Disintegrin and Metalloprotease-17 Represents the Putative Molecular Switch of its Shedding Activity Operated by Protein-disulfide Isomerase“, *Journal of the American Chemical Society*, Vo. 135, 2013, str. 5776-5781
- ²⁶ S. Düsterhöft, M. Michalek, F. Kordowski, M. Oldefest, A. Sommer, J. Röseler, K. Reiss, J. Grötzinger, I. Lorenzen, „Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM 17 Interacts with Membranes and is Essential for its Shedding Activity“, Vo. 54, 2015, str. 5791-5801
- ²⁷ S. Düsterhöft, K. Höbel, M. Oldefest, J. Lokau, G. H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Sheller, S. Rose-John, I. Lorenzen, J. Grötzinger, „A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor“, *Journal of Biological Chemistry*, Vo. 289, 2014, str. 16336-16348
- ²⁸ D. R. Edwards, M. M. Handsley, C. J. Pennington, „The ADAM metalloproteinases“, *Molecular Aspects of Medicine*, Vo. 29, 2008, str. 258-289
- ²⁹ M. Gooz, „ADAM-17 the enzyme that does it all“, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vo. 45, 2010, str. 146-169
- ³⁰ S. Rose-John, „ADAM 17, shedding, TACE as therapeutic targets“, *Pharmacological Research*, Vo. 71, 2013, str. 19-22
- ³¹ X. Li, T. Maretzky, G. Weskamp, C. P. Bolbel, „iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM 17-dependent EGFR signaling“, *Development Biology*, Vo. 112, 2015, str. 6080-6085
- ³² A. Rossello, E. Nuti, S. Ferrini, M. Fabbi, „Targeting ADAM 17 sheddase activity in cancer“, *Current Drug Targets*, Vo. 17, 2016, str. 1908-1927
- ³³ A. G. Grieve, H. Xu, K. P. Bambrough, B. Sieber, M. Freeman, „Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling“, *eLife*, Vo. 6, 2017, str. 1-22
- ³⁴ S. F. Josephs, T. E. Ichim, S. M. Prince, S. Kesari, F. M. Marincola, A. R. Escobedo, A. Jafri, „Unleashing endogenous TNF- α as a cancer immunotherapeutic“, *Journal of Translational Medicine*, Vo. 16, 2018, str. 1-8
- ³⁵ S. Lu, Y. Wang, J. Liu, „Tumor necrosis factor- α signaling in nonalcoholic steatohepatitis and targeted therapies“, *Journal of Genetics and Genomics*, Vo. 49, 2022, str. 269-278
- ³⁶ D. Jang, A. H. Lee, H. Y. Shin, H. R. Song, J. H. Park, T. B. Kang, S. R. Lee, S. H. Yang, „The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vo. 22, 2021, str. 1-16
- ³⁷ N. Schumacher, D. Meyer, A. Mauermann, J. Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J. W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Calaris, S. Rose-John, B. Rabe, „Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-R6) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM)

proteases while a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles", *Vo. 290*, 2015, str. 26059-26071

³⁸ C. Wolf, Y. Qian, M. A. Brooke, D. P. Kesell, C. W. Franzke, „ADAM 17/EGFR axis promotes transglutaminase-dependent skin barrier formation through phospholipase Cy1 and protein kinase C pathways", *Scientific Reports*, *Vo. 6*, 2016, str. 1-13

³⁹ L. Rao, D. Giannico, P. Leone, A. G. Solimando, E. Maiorano, C. Caporusso, L. Duda, R. Tamma, R. Mallamaci, N. Susca, A. Buonavoglia, M. C. Vià, D. Ribatti, V. D. Re, A. Vacca, V. Racanelli, „HB-EGF-EGFR signaling in bone marrow endothelial cells mediates angiogenesis associated with multiple myeloma", *Cancers*, *Vol. 12*, 2020, str. 1-18

⁴⁰ J. G. Heuer, S. M. Harian, D. D. Yang, D. L. Jaqua, J. S. Boyles, J. M. Wilson, K. M. Heinz-Taheny, J. M. Sullivan, T. Wei, H. R. Qian, D. R. Witcher, M. D. Breyer, „Role of TGF- α in the progression of diabetic kidney disease", *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *Vo. 312*, 2017, str. F951-F962

⁴¹ V. Hosur, M. L. Farley, L. M. Burzenski, L. D. Shultz, M. V. Wiles, „ADAM 17 is essential for ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand amphiregulin", *FEBS Open Bio*, *Vo. 8*, 2018, str. 702-710

⁴² M. Stolarczyk, B. J. Scholte, „The EGFR-ADAM17 axis in chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis lung pathology", *Mediators of inflammation*, *Vo. 2018*, 2018, str. 1-22

⁴³ S. Tholen, C. Wolf, B. Mayer, J. D. Knopf, S. Löffek, Y. Qian, J. N. Kizhakkedathu, M. L. Biniossek, C. W. Franzke, O. Schilling, „Skin barrier defects caused by keratinocyte-specific deletion of ADAM 17 or EGFR are based on highly similar proteome and degradome alterations", *Journal of Proteome Research*, *Vo. 15*, 2016, str. 1402-1417

⁴⁴ I. González-Foruria, P. Santulli, S. Chozenoux, F. Carmona, C. Chapron, F. Batteux, „Dysregulation of the ADAM 17/Notch signalling pathways in endometriosis: from oxidative stress to fibrosis", *Molecular Human Reproduction*, *Vo. 23*, 2017, str. 488-499

⁴⁵ M. I. Saad, S. Rose-John, B. J. Jenkins, „ADAM 17: an emerging therapeutic target for lung cancer", *Cancers*, *Vo. 11*, 2019, str. 1-28

⁴⁶ J. Xu, S. Sriramula, H. Xia, L. Monero-Walton, F. Culicchia, O. Domenig, M. Poglitsch, E. Lazartigues, „Clinical relevance and role of neuronal AT₁ receptors in ADAM 17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension", *Circulation Research*, *Vo. 121*, 2017, str. 43-55

⁴⁷ A. Gilbert, J. Liu, G. Cheng, C. An, K. Deo, A. M. Gorret, X. Qin, „A review of urinary angiotensin converting enzyme 2 in diabetes and diabetic nephropathy", *Biochimica Medica*, *Vo. 29*, 2018, str. 1-11

⁴⁸ G. Y. Oudit, G. C. Liu, J. C. Zhong, R. Basu, F. L. Chow, J. Zhou, H. Loibner, E. Janzek, M. Schuster, J. M. Penninger, A. M. Herzenberg, Z. Kassiri, J. W. Scholey,

„Human Recombinant ACE2 Reduces the Progression of Diabetic Nephropathy“, *Diabetes*, Vo. 59, 2010, str. 529-538

⁴⁹ E. P. M. Loon, W. P. Pulskens, E. A. E. Hagen, M. Lavrijsen, M. G. Vervloet, H. Goor, R. J. M. Bindels, J. G. J. Hoenderop, „Shedding of klotho by ADAMs in the kidney“, *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, Vo. 309, 2015, str. F359-F368

⁵⁰ R. Mencke, H. Olauson, J. L. Hillebrands, „Effects of Klotho on fibrosis and cancer: a renal focus on mechanism and therapeutic strategies“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vo. 121, 2017, str. 85-100

⁵¹ W. Nishie, „Collagen XVII processing and blistering skin diseases“, *Acta Dermato-Venereologica*, Vo. 100, 2020, str. 1-6

⁵² J. Jacków, A. Schlosser, R. Sormunen, A. Nyström, C. Sitaru, K. Tesanen, L. Bruckner-Tuderman, C. W. Franzke, „Generation of a functional non-shedding collagen XVII mouse model: relevance of collagen XVII shedding in wound healing“, *Journal of Investigative Dermatology*, Vo. 136, 2016, str. 516-525

⁵³ Y. Lu, F. Jiang, X. Zheng, M. Katakowski, B. Buller, S. S. T. To, M. Chopp, „TGF- β 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM 17“, *Oncology Reports*, Vo. 25, 2011, str. 1329-1335

⁵⁴ A. Kisling, R. M. Lust, L. C. Katwa, „What is role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease?“, *Life Sciences*, Vo. 228, 2019, str. 30-34

⁵⁵ M. Calligaris, D. Cuffaro, S. Bonelli, D. P. Spanò, A. Rossello, E. Nuti, S. D. Scilabra, „Strategies to target ADAM 17 in disease: from its discovery to the iRhom revolution“, *Molecules*, Vo. 26, 2021, str. 1-37

⁵⁶ N. Hedemann, A. Herz, J. H. Schiepaniski, J. Dittrich, S. Sebens, A. Dempfle, J. Feuerborn, C. Rogmans, N. Tribian, I. Flörkemeier, J. Weimer, S. Krüger, N. Maass, D. O. Bauerschlang, „ADAM 17 inhibition increases the impact of cisplatin treatment in ovarian cancer spheroids“, *Cancer*, Vo. 13, 2021, str. 1-20

⁵⁷ F. Caiazza, P. M. McGowan, M. Mullooly, A. Murray, N. Synnott, N. O'Donovan, L. Flanagan, C. J. Tape, G. Murphy, J. Crown, M. J. Duffy, „Targeting ADAM-17 with an inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer cells“, *British Journal of Cancer*, Vo. 112, 2015, str. 1895-1903

⁵⁸ R. Mustafi, U. Dougherty, D. Mustafi, F. Ayaloglu-Butun, M. Fletcher, S. Adhikari, F. Sadiq, K. Meckel, H. I. Haider, A. Khalil, J. Pekow, V. Konda, L. Joseph, J. Hart, A. Fichera, Y. C. Li, M. Bissonnette, „ADAM 17 is a tumor promoter and therapeutic target in Western diet-associated colon cancer“, *Clinical Cancer Research*, Vo. 23, 2017, str. 549-561

⁵⁹ M. I. Saad, S. Alhayyani, L. McLeod, L. Yu, M. Alanazi, V. Deswaerte, K. Tang, T. Jarde, J. A. Smith, Z. Prodanovic, M. D. Tate, J. J. Balic, D. N. Watkins, J. E. Cain, S. Bozinovski, E. Algar, T. Kohmoto, H. Ebi, W. Ferlin, C. Garbers, S. Ruwanpura, I. Sagi, S. Rose-John, B. J. Jenkins, „ADAM 17 selectively activates the IL-6 trans-signaling/ERK MAPK axis in KRAS-addicted lung cancer“, *EMBO Molecular Medicine*, Vo. 11, 2019, str. 1-19

-
- ⁶⁰ P. Ni, M. Yu, R. Zhang, M. He, H. Wang, S. Chen, G. Duan, „Prognostic significance of ADAM 17 for gastric cancer survival: a meta-analysis”, *Medicina*, Vo. 56, 2020, str. 1-11
- ⁶¹ M. Lesina, M. U. Kurkowski, K. Ludes, S. Rose-John, M. Treiber, G. Klöppel, A. Yoshimura, W. Reindl, B. Sipos, S. Akira, R. M. Schmid, H. Algül, „Stat3/Socs3 Activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasie and development of pancreatic cancer”, *Cancer Cell*, Vo. 19, 2011, str. 456-469
- ⁶² X. Wang, T. Oka, F. L. Chow, S. B. Cooper, J. Odenbach, G. D. Lopaschuk, Z. Kassiri, C. Fernandez-Patron, „Tumor necrosis factor- α converting enzyme is a key regulator of agonist-induced cardiac hypertrophy and fibrosis”, *Hypertension*, Vo. 54, 2009, str. 575-582
- ⁶³ A. Nicolaou, Z. Zhao, B. H. Northoff, K. Sass, A. Herbst, A. Kohlmaier, A. Chalaris, C. Wolfrum, C. Weber, S. Steffens, S. Rose-John, D. Teupser, L. M. Holdt, „Adam 17 deficiency promotes atherosclerosis by enhanced TNFR2 signaling in mice”, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vo. 37, 2017, str. 247-257
- ⁶⁴ M. Stolarczyk, G. D. Amatngalim, X. Yu, M. Veltman, P. S. Hiemstra, B. J. Scholte, „ADAM 17 and EGFR regulate IL-6 receptor and amphiregulin mRNA expression and release in cigarette smoke-exposed primary bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)”, *Physiological Reports*, Vo. 4, 2016, str. 1-15
- ⁶⁵ L. Fiorentino, A. Vivanti, M. Cavallera, V. Marzano, M. Ronci, M. Fabrizi, S. Menini, G. Pugliese, R. Menghini, R. Khokha, R. Lauro, A. Urbani, M. Federici, „Increased tumor necrosis factor α -converting enzyme activity induces insulin resistance and hepatosteatosis in mice”, *Hepatology*, Vo. 51, 2010, str. 103-110
- ⁶⁶ E. S. B. Salem, N. Grobe, K. M. Elased, „Insulin treatment attenuates renal ADAM 17 and ACE2 shedding in diabetic Akita mice”, *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, Vo. 306, 2014, str. F629-F639
- ⁶⁷ E. Kefaloyianni, M. L. Muthu, J. Kaeppler, X. Sun, V. Sabbisetti, A. Chalaris, S. Rose-John, E. Wong, I. Sagi, S. S. Waikar, H. Rennke, B. D. Humphreys, J. V. Bonventre, A. Herrlich, „ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis”, *JCI Insight*, Vo. 1, 2016, str. e87023-e87042
- ⁶⁸ R. Li, L. Uttarwar, B. Gao, M. Charbonneau, Y. Shi, J. S. D. Chan, C. M. Dubois, J. C. Krepinsky, „High Glucose Up-regulates ADAM17 through HIF-1 α in Mesangial Cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vo. 290, 2015, str. 21603-21614
- ⁶⁹ P. Lam, K. S. Lim, S. M. Wang, K. M. Hui, „A microarray study to characterize the molecular mechanism of TIMP-3 – mediated tumor rejection”, Vo. 12, 2005, str. 144-152
- ⁷⁰ D. Fan, Z. Kassiri, „Biology of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3), and its therapeutic implications in cardiovascular pathology”, *Frontiers in Physiology*, Vo.11, 2020, str. 1-16

-
- ⁷¹ M. Wisniewska, P. Goettig, K. Maskos, E. Belouski, D. Winters, R. Hecht, R. Black, W. Bode, „Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex”, *Journal of Molecular Biology*, Vo. 381, 2008, str. 1307-1319
- ⁷² M. Wisniewska, P. Goettig, K. Maskos, E. Belouski, D. Winters, R. Hecht, R. Black, W. Bode, „Structural determinants of the ADAM inhibition by TIMP-3: crystal structure of the TACE-N-TIMP-3 complex”, *Journal of Molecular Biology*, Vo. 381, 2008, str. 1307-1319
- ⁷³ K. Kagawa, A. Nakano, H. Miki, A. Oda, H. Amou, K. Takeuchi, S. Nakamura, T. Harada, S. Fujii, K. Yata, S. Ozaki, T. Matsumoto, M. Abe, „Inhibition of TACE activity enhances the susceptibility of myeloma cells to TRAIL” *PloS one*, Vo. 7, 2012, str. 1-9
- ⁷⁴ A. Balakrishnan, B. Patel, S. A. Sieber, D. Chen, N. Pachikara, G. Zhong, B. F. Cravatt, H. Fan, „Metalloprotease inhibitors GM6001 and TAPI-0 inhibit the obligate intracellular human pathogen *chlamydia trachomatis* by targeting peptide deformylase of the bacterium”, *Journal of Biological Chemistry*, Vo. 281, 2006, str. 16691-16699
- ¹ R. M. M. Khan, Z. J. Y. Chua, J. C. Tan, Y. Yang, Z. Liao, Y. Zhao, „Form Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research”, *Medicina*, Vol. 55, 2019, str. 546-576
- ⁷⁶ A. Petersmann, M. Nauck, D. Müller-Wieland, W. Kerner, U. A. Müller, R. Landgraf, G. Freckmann, L. Heinemann, „Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus”, *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, Vol. 126, 2018, str. 406-410
- ⁷⁷ World Health Organization, „Global Report of Diabetes”, Genewa 2016
- ⁷⁸ World Health Organization, „Diabetes”, 2024
- ⁷⁹ L. E. Graves, K. C. Donaghue, „Management of diabetes complications in youth” *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 10, 2019, str. 1-12
- ⁸⁰ S. D. Solomon, E. Chew, E. J. Duh, L. Sobrin, J. K. Sun, B. L. VanderBeek, C. C. Wykoff, T. W. Gardner, „Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association”, *Diabetes Care*, Vol. 40, 2017, str. 412-418
- ⁸¹ Y. Ding, M. E. Choi, „Autophagy in Diabetic Nephropathy”, *The Journal of Endocrinology*, Vol. 224, 2015, str. R15-R30
- ⁸² P. B. Rodica, „Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: a clinical perspective”, *Diabetes Care*, Vol. 33, 2010, str. 434-441
- ⁸³ A. Gupta, T. Behl, A. Sehgal, S. Bhardwaj, S. Singh, N. Sharma, A. Hafeez, „Exploring the recent molecular targets for diabetes and associated complications”, *Molecular Biology Reports*, Vo. 48, 2021, str. 2863-2879
- ⁸⁴ E. W. Gregg, I. Hora, S. R. Benoit, „Resurgence in Diabetes-Related Complications”, *Journal of the American Medical Association*, Vol. 321, 2019, str. 1867-1868

-
- ⁸⁵ K. Ogurtsova, J. R. Rocha Fernandes, Y. Huang, U. Linnenkamp, L. Guariguata, N. H. Cho, D. Cavan, J. E. Shaw, L. E. Makaroff, „IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040”, *Diabetes Research and Clinical Practice*, Vo. 128, 2017, str. 40-50
- ⁸⁶ International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, Belgium, 2021 <https://www.diabetesatlas.org>
- ⁸⁷ D. Sharma, P. Bhattacharya, K. Kalia, V. Tiwari, „Diabetic nephropathy: New insights into established therapeutic paradigms and novel molecular targets”, *Diabetes Research and Clinical Practice*, Vol. 128, 2017, str. 91-108
- ⁸⁸ P. Bjornstad, M. A. Lanasa, T. Ishimoto, T. Kosugi, S. Kume, D. Jalal, D. M. Maahs, J. K. Snell-Bergeon, R. J. Johnson, T. Nakagawa, „Fructose and uric acid in diabetic nephropathy”, *Diabetologia*, Vol. 58, 2015, str. 1993-2002
- ⁸⁹ K. Umanath, J. B. Lewis, „Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018”, *American Journal of Kidney Disease*, Vol. 71, 2018, str. 884-895
- ⁹⁰ M. Feodoroff, V. Harjutsalo, C. Forsblom, L. Thorn, J. Waden, N. Tolonen, R. Lohvius, P. H. Groop, „Smoking and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes”, *Acta Diabetologica*, Vol. 53, 2016, str. 525-533
- ⁹¹ K. Tziomalos, V. G. Athyros, „Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis”, *The Review of Diabetic Studies: RDS*, Vol. 12, 2015, str. 110-118
- ⁹² G. C. W. Chan, S. C. W. Tang, „Diabetic nephropathy: landmark clinical trials and tribulations”, *Nephrology dialysis transplantation*, Vol. 31, 2016, str. 359-368
- ⁹³ E. Dounousi, A. Duni, K. Leivaditis, V. Vaios, T. Eleftheriadis, V. Liakopoulos, „Improvements in the Management of Diabetic Nephropathy”, *The Review of Diabetic Studies: RDS*, Vol. 12, 2015, str. 119-133
- ⁹⁴ M. K. Sagoo, L. Gnudi, „Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress”, *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 116, 2018, str. 50-63
- ⁹⁵ N. Papadopoulou-Marketou, G. P. Chrousos, C. Kanaka-Gantenbein, „Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis and diagnosis”, *Diabetes/metabolism research and reviews*, Vol. 33, 2017, str. e2841-e2850
- ⁹⁶ X. Xiao, Y. Wang, Y. Hou, F. Han, J. Ren, Z. Hu, „Vitamin D deficiency and related risk factors in patients with diabetic nephropathy”, *Journal of International Medical Research*, Vol. 44, 2016, str. 673-684
- ⁹⁷ S. Ravindran, V. Kuruville, K. Wilbur, S. Munusamy, „Nephroprotective Effects of Metformin in Diabetic Nephropathy”, *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 232, 2017, str. 731-742
- ⁹⁸ K. A. Hasani, I. Khurana, T. Farhat, A. Eid, A. E. Osta, „Epigenetic of diabetic nephropathy: from biology to therapeutics”, *European Medical Journal*, Vo. 5, 2020, str. 48-57
- ⁹⁹ S. John, „Complication in diabetic nephropathy”, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, Vol 10, 2016, str. 247-249

-
- ¹⁰⁰ A. Y. Lee, M. E. Choi, „Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria“, *Pediatric nephrology*, Vol. 30, 2015, str. 1063-1075
- ¹⁰¹ M. Kato, R. Natarajan, „MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers and therapeutic targets“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1353, 2015, str. 72-88
- ¹⁰² C. Gluhovschi, G. Gluhovschi, L. Petrica, R. Timar, S. Velciov, I. Ionita, A. Kaycsa, B. Timar, „Urinary Biomarkers in the Assessment of Early Diabetic Nephropathy“, *Journal of diabetes research*, Vol. 2016, 2016, str. 1-13
- ¹⁰³ N. Papadopoulou-Marketou, C. Kanaka-Gentenbein, N. Marketos, G. P. Chrousos, I. Papassotiriou, „Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update“, *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, Vol. 54, 2017, str. 326-342
- ¹⁰⁴ S. N. Uwaezuoke, „The role of novel biomarkers in predicting diabetic nephropathy: a review“, *International journal of nephrology and renovascular disease*, Vol. 10, 2017, str. 221-231
- ¹⁰⁵ C. Y. Hong, K. Hughesm K. S. Chia, V. Ng, S. L. Ling, „Urinary α_1 -microglobulin as marker of nephropathy in type 2 diabetic asian subjects in Singapore“, *Diabetes Care*, Vo. 26, 2003, str. 338-342
- ¹⁰⁶ T. Fiseha, „Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients“, *Biomarker research*, Vol. 3, 2017, str. 1-7
- ¹⁰⁷ T. Fiseha, „Urinary Markers of Tubular Injury in Early Diabetic Nephropathy“, *International journal of nephrology*, Vol. 2016, 2016, str. 1-10
- ¹⁰⁸ C. H. Chung, J. Fan, E. Y. Lee, J. S. Kang, S. J. Lee, P. E. Pyagay, C. C. Khoury, T. K. Yeo, M. F. Khayat, A. Wang, S. Chen, „Effects of tumor necrosis factor- α on podocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 and in diabetic nephropathy“, *Nephron Extra*, Vol. 5, 2015, str. 1-18
- ¹⁰⁹ Y. K. Ahmed, A. M. A. Hegazy, M. A. H. Keder, M. A. M. Moustafa, „Urinary level of tumor necrosis factor alpha in patients with type-2 diabetic nephropathy“, *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, Vol. 77, 2019, str. 5579-5588
- ¹¹⁰ A. Matheson, M. D. P. Willcox, J. Flanagan, B. J. Walsh, „Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review“, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, Vol. 26, 2010, str. 150-171
- ¹¹¹ S. T. Chou, S. T. Tseng, „Oxidative stress markers in type 2 diabetes patients with diabetic nephropathy“, *Clinical and Experimental Nephrology*, Vol. 21, 2017, str. 283-292
- ¹¹² J. Z. Hang, j. Liu, X. Qin, „Advances in early biomarkers of diabetic nephropathy“, *Revista da Associacao Medica Brasileira*, Vol. 64, 2018, str. 85-92
- ¹¹³ P. G. Khatami, A. Soleimani, N. Sharifi, E. Aghadavod, Z. Asemi, „The effects of high-dose vitamin E supplementation on biomarkers of kidney injury, inflammation, and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial“, *Journal of Clinical Lipidology*, Vol. 10, 2016, str. 922-929

-
- ¹¹⁴ E. Aghadavod, A. Soleimani, E. Amirani, P. G. Khatami, N. Akasheh, R. S. Chaleshtori, R. Shafabakhsh, Z. Banikazemi, Z. Asemi, „Comparison between biomarkers of kidney injury, inflammation, and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy and type 2 diabetes mellitus“, *Iranian Journal of Kidney Disease*, Vol. 14, 2020, str. 31-35
- ¹¹⁵ K. Simpson, A. Wonnacott, D. J. Fraser, T. Bowen, „MicroRNAs in Diabetic Nephropathy: From Biomarkers to Therapy“, *Current diabetes reports*, Vol. 16, 2016, str. 1-7
- ¹¹⁶ C. Magee, D. J. Grieve, C. J. Watson, D. P. Brazil, „Diabetic Nephropathy: a Tangled Web to Unweave“, *Cardiovascular Drugs and Therapy*, Vol. 31, 2017, str. 579-592
- ¹¹⁷ D. Kawanami, K. Matoba, Y. Takeda, Y. Nagai, T. Akamine, T. Yokota, K. Sango, K. Utsunomiya, „SGLT2 Inhibitors as a Therapeutic Option for Diabetic Nephropathy“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18, 2017, str. 1083-1098
- ¹¹⁸ E. S. Lee, H. M. Kim, S. H. Lee, K. B. Ha, Y. S. Bae, S. J. Lee, S. H. Moon, E. Y. Lee, J-H Lee, C. H. Chung, „APX-115, a pan-NADPH oxidase inhibitor, protects development of diabetic nephropathy in podocyte specific NOX5 transgenic mice“ *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 161, 2020, str. 92-101
- ¹¹⁹ J. J. Cha, H. S. Min, K. T. Kim, J. E. Kim, J. Y. Ghee, H. W. Kim, J. E. Lee, J. Y. Han, G. Lee, H. J. Ha, Y. S. Bae, S. R. Lee, S. H. Moon, S. C. Lee, G. Kim, Y. S. Kang, D. R. Cha, „APX-115, a first in-class pan-NADPH oxidase (Nox) inhibitor, protects db/db mice from renal injury“, *Laboratory Investigation*, Vol. 97, 2017, str. 419-431
- ¹²⁰ L. Kishore, N. Kaur, R. Singh, „Renoprotective effect of *Bacopa monnieri* via inhibition of advanced glycation end products and oxidative stress in STZ-nicotinamide-induced diabetic nephropathy“, *Renal Failure*, Vol. 38, 2016, str. 1528-1544
- ¹²¹ Y. Katsuda, T. Sasake, H. Tadaki, Y. Mera, Y. Motohashi, Y. Kemmochi, K. Toyoda, K. Kakimoto, S. Kume, T. Ohta, „Contribution of hyperglycemia on diabetic complications in obese type 2 diabetic STD fatty rats: effects of SGLT inhibitor phlorizin“, *Experimental Animals*, Vol. 64, 2015, str. 1-27
- ¹²² G. Coppolino, C. Leporini, L. Rivoli, F. Ursini, E. D. di Paola, V. Cernaro, F. Arturi, D. Bolignano, E. Russo, G. D. Sarro, M. Andreucci, „Exploring the effects of DPP-4 inhibitors on the kidney from the bench to clinical trials“, *Pharmacological Research*, Vo. 129, 2018, str. 274-294
- ¹²³ K. Ueki, Y. Tanizawa, J. Nakamura, Y. Yamada, N. Inagaki, H. Watada, I. Shimomura, R. Nishimura, H. Miyoshi, A. Abiko, H. Katagiri, M. Hayashi, A. Shimada, K. Naruse, S. Fujimoto, M. Fujiwara, K. Shikata, Y. Okada, E. Araki, T. Yamazaki, T. Kadowaki, „Long-term safety and efficacy of alogliptin, a DPP-4 inhibitor, in patients with type 2 diabetes: a 3-year prospective, controlled, observational study (J-BRAND Registry)“, *BJM Open Diabetes Research & Care*, Vol. 9, 2021, str. 1-14

-
- ¹²⁴ E. Dounousi, A. Duni, K. Leivaditis, V. Vaios, T. Elftheriadis, V. Liakopoulos, „Improvements in the Management of Diabetic Nephropathy”, *Journal of the Society for Biomedical Diabetes Research*, Vo. 12, 2015, str. 119-133
- ¹²⁵ R. Yacoub, K. N. Campbell, „Inhibition of RAS in diabetic nephropathy”, *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, Vo. 8, 2015, str. 29-40
- ¹²⁶ J. Donate-Correa, E. Martin-Núñez, M. Muros de Fuentes, C. Mora-Fernández, J. F. Navarro-González, „Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy”, *Journal of Diabetes Research*, Vol. 2015, 2015, str. 1-9
- ¹²⁷ R. Wu, X. Liu, J. Yin, H. Wu, X. Cai, N. Wang, Y. Qian, F. Wang, „IL-6 receptor blockade ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting inflammasome in mice”, *Metabolism*, Vol. 83, 2018, str. 18-24
- ¹²⁸ W. J. Ni, L. Q. Tang, W. Wei, „Research progress in signalling pathway in diabetic nephropathy”, *Diabetes/metabolism research and reviews*, Vol. 31, 2015, str. 221-233
- ¹²⁹ H. Gallagher, R. J. Suckling, „Diabetic nephropathy: where are we on the journey from pathophysiology to treatment”, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, Vol. 18, 2016, str. 641-647
- ¹³⁰ S. Boyce, K. F. Tipton, „Enzyme Classification and Nomenclature”, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, str. 1-11
- ¹³¹ M. Krochmal, G. Kontostathi, P. Magalhaes, M. Makridakis, J. Klein, H. Husi, J. Leierer, G. Mayer, J. L. Bascands, C. Denis, J. Zoidakis, P. Zübig, C. Delles, J. P. Schanstra, H. Mischak, A. Vlahou, „Urinary peptidomics analysis reveals proteases involved in diabetic nephropathy”, *Scientific Reports*, Vo. 7, 2017, str. 1-11
- ¹³² M. Krochmal, J. P. Schanstra, H. Mischak, „Urinary peptidomics in kidney disease and drug research”, *Expert Opinion on Drug Discovery*, Vo. 13, 2018, str. 259-268
- ¹³³ S. Cluver, C. Li, H. M. Siragy, „Intrarenal Angiotensin-Converting Enzyme: the Old and the New”, *Current Hypertension Reports*, Vo. 19, 2017, str. 1-7
- ¹³⁴ A. Gilbert, J. Liu, G. Cheng, C. An, K. Deo, A. M. Gorret, X. Qin, „A review of urinary angiotensin converting enzyme 2 in diabetes and diabetic nephropathy”, *Biochemia Medica*, Vo. 29, 2018, str. 1-11
- ¹³⁵ D. J. Kelly, Y. Zhang, G. Moe, G. Naik, R. E. Gilbert, „Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats”, *Diabetologia*, Vo. 50, 2007, str. 2398-2404
- ¹³⁶ K. M. Thrailkill, R. C. Bunn, C. S. Moreau, G. E. Cockrell, P. M. Simpson, H. N. Coleman, J. P. Frindik, S. F. Kemp, J. L. Fowlkes, „Matrix Metalloproteinase-2 Dysregulation in Type 1 Diabetes”, *Diabetes Care*, Vo. 30, 2007, str. 2321-2326
- ¹³⁷ D. Suzuki, M. Miyazaki, K. Jinde, T. Koji, M. Yagame, M. Endoh, Y. Namoto, H. Sakai, „In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy”, *Kidney International*, Vo. 52, 1997, str. 111-119

-
- ¹³⁸ S. V. McLennan, D. J. Kelly, M. Schache, M. Waltham, V. Dy, R. G. Langham, D. K. Yue, R. E. Gilbert, „Advanced glycation end products decrease mesangial cell MMP-7: A role in matrix -accumulation in diabetic nephropathy?”, *Kidney International*, Vo. 72, 2007, str. 481-488
- ¹³⁹ J. K. Baidya, S. Banerjee, S. Gutti, T. Jha, N. Adhikari, „Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and its inhibitors: a minireview”, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, Vo. 10, 2024, str. 1-19
- ¹⁴⁰ X. Xu, L. Xiao, P. Xiao, S. Yang, G. Chen, F. Liu, Y. Y. Kanwar, L. Sun, „A Glimpse of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Nephropathy”, *Current Medicinal Chemistry*, Vo. 21, 2014, str. 3244-3260
- ¹⁴¹ A. J. Mouton, O. J. R. Gonzalez, A. R. Kaminski, E. T. Moore, M. L. Lindsey, „Matrix metalloproteinase-12 as an endogenous resolution promoting factor following myocardial infarction”, *Pharmacological Research*, Vo. 137, 2018, str. 252-258
- ¹⁴² N. Garcia-Fernandez, C. Jacobs-Cachá, J. Mora-Gutiérrez, A. Vergara, J. Orbe, M. J. Soler, „Matrix metalloproteinases in diabetic kidney disease”, *Journal of Clinical Medicine*, Vo. 9, 2020, str. 1-17
- ¹⁴³ L. Petrica, S. Ursoniu, F. Gadalean, A. Vlad, G. Gluhovschi, V. Dumitrascu, D. Vlad, C. Gluhovschi, S. Velciov, F. Bob, P. Matusz, O. Milas, A. Secara, A. Simulescu, R. Popescu, „Urinary podocyte-associated mRNA levels correlate with proximal tubule dysfunction in early diabetic nephropathy of type 2 diabetes mellitus”, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, Vo. 9, 2017, str. 1-12
- ¹⁴⁴ L. Fiorentino, M. Cavalera, S. Menini, V. Marchetti, M. Mavilio, M. Fabrizi, F. Conserva, V. Casagrande, R. Menghini, P. Pontrelli, I. Arisi, M. D’Onodrio, D. Lauro, R. Khokha, D. Accili, G. Pugliese, L. Gesualdo, R. Lauro, M. Federici, „Loss of TIMP3 underlies diabetic nephropathy via FoxO1/STAT1 interplay”, *EMBO Molecular Medicine*, Vo. 5, 2013, str. 441-455
- ¹⁴⁵ C. P. Domingueti, L. M. S. Dusse, M. G. Carvalho, K. B. Gomes, A. P. Fernandes, „Hypercoagulability and cardiovascular disease in diabetic nephropathy”, *Clinica Chemica Acta*, Vo. 415, 2013, str. 279-285
- ¹⁴⁶ B. Mitic, G. Lazarevic, P. Vlahovic, M. Rajic, V. Stefanovic, „Diagnostic Value of the Aminopeptidase N, N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase and Dipeptidylpeptidase IV in Evaluating Tubular Dysfunction in Patients with Glomerulopathies”, *Renal Failure*, Vo. 30, 2009, str. 896-903
- ¹⁴⁷ T. M. Ansary, M. Urushihara, Y. Fujisawa, S. Nagata, H. Urata, D. Nakano, H. Hirofumi, K. Kitamura, S. Kagami, A. Nishiyama, "Effects of the selective chymase inhibitor TEI-F00806 on the intrerenal renin-angiotensin system in salt-treated angiotensin I-infused hyperstensive mice", *Experimental Physiology*, Vo. 103, 2018, str. 1524-1531
- ¹⁴⁸ A. A. Husan, B. Hoher, "Role of soluble and membrane-bound dipeptidyl peptidase-4 in diabetic nephropathy", *Journal of Molecular Endocrinology*, Vo. 59, 2017, str. R1-R10

-
- ¹⁴⁸ S. Shi, D. Koya, K. Kanasaki, "Dipeptidil peptidase-1 and kidney fibrosis in diabetes", *Fibrogenesis & Tissue Repair*, Vo. 9, 2016, str. 1-10
- ¹⁴⁹ V. Peters, M. Kebbewar, E. W. Jansen, C. Jakobs, E. Riedl, H. Keppler, D. Frey, K. Adelman, K. Klingbeil, M. Mack, G. F. Hoffmann, B. Janssen, J. Zschocke, B. A. Yard, „Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity“, *Amino Acids*, Vo. 38, 2010, str. 1607-1615
- ¹⁵⁰ S. L. Habib, „Diabetes and renal tubular cell apoptosis“, *World Journal of Diabetes*, Vo. 4, 2013, str. 27-30
- ¹⁵¹ 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“, *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, Vo. 1867, 2020, str. 1-13
- ¹⁵² P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek, „Cathepsin D- many functions of one aspartic protease“, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Vo. 68, 2008, str. 12-28
- ¹⁵³ L. Musante, D. Tataruch, D. Gu, X. Liu, C. Forsblom, P. H. Groop, H. Holthofer, „Proteases and Protease Inhibitors of Urinary Extracellular Vesicles in Diabetic Nephropathy“, *Journal of Publishing Corporation*, Vo. 2015, 2015, str. 1-15
- ¹⁵⁴ J. E. Swedberg, L. V. Nigon, J. C. Reid, S. J. de Veer, C. M. Walpole, C. R. Stephens, T. P. Walsh, T. K. Takayama, J. D. Hooper, J. A. Clements, A. M. Buckle, J. M. Harris, :Substrate-guided design of a potent and selective kallikrein-related peptidase inhibitor for kallikrein 4, *Chemistry & Biology*, Vo. 16, 2009, str. 633-643
- ¹⁵⁵ Y. Yano, N. Kitagawa, E. C. Gabazza, K. Morioka, H. Urakawa, T. Tanaka, A. Katsuki, R. Araki-Sasaki, Y. Hori, K. Nakatani, O. Taguchi, Y. Sumida, Y. Adachi, „Increased Plasma Thrombin-Activatable Fibrinolytic Inhibitor Levels in Normotensive Type 2 Diabetic Patients with Microalbuminuria“, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vo. 88, 2003, str. 736-741
- ¹⁵⁶ J. Saint-Pol, E. Eschenbrenner, E. Dornier, C. Boucheix, S. Charrin, E. Rubinstein, „Regulation of the trafficking and the function of the metalloprotease ADAM 10 by tetraspanins“, *Biochemical Society Transactions*, Vo. 45, 2017, str. 937-944
- ¹⁵⁷ P. Gutwein, A. Schramme, M. S. Abdel-Bakky, K. Doberstein, I. A. Hauser, A. Ludwig, P. Altevogt, S. Gauer, A. Hillmann, T. Weide, C. Jespersen, W. Eberhardt, J. Pfeilschifter, „ADAM10 is expressed in human podocytes and found in urinary vesicles of patients with glomerular kidney diseases“, *Journal of Biochemical Science*, Vo. 17, 2010, str. 2-9
- ¹⁵⁸ V. Palau, B. Nugraha, D. Benito, J. Pascual, M. Y. Emmert, S. P. Hoerstrup, M. Riera, M. J. Soler, „Both specific endothelial and proximal tubular ADAM 17 deletion protect against diabetic nephropathy“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vo. 22, 2021, str. 1-20
- ¹⁵⁹ J. R. Charlton, E. J. Baldelomar, D. M. Hyatt, K. M. Bennett, „Nephron number and its determinants: a 2020 update“, *Pediatric Nephrology*, Vo. 36, 2021, str. 797-807

-
- ¹⁶⁰ A. P. McMahon, „Development of the mammalian kidney”, *Current Topics in Developmental Biology*, Vo. 117, 2016, str. 31-64
- ¹⁶¹ S. Kardasz, „The function of the nephron and the formation of urine”, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, Vo. 16, 2015, str. 286-291
- ¹⁶² R. W. Naylor, M. R. P. T. Morais, R. Lennon, „Complexities of the glomerular basement membrane”, *Nature Reviews Nephrology*, Vo. 17, 2021, str. 112-127
- ¹⁶³ J. Reiser, M. M. Altintas, „Podocytes”, *F1000 Research*, Vo. 5, 2016, str. 1-19
- ¹⁶⁴ L. Oxburgh, „Kidney Nephron Determination”, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vo. 34, 2018, str. 427-450
- ¹⁶⁵ J. H. Zhao, „Mesangial cells and renal fibrosis”, *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*, Vo. 1165, 2019, str. 165-194
- ¹⁶⁶ C. B. Marshall, „Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: adaptive or pathogenic?”, *American Journal of Physiology Renal Physiology*, Vo. 311, 2016, str. F831-F843
- ¹⁶⁷ M. Nagata, „Podocyte injury and its consequences”, *Kidney International*, Vo. 89, 2016, str. 1221-1230
- ¹⁶⁸ C. W. Tung, Y. C. Hsu, Y. H. Shih, P. J. Chang, C. L. Lin, „Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy”, *Nephrology*, Vo. 23, 2018, str. 32-37
- ¹⁶⁹ J. S. Lin, K. Susztak, „Podocytes: the weakest link in diabetic kidney disease?”, *Current Diabetes Reports*, Vo. 16, 2016, str. 1-17
- ¹⁷⁰ D. Rogacka, „Insulin resistance in glomerular podocytes: potential mechanism of induction”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vo. 710, 2021, str. 1-12
- ¹⁷¹ Z. Lv, M. Hu, J. Zhen, J. Lin, Q. Wang, R. Wang, „Rac1/PAK1 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition of podocytes in vitro via targeting β -catenin transcriptional activity under high glucose conditions”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vo. 45, 2013, str. 255-264
- ¹⁷² A. Piwkowska, D. Rogacka, I. Audzeyenka, M. Jankowski, S. Angielski, „High glucose concentration effects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes”, *Journal of Cellular Biochemistry*, Vo. 112, 2011, str. 1661-1672
- ¹⁷³ A. Olejnik, A. Franczak, A. Krzywonos-Zawadzka, M. Kałużna-Oleksy, I. Bil-Lula, „The biological role of klotho protein in the development of cardiovascular diseases”, *BioMed Research International*, Vo. 2018, 2018, str. 1-17
- ¹⁷⁴ L. Hosseini, S. Babaie, P. Shahabi, K. Fekri, A. R. Shafiee-Kandjani, V. Mafikandi, L. Maghsoumi-Norouzabad, N. Abolhasanpour, „Klotho: molecular mechanisms and emerging therapeutics in central nervous system diseases”, *Molecular Biology Reports*, Vo. 51, 2024, str. 1-12
- ¹⁷⁵ Y. Xu, Z. Sun, „Molecular basis of klotho: from gene to function in aging”, *Endocrine Reviews*, Vo. 36, 2015, str. 174-193
- ¹⁷⁶ A. Piwkowska, P. Rachubik, M. Typiak, T. Kulesza, I. Audzeyenka, M. A. Saleem, N. Gruba, M. Wysocka, A. Lesner, D. Rogacka, „ADAM 10 as a major activator of

reactive oxygen species production and klotho shedding in podocytes under diabetic conditions", *Biochemical Pharmacology*, Vo. 225, 2024, str. 1-19

¹⁷⁷ M. Kuro-o, „The Klotho proteins in health and disease" *Nature Reviews Nephrology*, Vo.15, 2019, str. 27-44

¹⁷⁸ A. Tang, Y. Zhang, L. Wu, Y. Lin, L. Lv, L. Zhao, B. Xu, Y. Huang, M. Li, „Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy", *Frontiers in Endocrinology*, Vo. 13, 2023, str. 1-17

¹⁷⁹ R. Liu, X. Li, K. S. Lam, „Combinatorial chemistry in drug discovery", *Current Opinion in Chemical Biology*, Vo. 38, 2017, str. 117-126

¹⁸⁰ A. Rasheed, R. Farhat, „Combinatorial Chemistry a Review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vo. 4, 2013, str. 2502-2516

¹⁸¹ H. Singh, N. Sharma, M. P. Khinchi, S. G. A. Kumawat, „Combinatorial chemistry a review", *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, Vo. 5, 2017, str. 1-10

¹⁸² S. Shastri, H. Narang, „Combinatorial chemistry – modern synthesis approach", *Pharma Tutor*, Vo. 5, 2017, str. 37-63

¹⁸³ P. Wentworth Jr, K. D. Janda, „Generating and analyzing combinatorial chemistry libraries", *Current opinion in combinatorial chemistry libraries*, Vo. 9, 1998, str. 109-115

¹⁸⁴ A. Abdilidinova, M. J. Kueth, Y. D. Gong, „Heterocycles as a peptidomimetics scaffold: solid-phase synthesis strategies", *Pharmaceuticals*, Vo. 14, 2021, str. 1-17

¹⁸⁵ A. R. Puentes, M. C. Morejón, D. G. Rivera, L. A. Wessjohann, „Peptide macrocyclization assisted by traceless turn inducers derived from ugi peptide ligation with cleavable and resin-linked amines", *Organic Letters*, Vo. 19, 2017, str. 4022-4025

¹⁸⁶ M. Alhassan, O. A. Musaimi, J. M. Collins, F. Albericio, B. G. de la Torre, „Cleaving protected peptides from 2-chlorotrityl chloride resin. Moving away from dichloromethane", *Green Chemistry*, Vo. 22, 2020, str. 2840-2845

¹⁸⁷ T. K. Lee, S. J. Ryoo, Y. S. Lee, „A new method for the preparation of 2-chlorotrityl resin and its application to solid-phase peptide synthesis", *Tetrahedron Letters*, Vo. 48, 2007, str. 389-391

¹⁸⁸ A. El-Faham, F. Albericio, „Carpino's protecting groups, beyond the Boc and the Fmoc", *Peptide Science*, Vo. 112, 2020, str. 1-9

¹⁸⁹ S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, „Microwave heating in solid-phase peptide synthesis", *Chemical Society Review*, Vo. 41, 2012, str. 1826-1844

¹⁹⁰ M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, „Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis", *Methods in Molecular Biology*, Vo. 33, 2006, str. 239-249

¹⁹¹ T. Klein, U. Eckhard, A. Dufour, N. Solis, C. M. Overall, „Proteolytic cleavage-mechanism, function, and „omic" approaches for a near-ubiquitous posttranslational modification", *Chemical Reviews*, Vo. 118, 2018, str. 1137-1168

-
- ¹⁹² K. Nakashima, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto, „Spectrophotometric assay for protease activity in ionic liquids using chromogenic substrates”, *Analytical Biochemistry*, Vo. 374, 2008, str. 285-290
- ¹⁹³ M. R. Becker, V. Stefani, R. R. B. Correia, C. Bubeck, M. Jahja, M. M. C. Forte, „Waveguide optical properties of polystyrene doped with p-nitroaniline derivatives”, *Optical Materials*, Vo. 32, 2010, str. 1526-1531
- ¹⁹⁴ L. M. DeMarco, S. Fischer, T. Henle, „High molecular weight coffee melanoidins are inhibitors for matrix metalloproteases”, *Journal of Agricultural and food chemistry*, Vo. 59, 2011, str. 11417-11423
- ¹⁹⁵ G. Feng, G. Q. Zhang, D. Ding, „Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagram”, *Chemical Society Reviews*, Vo. 49, 2020, str. 8179-8234
- ¹⁹⁶ L. M. Jungbauer, C. Yu, K. J. Laxton, M. J. LaDu, „Preparation of fluorescently-labeled amyloid-beta peptide assemblies: the effect of fluorophore conjugation on structure and function”, *Journal of Molecular Recognition*, Vo. 22, 2009, str. 403-413
- ¹⁹⁷ J. D. Stewart, „Optimalization of dye molecules for use in studying inflammatory caspase enzymes”, *DePaul Discoveries*, Vo. 11, 2022, str. 1-12
- ¹⁹⁸ F. Islam, M. Basu, P. P. Mishra, „From ensemble FRET to single-molecule imaging monitoring individual cellular machinery in action”, *Optical Spectroscopic and Microscopic Techniques Analysis of Biological Structures*, 2022, str. 113-142
- ¹⁹⁹ B. T. Bajar, E. S. Wang, S. Zhang, M. Z. Lin, J. Chu, „A guide to fluorescent protein FRET pairs”, *Sensors*, Vo. 16, 2016, str. 1-24
- ²⁰⁰ M Skruzny, E. Pohl, M. Abella, „FRET microscopy in yeast”, *Biosensors*, Vo. 9, 2019, str. 1-17
- ²⁰¹ A. Kaur, P. Kaur, S. Ahuja, „Fröster resonance Energy transfer (FRET) and applications thereof”, *Analytical Methods*, Vo. 12, 2020, str. 5532-5550
- ²⁰² M. Wysocka, A. Lesner, „Future of protease activity assays”, *Current Pharmaceutical Design*, Vo. 19, 2013, str. 1062-1067
- ²⁰³ M. Poreba, A. Szalek, W. Rut, P. Kasperkiewicz, I. Rutkowska-Włodarczyk, S. J. Snipas, Y. Itoh, D. Turk, B. Turk, C. M. Overall, L. Kaczmarek, G. S. Salvesen, M. Drag, „Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families”, *Scientific Reports*, Vo. 7, 2017, str. 1-12
- ²⁰⁴ V. Hook, M. Yoon, C. Mosier, G. Ito, S. Podvin, B. P. Head, R. Rissman, A. J. O'Donoghue, G. Hook, „Cathepsin B in neurodegeneration of Alzheimer's disease, traumatic brain injury, and related brain disorders”, *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, Vo. 1868, 2020, str. 1-14
- ²⁰⁵ A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F. M. Veronese, „Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vo. 60, 2008, str. 13-28

-
- ²⁰⁶ B. Srinivasan, „A guide to the Michaelis-Menten equation: steady state and beyond”, *The FEBS Journal*, Vo. 289, 2022, str. 6086-6098
- ²⁰⁷ B. Geueke, H. P. E. Kohler, „Enzyme assays, substrate specificities, kinetic parameters: measurement of enzyme activities”, *Handbook of hydrocarbon and Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families lipid microbiology*, 2010, str. 4195-4202
- ²⁰⁸ U. Florjanczyk, D. P. Ng, S. Andreopoulos, J. Jenkinson, „Developing a three-dimensional animation for deeper molecular understanding of Michaelis-Menten enzyme kinetics”, *Multimedia in Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vo. 46, 2018, str. 561-565
- ²⁰⁹ C. Park, „Visual Interpretation of the meaning of k_{cat}/K_M in enzyme kinetics”, *Journal of Chemical Education*, Vo. 99, 2022, str. 2556-2562
- ²¹⁰ 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”, *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, Vo. 48, 2000, str. 1740-1744
- ²¹¹ S. T. Furlong, R. C. Mauger, A. M. Strimpler, Y. P. Liu, F. X. Morris, P. D. Edwards, „Synthesis and physical characterization of a P1 arginine combinatorial library, and its application to the determination of the substrate specificity of serine peptidases”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vo. 10, 2002, str. 3637-3647
- ²¹² M. A. Saleem, M. J. O'Hare, J. Reiser, R. J. Coward, C. D. Inward, T. Faern, C. Y. Xing, L. Ni, P. W. Mathieson, P. Mundel, „A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression”, *Journal of the American Society of Nephrology*, Vo. 13, 2002, str. 630-638
- ²¹³ B. L. Furman, „Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats”, *Current Protocols in Pharmacology*, Vo. 70, 2015, str. 1-20
- ²¹⁴ M. A. Miller, L. Barkal, K. Jeng, A. Herrlich, L. G. Griffith, D. A. Lauffenburger, „Proteolytic activity matrix analysis (PrAMA) for simultaneous determination of multiple protease activities”, *Integrative Biology*, Vo. 3, 2011, str. 422-438
- ²¹⁵ P. P. Geurink, T. Klein, L. Prély, K. Paal, M. A. Leeuwenburgh, G. A. van der Marel, H. F. Kauffman, H. S. Overkleeft, R. Bischoff, „Design of peptide hydroxamate-based photoreactive activity-based probes of zinc-dependent metalloproteases”, *European Journal of Organic Chemistry*, Vo. 1, 2010, str. 2100-2112
- ²¹⁶ M. Alvarez-Iglesias, G. Wayne, K. P. O'Dea, A. Amour, M. Takata, „Continuous real-time measurement of tumor necrosis factor- α converting enzyme activity on live cells”, *Laboratory Investigation*, Vo. 82, 2005, str. 1440-1448
- ²¹⁷ M. L. Moss, D. Minond, T. Yoneyama, H. P. Hansen, N. Vujanovic, F. H. Rasmussen, „An improved fluorescent substrate for assaying soluble and membrane-associated ADAM family member activities”, *Analytical Biochemistry*, Vo. 507, 2016, str. 13-17

-
- ²¹⁸ C. Camodeca, E. Nuti, F. Tosetti, A. Poggi, C. D'Arrigo, M. R. Zocchi, A. Rossello, „Synthesis and in vitro evaluation of ADAM 10 and ADAM 17 highly selective biomaging probes“, *ChemMedChem*, Vo. 13, 2018, str. 2119-2131
- ²¹⁹ A. Amour, P. M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C. G. Knight, B. J. Smith, P. E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knäuper, A. J. P. Docherty, G. Murphy „TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3“, *FEBS Letters*, Vo. 435, 1998, str. 39-44
- ²²⁰ G. Jin, X. Huang, R. Black, M. Wolfson, C. Rauch, H. McGregor, G. Ellestad, R. Cowling, „A continuous fluorimetric assay for tumor necrosis factor- α converting enzyme“, *Analytical Biochemistry*, Vo. 302, 2002, str. 269-275
- ²²¹ G. B. Fields „Using fluorogenic peptide substrates to assay matrix metalloproteinases“, *Methods in Molecular Biology*, Vo. 151, 2001, str. 495-518
- ²²² C. G. Knight, F. Willenbrock, G. Murphy, „A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases“, *Federation of European Biochemical Societies*, Vo. 296, 1992, str. 263-266
- ²²³ U. Neumann, H. Kubota, K. Frei, V. Ganu, D. Leppert, „Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme“, *Analytical Biochemistry*, Vo. 328, 2004, str. 166-173
- ²²⁴ C. I. Caescu, G. R. Jeschke, B. E. Turk, „Active site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM 17“, *Biochemical Journal*, Vo. 424, 2010, str. 79-88
- ²²⁵ M. H. Lambert, R. K. Blackburn, T. D. Seaton, D. B. Kassel, D. S. Kinder, M. A. Leesnitzer, D. M. Bickett, J. R. Warner, M. W. Andersen, J. G. Badiang, D. J. Cowan, M. D. Gaul, K. G. Petrov, M. H. Rabinowitz, R. W. Wiethe, J. D. Becherer, D. L. McDougald, D. L. Musso, R. C. Andrews, M. L. Moss, „Substrate specificity and novel selective inhibitors of TNF- α converting enzyme (TACE) from two-dimensional substrate mapping“, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, Vo. 8, 2005, str. 327-339
- ²²⁶ E. J. Lee, P. G. Moon, M. C. Baek, H. S. Kim, „Comparison of the effects of matrix metalloproteinase inhibitors on TNF- α release from activated microglia and TNF- α converting enzyme activity“, *Biomolecules & Therapeutics*, Vo. 22, 2014, str. 414-419
- ²²⁷ M. L. Moss, F. H. Rosmussen, „Fluorescent substrates for the proteinases ADAM 17, ADAM 10, ADAM 8, and ADAM 12 useful for high-throughput inhibitor screening“, *Analytical Biochemistry*, Vo. 366, 2007, str. 144-148
- ²²⁸ D. M. Bennion, C. A. Rosado, E. A. Haltigan, R. W. Regenhardt, C. Sumners, M. F. Waters, „Serum activity of angiotensin converting enzyme 2 is decreased in patients with acute ischemic stroke“, *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, Vo. 17, 2016, str. 1-7
- ²²⁹ V. Palau, J. Jarrin, S. Villanueva, D. Benito, E. Marquez, E. Rodriguez, M. J. Soler, A. Oliveras, J. Gimeno, L. Sans, M. Crespo, J. Pascual, C. Barrios, M. Riera,

„Endothelial ADAM17 expression in the progression of kidney injury in an obese mouse model of pre-diabetes“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vo. 23, 2022, str. 1-12

²³⁰ S. Zhang, J. Yang, H. Li, Y. Li, Y. Liu, D. Zhang, F. Zhang, W. Zhou, X. Chen, „Skimmin, a coumarin, suppresses the streptozotocin-induced diabetic nephropathy in wistar rats“, *European Journal of Pharmacology*, Vo. 692, 2012, str. 78-83

OŚWIADCZENIE

Ja niżej podpisana oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca doktorska pt. "Aktywność proteolityczna enzymu ADAM 17 jako czynnika predykcyjnego rozwoju nefropatii cukrzycowej", wykonana pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Wysockiej prof. UG, w katedrze Chemii Biomedycznej, nie narusza praw autorskich, interesów prawnych i materialnych osób w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz.U. 2000r. Nr 80, poz 904, z późn.zm.)

.....
data

.....
podpis