Proteazy: znaczenie, rola i oznaczanie

Anna TOKARZEWICZ, Ewa GORODKIEWICZ* – Zakład Elektrochemii, Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstok, Białystok

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2015, **69**, 2, 81–88

Wstęp

Tematem artykułu są proteazy, ich znaczenie w życiu człowieka oraz metody pomiaru stężenia i aktywności tych związków.

Proteazy (proteinazy, peptydazy lub enzymy proteolityczne) odgrywają bardzo istotną rolę w ludzkim życiu. Do tej pory, w ludzkim organizmie zidentyfikowano ponad 500 tego typu związków, które są kodowane przez ok. 2% wszystkich genów [1].

Klasyfikacja i podział proteaz

Enzymy protelityczne są podklasą klasy hydrolaz i są oznaczone kodem EC 3.4. Hydrolizują one wiązania peptydowe w środku wiązania białkowego (endopeptydazy), badź też na jego końcach (egzopeptydazy).

Istnieją trzy podziały proteaz. Pierwszym z nich jest podział ze względu na substrat i umiejscowienie wiązania, które ulega hydrolizie. Drugim jest podział ze względu na mechanizm katalizy. Trzeciego podziału proteaz dokonano pod względem pH, w którym wykazują one maksimum aktywności [2, 3].

Znaczenie proteaz w życiu człowieka

Proteazy odgrywają istotną rolę w wielu procesach, takich jak: zapłodnienie, trawienie, wzrost, dojrzewanie, starzenie się, a nawet śmierć organizmu. Regulują one liczne procesy fizjologiczne poprzez kontrolę aktywacji, syntezy oraz degradacji białek. Pełnią również istotną funkcję w replikacji oraz rozprzestrzenianiu się wirusów, bakterii oraz parazytów. Odpowiedzialne są za efektywną transmisję choroby wywoływanej przez te patogeny. Z tego powodu peptydazy stanowią istotny cel w przypadku leczenia wielu chorób.

Enzymy proteolityczne odgrywają bardzo istotną rolę we wzroście pierwotnego guza nowotworowego i powstawaniu jego przerzutów (metastazy) [3÷5]. Umożliwiają one dzielenie się komórek nowotworowych guza, torują im drogę w przestrzeniach międzykomórkowych, umożliwiają przedostawanie się do i ze światła naczyń krwionośnych, a także zagnieżdżanie się w innych tkankach organizmu [6].

Dalej opisano proteazy najważniejsze dla człowieka, które są w większości związkami z udowodnionym znaczeniem klinicznym.

Kaspazy

Kaspazy są związkami z grupy proteaz, które kontolują apoptozę. Są one również związane z funkcjonowaniem systemu odpornościowego, co umożliwia post-translacyjną modyfikację cytokin i aktywację kaskady kaspaz w reakcjach cytotoksycznych. Są one odpowiedzialne w największym stopniu za uszkodzenia komórek. Kaspazy zabijają wszystkie komórki i muszą być kontrolowane przez aktywację/dezaktywację ich zymogenów [7].

Najczęściej badanym enzymem należącym do tej grupy jest kaspaza-8.

Kaspaza-8

Kaspaza-8 (EC 3.4.22.61, endopeptydaza), jest członkiem rodziny cysteinowo-aspartylowych proteaz, które wykazują maksimum aktywności w pH=2–3. Aktywna kaspaza-8 ma zdolność do aktywowania kaspaz efektorowych. Co w pózniejszym czasie popycha komórki cytotoksyczne T do zabicia komórek nowotworowych. W rezultacie, kaspaza-8 pośrednio uczestniczy w hamowaniu rozwoju nowotworu [8].

Autor do korespondencji:
Dr hab. Ewa GORODKIEWICZ, e-mail: ewka@uwb.edu.pl

Mutację, która inaktywuje kaspazy-8 wykazano m.in. u dzieci z neuroblastomą, nowotworami jelita grubego, w raku wątroby, ostrej białaczce [9].

Katepsyny

Katepsyny są proteazami lizosomalnymi, które powodują hydrolityczną degradację łańcuchów białkowych zaangażowanych w rozkład komórek. Penetrujące katepsyny z zewnątrz komórki przez jej błonę mogą spowodować degradację jej struktur przez kontakt z tymi enzymami. Jest to stan patologiczny i może powodować liczne choroby, takie jak nowotwory, osteoporozę, chorobę Alzheimera i inne. Ostatnio odkryto, że tego rodzaju enzymy są zaangażowane w apoptozę komórek poprzez wywoływanie kaspazozależnej śmierci komórek [10, 11].

Katepsyna D

Katepsyna D (EC 3.4.23.5, maksimum aktywności w pH=2–3) jest enzymem zaliczanym do endopeptydaz aspartylowych. Lizosomalna katepsyna D bierze udział w proteolizie wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych białek. Stwierdzono, że katepsyny D i B są bardzo ważnymi czynnikami w apoptotycznej zaprogramowanej śmierci komórek [12].

Katepsyna D jest zaangażowana w proces wzrostu guza, jego penetracji w tkankach, migracji komórek nowotworowych i ich umiejscowieniu w ogniskach przerzutowych. Nasilenie rozpadu i wzrost aktywności katepsyny D we krwi ma również miejsce w stanach patologicznych, takich jak stany zapalne, niedokrwienie mięśnia sercowego, choroby wątroby, dystrofii mięśni, w stwardnieniu rozsianym lub chorobie Alzheimera.

W przypadku mięśniaków macicy, gruczolakoraku okrężnicy jest ona uznawana za marker nowotworowy i ustalenie jej stężenia w płynach ustrojowych jest komplementarne do badania histopatologicznego [13÷18].

Katepsyna B

Katepsyna B (EC 3.4.22.1) jest zaliczana do neutralnych (maksimum aktywności w pH=6–7) endopeptydaz cysteinowych [19]. Jest ona jedną z najbardziej rozpowszechnionych proteaz w organizmie. Bierze udział w procesie kancerogenezy na wielu poziomach – uczestniczy w transformacji nowotworowej, inwazji oraz powstawaniu przerzutów. Wykazano, że katepsyna B wnika w jądro komórkowe i w ten sposób aktywuje apoptozę [12]. Większość badań potwierdza możliwość pomiaru aktywności endopeptydaz cysteinowych jako markerów "agresywności nowotworu" oraz inhibitorów tych enzymów jako markerów "obronności organizmu" w diagnostyce nowotworowej i monitorowaniu terapii [20÷22].

Katepsyna G

Katepsyna G (EC 3.4.21.20) jest jedną z alkalicznych (maksimum aktywności w pH=8–9), serynowych endopeptydaz. Fizjologiczna rola katepsyny G w żywym organizmie jest głównie związana z wczesną odpowiedzią immunologiczną, lecz jej aktywność biologiczna nie jest ograniczona wyłącznie do tego. Katepsyna G bierze również udział w wielu procesach fizjologicznych, takich jak degradacja tkanek, aktywacja płytek krwi, chemotaksja monocytów i neutrofili, proteoliza

czynników krzepnięcia krwi i powstawanie angiotensyny II. Ostatnio zaobserwowano, że enzym ten wywołuje wielokomórkowe sferoidy komórek nowotworowych sutka [23÷25].

Konwertaza angiotensyny (Angiotensin- Converting Enzyme, ACE) i renina

Konwertaza angiotensyny (ACE, EC 3.4.15.1) jest zaliczana do zasadowych, metaloorganicznych egzopeptydaz i do peptydylowych dipeptydaz. Enzym ten katalizuje odszczepienie C-końcowego dipeptydu z dekapeptydu angiotensyny I z wytworzeniem oktapeptydu angiotensyny II, która jest najsilniejszą substancją powodującą skurcz błony mięśni naczyń krwionośnych. Degraduje ona również bradykininę, która wykazuje podobne działanie [26]. Obecnie, szeroko stosowane w medycynie są leki (kaptopryl, benazepril), które są inhibitorami konwertazy angiotensyny (inhibitory ACE).

Renina (angiotensynogenaza, EC 3.4.23.15, endopetydaza aspartylowa- maksimum aktywności w pH=2–3) jest enzymem proteolitycznym i zwierzęcym hormonem wydzielanym przez nerki. Jest ona składnikiem układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA, RAAS). Jej działanie powoduje podwyższenie ciśnienia krwi [27].

Proteaza HIV-1

HIV-1 proteaza (EC 3.4.23.16, endopeptydaza aspartylowa – maksimum aktywności w pH=2–3) jest konieczna dla reprodukcji i dojrzewania wirusa ludzkiego niedoboru odporności (HIV) w zainfekowanym organizmie [28, 29]. Hamowanie proteazy HIV-1 w cyklu życiowym wirusa HIV jest jedną z możliwości, aby zatrzymać rozwój zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS) w organizmie. W związku z tym, inhibitory proteazy HIV-1, takie jak amprenawir, tipranawir lub darunawir, są wykorzystywane w wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej [30, 31].

Proteaza HCV NS2/3 i HCV NS3/4

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV- hepatitis C virus) jest członkiem rodziny *Flaviviridae*. Ta poliproteina jest przekształcana przez sygnałowe peptydazy gospodarza i dwie wirusowe proteazy – NS 2/3 i NS 3/4A (neutralne, serynowe endopeptydazy) do 10 białek niezbędnych w replikacji wirusa [32÷37]. W medycynie używa się inhibitorów proteazy, takich jak boceprewir i telaprervir, do leczenia wirusowego zapalenia wątroby.

Tkankowy aktywator plazminogenu (tPA- *Tissue Plasminogen Activator*)

Tkankowy aktywator plazminogenu (EC 3.4.21.68) jest alkaliczną, serynową endoproteazą. Enzym ten przekształca proenzym – plazminogen do plazminy. Plazmina powoduje lizę fibryny i tym samym zwiększenie przepływu naczyń krwionośnych zamkniętych materiałem zakrzepowym. Jest to główna reakcja rozkładająca skrzep.

tPA odgrywa ważną rolę w migracji komórek i przebudowie tkanek. Zwiększona aktywność tego enzymu powoduje zwiększoną fibrynolizę, która objawia się nadmiernym krwawieniem; obniżona aktywność sprzyja zakrzepicy i zatorowości.

Enzym ten jest stosowany w pewnych przypadkach chorób zakrzepowych, takich jak zator tętnicy płucnej, zawał serca i udar [38, 39].

Proteasom 26S

Proteasom 26S (EC 3.4.25.1, zasadowa, treoninowa endopeptydaza) jest odpowiedzialny za degradację więcej niż 80% uprzednio ubikwitynowanych białek komórkowych (także z komórek nowotworowych) z uwolnieniem ubikwityny. Hamowanie proteasomu prowadzi do hamowania wzrostu i proliferacji komórek guza. Stosowanie egzogennych inhibitorów proteasomu w walce z rakiem stwarza nowe, obiecujące możliwości terapeutyczne [40÷42].

Metody pomiaru stężenia i aktywności peptydaz

Oprócz stężenia enzymu, jako cechę określająca ilość enzymu w roztworze, stosowana jest również jego aktywność enzymatyczna. Obecność enzymu wykrywa się w specyficznej reakcji, która katalizowana jest przez ten związek. Metody oznaczania wykorzystują różne typy interakcji, takie jak oznaczenia izotopowe (radioimmunologia), wiązanie analitu (antygenu) ze znakowanym przeciwciałem (immunohistochemia) lub spektroskopię.

Metody pomiaru aktywności enzymatycznej

Istnieje wiele metod oznaczania aktywności enzymatycznej. Do tej grupy należą m.in.: metody spektrofotometryczne (np. metoda Folin-Ciocalteu, spektrofluorymetria, kolorymetria), elektroforeza, chromatografia, radiometria, metoda fazy stałej, metody elektrochemiczne, analiza proteolityczna aktywności macierzowej (PrAMA- proteolytic activity matrix analysis) oraz inne oznaczające produkty reakcji enzymatycznej. Wybór metody pomiarowej, zależy od rodzaju substratów (białkowe naturalne, białkowe modyfikowane, substraty amidolityczne, fluorogenne i inne), oczekiwanych produktów, środowiska reakcji, kosztów i wielu innych czynników.

Metody pomiaru stężenia enzymów

Metody te mogą być podzielone na dwie grupy: metody półilościowe i metody ilościowe.

Metody półilościowe

Metody półilościowe są wykorzystywane do oszacowania ilości enzymu. Otrzymywane wartości nie są dokładne, ani ściśle określone. Do tej grupy metod mogą być włączone metody histochemiczne oraz technika Western Blot.

Immunohistochemia

Immunohistochemia, dzięki ekspresji produktów reakcji antygen-specjalnie oznakowane przeciwciało, umożliwia określenie przybliżonej ilości substancji (na przykład antygenu), który znajduje się w próbce. Istnieje wiele technik immunohistochemicznych, które mogą być użyte w celu zlokalizowania antygenu. Wybór odpowiedniej metody powinien być oparty na parametrach, takich jak rodzaj badanej próbki, granica wykrywalności [43]. Metody immunohistochemiczne zastosowano m.in. do pomiaru stężenia SUMO-specyficznej proteazy I [44], tryptazy i chymazy [45], metaloproteinaz, katepsyno L- podobnej proteazy cysteinowej z *Taenia pisiformis* [46], proteazy M [47], trombiny [48], katepsyny B [49].

Western Blot

Jest to metoda służąca do wykrywania określonych białek w próbkach. Umożliwia ona rozdział zdenaturowanych białek według ich mas oraz niezdenaturowanych według ich struktury 3-D, za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym [50]. W ten sposób sprawdzano obecność katepsyno L- podobnej proteazy cysteinowej z *Philasterides dicentrarchi* [51].

Metody ilościowe

Metody ilościowe podają dokładne, dobrze zdefiniowane wartości stężeń badanego związku w próbce. Do tej grupy metod można włączyć test immunoenzymatyczny (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*), radioimmulogię, turbidymetrię, nefelometrię, technikę powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR – *surface plasmon resonance technique* i SPRI – *surface plasmon resonance imaging technique*).

ELISA

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), służy do wykrywania określonych białek w badanym materiale z użyciem przeciwciał

poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Test ten jest częścią większej grupy tak zwanych „testów w fazie stałej" i jest jednym z najczęściej używanych [52]. Tego rodzaju test jest stosowany do pomiaru stężeń wielu enzymów, np. katepsyny B-3 [53], rekombinowanej *Opisthorchis viverrini* katepsyny B-1 (rOV-CB-1) [54], subtylizyno-podobnych proteaz serynowych z *Curvularia lunata* [55], proteazy NS3 wirusa HCV [56].

Metody radioizotopowe

Wykorzystuje się dwie główne metody pomiaru stężeń badanych związków w próbce: test radioimmunologiczny (RIA) oraz test immunoradiometryczny (IRMA). Mierzą one radioaktywności pochodzącą z próbki [57].

W metodzie RIA do znakowania stosowane są następujące izotopy: ^{125}I, ^{131}I, ^{14}C, ^{3}H. Metoda ta opiera się reakcji nadmiaru antygenu z przeciwciałem i zaliczana jest do tzw. kompetycyjnych metod radioizotopowych. Tak oznaczano m.in. β- tryptazę [58], reninę [59].

Test IRMA jest zaliczany do tzw. niekompetycyjnych metod izotopowych. Wykorzystuje się dwa przeciwciała w nadmiarze w stosunku do antygenu [57]. Tym sposobem określono ilościowo reninę [60], dezintegrynę i metaloproteinazę z motywem trombospodyny typu 1, członek 13 (ADAMTS-13) [61].

Turbidymetria i nefelometria

Turbidymetria i nefelometria są to techniki analityczne podobne do kolorymetrii, stosowane do oznaczania małych ilości związków słabo rozpuszczalnych. Nefelometria wykorzystuje efekt Tyndalla, który mierzy ilość światła rozproszonego przez roztwór mętny. Metoda ta została użyta do pomiarów stężenia substancji: aspergillopepsyny I i II, [62], trypsyny [63], katepsyno B – podobnego enzymu z *Eimeria tenella* [64].

Turbidymetria jest oparta na pomiarze natężenia światła przechodzącego przez zawiesinę substancji trudnorozpuszczalnej. Intensywność światła jest odwrotnie proporcjonalna do ilości składnika analitu [65]. Pomiary turbidymetryczne zostały wykorzystane do oznaczania np. trypsyny [66].

Technika Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów (SPR i SPRI)

Metoda SPR i SPRI polega na wykorzystaniu efektu rezonansu wolnych elektronów metalu-plazmonów i zmiany intensywności promieniowania padającego na biosensor w zależności od zmian współczynnika załamania kolejnych warstw na powierzchni biosensora. Sporządzenie odpowiednich krzywych kalibracyjnych, będących zależnością sygnału SPRI w funkcji stężenia badanego enzymu, pozwala na ilościowe pomiary tych substancji w próbkach rzeczywistych [67].

Bioczujniki SPR i SPRI są powszechnie stosowane do określania stężeń proteaz. Oznaczano stężenia katepsyny G, D i B [68, 69, 70], kaspazy-3 i kaspazy- 6 [71].

Literatura

1. Puente X. S., Sánchez L. M., Overall, C. M., López-Otín, C.: *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nat. Rev. Genet., 2003, **4**, 544–58.
2. Hyperlink "http://www.enzyme-database.org/contents.php" ExploreEnz- the Enzyme database 11.09. 2014.
3. Gorodkiewicz E., Regulska E.: *SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material*. Protein Pept. Lett., 2010, **17**, 1148–54.
4. Cottam D. W., Rees R. C.: *Regulation of matrix metalloproteinases: their role in tumor invasion and metastasis.* Int. J. Oncol., 1993, **2**, 861–72.
5. Mignatti P., Rifkin D. B.: *Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion.* Phys. Rev., 1993, **73**, 161–95.
6. Ferrier C. M., Van Muijen G. N. P., Ruiter D. J.: *Proteases in cutaneous melanoma*. Ann. Med. 1998, **30**, 431–42.
7. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T.: Immunologia. PWN, 2007, **88**, 247–249, 480.
8. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X.: *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.* Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 1999, **15**, 269–90.
9. McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W.: *Caspase Functions in Cell Death and Disease. Cold Spring*. Harb. Perspect. Biol., 2013, **1**, 1–28.
10. Droga-Mazovec G., Bojic L., Petelin A., Ivanova S., et al: *Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic bcl-2 homologue.* J. Biol. Chem., 2008, **283**, 19140–150.
11. Gorodkiewicz E.: *Surface Plasmon Resonance Imaging sensor for cathepsin determination based on immobilized Cystatin.* Protein Pept. Lett., 2009, **16**, 1379–1385.
12. Broker L. E., Kruyt F. A. E., Giaccone G.: *Cell Death Independent of Caspases: A Review.* Clin. Cancer. Res., 2005, **11**, 3155-62.
13. Szajda S. D., Zalewska, B., Michalak K., Skrzydlewski Z.: *Cathepsin D activity in women in cases of uterine fibroids.* Contemp. Oncol., 2004, **8**, 266–68.
14. Szajda S. D., Roszkowska-Jakimiec W., Snarska J., Zwierz K.: *Cathepsin D activity in serum and urine of patients with colorectal cancer.* Contemp. Oncol., 2006, **10**, 321–23.
15. Garcia M., Derocq D., Pujol P., Rochefort H.: *Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency.* Oncogene, 1990, **5**, 1809–14.
16. Szajda S. D., Jankowski M., Zalewska B., Kożuszko B., Gabrylewski W., Skrzydlewski Z.: *The cancer procoagulant activity of cathepsin D in breast cancer cases.* Contemp. Oncol., 2004, **8**, 132–35.
17. Lodice A. A.: *The inhibition by pepstatin of cathepsin D and autolysis of dystrophic muscle.* Life Sci. 1976, **19**, 1351–58.
18. Warwas M., Turowska E.: *The importance of cathepsin D in the diagnosis of cancer.* Postepy Hig. Med. Dosw., 1993, **47**, 277–88.
19. Sukoh N., Abe S., Ogura S., Isobe H., Takekawa H., Inoue K., Kawakami Y.: *Immunohistochemical study of cathepsin B. Prognostic significance in human lung cancer.* Cancer, 1994, **1**, 46–51.
20. Wyrwińska A., Torliński L.: *Cystatin and cysteine proteases in cancer. Part I. Diagnostic and prognostic value of the determination of Cystatin and/ or cysteine proteases.* Now. Lek., 2003, **72**, 228–23.
21. Sinha A. A., Quast B. J., Wilson M. J., Fernandes E. T., Reddy P. K., Ewing S. L., Gleason D. F.: *Prediction of pelvic lymphnode metastasis by the ratio of cathepsin B to stefin A in patients with prostate carcinoma.* Cancer, 2002, **15**, 3141–9.
22. Levicar N., Strojnik T., Kos J., Dewey R. A., Pilkington G. J., Lah T. T.: *Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion.* J. Neuro. Oncol., 2002, **58**, 21–32;
23. Gorodkiewicz E., Regulska E., Wojtulewski K.: *Development of an SPR imaging biosensor for determination of cathepsin G in saliva and white blood cell.* Microchim. Acta, 2011, **173**, 407–13.
24. Kudo T., Kigoshi H., Hagiwara T., Takino T., Yamazaki M., Yui. S.: *Cathepsin G, a Neutrophil Protease, Induces Compact Cell-Cell Adhesion in MCF-7 Human Breast Cancer Cells.* Mediators Inflam., 2009, **2009**, 1–11.
25. Korkmaz B., Horwitz M. S., Jenne D. E., Gauthier F.: *Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases.* Pharmacol. Rev., 2010, **62**, 726–759.
26. Kierszenbaum A. L.: *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. Mosby Elsevier 2007, 596.
27. Imai T., Miyazaki H., Hirose S., Hori H., Hayashi T., et al.: *Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1983, **80**, 7405–9.
28. Hyperlink "http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=6" Proteine data bank- HIV-1 protease, 24.09.2014.
29. Gulnik S., Erickson J. W., Xie D:*HIV protease: enzyme function and drug resistance.* Vitam. Horm., 2000, **58**, 213–56.
30. Moore J. P., Stevenson M.: *New targets for inhibitors of HIV-1 replication.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000, **1**, 40–9.
31. Eron J. J.: *HIV-1 Protease Inhibitors.* Clin. Infect. Dis., 2000, **30**, 160–70.
32. Lawitz E., Sulkowski M., Jacobson I., Kraft W. K., Maliakkal B., et al: *Characterization of vaniprevir, a hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor, in patients with HCV genotype 1 infection: Safety, antiviral activity, resistance and pharmacokinetics.* Antiviral Res., 2013, **99**, 214–20.
33. Li X., Zhang Y. K., Liu Y., Zhang S., Ding C. Z., Zhou Y., et al: *Synthesis of new acylosulfamoyl benzoxaboroles as potent inhibitors of HCV NS3 protease.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, **20**, 7493–97.

34. Bartolini B., Giombini E., Zaccaro P., Selleri M., Rozera G., Abbate I.: *Extent of HCV NS3 protease variability and resistance- associated mutations assessed by next generation sequencing in HCV monoinfected and HIV/HCV coinfected patients.* Virus Res., 2013, **177**, 205–8.
35. Fatima K., Tahir M., Qadri I.: *Development of robust in vitro serine protease assay based on recombinant Pakistani HCV NS3-4A protease.* Virus Res., 2011, **160**, 230–7.
36. Franco S., Clotet B., Martínez M. A.: *A wide range of NS3/4A protease catalytic efficiencies in HCV- infected individuals.* Virus Res., 2008, **131**, 260–70.
37. Chase R., Skelton A., Xia E., Curry S., Liu S., McMonagle P., Huang H. C., Tong X.: *A novel HCV NS3 protease mutation selected by combination treatment of the boceprovir and NS5B polymerase inhibitors*. Antiviral Res., 2009, **84**, 178–184.
38. Wardlaw J. M., Murray V., Berge E., del Zoppo G., Sandercock P., Lindley R. L., Cohen G.: *Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis.* Lancet 2012, **379**, 2364–72.
39. DeMers G., Meurer W. J., Shih R., Rosenbaum S., Vilke G. M.: *Tissue plasminogen activator and stroke: review of the literature for the clinician.* J. Emerg. Med. 2012, **43**, 1149–54.
40. Peters J. M., Franke W. W., Kleinschmidt J. A.: *Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm.* J. Biol. Chem., 1994, **269**, 7709–18.
41. Voges D., Zwickl P., Baumeister W.: *The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis.* Annu. Review. Biochem., 1999, **68**, 1015–1068.
42. Kostur A., Kulczyńska A., Kłoczko J.: *Proteasomes– a new target for anticancer therapy.* Acta Hematol. Pol., 2010, **41**, 261–269
43. Hyperlink"http://www.ihcworld.com/_intro/intro.htm"IHCWorld- Immunohistochemistry, 17.11.2014
44. Li T., Huang S., Dong M., Gui Y., Wu D.: *Prognostic impact of SUMO-specific protease 1 (SENP1) in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy.* Urol. Oncol.- Semi. O. I., 2013, **31,** 1539–1545
45. Martins P. R., Nascimento R. D., Lisboa A. S., Martinelli P. M., Reis D.: *Neuroimmunopathology of Trypanosoma cruzi-induced megaoesophagus: Is there a role for mast cell proteases?* Hum. Immunol., 2014, **75**, 302–305.
46. Wang Q., Zhang S., Luo X., Hou J., Zhu X., Cai X.: *Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from Taenia pisiformis.* Vet. Parasitol., 2013, **194**, 26–34.
47. Bando Y., Ito S., Nagai Y., Terayama R., Kishibe M., Ying-Ping Jiang Y. P., Mitrovic B., Takahashi T., Yoshida S.: *Implications of protease m/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination.* Neurosci. Lett., 2006, **405,** 175–180.
48. Puthiyachirakkal M., Lemerand K., Kumar D., Moore R., Philipson E., Mercer B. M., Mansour J. M., Hauguel-de Mouzon S., Moore J. J.: *Thrombin weakens the amnion extracellular matrix (ECM) directly rather than through protease activated receptors.* Placenta, 2013, **34,** 924–931.
49. Creemers L. B., Hoeben K. A., Jansen D. C., Buttle D. J., Beertsez W., Everts V.: *Participation of intracellular cysteine proteinases, in particular cathepsin B, in degradation of collagen in periosteal tissue explants.* Matrix Biol., 1998**, 16**, 575–584.
50. Hyperlink "http://hylostet.pl/igm/article/70/" Hylostet 17.11.2014
51. Shin S. P., Han S. Y., Han J. E., Jun J. W., Kim J. H., Park S. C.: *Expression and characterization of cathepsin L-like cysteine protease from Philasterides* **dicentrarchi.** Parasitol. Int., 2014, **63**, 359–365.
52. Lequin R.: *Enzyme immunoassay (EIA)/ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin. Chem. 2005, **51**, 2415– 2418.
53. Anuracpreeda P., Chawengkirtikul R., Tinikul Y., Poljaroen J., Chotwiwatthanakun C., Sobhon P.: *Diagnosis of Fasciola gigantica infection using a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of circulating cathepsin B3 protease*. Acta Trop., 2013, **127**, 38–45.
54. Srip J., Brindley P. J., Srip B., Loukas A., Kaewkes S., Laha T.: *Evaluation of liver fluke recombinant cathepsin B-1 protease as a serodiagnostic antigen for human opisthorchiasis.* Parasitol. Int., 2012, **61**, 191–195.
55. Tripathi P., Nair S., Singh B.P., Arora N.: *Molecular and immunological characterization of subtilisin like serine protease, a major allergen of* **Curvularia lunata.** Immunobiology**,** 2011, **216**, 402–408.
56. Alaee M., Rajabi P., Sharifi Z., Farajollah M. M. *Immunoreactivity assessment of hepatitis C virus NS3 protease and NS5A proteins expressed in TOPO cloning system;* J. Microbiol. Immunol. Inf.**,** 2014, **47**, 282–291.
57. Hyperlink „http://www.5wszk.com.pl/nucmed/nuklearna.htm" 5 Wojskowy Szpital w Karkowie ,17.11.2014
58. Edston E., Hage-Hamsten M.: *β-Tryptase measurements post-mortem in anaphylactic deaths and in controls. Forensic Sci. Int.,* 1998, **93,** 135–142.
59. Grasser E. K., Goswami N., Rössler A., Vrecko K., Hinghofer-Szalkay H.: *Hemodynamic and neurohormonal responses to extreme orthostatic stress in physically fit young adults*: *Acta Astronaut*., 2009**, 64,** 688–696.
60. Iervasi A., Zucchelli G. C., Turchi S., Emdin M., Passino C., Ripoli A., Clerico A.: *Analytical and clinical performance of an automated chemiluminescent immunoassay for direct renin measurement: comparison with PRA and aldosterone assays.* Immuno-Anal. Biol. Spe., 2005, **20,** 257–262.
61. Veyradier A., Girma J. P.: *Assays of ADAMTS-13 activity*. Semin. Hematol., 2004, **41**, 41–47.
62. Marangon M., Van Sluyter S. C., Robinson E. M., Muhlack R. A., Holt H. E., Haynes P. A., Godden P. W., Smith P. A., Waters E. J.: *Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization.* Food Chem., 2012**, 135**, 1157–1165.
63. Chow B. F., Peticolas M. A.: *A rapid method for the determination of proteolytic activities of enzyme preparations. J. Gen. Physiol.,* 1948, **10,** 17-24.
64. Schroeder J., Heckeroth A. J., Noack S., Gassel M., Mottrama J. C., Selzer P. M., Coombs G. H.: *Identification of Lead Compounds Targeting the Cathepsin B-Like Enzyme of Eimeria tenella;* Antimicrob. Agents Ch., 2012, **56,** 1190–1201.
65. Lipiec T., Szmal Z. S.: *Analytical chemistry of elements of instrumental analysis, textbook for students of pharmacy;* National Institute of Medical Publications **1980,** 524–525.
66. Walker M. B., Retzinger A. C., Retzinger G. S.: *A turbidimetric method for measuring the activity of trypsin and its inhibition.* Anal. Biochem., 2006, **351**, 114–112.
67. Steiner G.: *Surface plasmon resonance imaging*; Ann. Bioanal. Chem. 2004, **379**, 328-31.
68. Gorodkiewicz E., Regulska E., Wojtulewski K.: *Development of an SPR imaging biosensor for determination of cathepsin G in saliva and white blood cells. Microchim Acta.* 2011, **173**, 407–413.
69. Laudanski P., Gorodkiewicz E., Ramotowska B., Charkiewicz R., Kuzmicki M., Szamatowicz J.: *Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis by the surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique. Eur. J.* Obstet. Gyn. R. B. 2013, **169**, 80–83.
70. Gorodkiewicz E., Regulska E., Roszkowska-Jakimiec W.: *Determination of the active form concentration of cathepsins D and B by SPRI biosensors.* J. Lab. Diag., 2010, **46**, 107–109.
71. Inoue Y., Mori T., Yamanouchi G., Han X., Sonoda T., Niidome T., Katayama Y.: *Surface plasmon resonance imaging measurements of caspase reactions on peptide microarrays*. Anal. Biochem. 2008**, 375**, 147–149.

Mgr Anna TOKARZEWICZ jest studentką studiów doktoranckich na kierunku chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwerytetu w Białymstoku. Jest również uczestniczką projektu „Stypendia dla doktorantów województwa podlaskiego", współfinansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz środków budżetu Województwa Podlaskiego. Zainteresowania naukowe: markery nowotworowe, biosensory, powierzchniowy rezonans plazmonów.

e-mail: anna.tokarzewicz@gmail.com, tel. +48 85 745 76 01

*Dr hab. Ewa GORODKIEWICZ absolwentka chemii Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Warszawskiego Filia w Białymstoku (1992), doktorat z chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku (2001). Staż na Uniwersytecie Technicznym w Dreźnie (2002-2004). Habilitacja na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej (2013). Obecnie pracuje w Instytucie Chemii Wydział Biologiczno-Chemiczny Uniwersytetu w Białymstoku. Zainteresowania naukowe: markery nowotworowe, biosensory, technika powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR).

e-mail: ewka@uwb.edu.pl, tel. +48 85 745 76 01