

Anna Wojtysiak  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej**

### **„Substraty i niskocząsteczkowe inhibitory wybranych enzymów proteolitycznych z rodziny kalikrein. Synteza chemiczna i badania enzymatyczne.”**

mgr Anna Wojtysiak

Enzymy proteolityczne (proteazy) należą do grupy hydrolaz i katalizują rozpad wiązania amidowego w peptydach oraz białkach w obecności wody (proteoliza). Biorąc pod uwagę typ katalizy reakcji, molekularną strukturę enzymu, a także jego indywidualne cechy dokonano podziału proteinaz na: aspartyłowe, cysteinowe, glutaminowe, asparaginowe, serynowe, treoninowe, metaloproteazy, mieszane oraz proteazy o nieznanym typie katalizy. Najliczniejszą grupę wśród nich stanowią jednak proteiny serynowe, które w centrum katalitycznym posiadają silnie nukleofilową resztę seryny, w sąsiedztwie histydyny i kwasu asparaginowego.

Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stała się ludzka tkankowa kalikreina 14 (hK14), która stanowi jedną z piętnastu proteaz serynowych wchodzących w skład rodziny kalikrein. Szczególną cechą tej grupy enzymów są ich właściwości biomarkerowe. Kalikreina 14 należy do enzymów, których ekspresja jest ściśle zależna od regulacji hormonalnej, a jej podwyższoną aktywność powiązano z nowotworami jajników, sutka czy też gruczołu krokowego. Ponadto, hK14 jest jedną z kalikrein (obok hK5 i hK7) obecnych w naskórku, gdzie bierze czynny udział w procesach jego złuszczenia, a nadmierną aktywność proteolityczną enzymu powiązano z pojawieniem się zespołu Nethertona.

Celem prowadzonych przeze mnie badań nad ludzką tkankową kalikreina 14 było w początkowym etapie poszukiwanie jej selektywnych substratów fluorescencyjnych, dzięki którym będę w stanie odróżnić aktywność badanej kalikreiny od pozostałych enzymów wywodzących się z tej rodziny. Z wykorzystaniem chemii kombinatorycznej, dokonałam charakterystyki substratowej zarówno w pozycjach nieprimowanych, jak i primowanych (zgodnie z nomenklaturą wprowadzoną przez Schechtera i Bergera). Kalikreinie 14 przypisuje

się trypsynopodobną specyficzność substratową, przy czym niektóre ze źródeł wskazują również na niewielką preferencję hK14 do hydrolizowania wiązań peptydowych po dużych hydrofobowych resztach aminokwasowych w pozycji P<sub>1</sub> (chymotrypsynopodobna specyficzność substratowa), dlatego mówi się o jej podwójnej specyficzności. W związku z tym, zaprojektowałam bibliotekę substratów fluorescencyjnych opartych o zjawisko FRET o wzorze ogólnym: ABZ-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-Arg-ANB-NH<sub>2</sub> oraz ABZ-fragment peptydowy-X<sub>1</sub>'-X<sub>2</sub>'-X<sub>3</sub>'-Tyr(3-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> (gdzie w pozycje X<sub>2</sub>-X<sub>4</sub> oraz X<sub>1</sub>'-X<sub>3</sub>' wprowadziłam 19 różnych białkowych reszt aminokwasowych z wyłączeniem cysteiny) i przeprowadziłam proces dekonwolucji przy zastosowaniu metody iteracyjnej. Otrzymane wyniki, porównywałam z rezultatami otrzymanymi dla innych enzymów z tej rodziny. Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników, zsyntetyzowałam także najwydajniej hydrolizowany substrat dla hK14.

W kolejnych etapach pracy, zaprojektowałam i zsyntetyzowałam niskocząsteczkowe inhibitory, których struktura w dużej mierze została oparta o wyselekcjonowaną w pierwszym kroku sekwencję substratów tego enzymu (wzór ogólny Biotyna-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-Arg-CMK lub Biotyna-O<sub>2</sub>Oc-X<sub>4</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>2</sub>-Arg-CMK, gdzie CMK oznacza chlorometyloketon).

Dla wszystkich otrzymanych struktur wyznaczyłam parametry kinetyczne, a najlepsze związki wykorzystałam do dalszych analiz. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiłam możliwość zastosowania odpowiednio zmodyfikowanych związków, jak i różnych technik (m.in. metody fluorescencyjne czy elektrochemiczne) do oznaczania aktywności proteolitycznej kalikreiny 14. Ponadto, dzięki współpracy z innymi ośrodkami naukowymi sprawdzono zsyntetyzowane przeze mnie związki pod kątem wykrywania aktywności hK14 w liniach komórkowych wywodzących się z raka prostaty (LNCaP, ang. *lymph node carcinoma of the prostate*) oraz w komórkach fibroblastów ludzkiej skóry (HDF, ang. *human dermal fibroblasts*), uzyskując jednocześnie obiecujące rezultaty.

Ostatnim etapem pracy było sprawdzenie możliwości detekcji aktywności proteolitycznej kalikreiny 14 w próbkach biologicznych. Z wykorzystaniem otrzymanych związków wykonałam wstępne badania biologiczne na próbkach śliny osób potencjalnie zdrowych oraz pacjentów cierpiących na nowotwór ślinianek. Obserwowana różnica przyrostu fluorescencji w przypadku próbek kontrolnych, jak i nowotworowych jest znaczna, co daje nadzieję na możliwość uzyskania dobrego narzędzia diagnostycznego w przypadku obecności tego rodzaju nowotworu. Warto jednak podkreślić, że analizy mają charakter badań wstępnych i wymagają dalszej weryfikacji.