

Mgr inż. Tomasz Janiszewski

## **Monitorowanie aktywności granzymu B w układach biologicznych przy zastosowaniu nowych narzędzi chemicznych**

Komórki naturalnych zabójców (ang. *Natural Killer Cells*) oraz cytotoksyczne limfocyty T są efektorowymi komórkami wrodzonego układu odpornościowego zaangażowanymi w proces eliminacji patogenów oraz komórek nowotworowych. Pełnienie tych funkcji możliwe jest dzięki obecności między innymi granzymów, proteaz serynowych znajdujących się w ziarnistościach wspomnianych komórek. Pomimo wielu lat intensywnych badań nad tymi enzymami, ich dokładna funkcja oraz lokalizacja wciąż pozostają nie do końca poznane. W obliczu tego problemu, w niniejszej rozprawie doktorskiej zbadano lokalizację oraz aktywność granzymu B (GrB) w różnych liniach komórkowych dzięki nowym narzędziom chemicznym zawierającym w swojej budowie unikalne sekwencje aminokwasowe.

Pierwszy etap badań obejmował ustalenie profili specyficzności miejsca aktywnego granzymu B. W tym celu wykorzystano technikę hybrydowych kombinatorycznych bibliotek fluorogenicznych substratów (HyCoSuL), a także zdefiniowane biblioteki substratowe zawierające szeroką gamę nienaturalnych aminokwasów. Pozwoliło to na precyzyjne ustalenie najlepiej rozpoznawanych reszt aminokwasowych przez kieszenie S5-S1 miejsca aktywnego GrB. Wykorzystanie kombinacji dwóch powyższych technik dało podstawy do zaprojektowania i syntezy specyficznych narzędzi do badania aktywności granzymu B: substratów fluorogenicznych, inhibitora, a także inhibitorowych markerów chemicznych zawierających biotynę lub fluorofor. W kolejnym etapie badań ustalono preferencje enzymu do określonych reszt aminokwasowych w pozycjach P1'-P3', co pozwoliło na syntezę substratowego wygaszonego markera chemicznego, który w odróżnieniu od inhibitorowych markerów chemicznych zawiera w swojej budowie cząsteczkę wygaszacza, natomiast nie posiada wiążącej grupy elektrofilowej. Ze względu na wysokie podobieństwo w profilach specyficzności GrB z kaspazami, sprawdzono selektywność stworzonego markera chemicznego w złożonych układach biologicznych. Dzięki wykorzystaniu techniki SDS-PAGE wykryto obecność wysokiego stężenia aktywnej formy granzymu B w linii komórkowej YT, a także jego brak w komórkach raka piersi (MDA-MB 231), co pozwoliło na wykorzystanie tego markera w kolejnych etapach badań. W przedstawionej rozprawie doktorskiej podjęto próbę zbadania wpływu granzymu B na komórki nowotworowe przy jednoczesnej wizualizacji enzymu w czasie rzeczywistym. Badania przy wykorzystaniu opracowanego substratowego wygaszonego markera chemicznego w połączeniu z technikami cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej ukazały stopień wychwytu markera z medium hodowlanego w czasie, a także potwierdziły obecność granzymu B wewnątrz komórek YT. Do dnia dzisiejszego, największym problemem badania aktywności granzymu B były narzędzia chemiczne o niskim powinowactwie do miejsca aktywnego enzymu, a w niniejszej

rozprawie doktorskiej przedstawiono struktury cząsteczek, dzięki którym możliwe jest śledzenie aktywności granzymu B w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.