

Mgr inż. Sylwia Modrzycka

Opracowanie selektywnych markerów chemicznych do badania aktywności wybranych proteaz serynowych zaangażowanych w kaskadę krzepnięcia krwi

Hemostaza (krzepnięcie krwi) to wysoce uregulowany proces wywołany przez uszkodzenie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych lub przez działanie ujemnie naładowanych cząsteczek, co prowadzi do kaskady aktywacji proteolitycznej. Kaskada krzepnięcia obejmuje kilka reakcji, w których kolejno aktywowane są zymogeny proteaz serynowych. Ostatecznie prowadzi to do powstania trombiny, która wiąże fibrynę i płytki krwi, tworząc skrzep. Wszystkie proteazy biorące udział w tej skomplikowanej kaskadzie zdarzeń odgrywają rolę w utrzymaniu równowagi między krzepnięciem, a krążeniem krwi. Wydaje się jednak, że równowaga ta zależy głównie od aktywności aktywowanego białka C (APC), trombiny, czynnika Xa i czynnika XIa. Zaburzenia naturalnie występujących poziomów tych proteaz w osoczu mogą prowadzić do poważnych zaburzeń. Nieprawidłowa aktywność tych czynników krzepnięcia jest związana z takimi schorzeniami, jak hemofilia, zakrzepica, rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe, choroba Alzheimera, sepsa, udar, nowotwory, stwardnienie rozsiane i COVID-19. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu układu krzepnięcia nie ustalono jeszcze w pełni roli APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w różnych stanach chorobowych, nie ma też wystarczająco czułych i selektywnych metod wykrywania ich indywidualnych poziomów w próbkach biologicznych, takich jak osocze krwi. Dlatego też opracowanie selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających wykrywanie i rozróżnianie czynników krzepnięcia w ludzkim osoczu, pomogłoby w ujawnieniu ich funkcji w różnych stanach chorobowych.

Liczne role APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych zwiększają znaczenie monitorowania ich aktywności w próbkach biologicznych jako markerów farmakodynamicznych i diagnostyczno-prognostycznych. Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie silnych i selektywnych narzędzi chemicznych umożliwiających szybkie i proste znakowania APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w próbkach biologicznych. W celu określenia specyficzności substratowej tych czynników krzepnięcia wykorzystano zdefiniowaną bibliotekę P1 oraz Hybrydową Kombinatoryczną Bibliotekę Substratów HyCoSuL (ang. *Hybrid Combinatorial Substrate Library*). Obie biblioteki zawierały dużą pulę nienaturalnych aminokwasów, co pozwoliło na

szersze zbadanie przestrzeni chemicznej w pozycjach P4-P1. Wyniki otrzymane ze skanów bibliotek pozwoliły na zaprojektowanie i syntezę aktywnych i selektywnych substratów dedykowanych APC, trombinie, czynnikowi Xa i XIa, które umożliwiły odróżnienie tych proteaz od innych czynników krzepnięcia. Najbardziej selektywne substraty zostały następnie przekształcone w inhibitory i markery chemiczne (ang. *activity-based probes*, ABPs) z fluoroforami Cy3/Cy5/Cy7/BODIPY do szybkiego, bezpośredniego i jednoczesnego wykrywania APC, trombiny, czynnika Xa i XIa. Wykazano, że fluorescencyjne ABPs mogą selektywnie znakować czynniki krzepnięcia przy użyciu mieszanin oczyszczonych enzymów oraz ludzkiego osocza. Markery te mogą być w przyszłości wykorzystane do wizualizacji i porównania poziomów APC, trombiny, czynnika Xa i XIa w próbkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Zdolność tych fluorescencyjnych ABPs do selektywnego wykrywania tych proteaz w próbkach biologicznych ma ogromne znaczenie, ponieważ proteazy te służą jako markery diagnostyczne i prognostyczne dla wielu schorzeń. W przyszłości zestaw fluorescencyjnych markerów może okazać się przydatny w ujawnieniu funkcji czynników krzepnięcia. ABPs mogą być również wykorzystywane jako narzędzia diagnostyczne i ułatwiać wybór odpowiedniej terapii w wielu zaburzeniach, takich jak hemofilia, zakrzepica, udar, sepsa i wiele innych.