

Organizm ludzki wykształcił wiele mechanizmów obrony przed mikroorganizmami oraz komórkami nowotworowymi. Jednym z nich są komórki układu odpornościowego, takie jak cytotoksyczne limfocyty T, komórki „naturalni zabójcy” oraz neutrofile, posiadające cytotoksyczne ziarnistości. Granule te zawierają enzymy proteolityczne, które poprzez szereg reakcji hydrolizy prowadzą do eliminacji komórek docelowych. Jedną z grup enzymów zaangażowanych w ten proces są granzymy, z GrA jako jednym z głównych przedstawicieli. W niniejszej rozprawie doktorskiej opracowano nowe narzędzia do badania aktywności GrA oraz wykorzystano je do badań nad aktywnością oraz lokalizacją enzymu w komórkach.

W pierwszej kolejności dokonano optymalizacji metody ekspresji aktywnego GrA używając ssaczego systemu ekspresji – komórek HEK293 FreeStyle. Następnie wykorzystano technologię bibliotek HyCoSuL oraz zdefiniowane biblioteki substratowe z pulą nienaturalnych aminokwasów i określono specyficzność substratową kieszeni S4-S1 centrum aktywnego GrA. Połączenie tych dwóch metod umożliwiło wybranie najbardziej preferowanych reszt w każdej z pozycji, które następnie wykorzystano do syntezy specyficznych związków dedykowanych GrA: substratów, inhibitora oraz fluorescencyjnego markera. Zaprojektowanie oraz synteza substratów wewnętrznie wygaszonych uwzględniających aminokwasy wiążące się w kieszeniach primowanych centrum aktywnego GrA pozwoliły na otrzymanie substratowego markera GrA z wygaszoną fluorescencją. W kolejnej części pracy wykorzystano takie metody jak SDS-PAGE oraz mikroskopia konfokalna do optymalizacji wiązania się markerów z aktywnym GrA oraz zbadania lokalizacji i funkcji proteazy w komórkach. Aktywny enzym wyznakowano w lizatach oraz żywych komórkach NK92 oraz neutrofilach, dzięki czemu potwierdzono możliwość zastosowania fluorescencyjnego markera w układach biologicznych oraz przedstawiono pierwszy tego typu marker do obrazowania aktywności GrA. Wykorzystując wygaszony marker GrA zbadano lokalizację aktywnego enzymu w neutrofilach przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz dodatkowo wskazano lokalizację GrA w określonym typie granul cytotoksycznych. Następnie, zbadano lokalizację enzymu w dwóch rodzajach śmierci komórkowej: netozie oraz pyroptozie. W obu przypadkach zauważono translokację GrA do okolic jądra komórkowego, co może wskazywać na udział proteazy w modelach śmierci komórkowej. Wzmoczona aktywność GrA wokół jądra, jak i jego aktywność w cytozolu może mieć związek z hydrolizą białek charakterystycznych dla każdego modelu śmierci komórkowej: histonów i lamin jako promotorów rozwinięcia chromatyny podczas netozy, oraz białek z rodziny gazdermin i pro-interleukiny-1 $\beta$  jako początkowych stadiów pyroptozy.