

Masroor Ahmed Khan

Synteza bioluminogenych substratów lucyferaz świetlika i NanoLuc® oraz walidacja ich odpowiedzi na anality zaangażowane w homeostazę redoks.

Bioluminescencja to zjawisko polegające na emisji światła w wyniku utlenienia cząsteczki lucyferyny przez odpowiadający jej enzym lucyferazę. Metoda ta ma kluczowe znaczenie w badaniach biologicznych ze względu na wysoką czułość, nieinwazyjność i możliwość monitorowania w czasie rzeczywistym. Jednym z zastosowań bioluminescencji jest wykrywanie analitów zaangażowanych w procesy fizjologiczne i patologiczne za pomocą sond opartych na reakcji chemicznej z analitem (tzw. activity-based probes). Takie sondy bioluminescencyjne projektuje się, aby wykrywały określone anality poprzez maskowanie grup funkcyjnych lucyferyny za pomocą odpowiednich grup ochronnych o aktywności ukierunkowanej na analit, co zapobiega jej reakcji z lucyferazą. Po napotkaniu docelowego analitu grupa maskująca zostaje chemicznie usunięta, uwalniając lucyferynę, która może następnie reagować z lucyferazą generując fotony. Umożliwia to ilościowe określenie obecności i aktywności analitu na podstawie emitowanego światła.

Wiele chorób obejmuje złożone interakcje pomiędzy wieloma analitami. Zrozumienie tych interakcji może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych. Wymaga to jednoczesnego monitorowania wielu analitów, jednak podejście to było rzadko eksplorowane w przypadku sond bioluminescencyjnych. Jest to możliwe poprzez zastosowanie dwóch oddzielnych sond jednoanalitowych, najlepiej z tym samym systemem lucyferazy, aby uniknąć konieczności wprowadzania dwóch enzymów do układu. Strategia „rozszczipionej lucyferyny” (tzw. split luciferin) jest dobrze dopasowana do tego celu, ponieważ dwie oddzielne połowy mogą być niezależnie maskowane i po aktywacji ulegają bio-ortogonalnej reakcji w fizjologicznym pH, tworząc aktywną D-lucyferynę. Innym sposobem jednoczesnego monitorowania analitów jest zastosowanie tzw. bioluminescencyjnych sond dwuanalitowych, z których każda zawiera dwie grupy reagujące na analit. Eliminuje to wyzwania związane z użyciem dwóch sond jednoanalitowych, które są szczególnie skomplikowane z powodu różnic w ich farmakokinytyce i kolokalizacji, co komplikuje interpretację sygnału. Niemniej jednak, do tej pory opublikowano bardzo niewiele takich sond bioluminescencyjnych.

Masroor Ahmed Khan

Celem mojej pracy była synteza i scharakteryzowanie sond bioluminescencyjnych z zamiarem rozszerzenia palety narzędzi bioluminescencyjnych do jednoczesnego wykrywania wielu analitów. Główne struktury wykorzystane w tym badaniu oparte są na lucyferynie świetlika i furimazynie, substracie dla małej lucyferazy NanoLuc®. NanoLuc® posiada takie zalety jak, jaśniejsza luminescencja, mniejszy rozmiar i większa stabilność w porównaniu do tradycyjnych lucyferaz, a także nie wymaga kofaktorów takich jak ATP czy Mg^{2+} , które są potrzebne dla lucyferazy świetlika (ang. firefly luciferase). Niniejsza praca skupia się na analitach związanych z homeostazą redoks, w szczególności żelazie, gamma-glutamylotransferazie (GGT) i nitroreduktazie (NTR), ponieważ znaczenie ich wzajemnego oddziaływania w chorobach takich jak nowotwory jest kluczowe i wciąż nie w pełni zrozumiane.

W pierwszym etapie badań opracowano sondę kompatybilną ze strategią rozszczepionej lucyferyny do wykrywania jonów żelaza(II). Sonda ta wykazywała odpowiedź w testach *in vitro* i w lizatach komórkowych. Mimo, że oczekiwana odpowiedź była obserwowana w badaniach na żywych komórkach, niska intensywność i wysoka złożoność odpowiedzi stanowiły wyzwanie w wiarygodnej interpretacji wyników. Dalsze badania ujawniły, że niektóre jony metali, w tym Fe(II), mają zdolność do biologicznego inhibowania lucyferaz, przy czym lucyferaza świetlika jest szczególnie podatna na tę inhibicję. Zatem omawiane badania przyczyniły się do zrozumienia wyzwań związanych z wiarygodnym wykorzystaniem strategii rozszczepionej lucyferyny w rzeczywistym wykrywaniu analitów w biologii i dostarczyła narzędzi do zapewnienia ich solidnej walidacji.

Następnie opracowano trzy różne sondy reagujące na nitroreduktazę (NTR), kompatybilne zarówno z systemem rozszczepionej lucyferyny, jak i NanoLuc®. W szczególności opracowano dwa warianty oparte na 2-cyjano-6-hydroksybenzotiazolu i D-cysteinie. Nowa sonda na bazie D-cysteiny wykazała znaczącą aktywność *in vitro*, co zostało potwierdzone w spektroskopowych badaniach kinetycznych jak i z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dodatkowo, stworzono pierwszą bioluminescencyjną sondę opartą na furimazynie, która umożliwiła potencjalnie bardziej wiarygodne wykrywanie NTR, wykorzystując niezależną od kofaktora funkcjonalność

Masroor Ahmed Khan

lucyferazy NanoLuc®. Sonda ta również wykazała znaczną odpowiedź nawet przy niskich stężeniach NTR.

Finalnie zsyntetyzowano sondę dwuanalitową opartą na szkielecie aminolucyferyny, która była zdolna do wykrywania jednoczesnej obecności nitroreduktazy (NTR) i gamma-glutamylotransferazy (GGT). Potwierdziło to możliwość wykorzystania pojedynczej sondy molekularnej do jednoczesnego monitorowania wielu analitów. Dodatkowo opracowano wariant D-lucyferyny tej sondy dwuanalitowej, zawierający motyw responsywny na dwa anality - NTR i GGT, jako związek pośredni, który może być sprzężony z innymi fluoroforami lub bioluminoforami. Te wyniki poszerzają dostępny zestaw narzędzi molekularnych z grupy wieloanalitowych sond bioluminescencyjnych.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska przedstawia osiągnięcia i postęp w dziedzinie sond bioluminescencyjnych, generując nowe narzędzia do jednoczesnego badania wielu analitów w systemach biologicznych oraz rzucając światło na zalety i ograniczenia różnych konstrukcji sond. Opracowane sondy dostarczają istotnych informacji dla przyszłego wiarygodnego wykorzystania takich narzędzi w zastosowaniach komórkowych i in vivo, co jest kluczowe dla zrozumienia przyczyn i przebiegu chorób i ostatecznie opracowania skuteczniejszych metod terapii.