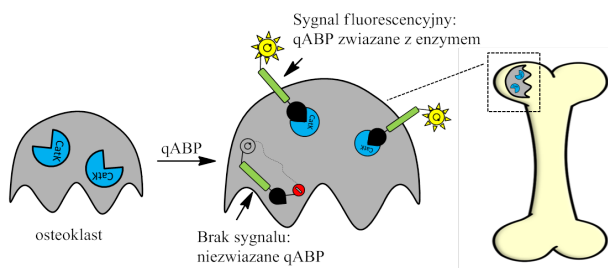


Proteazy to enzymy, które uczestniczą w niemal wszystkich procesach w organizmie człowieka, regulując jego prawidłowe funkcjonowanie, począwszy od trawienia po kaskadę krzepnięcia krwi. Proteazy dzieli się na kilka grup, wśród których jedną z najliczniejszych są proteazy cysteinowe, które swoją nazwę zawdzięczają obecności jednego z aminokwasów - cysteiny w centrum aktywnym. Katepsyna K jest jedną z proteaz cysteinowych, której obecność wykazano w procesie prawidłowego rozwoju kości w czasie wzrostu, a także uczestniczy ona w przebudowie i naprawie kości np. po złamaniu. Enzym ten należy do jednych z najbardziej aktywnych, gdy jest w stanie hydrolizować macierz zewnątrzkomórkową, dlatego celem jego regulacji, w organizmie znajduje się szereg czynników tzw. inhibitorów zapobiegających niepożądanemu aktywności CatK.

Czasami jednak dochodzi do zaburzenia takiej kontroli, co w przypadku CatK prowadzi do nadmiernej resorpcji kości. Ów proces ma miejsce w chorobach cywilizacyjnych, do których należą m. in. osteoporoza i nowotwór kości. Postępowanie przy osteoporozie czy nowotworze kości związane jest ze zbyt szybką redukcją kości tkanki kostnej, czyniąc ją bardziej podatną na złamania. Spowodowane jest to między innymi zaburzeniami równowagi na poziomie enzym-inhibitor, bądź nadprodukcją enzymu lub niedomiarem inhibitora.

Dotychczasowa wiedza nie pozwala na skuteczne leczenie chorób kości. Związane jest głównie z brakiem dokładnych informacji na temat poszczególnych czynników mających wpływ na proces resorpcji kości, co z kolei jest spowodowane brakiem specyficznych narzędzi do badania tych czynników. Czynnikiem takim jest katepsyna K, która uważana jest za marker biologiczny osteoklastów. Dlatego celem projektu jest uzyskanie czynnika zwanego markerem chemicznym, który umożliwi wiarygodną analizę enzymu, którego aktywność została powiązana z nadmierną redukcją tkanki kostnej. Czynnikiem takim będzie wiązanie się jedynie z aktywnym enzymem umożliwiające jego badanie, dające informacje na temat obecności, ilości i rozmieszczenia tego enzymu w komórkach kościogubnych. W proponowanym projekcie badanie katepsyny K będzie odbywało się na poziomie komórkowym, przy użyciu tzw. linii komórkowych.



Marker chemiczny składał się z kilku elementów, wśród których każdy pełni inną funkcję. Pierwszym elementem będzie sekwencja peptydowa, która umożliwi specyficzne wiązanie, a tym samym znakowanie tylko katepsyny K. Sekwencja ta będzie zaprojektowana z pomocą chemii kombinatorycznej oraz szerokiej gamy nienaturalnych aminokwasów pozwalając na selekcję z wielu strukturalnie podobnych czynnika w krótkim czasie. Drugim elementem będzie fragment reagujący w centrum aktywnym enzymu tzw. warhead (głowica bojowa). Takie wiązanie

enzym-marker umożliwia ich trwałe połączenie, co jest niezbędne do przeprowadzenia badań biochemicznych. Kolejny fragment to reszta fluorescencyjna, dzięki której możliwe będzie monitorowanie enzymu podczas badań biochemicznych oraz w układach biologicznych. Jednak poza fragmentem specyficznym, kluczowym elementem jest tzw. wygaszacz fluorescencyjny. Jego zadaniem będzie, jak nazwa wskazuje, wygaszenie fluorescencji, gdy marker będzie niezwiązany z enzymem. Natomiast, gdy takie wiązanie nastąpi, wygaszacz zostanie odłączony od markera i tym samym umożliwi będzie obserwację sygnału fluorescencyjnego. Cecha ta ma szczególne znaczenie podczas monitorowania enzymu w żywych komórkach, gdy umożliwia wizualizację markera związanego z enzymem, a nie jedynie markera wchłoniętego przez komórki. Tak zaprojektowany marker może znaleźć zastosowanie w badaniach *in vitro* funkcji, wydzielania i aktywności enzymu w osteoklastach (komórki kościogubne) poszerzając wiedzę w tym temacie. Hipoteza badawcza zakłada, że marker taki będzie użytecznym narzędziem do badania katepsyny K.