

Enzymy to białka, będące katalizatorami procesów zachodzących w organizmach żywych. Hydrolazy stanowią grupę enzymów, katalizujących rozcięcie wiązań chemicznych w procesie hydrolizy. Ich działanie można przedstawić ogólnie jako: $AB + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$. Z kolei, glikozydazy są podgrupą hydrolaz i charakteryzują się tym, że katalizują hydrolizę wiązania glikozydowego. Wiązanie glikozydowe jest wiązaniem, które tworzy cukier z inną cząsteczką organiczną, np. drugim cukrem (oligo- i polisacharydy), aminokwasem (glikoproteiny), lipidem (glikolipidy), aminą (kwasy nukleinowe), kwercetyną (rutyna), itp. Właściwe działanie glikozydaz jest kluczowe dla funkcjonowania żywych organizmów. Upośledzona aktywność ludzkich glikozydaz powoduje poważne dysfunkcje, zwane lizosomalnymi chorobami spichrzeniowymi, wynikające z nagromadzenia niezdegradowanych cząstek o charakterze glikozydów w lizosomach. Monitorowanie aktywności glikozydaz jest więc kluczowe dla szybkiej i właściwej diagnozy tych schorzeń. Monitorowanie aktywności glikozydaz ma też priorytetowe znaczenie w różnych gałęziach przemysłu i medycyny. Przykładowo, podstawą produkcji biopaliw z biomasy jest kontrola aktywności β -glukozydazy, enzymu hydrolizującego wiązanie 1,4- β -glikozydowe w celulozie.

Celem moich badań jest zaprojektowanie, przygotowanie oraz badanie aktywności fluorescencyjnych wskaźników aktywności β -glikozydaz, ocena mechanizmu działania tych znaczników i w efekcie znalezienie czulej, selektywnej, powtarzalnej i aplikacyjnej metody monitorowania aktywności β -D-glukozydazy, β -D-glukouronidazy i *N*-acetylo- β -D-glukozaminidazy.

Fluorescencyjne wskaźniki aktywności enzymów zwykle zawierają w swojej strukturze fluorofor, związany z cząsteczką o charakterze chiralnym, co zapewnia im dopasowanie do enzymu. W wyniku działania enzymu uwalniany jest fluorofor i dlatego aktywność enzymu jest ściśle skorelowana z rosnącą intensywnością sygnału w widmie fluorescencji. Zaprojektowane przez nas wskaźniki są odpowiednimi β -D-glikozydami, w których aglikon stanowi barwnik fluorescencyjny, wykazujący zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym (ang. *Excited-state intramolecular proton transfer*, ESIPT). Działanie takiego wskaźnika będzie polegało na tym, że w trakcie hydrolizy wiązania glikozydowego uwalniany będzie fluorofor, który w stanie wzbudzonym N^* przekształca się do formy tautomerycznej T^* . Przesunięta ku czerwieni emisja formy T^* , ze znacznym przesunięciem Stokesa, posłuży nam jako sygnał analityczny do monitorowania postępu hydrolizy enzymatycznej. Fluorofory ESIPT mają tę przewagę nad aktualnie stosowanymi znacznikami, 4-metyloumbeliferonem i fluoresceiną, że ich przesunięta jest ku czerwieni fluorescencja nie pokrywa się z tłem, pochodzącym od próbki biologicznej. Poza tym, takie fluorofory nie są podatne na reabsorpcję i możliwe jest dla nich wyznaczenie liniowej zależności intensywności fluorescencji od stężenia w szerokim zakresie stężeń. Spośród fluoroforów ESIPT wybrałam 4'-podstawione pochodne flawonolu (2-fenyl-3-hydroksychromen-4-onu), które będą posiadały grupy elektronoakceptorowe (fluoro, chloro, cyjano) oraz grupy elektronodonorowe (metoksy, dimetyloamino). Dwa inne fluorofory będą 2-furan-2-yl- i 2-tiofuran-2-yl- pochodnymi 3-hydroksychromen-4-onu. Takie spektrum fluoroforów umożliwi mi wybranie najefektywniejszego. Zsyntezuję te fluorofory i dobiórę warunki pomiarowe w celu uzyskania jak najlepszej wydajności kwantowej fluorescencji. Następnie, zsyntezuję glikozydy tych fluoroforów, określe warunki monitorowania ich enzymatycznej hydrolizy, zbadam kinetykę tych reakcji i zaproponuję rozwiązania mające na celu uproszczenie metodyki i wzmocnienie efektu działania badanych wskaźników. W celu zwiększenia skuteczności i odtwarzalności metody będę testować różne rozwiązania, z których najważniejszym będzie wzmocnienie fluorescencji w oparciu o zjawisko MEF (ang. *Metal Enhanced Fluorescence*).

Biorąc pod uwagę powyższe aspekty, rezultatem mojego projektu będzie opracowanie wysoce czulej, selektywnej i powtarzalnej metody monitorowania aktywności β -glukozydazy, β -glukuronidazy i β -*N*-acetyloglukozaminidazy. Zaproponowany dobór fluoroforów umożliwi też wnioskowanie o mechanizmie działania testowanych fluoroforów jak również o mechanizmie działania badanych glikozydaz. Opracowana metodyka będzie mogła być stosowana do monitorowania aktywności innych enzymów hydrolitycznych.