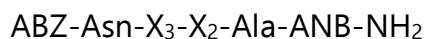


Streszczenie

Enzym Dezintegryny i Metaloproteazy 17 (ang. A Disintegrin And Metalloprotease, ADAM 17) to transmembranowa proteaza multidomenowa, która uczestniczy w procesach uwalniania cytokin z powierzchni komórki. Enzym ten zaangażowany jest w hydrolizę wielu substratów białkowych, dlatego wszelkie zmiany w jego aktywności mogą prowadzić do zaburzeń w homeostazie enzymatycznej, co skutkuje rozwojem patologicznych zmian w organizmie. Wiele badań dowodzi, że ADAM 17 jest między innymi powiązany z patogenezą nefropatii cukrzycowej.

Nefropatia cukrzycowa (DN), znana również jako cukrzycowa choroba nerek, jest poważnym powikłaniem cukrzycy. Diagnozowanie tej choroby jest bardzo skomplikowane i obecnie opiera się na badaniu obecności białka w moczu (mikroalbuminuria). Niestety, objaw ten pojawia się dopiero w trzecim stadium choroby, kiedy zmiany w strukturze kłębuszków nerkowych stają się nieodwracalne. Dodatkowo, podwyższone stężenie białka jest charakterystyczne dla wielu innych chorób nerek. Dokładny mechanizm rozwoju tej choroby nie jest wciąż w pełni poznany. Badania wykazują korelację między rozwojem DN a zwiększoną aktywnością specyficznych proteaz, takich jak metaloproteiny macierzy pozakomórkowej oraz enzymów z rodziny ADAM w tym ADAM 17.

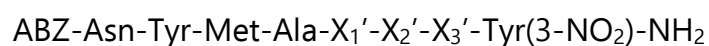
Aktywność ADAM 17 można monitorować za pomocą substratów fluorogenicznych. W niniejszej pracy sekwencja substratu została wyselekcjonowana przy zastosowaniu metod chemii kombinatorycznej (porcjowania i łączenia). W tym celu wykonałam syntezę dwóch bibliotek peptydowych o wzorach ogólnych:



Gdzie: X_3 , X_2 – reszty aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy (donor fluorescencji)

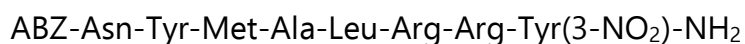
ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (akceptor fluorescencji)



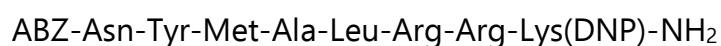
Gdzie: X₃', *X₂'*, *X₁'* - reszty aminokwasów białkowych z wyjątkiem cysteiny

Tyr(3-NO₂)-NH₂ – amid 3-nitro-L-tyrozyny (akceptor fluorescencji)

Dekonwolucję wobec ADAM 17 wykonałam metodą iteracyjną. W efekcie otrzymałam związek o sekwencji:



W późniejszych etapach badań analizowałam wpływ modyfikacji w obrębie C-końca substratu na tempo jego hydrolizy. Na podstawie parametrów kinetycznych określiłam sekwencję najefektywniej hydrolizowanego substratu:



Gdzie: Lys(DNP)-NH₂ – amid N-ε-2,4-dinitrofenylolizyny (akceptor fluorescencji)

W ramach niniejszej pracy przeprowadziłam również analizę selektywności otrzymanego substratu względem kilku proteaz i udowodniłam, że substrat wykazuje dużą selektywność wobec ADAM 17. Dodatkowo przeprowadziłam pomiary aktywności proteolitycznej enzymu ADAM 17 w materiale biologicznym. Na ich podstawie określiłam aktywność badanego enzymu w medium zewnątrzkomórkowym oraz lizatach ludzkich podocytów. Ponadto przeprowadziłam badania próbek moczu szczurów z indukowaną cukrzycą, gdzie zaobserwowałam znaczący wzrost aktywności badanego enzymu. Wykazałam również, że w moczu pacjentów z cukrzycą obserwuje się zwiększoną aktywność tego enzymu.