

## STRESZCZENIE

Glikozydazy należą do dużej grupy enzymów, które katalizują hydrolizę wiązania glikozydowego, powodując rozpad oligosacharydów, glikokoniugatów i innych glikozyłowanych molekuł. Właściwe działanie glikozydaz jest niezbędne dla funkcjonowania żywych organizmów i dla licznych zastosowań glikozydaz w różnych dziedzinach nauki i przemysłu.

Celem moich badań było zaprojektowanie, przygotowanie oraz zbadanie wskaźników aktywności  $\beta$ -glikozydaz, ocena mechanizmu ich działania i w efekcie znalezienie czulej, selektywnej, powtarzalnej i aplikacyjnej metody monitorowania aktywności różnych glikozydaz. Cel ten został osiągnięty poprzez badania oddziaływań  $\beta$ -glikozydaz z nowoczesnymi sondami, składającymi się z chiralnej części glikozydowej, która ze względu na swoją unikalną strukturę i dopasowanie do miejsca aktywnego enzymu zapewniła wysoką selektywność metody. Zaprojektowane sondy wykorzystują zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym (ESIPT). Taka fluorescencja jest niewrażliwa na reabsorpcję ze względu na znaczne przesunięcie Stokesa. Dzięki temu zaprojektowana metoda jest odtwarzalna na poziomie pomiarów fluorescencji i mniej podatna na rozpraszanie światła w mętnych próbkach biologicznych.

Jako ESIPT fluorescencyjne sondy wybrałam 2-podstawione pochodne 3-hydroksychromen-4-onu, w tym 4'-podstawione pochodne flawonolu. Ich glikozyłowanie prowadziłam za pomocą odpowiedniego bromku (rzadziej chlorku) glikozyłu w układzie dwufazowym ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ ) w obecności  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i TBAB jako katalizatora przeniesienia fazowego. Otrzymane w ten sposób glikozydy poddawałam reakcji *O*-deacetylowania.

Na wstępie dobrałam warunki pomiarowe, wykonując widma absorpcji i fluorescencji niezwiązanych glikozydowo fluoroforów. Na tym etapie oraz na etapie prowadzenia enzymatycznej hydrolizy stosowałam różne podejścia mające na celu wzmocnienie fluorescencji: ekstrakcję do DCM, dodatek BSA, fluorescencję wzmocnioną metalem (MEF). Kluczowym etapem realizacji projektu doktorskiego było poddanie zystezowanych glikozydów działaniu glikozydazy i przeprowadzenie enzymatycznej hydrolizy, w trakcie której uwalniany był odpowiedni fluorofor. Szerokie spektrum aglikonów umożliwiło mi przeprowadzenie badań porównawczych kinetyki hydrolizy enzymatycznej sond w różnych pH, w tym fizjologicznym. Zbadałam też wpływ 4'-podstawnika flawonolu na szybkość i mechanizm hydrolizy. Działanie zaproponowanych wskaźników zostało zweryfikowane dla różnych glikozydaz:  $\beta$ -D-glukozydazy,  $\beta$ -D-glukuronidazy i *N*-acetylo- $\beta$ -D-glukozaminidazy.