

Streszczenie pracy doktorskiej: „Izolacja oczyszczanie oraz charakterystyka terapeutycznego peptydu – lunazyny”

Celem badań zaprezentowanych w niniejszej pracy, było opracowanie nowej technologii otrzymywania preparatu białkowego zawierającego lunazynę. Zaproponowana technologia umożliwiła uzyskanie z nasion soi preparatu zawierającego lunazynę. W pierwszej części pracy przedstawiono metody preparatywne wykorzystane do izolacji lunazyny z materiału roślinnego oraz alternatywną metodę pozyskiwania lunazyny na drodze nadekspresji w bakteriach *Escherichia coli*. Poza technikami preparatywnymi, zoptymalizowano również metody analityczne, niezbędne do kontroli międzyoperacyjnej. Uzyskane preparaty scharakteryzowano biochemicznie – określono ich podatność na trawienie trypsyną i stabilność w roztworze wodnym. Ostatnim etapem prac było sprawdzenie aktywności biologicznych uzyskanych preparatów. Jako model wykorzystano komórki raka jelita grubego (HT-29) oraz komórki fibroblastów (MSU 1.1).

Metody preparatywne zostały dobrane w taki sposób, aby możliwe było powiększenie skali procesu i wykorzystanie ich w produkcji przemysłowej. W początkowych etapach zoptymalizowano warunki ekstrakcji, zwiększając tym samym stopień oczyszczenia lunazyny. Następnie sprawdzono metody klarowania uzyskanego ekstraktu. Jako najkorzystniejszą wybrano metodę filtracji stycznej, gwarantującą prowadzenie procesu w układzie ciągłym. Jako alternatywną metodę klarowania, zaproponowano metodę strącaniową, które zapewnia dużą wydajność procesu bez konieczności wykorzystania specjalistycznej aparatury.

Kolejnym etapem była optymalizacja procesu selektywnego zateżenia, z wykorzystaniem chromatografii cieczonej. Jako złożę chromatograficzne wybrano silny kationit. Odpowiedni dobór warunków umożliwił znaczące zwiększenie stopnia oczyszczenia. Frakcje uzyskane po chromatografii cieczonej, po usunięciu niskocząsteczkowych zanieczyszczeń, stanowił „preparat zawierający lunazynę I”. Dalsze etapy oczyszczania uwzględniające rozerwanie mostków disiarczkowych łączących lunazynę z większą podjednostką oraz oddzielenie lunazyny od związków o większej masie cząsteczkowej, pozwoliły na przygotowanie „preparatu zawierającego lunazynę II”.

Lunazynę uzyskano również alternatywną metodą, na drodze nadekspresji. W tym celu przygotowano konstrukcję genową, którą wprowadzono do komórki *E.coli*. Do genu lunazyny dołączono sekwencję kodującą domenę His-Tag, dzięki której uzyskany peptyd oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa.



Uzyskane preparaty analizowano wykorzystując takie techniki jak: elektroforeza w warunkach denaturujących, Western Blot oraz HPLC. Zoptymalizowane, w ramach badań, metody z powodzeniem wykorzystano do kontroli międzyoperacyjnej w czasie optymalizacji technologii.

W kolejnym etapie sprawdzono podatność uzyskanych preparatów na hydrolizę trypsyną. Wyniki potwierdziły, że zarówno lunazyna syntetyczna, jak i lunazyna uzyskana na drodze nadekspresji zostały całkowicie zhydrolizowane przez trypsynę. „Preparat zawierający lunazynę II” został strawiony w 92% w czasie 30 min., natomiast „preparat zawierający lunazynę I” zaledwie w 50%. Wynik ten ma znaczenie dla biodostępności otrzymanego preparatu.

W celu sprawdzenia możliwości wykorzystania preparatów do zastosowania miejscowego w formie roztworu wykonano test stabilności. Porównano w nim, metodą elektroforetyczną, roztwór przechowywany w temperaturze pokojowej przez okres 3 miesięcy z roztworem referencyjnym, przechowywanym w formie zamrożonej. Wyniki nie wskazały zauważalnych różnic.

W toku badań sprawdzono również aktywność biologiczną uzyskanych preparatów w hodowlach ludzkich komórek raka jelita grubego oraz linii nieśmiertelnych fibroblastów. Uzyskane wyniki potwierdziły, że preparaty zawierające lunazynę, istotnie obniżyły żywotność komórek nowotworowych, nie wpływając na przeżywalność komórek nienowotworowych. Wyniki te zostały potwierdzone obserwacjami mikroskopowymi, w których wykazano zmiany w morfologii komórek raka jelita grubego hodowanych *in vitro* w obecności preparatu zawierającego lunazynę.

Opracowana technologia umożliwia pozyskiwanie preparatu zawierającego lunazynę, który wykazuje stabilność w formie roztworu oraz mniejszą podatność na trawienie trypsyną, niż homogenna lunazyna. Otrzymane wyniki potwierdziły aktywność biologiczną preparatów.

Filip Ramo