

Anna Wojtczak

Streszczenie

Struktura kapu (m^7GpppN) znajdująca się na końcu 5' mRNA poprzez specyficzne oddziaływanie z białkami wiążącymi kap warunkuje procesy składające się na ekspresję genów. Nieprawidłowa aktywność białek wiążących kap może prowadzić do zaburzeń ekspresji genów, a w konsekwencji do chorób nowotworowych lub neurodegeneracyjnych. Regulowanie aktywności białek wiążących kap może następować poprzez dostarczanie małowcząsteczkowych ligandów (analogów kapu), które będą wiązać się z białkami, jednocześnie uniemożliwiając ich wiązanie z końcem 5' mRNA. Z uwagi na potencjalne znaczenie terapeutyczne ligandów białek wiążących kap rozwijane są metody do ich efektywnego poszukiwania i charakteryzowania. Metody standardowo używane w tym celu, takie jak: miareczkowanie fluorescencyjne zsynchronizowane czasowo i izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne, są żmudne i czasochłonne. Do poszukiwania inhibitorów białek coraz częściej wykorzystuje się podejście wysokoprzepustowe, w którym testuje się jednocześnie ok. 80 lub więcej nowych związków chemicznych pod względem powinowactwa do białka. Podejście to w znaczący sposób zwiększa wydajność poszukiwania modyfikacji chemicznych kluczowych do oddziaływania z białkiem, jak i samych inhibitorów.

Głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie metod opartych na fluorescencji do poszukiwania i badania ligandów białek wiążących strukturę końca 5' mRNA, czyli strukturę kapu. W pracy można wyróżnić dwie naturalnie współistniejące ze sobą części: pierwszą dotyczącą rozwoju metodologii badania oddziaływania białko-ligand oraz drugą, czyli zastosowania opracowanych metod do charakterystyki związków o nieznanymi właściwościach względem białek wiążących kap. W pracy duży nacisk położono na rozwój metod wysokoprzepustowych, umożliwiających wydajne przeszukiwanie bibliotek związków w celu znalezienia tych o pożądanymi właściwościami.

Pierwszym podejściem rozwiniętym w ramach pracy doktorskiej do badania inhibicji enzymu DcpS jest metoda oparta na śledzeniu aktywności enzymatycznej poprzez pomiar stężenia jonów fluorkowych uwalnianych w trakcie reakcji. W metodzie wykorzystuje się nienaturalny substrat enzymu DcpS – analog m^7GMPF , który jest hydrolizowany do m^7GMP i jonu fluorkowego. Aby zmierzyć stężenie jonów fluorkowych wykorzystuje się sondę fluorogeniczną, w tym przypadku pochodną fluoresceiny, której grupy hydroksylowe są zabezpieczone grupami tertbutylodimetylosililowymi. Opracowana metoda była pierwszym wysokoprzepustowym podejściem do poszukiwania i charakteryzowania inhibitorów DcpS. Została ona wykorzystana do poszukiwania nowych inhibitorów tego enzymu, zarówno wśród bibliotek związków dostępnych komercyjnie, jak i tych, zsyntetyzowanych w Laboratorium Chemii Bioorganicznej. W sumie użyto jej do przetestowania 1346 związków. Wśród nich zidentyfikowano inhibitor silnie oddziałujący z enzymem DcpS ($m^7GSppspSG$ D2), o powinowactwie zbliżonym do RG3039 – związku, który brał udział w badaniach klinicznych jako terapeutyk w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni. Jest to jednocześnie największe osiągnięcie projektu doktorskiego.

Kolejną opracowaną metodą była anizotropia fluorescencji. Jest to podejście szeroko stosowane do badania oddziaływań białko:ligand, które w przeciwieństwie do powyżej przedstawionej metody jest jednoetapowe, a co jednocześnie oznacza, że charakterystyka ligandów z wykorzystaniem metody anizotropii fluorescencji jej szybsza. Celem mojej pracy było opracowanie metody anizotropii fluorescencji dla 3 białek: cN-IIIB, eIF4E i DcpS. W sumie przetestowano 23 układy białko:ligand do opracowania

metody anizotropii fluorescencji. W przypadku enzymu cN-IIIB nie udało się opracować metody anizotropii fluorescencji ze względu na zbyt niskie powinowactwo sond fluorescencyjnych do białka. Zaś z powodzeniem metoda anizotropii fluorescencji została opracowana na białek DcpS i eIF4E, którą można używać do wysokoprzepustowego poszukiwania ligandów oraz ich charakterystyki. W przypadku badań z białkiem eIF4E, udało się rozszerzyć aplikacyjność metody - może być ona również wykorzystana do badania ligandów allosterycznych białka eIF4E, a także do oceny powinowactwa krótkich oligonukleotydów. Z uwagi na szybkość i prostotę metody anizotropii fluorescencji, stanowi ona konkurencyjne narzędzie do poszukiwania ligandów.

Innym zagadnieniem poruszonym w pracy doktorskiej była charakterystyka analogów kapu modyfikowanych w pozycji C⁸ Guo lub m⁷Guo. Scharakteryzowano 14 związków pod kątem ich użyteczności jako sond do badania oddziaływania z białkami wiążącymi kap. Przeprowadzono analizę ich właściwości spektroskopowych, stabilności, a także przebadano je pod kątem oddziaływania z białkami eIF4E i DcpS. A także sprawdzono jak zmienia się intensywność fluorescencji pod wpływem aktywności hydrolitycznej enzymów DcpS i Nudt16. Największą uwagę skupiono na 6 analogach kapu charakteryzujących się wyższą wydajnością kwantową w porównaniu do naturalnej struktury kapu, były to związki zawierające znaczniki -Py, -Ph, -CNPh i DMPh. Związki te działają jak molekularne rotory (są wrażliwe na zmiany lepkości środowiska), co można wykorzystać do badań oddziaływania z białkami. Dla każdego białka: eIF4E, DcpS i Nudt16 udało się wyłonić analog kapu, który zmienia swoje właściwości emisyjne pod wpływem wiązania z białkiem lub w wyniku zachodzącej reakcji enzymatycznej. Przedstawione badania stanowią podstawę do rozwoju nowych metod fluorescencyjnych z wykorzystaniem analogów modyfikowanych w pozycji C⁸ Guo lub m⁷Guo jako sond.

Drugą część pracy doktorskiej stanowiła charakterystyka nowych analogów kapu jako ligandów białek eIF4E i DcpS z wykorzystaniem opracowanych metod fluorescencyjnych, a także standardowej metody miareczkowania fluorescencyjnego. Jako wynik prac scharakteryzowano 34 fosfortriazolowe analogi kapu, 3 analogi kapu z modyfikacją w postaci 1,5-anhydroaltritolu, 15 fosfotioestrowych analogów kapu i 17 benzylowych analogów kapu. Wykorzystanie metod fluorescencyjnych dostarczyło cennych informacji na temat wpływu modyfikacji na stabilizację kompleksy białko-ligand. Ponadto badania pozwoliły ustalić, które pozycje struktury kapu są krytyczne dla efektywnego oddziaływania białko:ligand, a także wytyczyć nowe kierunki badań.