

Streszczenie

Rozwój i osiągnięcia współczesnej medycyny dały ludzkości możliwość leczenia czy też wyeliminowania chorób jeszcze niewiele lat temu nieuleczalnych. Ta niepostrzymana ewolucja medycyny wydłuża oraz poprawia jakość życia ludzkiego. Niestety wszystko ma swoje złe oblicza. Razem z pozytywnymi aspektami wspomnianego rozwoju pojawiło się kolejne wyzwanie: rak. W populacjach krajów wysoko rozwiniętych schorzenie to jest jedną z głównych przyczyn śmierci. Jednak wraz z rozwojem prac badawczych nad technikami leczenia bazującymi na wiedzy o kancerogenezie, jesteśmy w stanie leczyć lub nawet zapobiegać kolejnym fazom rozwoju nowotworów. Wśród wielu proponowanych metod można znaleźć transfekcje wybranym białkiem docelowym ("target protein") komórek nowotworowych czy też wykorzystanie niskocząsteczkowych inhibitorów enzymatycznych. W związku ze wspomnianymi metodami pozostaje temat prezentowanej dysertacji, a mianowicie mechanizm interakcji z ligandami dwóch enzymów (Fosforylaza Nukleozydów Purynowych i Syntazy Tymidylanowej), które pełnią niezwykle ważną rolę w recyklingu i syntezie DNA.

Fosforylaza Nukleozydów Purynowych (PNP – ang. Purine Nucleoside Phosphorylase) znajduje się na drodze odzysku zasad purynowych, ponownie wykorzystywanych do syntezy DNA. Enzym ten katalizuje reakcję odwracalnej fosforolizy (deoksy)rybonukleozydów prowadzącej do przecięcia wiązania glikozydowego między zasadą purynową oraz pentozą, wykorzystując do tego drugi substrat – fosforan. Syntaza Tymidylanowa (TS – ang. Thymidylate Synthase) z kolei katalizuje reakcję konwersji dUMP do dTMP, który inkorporowany jest do DNA.

Niniejsza dysertacja przedstawia badania, którym przyświecały następujące cele: (i) analizę właściwości spektroskopowych molekularnych celów w terapiach przeciwnowotworowych - Fosforylaza Nukleozydów Purynowych z *E. Coli* (PNPr) oraz Syntazy Tymidylanowej z *M. Musculus* (mTS) i ich mutantów, a także (ii) spektroskopową charakterystykę interakcji wyżej wspomnianych enzymów oraz ich mutantów z wybranymi ligandami: formycyną A (z PNP) oraz dUMP, FdUMP i N⁴-OH-dCMP (z TS). Uściślając, w przypadku Fosforylaza Nukleozydów Purynowych z *E. Coli* celem było określenie (i) roli fenyloalaniny na pozycji 159 (Phe159) oraz tyrozyny na pozycji 160 (Tyr160) w oddziaływaniach z nukleozydami (formycyna A została użyta jako reprezentatywny nukleozyd) oraz (ii) rolę oddziaływań $\pi - \pi$ między formycyną A, Phe159 i Tyr160. Co więcej, autorka zaplanowała weryfikację hipotezy o Tyr160 będącej jedynym donorem energii dla formycyny A podczas zjawiska bezpromienistego przeniesienia

energii (FRET-Förster Resonance Energy Transfer). Dodatkowym, drugoplanowym celem była charakterystyka właściwości spektroskopowych mutantów Fosforylasy Nukleozydów Purynowych z *E. Coli*: PNPf159Y (PNPY), PNPf159A (PNPA), PNPY160F (PNPF) i PNP160S (PNPS).

Cele określone dla Syntazy Tymidylanowej z *M. Musculus* były następujące: (i) weryfikacja hipotezy o rozprężeniu dwóch etapów reakcji katalizowanej przez enzym, towarzyszącemu inhibicji powolnego wiązania przez N^4 -OH-dCMP, (ii) określenie roli potencjału elektrostatycznego w interakcjach mTS z nukleotydami, oraz (iii) charakteryzacja właściwości spektroskopowych dwóch mutantów mTS: H190A oraz W103G.

Fosforylaza Nukleozydów Purynowych z *E. Coli*.

Wyniki uzyskane dla kompleksów PNPr oraz wymienionych wcześniej mutantów z formycyną A (FA) dowodzą, iż Phe159 oraz Tyr160 są kluczowymi w wiązaniu FA aminokwasami. Wszystkie wykorzystane w niniejszej dysertacji metody, spektroskopia absorpcyjna i fluorescencyjna, obliczenia stałych dysocjacji, obliczenia wydajności FRET oraz badania wpływu FA na komponenty zaniku fluorescencji wskazały na to, że brak Phe159 (mutant PNPA) w znacznym stopniu obniża zdolność wiązania formycyny A do centrum aktywnego enzymu. Prezentowane tu wyniki sugerują raczej kolizyjne wygaszanie fluorescencji PNPA przez FA.

Niezwykłe interesujące i zaskakujące wyniki zostały uzyskane dla mutantu PNPY (PNPf159Y, gdzie Phe jest zamieniona na Tyr), które były nie tylko związane z interakcjami z FA ale również z właściwościami spektroskopowymi wspomnianego enzymu. Badania dostarczyły dowodów na to, iż powstaje anion tyrozynowy (Tyr) jak również jego stan wzbudzony (Tyr*), który silnie wpłynął na kształt widm absorpcji i emisji, na parametry zaniku fluorescencji (obecność dodatkowego komponentu) i dodatkowo spowodował w znacznym stopniu obniżenie wydajności FRET między PNPY oraz FA. Wyniki, mimo że ukazały jedynie niewielki wzrost emisji FA w kompleksach z PNPY (w porównaniu do PNPr) świadczyły o tym, że te obserwacje są najprawdopodobniej wynikiem prostopadłej orientacji momentów przejście donora (Tyr150/Tyr160) oraz akceptora energii (FA).

Trzeba wspomnieć również, że wyniki badań wskazały na to, że mutant PNPY silnie wiąże FA w centrum aktywnym, co plasuje go w roli obiecującego obiektu dalszych badań. Wyniki wskazały, że w tym aspekcie bardzo ważną rolę odgrywa Tyr160. Mutanty, które nie zawierały Tyr160 (PNPY160F oraz PNPY160S) nie były w stanie formować stabilnych kompleksów z FA. Zarówno w przypadku absorpcyjnych, jak i fluorescencyjnych widm różnicowych nie znaleziono żadnych cech świadczących o oddziaływaniach statycznych, co sugerowało obserwację raczej kolizyjnego wygaszania emisji wspomnianych enzymów.

Podsumowując, wyniki uzyskane dla Fosforylasy Nukleozydów Purynowych z *E. Coli* wyraźnie sugerują istotną rolę dwóch rodzajów par aminokwasowych w wiązaniu formycyny A, jednocześnie potwierdzając istotność oddziaływań π - π : Phe159-

Tyr160, Tyr159-Tyr160.

Syntaza Tymidylanowa z *M. Musculus*

Syntaza Tymidylanowa katalizuje zależną od N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu (mTHF) metylację C(5) w dUMP, prowadzącą do powstania 5,7-dihydrofolianu (DHF) oraz tymidylanu. Reakcja ta wydaje się zawierać dwie części: transfer grupy metylenowej z mTHF oraz jej redukcję przy udziale THF. Wcześniejsze doniesienia krystalograficzne (Dowierciał et al. *Pteridines* 24, 93-98, 2013) sugerowały, że wolno wiązany inhibitor TS, N⁴-OH-dCMP może powodować rozprzężenie tych dwóch komponentów reakcji, skutkując nieodwracalną inaktywacją enzymu w wyniku redukcji C(5) inhibitora oraz utworzonego wiązania kowalencyjnego między C(6) inhibitora i katalityczną cysteiną. W konsekwencji sformułowano hipotezę mówiącą o tym, że enzym może użyć THF jako redukującego dUMP kofaktora pod nieobecność grupy 5-metylenowej. Aby zweryfikować powyższą hipotezę, prezentowane badania skoncentrowały się na sprawdzeniu czy podczas czasowo zależnej inhibicji mTS przez N⁴-OH-dCMP zachodzi oksydacja THF do DHF, która rejestrowana jest jako wzrost absorpcji przy długości fali $\lambda = 340$ nm.

Tak jak wcześniej wydedukowano na podstawie struktury krystalograficznej (PDB ID: 4EZ8), wyniki uzyskane za pomocą spektroskopii absorpcyjnej wskazały na czasowo i temperaturo zależną produkcję DHF w reakcji mTS z mTHF oraz N⁴-OH-dCMP. Co więcej, produkcję DHF również udało się zarejestrować dla mieszanin mTS z THF (pośrednim produktem reakcji) oraz z N⁴-OH-dCMP lub z FdUMP (silnym inhibitorem TS, który jest również formą aktywną środków przeciwnowotworowych), co jest w zgodzie z hipotezą o rozprzężeniu reakcji mTS, wynikającym z inhibicji przez N⁴-OH-dCMP. W dalszych badaniach mechanizmu inhibicji (przez N⁴-OH-dCMP) mTS wykorzystano dwa mutanty, H190A oraz W103G. Białka te zostały zaprojektowane na podstawie struktur krystalograficznych TS ze związanym w centrum aktywnym inhibitorem. Każda ze zmutowanych reszt aminokwasowych (H190 i W103) była wskazana jako reszta mogąca tworzyć wiązania wodorowe z podstawnikiem N⁴-OH. W obu wypadkach wyniki spektroskopii absorpcyjnej potwierdziły zależną od aktywności enzymu produkcję DHF w reakcjach z mTHF/THF oraz z N⁴-OH-dCMP/FdUMP.

Wyniki analizy właściwości spektroskopowych wszystkich trzech enzymów (mTS, H190A i W103G) ujawniły interesującą obserwację. Tryptofan na pozycji 103 posiada bardzo nietypowe właściwości spektroskopowe, które wpływają na emisję oraz parametry zaniku fluorescencji całej cząsteczki mTS. Usunięcie tego tryptofanu w białku W103G powoduje przesunięcie maksimum emisji o 16 nm w stronę fal krótszych. Pomiar wielowymiarowej fluorescencji (MDF – ang. Multi-dimensional fluorescence) połączone z analizą PARAFAC potwierdziły, że emisja badanych enzymów składa się z dwóch komponentów (jednego w spektrum krótkich, drugiego w spektrum fal długich). Podczas gdy dla mTS i H190A stosunek obu komponentów emisyjnych jest

wręcz identyczny (dominacja komponentu w spektrum fal długich), dla W103G eliminacja tryptofanu powoduje ogromną zmianę w tym stosunku na korzyść komponentu w spektrum fal krótkich. Ta obserwacja zasugerowała, że na drugi komponent emisyjny składa się głównie emisja Trp103.

Wyniki uzyskane za pomocą wielofalowej czasowo-rozdzielczej fluorescencji dla wszystkich trzech enzymów w roztworze oraz dla ich kompleksów z dUMP, FdUMP oraz N⁴-OH-dCMP potwierdziły powyższe wyniki jak również wskazały na bardzo słabe, prawdopodobnie kolizyjne interakcje ligandów z W103G. Potwierdzono użyteczność czasowo-rozdzielczych metod w badaniu interakcji mTS. Co więcej, obliczenia potencjału elektrostatycznego wokół reszt tryptofanowych w mTS wskazały na dużą, ujemną różnicę potencjału w kierunku benzen → pyrol dla Trp103, która jest 3-4 razy większa niż w przypadku pozostałych tryptofanów (oprócz Trp75). Potwierdza to tym samym ważną rolę Trp103 w mechanizmie reakcji mTS. Biorąc pod uwagę rolę Trp103 w zamykaniu miejsca aktywnego mTS, aspekt E.P. powinien być poddany dalszym badaniom.

Prezentowana praca doktorska demonstruje osiągnięcie zamierzonych celów. Wykazano istotną rolę aminokwasów aromatycznych na pozycjach 159 oraz 160 w interakcjach PNPr z formycyną A oraz dowiedziono rozrządzenia reakcji katalizowanej przez mTS, jednocześnie prezentując przydatność spektroskopii emisyjnej w wykonywanych badaniach. Uzyskane wyniki mogą w przyszłości być przydatne w rozwoju chemioterapii. Dodatkowo, wyniki wskazują obiecującą ścieżkę dalszych analiz wykorzystujących obliczenia potencjału elektrostatycznego.