

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Senkara
pt. "Zastosowanie mikrowagi kwarcowej w badaniach oddziaływań białko-ligand"

Promotor: dr hab. Joanna Cieśla, prof. PW

Oddziaływania typu białko-ligand kontrolują większość biologicznych funkcji komórki. Odgrywają podstawową rolę w niezbędnych do życia procesach, jak choćby transkrypcja, translacja czy replikacja, a także są niezbędne w katalizie enzymatycznej, bez której nie może przebiegać praktycznie żaden szlak czy cykl metaboliczny. Jakikolwiek zaburzenie tego typu oddziaływań w organizmie może więc powodować liczne i bardzo poważne schorzenia.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza oddziaływań typu białko-ligand przy użyciu mikrowagi kwarcowej z modułem dyssypacji (QCM-D). Wyniki przeprowadzonych badań mogą być pomocne przy projektowaniu nowych, skutecznych leków skierowanych przeciw nowotworom i innym chorobom wynikającym z nieprawidłowego funkcjonowania analizowanych białek *in vivo*. QCM-D jest unikatowym urządzeniem, które umożliwia ultraczułe śledzenie procesów zachodzących na powierzchni sensora w czasie rzeczywistym, zarówno pod względem ilości adsorbowanej masy, jak również zmian strukturalnych osadzonej warstwy. Przedstawiona analiza ukazuje szerokie spektrum zastosowań QCM-D w badaniach białkowych.

W pracy scharakteryzowano oddziaływania pomiędzy wybranymi lektynami: konkanawaliną A, lektyną lentil z *Lens culinaris* i lektyną z *Sambucus nigra*, z odpowiednimi ligandami glikoproteinowymi oraz porównano siły występujących interakcji. Te układy obrazują potencjał zastosowanych lektyn jako narzędzi do rozpoznawania molekularnego oraz ewentualnej diagnostyki komórek zmienionych nowotworowo.

Analizowano również wpływ dużej siły jonowej oraz temperatury roztworu na zmiany strukturalne warstwy G-aktyny osadzonej na powierzchni czujnika piezoelektrycznego. Ustalono, że QCM-D jest nieocenionym narzędziem do monitorowania mechanizmu zmian konformacyjnych białek dzięki możliwości śledzenia zmian fluktuacji energii osadzonej warstwy. Ponadto stwierdzono, że obecne w strukturze miozyny dwie cysteiny SH1 i SH2

nie mają negatywnego wpływu na funkcjonalność tego białka pod względem wiązania aktywności i zdolności do hydrolizy ATP.

Przeprowadzono analizę aktywności i inhibicji enzymatycznej na przykładzie kinazy białkowej CK2, co potwierdziło, że QCM-D może być komplementarnym (względem dotychczas stosowanych metod radiometrycznych) instrumentem do tego typu analizy. W dalszym toku badań zidentyfikowano interakcje zachodzące pomiędzy kinazą białkową CK2 i reduktazą dihydrofolianową DHFR oraz wyznaczono stałe kinetyczne procesu. Niska stała dysocjacji kompleksu może wskazywać na występowanie tego typu interakcji również *in vivo*, co pozwala na przypuszczenie, że badana kinaza może fosforylować DHFR w komórkach.

Scharakteryzowano wzajemne relacje zachodzące pomiędzy enzymami cyklu biosyntezy tymidylanu: syntazą tymidylanową (TS), reduktazą dihydrofolianową (DHFR) i hydroksymetylotransferazą serynową (SHMT). Przeprowadzone badania umożliwiły zidentyfikowanie oddziaływań występujących pomiędzy DHFR-SHMT i TS-DHFR oraz umożliwiły wyznaczenie siły tworzenia tych kompleksów. Stwierdzono również, że nieufosforylowana frakcja TS nie wykazuje powinowactwa względem SHMT, zaś ufosforylowany enzym tworzy z nią silny kompleks. Oznacza to, że w badanych warunkach fosforylacja syntazy tymidylanowej determinuje powstawanie kompleksu. Ponadto zaobserwowano, że w obecności wszystkich trzech enzymów w próbce tworzy się najbardziej stabilny energetycznie kompleks trójcząsteczkowy. Co ciekawe, w tym przypadku również fosforylacja TS powodowała podwyższenie trwałości utworzonego kompleksu DHFR-TS-SHMT. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy mogą wskazywać na niezbadaną dotychczas rolę fosforylacji jako włącznika molekularnego interakcji między tymi białkami. Wyniki te mogą zatem stanowić obiecujący punkt wyjścia przy projektowaniu nowych leków przeciwnowotworowych, przeciw pasożytniczych czy przeciwwirusowych, skierowanych na uniemożliwienie tworzenia się kompleksów trójcząsteczkowych lub obniżenie poziomu fosforylacji TS w komórce.



Warszawa, 10.06.2015r.