

mgr inż. Anna Antosiewicz

Zakład Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych,

Instytut Biotechnologii, Wydział Chemiczny,

Politechnika Warszawska

Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Oddziaływania między ludzkimi enzymami cyklu syntezy tymidylanu:
syntazą tymidylanową i reduktazą dihydrofolianową**

Promotor: dr hab. Joanna Cieśla, prof. PW

Syntaza tymidylanowa (TS, EC 2.1.1.45) i reduktaza dihydrofolianowa (DHFR, EC 1.5.1.3) wraz z hydroksymetylotransferazą serynową (SHMT, EC 2.1.2.1) tworzą cykl biosyntezy tymidylanu (TMP), w wyniku którego powstaje prekursor jednego z czterech deoksynukleotydów niezbędnych do syntezy i replikacji DNA. Ze względu na fakt, że reakcja katalizowana przez TS jest jedyną dostępną komórce drogą *de novo* syntezy TMP, wymienione enzymy należą do jednych z najistotniejszych białek, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania i namnażania komórek. Ich niedobór prowadzi do zahamowania procesów naprawy i powielania materiału genetycznego, a tym samym śmierci komórek określanej mianem śmierć beztyminowej. Inhibitory obu enzymów niezmiennie od ponad 50 lat stanowią podstawowe leki pierwszego wyboru w terapiach chorób nowotworowych i autoimmunologicznych.

Syntaza tymidylanowa i reduktaza dihydrofolianowa występują u większości organizmów w postaci odrębnych białek, podczas gdy w komórkach pierwotniaków i roślin tworzą bifunkcyjny enzym DHFR-TS. Białko bifunkcyjne stanowi pojedynczy łańcuch polipeptydowy zawierający domenę DHFR na N-końcu i domenę TS na C-końcu łańcucha. Enzymy posiadają osobne miejsca aktywne i zachowują zdolności katalityczne swoich monofunkcyjnych odpowiedników, wykazując jednocześnie interakcje między domenami. Domeny nie tylko oddziałują ze sobą nawzajem (DHFR - DHFR, TS - TS), ale także między sobą (DHFR - TS). Fizyczna obecność DHFR jest ponadto niezbędna dla prawidłowego

funkcjonowania TS. Biorąc pod uwagę istnienie bifunkcyjnych enzymów DHFR-TS, obserwowane interakcje pomiędzy ich domenami oraz bardzo wysoką homologię pomiędzy ewolucyjnie konserwowanymi białkami DHFR i TS pochodzącymi z różnych organizmów, sformułowano hipotezę, że ludzkie enzymy cyklu syntezy tymidylanu, DHFR i TS, oddziałują ze sobą a ich interakcje są konieczne do prawidłowego funkcjonowania komórki.

Niniejsza praca stanowi pierwszą analizę interakcji ludzkich białek DHFR i TS, które mimo ogromu zainteresowania do chwili obecnej pozostawały rozpatrywane jako praktycznie niezależne cele badawcze i terapeutyczne. W przedstawionych badaniach posługiwano się rekombinowanymi ludzkimi enzymami produkowanymi w szczepach bakteryjnych oraz ludzkimi liniami komórkowymi prawidłowych fibroblastów skóry i komórek raka jelita grubego. Opierając się na metodach elektroforezy w żelach poliakrylamidowych (SDS-PAGE, elektroforeza natywna), technikach Western i Far-Western blot oraz koimmunoprecypitacji białek z ekstraktów komórkowych, **udowodniono istnienie silnych, specyficznych oddziaływań między DHFR i TS z wytworzeniem kompleksu białkowego DHFR-TS.** Powstawanie kompleksu w wyniku inkubacji obu enzymów w temperaturze 30 i 37°C nie było zależne do czasu, temperatury i obecności ligandów DHFR i TS. Interakcji nie stwierdzono natomiast przy inkubacji enzymów w temperaturze 4°C, jednak dodatek substratów TS i kofaktora DHFR sprawił, że i w tej temperaturze zaobserwowano tworzenie kompleksu obu enzymów. Obecność ligandów może zatem pełnić rolę czynnika stabilizującego. Posługując się przeciwciałami I-rzędowymi przeciwko ufosforylowanym aminokwasom **wykazano, że pojedyncze białka zawierają fosfotyrozynę oraz fosfoserynę i fosfotreoninę.** Tymczasem enzymy wchodzące w skład kompleksu DHFR-TS wydają się zawierać w swojej budowie jedynie fosfotyrozynę. Sam proces tworzenia kompleksu **scharakteryzowano za pomocą parametrów kinetycznych** (m.in. stałej dysocjacji białek oraz energii stabilizacji kompleksu), uzyskując zbieżne wartości parametrów określonych techniką mikrotermoforezy (MST) i mikrowagi kwarcowej z monitorowaniem dyssypacji energii (QCM-D). Analizując dane uzyskane obydwoma technikami **wyznaczono stosunek molowy obu enzymów w kompleksie oraz rodzaj łączących białka oddziaływań międzycząsteczkowych.** Opisano pozytywną kooperację wiązania DHFR do TS, a także dowiedziono konieczności zachodzenia zmian konformacyjnych niezbędnych do powstania kompleksu DHFR-TS. Dodatkowo, wykorzystując metodę Far-Western blot, **wykazano brak oddziaływań pomiędzy parami DHFR i SHMT oraz TS i SHMT, przy równoczesnym zachodzeniu interakcji między kompleksem DHFR-TS a SHMT.**

Prowadząc badania na liniach komórkowych **potwierdzono powstawanie kompleksu DHFR-TS bezpośrednio w komórkach ludzkich**. Obydwa enzymy wyznakowano immunocytochemicznie fluoroforami i określono ich rozmieszczenie oraz kolokalizację w kompartmentach komórkowych z użyciem mikroskopii konfokalnej. Uzyskane wyniki wykazały różnicę w lokalizacji DHFR, TS i ich kompleksu w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Co więcej, **przedstawiono wpływ inhibitorów (5-fluorouracylu i metotreksatu) na rozmieszczenie obu białek i ich kolokalizację w komórkach raka jelita grubego**. Wykazano istnienie znaczących różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi i traktowanymi inhibitorami, wiążących się w szczególności z występowaniem kompleksu DHFR-TS w jądrze. Jednocześnie **wskazano potencjalne znaczenie kompleksu DHFR-TS jako celu terapeutycznego w leczeniu chorób nowotworowych**. Doniesienia literaturowe wiązały zwiększoną przeżywalność chorych na raka jelita grubego leczonych 5-fluorouracylem z obserwowanym obniżeniem poziomu TS w jądrze komórkowym. Niniejsza praca jako pierwsza wyraźnie pokazuje obniżenie poziomu kompleksu TS z DHFR w jądrze, znacząco przewyższające procentowy spadek ilości samej TS w rozpatrywanym kompartmentcie. Na podstawie dostępnych struktur krystalograficznych pierwotniaczych enzymów bifunkcyjnych **stworzono molekularny model ludzkiego kompleksu**, którego analiza potwierdziła możliwość projektowania związków chemicznych wiążących się z powierzchnią oddziaływania DHFR i TS. Zaburzenie procesu powstawania lub destabilizacja już utworzonego kompleksu może być odpowiednim kierunkiem poszukiwania nowych chemioterapeutyków i odpowiedzią na wzrastający problem lekooporności.

Przedstawione wyniki badań realizują wszystkie postawione w przedłożonej pracy cele naukowe, wskazując jednocześnie nowy kierunek poszukiwań leków przeciwnowotworowych. Wiedza zdobyta dzięki przeprowadzonym badaniom została udostępniona w postaci dwóch artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz zaprezentowana na czterech międzynarodowych i trzech krajowych konferencjach naukowych.

A. Amboniewicz