

Dr Agnieszka Krakowiak

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych,
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

AUTOREFERAT

przedłożony Centralnej Komisji
do Spraw Stopni i Tytułów

Tiofosforanowe analogi nukleotydów jako substraty i inhibitory enzymów Fhit i Hint1, supresorów nowotworowych z rodziny białek HIT

Łódź, 2017

Spis treści

1	Informacje o autorze	2
1.1	Dane Personalne	2
1.2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	2
1.3	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.	3
1.4	Staże w ośrodkach naukowych lub akademickich	3
2	Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	4
2.1	Tytuł osiągnięcia naukowego:.....	4
2.2	Lista publikacji naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)	4
2.3	Posumowanie osiągnięcia naukowego	6
2.4	Komentarz autora do cyklu publikacji będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego	6
2.4.1	Białko Hint1	8
2.4.2	Białko Fhit	16
2.4.3	Posumowanie	24
2.4.4	W toku realizacji rozprawy habilitacyjnej.....	25
2.5	Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze	25
2.6	Bibliografia	30

1 Informacje o autorze

1.1 Dane Personalne

Imię i nazwisko: Agnieszka Krakowiak
Tytuł naukowy: Doktor
Miejsce pracy: Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polskiej Akademii Nauk, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Nr telefonu: +48 42 68 03 272
E-mail: akrakow@cbmm.lodz.pl

1.2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 1988 - **Magister inżynier chemik**
specjalizacja: Chemia i technologia leków
Politechnika Łódzka, Wydział chemiczny, Instytut Lekkiej Syntezy Organicznej,
Tytuł pracy magisterskiej: *“Próby enzymatycznego rozdziału α -hydroksymetyloaminokwasów”*, pod kierunkiem dr Urszuli Słomczyńskiej,
promotor: prof. dr. hab. Mirosław Leplawy.
- 1999 - Stopień naukowy: **doktor nauk chemicznych** w zakresie **chemii**
specjalizacja: biochemia kwasów nukleinowych.
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
Tytuł pracy doktorskiej: *“Badania wpływu stereochemii oligonukleozydotiofosforanów na aktywność RNazy H i odwrotnej transkryptazy”*, opiekun: dr Maria Koziółkiewicz,
promotor: prof. dr hab. Wojciech J. Stec

Dodatkowe Szkolenia

- 2009 Szkolenie w zakresie obsługi cytometru przepływowego FACS Calibur (ZCHB, Łódź).
- 2009 Kurs: „Analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy” (kurs MBS, Łódź)
- 2009 Warsztaty: „Mikromacierze- analiza wyników” (kurs MBS, Warszawa)
- 2015 Kurs „11 Letnia Szkoła Komórki Macierzystej” - Zakład Transplantologii Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kraków).

- 2016 Szkolenie na temat MST - techniki mikroskalowej termoforezy w badaniach oddziaływań między biomolekułami (ZCHB, Łódź)
- 2016 Warsztaty „II Warsztaty Konfokalnej Mikroskopii Ramanowskiej, SERS, AFM, SNOM” (Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej PŁ, Łódź)

1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 1987-1992 Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi
stanowisko: chemik
zadania: synteza chemiczna i oczyszczanie blokowanych nukleozydów
- 1992-2003 Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi
stanowisko: asystent
praca w laboratorium badawczym - realizacja projektów w zakresie biochemii i inżynierii białkowej
- 2003-obecnie Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi
stanowisko: adiunkt (od 2016-specjalista)
kierowanie zespołem badawczym, realizacja i zarządzanie projektami badawczymi w zakresie biochemii, inżynierii białkowej, biologii komórkowej

1.4 Staże w ośrodkach naukowych lub akademickich

- 1998 (2 tygodnie) Francja, Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS-MNHN, INSERM, Paris, zespół prof. Claude Hélène, program wymiany między PAN i CNRS, temat wymiany: Zapoznanie się z nowymi metodami pracy w zakresie badania oddziaływań DNA-DNA i DNA-białko – aparat BiaCore.
- 2002-2003 Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA; zespół prof. Charlesa Brennera; staż podoktorski; Zadania: realizacja projektów badawczych w zakresie badań biochemicznych białek z rodziny triady histydynowej (HIT), między innymi Fhit i Hint – supresorów nowotworowych.
- 2006 (5 dni) Università degli Studi di Firenze; Dipartimento di Scienze Neurologiche Psichiatriche; Dr Bendetta Nacmias, temat wymiany: „Silencing of L392V PS-1 in 4NOV mutant bearing fibroblasts”.

2 Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

TIOFOSFORANOWE ANALOGI NUKLEOTYDÓW JAKO SUBSTRATY I INHIBITORY ENZYMÓW FHIT I HINT1, SUPRESORÓW NOWOTWOROWYCH Z RODZINY BIAŁEK HIT.

2.2 Lista publikacji naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Symbolem * oznaczyłam autora korespondencyjnego

Punkty MNiSW są zgodne z wykazem opublikowanym przez MNiSW w dniu 23 grudnia 2015 roku.

Współczynnik IF podano z roku opublikowania pracy.

Kopie wymienionych artykułów dołączone zostały w *Załączniku 5* i cytowane są w tekście z odpowiednio literą 'H' przed numerem odnośnika (np. [H-1]). Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów pracy określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie (*Załącznik 6*).

H-1 Krakowiak A., Kaczmarek R., Baraniak J., Wieczorek M., Stec W.J.*

Stereochemistry of rHint1 hydrolase assisted cleavage of P-N bond in nucleoside 5'-O-phosphoramidothioates.

Chem. Commun., 2163-2165 (2007).

MNiSW - 40

IF=5,141/6,38

Zaplanowałam zadania, wybrałam metodę i wykonałam eksperymentalną część pracy dotyczącą wyznaczenia stereochemii reakcji Hint1, przeprowadzając doświadczenia z enzymami (Hint1, kinaza adenylanowa, kinaza pirogronianowa i terminalna transferaza). Analizowałam otrzymane wyniki i brałam udział w dyskusji na ich temat. Uczestniczyłam w opracowywaniu tekstu pod względem merytorycznym i edycyjnym. Mój udział w całokształcie pracy szacuję na 55%.

H-2 Ozga M, Dolot R, Janicka M, Kaczmarek R, Krakowiak A.*

Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT-1) phosphoramidase transforms nucleoside 5'-O-phosphorothioates to nucleoside 5'-O-phosphates.

J. Biol. Chem. **285**, 40809-18 (2010)

MNiSW - 35

IF=5,328/4,65

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu środków w ramach projektu badawczego własnego. Zaplanowałam eksperymenty i nadzorowałam ich wykonywanie oraz przeprowadziłam część doświadczeń dotyczącą mutagenyzy Hint1, ekspresji i izolowania białek, badania aktywności Hint1 wobec różnych substratów i wyznaczenia parametrów kinetycznych tego enzymu wobec AMPS. Wykonałam także badania porównawcze z enzymem Fhit. Opracowałam tekst pod względem merytorycznym i edycyjnym (w tym opracowanie rysunków) i byłam autorem korespondencyjnym. Mój udział w całości pracy szacuję na 60%.

H-3 Krakowiak A *, Pęcherzewska R, Kaczmarek R, Tomaszewska A, Nawrot B, Stec WJ.

Evaluation of influence of Ap(4)A analogues on Fhit-positive HEK293T cells; cytotoxicity and ability to induce apoptosis.

Bioorg. Med. Chem. (2011) **19**: 5053-60.

MNiSW - 30

IF=2,921/2,82

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, a także na pozyskaniu środków w ramach projektu badawczego własnego. Zaplanowałam i nadzorowałam eksperymenty oraz wykonałam pewną część doświadczeń wprowadzania badanych związków do komórek a następnie badania ich wpływu na indukcję apoptozy mierząc wewnątrzkomórkową aktywność kaspaz (kaspaza 3, 8 i 9). Opracowałam tekst pod względem merytorycznym i edycyjnym. Byłam też autorem korespondencyjnym. Mój udział w całości pracy szacuję na 60%.

H-4 Krakowiak A. *, Pawłowska R., Kocoń-Rębowska B., Dolot R., Stec W.J.

Interactions of cellular histidine triad nucleotide binding protein 1 with nucleosides 5'-O-monophosphorothioate and their derivatives — Implication for desulfuration process in the cell.

Biochim. Biophys. Acta, **1840**: 3357–3366 (2014)

MNiSW - 35

IF=4,381/4,555

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, a także na pozyskaniu środków w ramach projektu badawczego własnego. Zaplanowałam i nadzorowałam eksperymenty oraz wykonałam część doświadczeń dotyczącą tworzenia kompleksów Hint1 z badanymi związkami. Opracowałam tekst pod względem merytorycznym i edycyjnym. Byłam też autorem korespondencyjnym. Mój udział w całości pracy szacuję na 65%.

H-5 Kaczmarek R. *,# , Krakowiak A. #, Korczyński D., Baraniak J., Nawrot B. (#equal contribution)

Phosphorothioate analogs of P1,P3-di(nucleosid-5'-yl) triphosphates: synthesis, assignment of the absolute configuration at P-atoms and P-stereodependent recognition by Fhit hydrolase.

Bioorg. Med. Chem. **24**: 5068–5075 (2016)

MNiSW - 30

IF=2,921/2,82

Zaplanowałam i wykonałam część biochemiczną pracy, czyli badania aktywności badanych związków wobec enzymu Fhit i wyznaczyłam parametry kinetyczne K_m i k_{cat} . Przeprowadziłam ekspresję i izolowania białka Fhit. Zaplanowałam metodę i przeprowadziłam eksperymenty dotyczące enzymatycznego określania konfiguracji absolutnej nowych związków metodą z użyciem svpde. Brałam udział w analizie i dyskusji dotyczącej otrzymanych wyników. Uczestniczyłam w opracowywaniu tekstu pod względem edycyjnym i merytorycznym przygotowując artykuł do druku. Mój udział w całości pracy szacuję na 45%

H-6 Krakowiak A. *, Kocoń-Rębowska B., Dolot R., Piotrkowska D.

New interactions between tumor suppressor Fhit protein and a non-hydrolyzable analog of its $A_{P4}A$ substrate.

FEBS Letters **591**: 548-559 (2017)

MNiSW – 30

IF=3,519/3,478

Mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu środków w ramach projektu badawczego własnego. Zaplanowałam i nadzorowałam eksperymenty oraz wykonałam doświadczenia z tworzeniem kompleksów Fhit z badanymi związkami. Analizowałam i interpretowałam otrzymane wyniki (w tym także analizy LC-MS). Opracowałam tekst pod względem merytorycznym i edycyjnym. Byłam też autorem korespondencyjnym. Mój udział w całokształcie pracy szacuję na 70%

2.3 Posumowanie osiągnięcia naukowego

27 - łączna liczba publikacji (w tym 2 przeglądowe bez IF i 1 artykuł w książce bez IF)

87,64 - wartość IF wszystkich publikacji

3,98 - Średni IF na publikację z całego dorobku

6 – Liczba publikacji przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora (w tym 1 przegląd i 1 artykuł w książce)

22 – Liczba publikacji po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (w tym 1 przegląd i 2 artykuły bez IF)

81,71 – wartość IF w odniesieniu do prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora,

298 - Całkowita liczba cytowań

266 - Całkowita liczba cytowań bez autocytowań

8 - Index Hirscha

Podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego są oryginalne wyniki badań przedstawione w 6 artykułach naukowych powiązanych tematycznie i opublikowanych w czasopismach z Thomson Reuters Master Journal List (tzw. listy filadelfijskiej) ujętych w zbiorach Journal Citation Report (JCR).

24,19 - Sumaryczny IF cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego (w roku druku)

4,032 - Średni IF cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

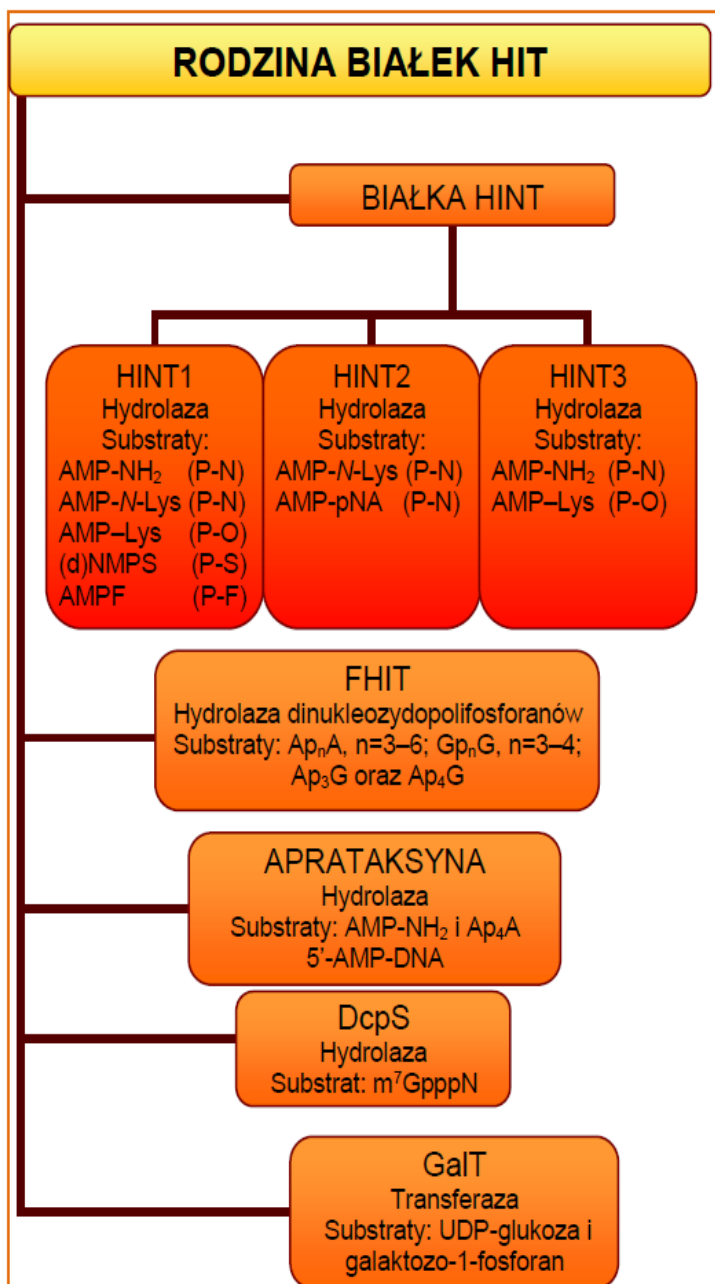
2.4 Komentarz autora do cyklu publikacji będących przedmiotem postępowania habilitacyjnego

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy są dotyczą zastosowania kilku modyfikowanych atomem siarki analogów nukleotydów, będących ligandami dla dwóch białek należących do rodziny HIT.

Rodzina HIT (ang. *Histidine triad proteins*) to grupa białek, która charakteryzuje się obecnością motywu triady histydynowej His-X-His-X-His-X-X (gdzie X oznacza resztę aminokwasu hydrofobowego) na C-końcu łańcucha aminokwasowego, przy czym motyw ten stanowi jednocześnie enzymatyczne centrum

katalityczne [1]. Białka z rodziny HIT wykazują aktywność hydrolaz lub transferaz nukleotydylowych, a z substratem nukleotydydowym wiążą się w taki sposób, że grupa α -fosforanowa znajduje się na przeciwko triady histydynowej. Zamiana drugiej histydyny w triadzie na inny aminokwas eliminuje aktywność enzymatyczną tych białek.

Rysunek 1. Rodzina białek HIT, substraty dla poszczególnych przedstawicieli.



Białka z rodziny HIT występują powszechnie zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, w tym u człowieka [2, 3]. Oznacza to, że aktywność enzymatyczna i związany z nią motyw triady histydynowej zostały zachowane w procesie ewolucji, co sugeruje, iż białka te jako enzymy pełnią prawdopodobnie niezwykle ważne funkcje w podstawowych procesach życiowych [4].

Rodzina HIT reprezentuje grupę enzymów o podobnym motywie strukturalnym w centrum katalitycznym, jednakże enzymy te wykazują różnice w specyficzności substratowej. Białka te charakteryzują się także różną dystrybucją w tkankach, różną lokalizacją wewnątrzkomórkową oraz różnorodnymi ale odmiennymi funkcjami biologicznymi. Mimo wielu badań prowadzonych początkowo na białkach bakteryjnych i drożdżowych, a później na analogicznych białkach ludzkich [1, 4], związek pomiędzy pełnioną funkcją a wykazywaną aktywnością enzymatyczną pozostaje w przypadku niektórych z tych białek (np. Fhit i Hint1) niejasny.

W ludzkim genomie zidentyfikowano siedem białek należących do rodziny HIT, a na podstawie struktury oraz ich specyficzności substratowej podzielono je na pięć podklas [5] (Rysunek 1). Do pierwszej podklasy należą białka Hint (ang. *Histidine triad nucleotide-binding protein*), które stanowią najstarszą ewolucyjnie gałąź rodziny. W genomie człowieka wykazano obecność trzech genów kodujących białka tej podklasy: Hint1, Hint2 i Hint3 [4], natomiast w bakteriach znaleziono tylko homologi ludzkiego Hint1. Ludzkie białko Fhit reprezentuje drugą podklasę rodziny HIT. Inne znane homologi Fhit to najwcześniej biochemicznie scharakteryzowana hydrolaza aph1 z drożdży *Schizosaccharomyces pombe* [6]. Kolejną, trzecią podklasę białek rodziny HIT reprezentuje aprataksyna (ang. *Aprataxin*), białko związane z procesami naprawy uszkodzeń DNA w komórkach [1, 5]. Aprataksyna wyszukuje 5'-adenylylo-DNA na pękniętej nici, a następnie usuwa z niej AMP, co umożliwia jej dalszą naprawę. Urydylotransferaza galaktozo-1-fosforanowa – GalT, to przedstawiciel kolejnej podklasy i jednocześnie jedyna transferaza. W organizmie człowieka białko to bierze udział w ciągu reakcji metabolicznych umożliwiających włączenie galaktozy (po przemianie do glukozy) do procesu glikolizy [7]. Następną, piątą podklasę białek rodziny HIT reprezentuje hydrolaza DcpS (ang. *scavenger RNA decapping enzyme*) [8]. Substratem dla tego enzymu jest m⁷GpppN, cząsteczka o strukturze kapu (ang. *cap*), powstająca w wyniku działania egzonukleaz na szlaku degradacji mRNA w kierunku 3'→5' [9].

W artykule przeglądowym [10] opisałam poznane dotychczas powiązania aktywności enzymatycznej z pełnioną funkcją u poszczególnych przedstawicieli białek HIT. W przypadku aprataksyny, GalT czy DcpS związek pomiędzy aktywnością enzymatyczną a funkcją biologiczną wydaje się klarowny. Jednakże, w przypadku białek Hint1, Hint2 oraz Fhit nie jest to już tak oczywiste. Białka te pełnią różnorodne funkcje w komórce, a ich cechą wspólną jest to, iż wykazują też działanie jako supresory nowotworzenia, przy czym w tym przypadku jest to niezależne od ich aktywności enzymatycznej.

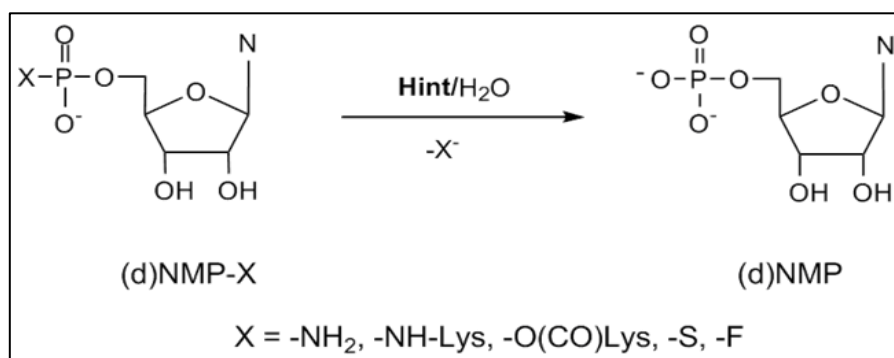
W niniejszej rozprawie przedstawione są wyniki badań aktywności enzymatycznej Fhit i Hint1 wobec tiofosforanowych analogów nukleotydów jako substratów bądź inhibitorów dla tych białek. Zaplanowany i przeprowadzony cykl badań pozwolił na dodanie do ogólnej wiedzy informacji o związku pomiędzy aktywnością enzymatyczną a funkcją biologiczną tych enzymów. Dlatego osiągnięcie naukowo-badawcze zostało podzielone na dwie zasadnicze części, z których każda omawia zastosowanie badanych związków w stosunku do jednego z białek.

2.4.1 Białko Hint1

Z punktu widzenia enzymologii, Hint1 (pełna nazwa to histidine triad nucleotide-binding protein) jest hydrolazą nukleotydylową, która akceptuje substraty zawierające kilka różnych typów wiązań:

amidofosforanowych (P-N) [11], acylofosforanowych (P-O-C(O)-R) [12], tiofosforanowych (P-S) [H-1] i fluorofosforanowych (P-F) [13]. Ogólny wzór substratów dla Hint1 można przedstawić jako (d)NMP-X (X = NHR, OC(O)R, S, F), które w wyniku reakcji dają produkty: (d)NMP i resztę X (Rysunek 2).

Rysunek 2. Ogólny schemat reakcji dla różnych typów substratów ulegających reakcji hydrolizy katalizowanej przez Hint1. Trawienie wiązań: P-N, P-O, P-S, P-F.



Wykazano, że Hint1 może pełnić różne funkcje w komórce i w zależności od tego jego aktywność enzymatyczna może być niezbędna lub nie mieć wpływu na rolę tego białka. Utrata aktywności Hint1 (drożdżowy ortolog Hint1) prowadzi do nadwrażliwości na mutacje w Ccl1, Tbf3 i Kin28, białek będących składnikami kinazy TFIIF, która z kolei wpływa na czynnik transkrypcyjny TFIID [11]. Niedawno stwierdzono związek pomiędzy występowaniem dziedzicznej obwodowej (aksonalnej) neuropatii a utratą aktywności enzymatycznej Hint1 [14], a także zauważono podwyższony poziom Hint1 w mózgach pacjentów z ciężkimi zaburzeniami depresyjnymi [15].

Wśród funkcji tego białka niezależnych od aktywności enzymatycznej jest działanie Hint1 jako supresora nowotworowego, poprzez mechanizm związany z indukcją apoptozy [16]. Ponadto, Hint1 oddziałuje między innymi z pontyną i reptyną, białkami szlaku sygnałowego β -katenina/Wnt, który odgrywa istotną rolę w regulacji takich procesów jak przeżywalność, proliferacja i różnicowanie się komórek [17]. Zaobserwowano również udział Hint1 w regulacji funkcji receptora opioidowego Mu w systemie nerwowym [18], gdzie białko to wpływa na tworzenie się kompleksów z pewnymi białkami sygnałowymi (np. kinaza białkowa C, serynowo-treoninowa kinaza Raf-1, Z2 regulator sygnalizacji białek G)[19]. Dowiedzono też roli białka Hint1 w regulacji transkrypcji (oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi TFIID, MITF, USF2) oraz w kontroli wzrostu komórek [20,21,22]. Zauważono także powiązanie pomiędzy istnieniem różnych wariantów genu HINT1 a chorobą u pacjentów ze schizofrenią [23].

Gen kodujący ludzkie białko Hint1 położony jest na chromosomie 5 w pozycji q31.2 i zawiera 3 eksony, dając w wyniku ekspresji niewielkie białko zbudowane z 126 reszt aminokwasowych. Na podstawie badań

krystalograficznych stwierdzono, że Hint1 występuje w postaci homodimeru o masie 27,6 kDa (2x 13,8 kDa), z dwoma miejscami wiązania dla nukleotydów bądź nukleozydów purynowych, po jednym na każdej podjednostce [2,24,25]. Początkowe doniesienia odnośnie specyficzności substratowej tego enzymu pochodziły z zespołu prof. Brennera i dotyczyły aktywności fosforoamidazowej Hint1, tj. zdolności do katalizowania reakcji hydrolizy wiązania P-N w syntetycznych substratach takich jak: AMP-NH₂, AMP-N-Lys i AMP-N-Ala [11]. Badania te dotyczyły króliczego białka Hint1, który jest w 93% homologiczny do białka pochodzenia ludzkiego.

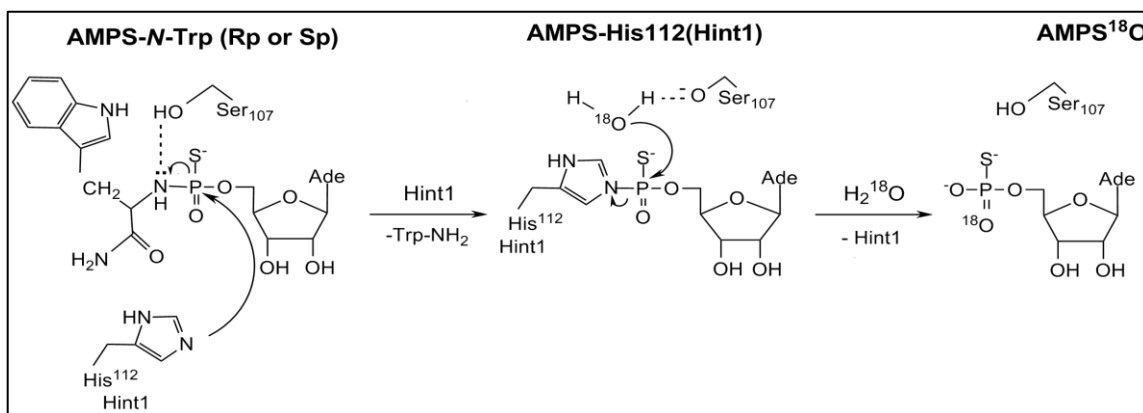
W roku 2002, w ramach podoktorskiego stażu naukowego dołączyłam do grupy badawczej prof. Ch. Brennera (Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA), który w tym czasie kierował zespołem zajmującym się biokrystalografią i biochemią białek z rodziny HIT. Uczestniczyłam w badaniach, w których między innymi zastosowano pierwszy kolorymetryczny substrat dla tego białka (ułatwiający badanie jego właściwości) oraz zaproponowano mechanizm reakcji hydrolizy z udziałem Hint1 [25]. Udowodniliśmy, że Ser107 bierze udział w reakcji jako dawca protonu dla grupy odchodzącej czyli jako katalizator kwasowo-zasadowy. Sugerowaliśmy, że reakcja przebiega analogicznie jak w przypadku innych białek z rodziny HIT (tzn. GalT i Fhit), tj. dwuetapowo z utworzeniem kowalencyjnego związku pośredniego AMP-Hint1, z udziałem środkowej reszty histydyny z triady histydynowej, czyli His112 w przypadku króliczego Hint1 (rHint1).

Ze stażu podoktorskiego wróciłam do Zakładu Chemii Bioorganicznej CBMM PAN kierowanego wówczas przez prof. Wojciecha J. Steca. Wykorzystując zdobyte wcześniej doświadczenie i zgromadzoną w ZChB wiedzę i metodykę syntezy tiofosforanowych analogów nukleotydów i oligonukleotydów, kontynuowałam badania nad właściwościami białek z rodziny HIT. Moim pierwszym zadaniem było określenie mechanizmu hydrolizy wiązania P-N katalizowanego przez białko Hint1. W tym celu wykorzystywałam metodę z zastosowaniem izotopomerycznych 5'-O-[¹⁸O]-monotiofosforanów nukleozydów do wyznaczenia mechanizmu reakcji enzymatycznych, która została opracowana w naszym Zakładzie [26,27]. Substratem badanej reakcji był tiofosforanowy analog nukleotydu, koniugat z aminokwasem, adenozyno 5'-O-amidotiofosforan N-amidotryptofanu (AMPS-N-Trp), który jest związkiem P-chiralnym. Związek ten był zsyntezowany metodą oksatiofosforanową opracowaną również w ZChB. W reakcji hydrolizy z udziałem rHint1 stosowałam czyste, rozdzielone diastereoizomery AMPS-N-Trp (R_p i S_p), których konfiguracja absolutna została ustalona rentgenograficznie. Do dalszych badań został wykorzystany izomer R_p, a szczegóły enzymatycznego wyznaczenia mechanizmu hydrolizy wiązania P-N w reakcji katalizowanej przez króliczy Hint1 przedstawione zostały w publikacji **H-1**. Badana reakcja prowadzona była w znakowanej izotopowo wodzie H₂¹⁸O, a oczekiwanymi produktami były izotopomeryczny 5'-O-¹⁸O-tiofosforan

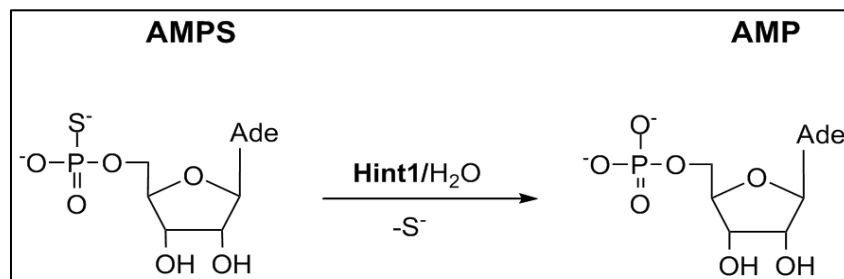
adenozyny (AMPS^{18}O) oraz tryptofanamid (Rysunek 3a). Związek AMPS^{18}O poddałam dalszej analizie konfiguracyjnej, która obejmowała przeprowadzenie kilku przemian z użyciem enzymów o znanej stereochemii reakcji, a następnie końcowej analizy produktu metodą spektrometrii masowej MALDI ToF, dzięki czemu uzyskałam informację o przebiegu stereochemicznym reakcji z udziałem Hint1. Udowodniłam, że reakcja zachodzi dwuetapowo, a efektem stereochemicznym omawianej reakcji jest retencja konfiguracji na atomie fosforu wynikająca z dwóch etapów przebiegających z inwersją konfiguracji (Rysunek 3a). W pierwszym etapie, następuje utworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomem azotu reszty His112 (środkowa reszta histydyny należąca do triady histydynowej) a atomem fosforu substratu, z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P-N w substracie nukleotydylo-aminokwasowym. Podczas tej reakcji, jak udowodniono poprzednio [25], grupa hydroksylowa reszty Ser107 pełni funkcję dawcy protonu dla uwalnianego produktu aminokwasowego. W efekcie tych procesów dochodzi do utworzenia związku pośredniego enzym-substrat: (Hint-His112)-AMP(S). W drugim etapie, w wyniku ataku cząsteczki wody (H_2^{18}O) na elektrofilowe centrum fosforowe, produkt pośredni zostaje przekształcony do AMPS^{18}O i wolnej cząsteczki enzymu.

Rysunek 3. (a) Mechanizm reakcji hydrolizy amidofosforanu AMP-N-Trp z udziałem białka Hint1 - trawienie wiązania P-N, (b) dalsza hydroliza 5'-tiofosforanu adenozy, cięcie wiązania P-S.

a)



b)

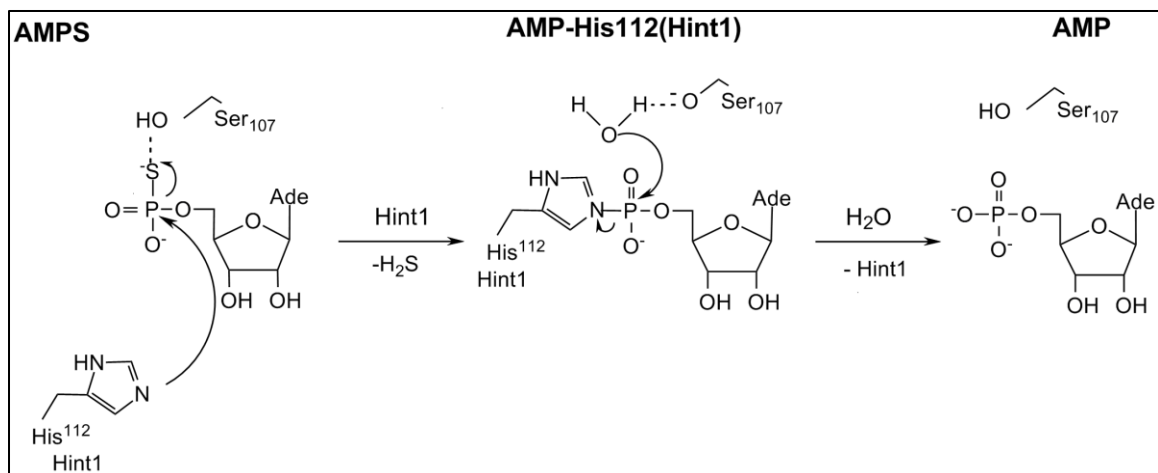


W trakcie powyższych badań zaobserwowałam, że procesowi hydrolizy wiązania P-N w AMPS-N-Trp towarzyszy następczy proces konwersji AMPS do AMP, czyli następuje dalsza hydroliza wiązania P-S w jednym z produktów reakcji (desulfuracja AMPS do AMP, Rysunek 3b), a ostatecznymi produktami hydrolizy AMPS-N-Trp katalizowanej przez Hint1 był AMP i tryptofanamid (w warunkach wyczerpującej reakcji), przy czym na żadnym etapie nie obserwowałam produktu AMP-N-Trp. W niezależnym eksperymencie wykazałam, że proces konwersji AMPS do AMP z udziałem Hint1 jest możliwy. Wyniki te skłoniły mnie do przeprowadzenia pogłębionej analizy procesu desulfuracji AMPS katalizowanej przez Hint1 i w dalszych badaniach skupiłam się na zbadaniu aktywności desulfurującej tego białka. W trakcie tych badań odkryłam, że jednym z produktów reakcji desulfuracji AMPS jest siarkowodór [H-2] co jest istotne, ponieważ związek ten obok tlenku azotu NO i tlenku węgla CO, znany jest jako trzeci nieorganiczny gazowy przenośnik sygnałów [28]. Następnie sprawdziłam aktywność Hint1 wobec pozostałych 5'-O-tiofosforanów nukleozydów. Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji H-2. Stwierdziłam, że substratami dla tej reakcji mogą być zarówno tiofosforany rybonukleozydów, jak i 2'-deoksorybonukleozydów. Biorąc pod uwagę szybkość reakcji desulfuracji można je uszeregować w następującym ciągu: GMPS > AMPS > dGMPS ≥ CMPS > UMPS > dAMPS >> dCMPS > TMPS.

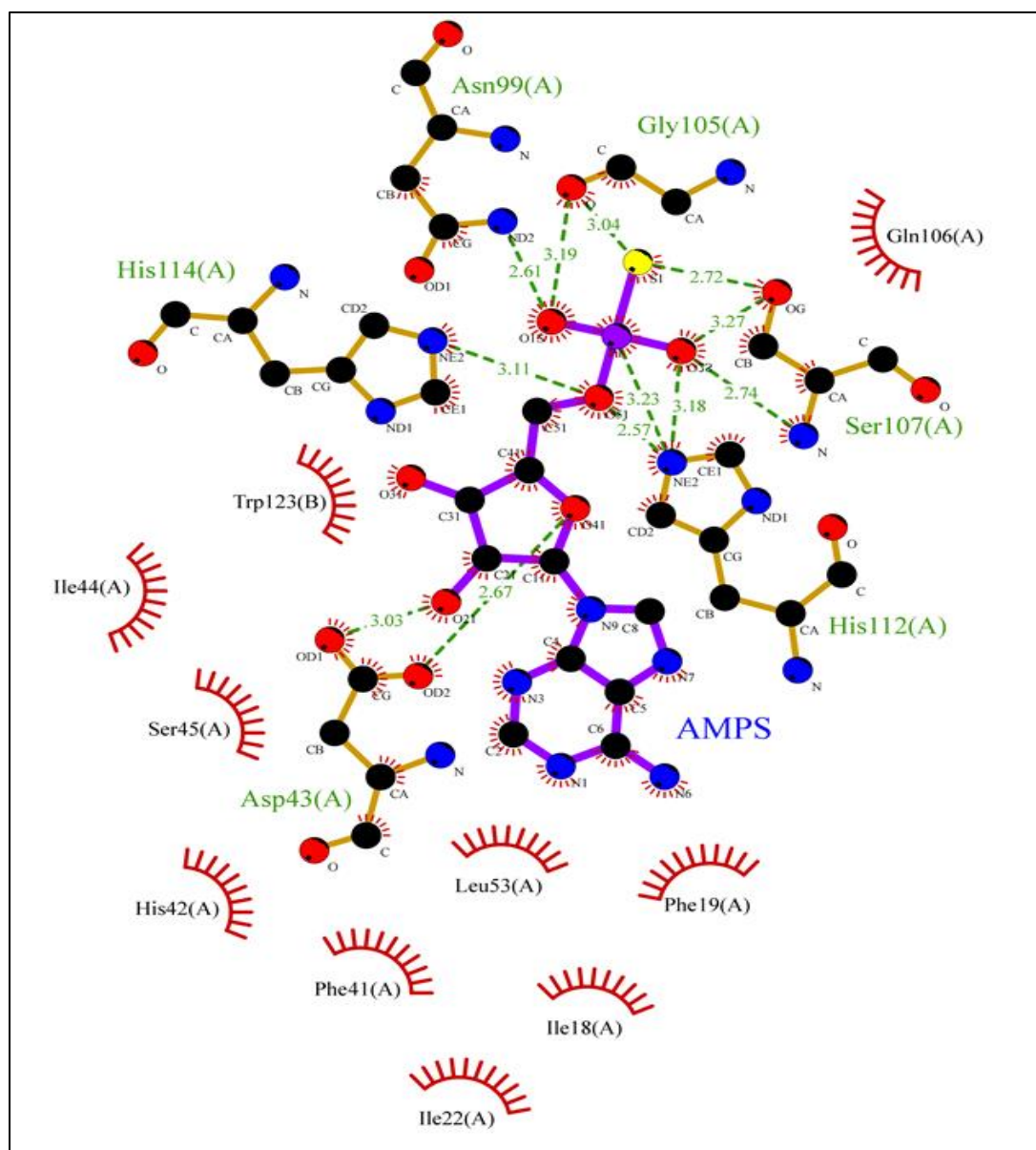
Stosując mutagenezę i analizując wpływ zmutowanych białek Hint1 (mutanty C38A, C84A, podwójny C38A/C84A oraz H114D, H114N i S107A) na szybkość reakcji hydrolizy wiązania P-N (substrat AMP-N-Lys) i P-S (substrat AMPS) udowodniłam, że mechanizm reakcji hydrolizy wiązania P-S katalizowany przez białko Hint1 jest analogiczny do mechanizmu hydrolizy wiązania P-N i zachodzi także dwuetapowo z utworzeniem kowalencyjnego związku pośredniego AMP—His112(rHint1) (tzw. adenilylowany enzym Hint1, Rysunek 4a), a cały proces zachodzi w tym samym miejscu katalitycznym [H-2]. W oparciu o powyższe wyniki, jak również na podstawie znanych struktur krystalograficznych białka Hint1 [25, 29] przedstawiony został schemat oddziaływań pomiędzy AMPS i aminokwasami zaangażowanymi w wiązanie substratu reakcję hydrolizy (Rysunek 4b).

Rysunek 4. (a) Proponowany mechanizm reakcji desulfuracji AMPS katalizowanej przez Hint1. (b) Grafika molekularna przedstawiająca AMPS w miejscu katalitycznym Hint1 (symulacja komputerowa, dokowanie ligandu przeprowadzono za pomocą programu AutoDock [Morris G.M, Goodsell D. S., Halliday R.S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K. Olson A. J. (1998) *J. Comput. Chem.* 19, 1639-1662] na podstawie struktury krystalicznej 1RZY [25]. Rysunek wygenerowano za pomocą program LigPlot [Wallace A. C., Laskowski R. A., Thornton J. M. (1996) *Protein Eng.* 8, 127-134]. AMPS przedstawiono w orientacji aktywnej. Reszty aminokwasowe pochodzące od pierwszego monomeru i biorące udział w interakcjach zaznaczono jako (A), natomiast reszta Trp123 pochodząca z drugiego monomeru jest zaznaczona jako (B). Zaznaczono odległości atomowe (Å) dla niektórych kluczowych oddziaływań.

a)

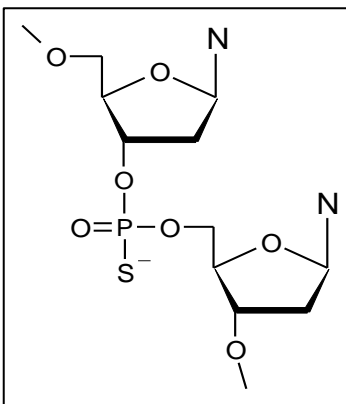


b)



Pozostaje pytanie: jakie może być znaczenie biologiczne zdolności Hint1 do katalizowania reakcji konwersji (d)NMPS do (d)NMP z jednoczesnym wydzielaniem się siarkowodoru w czasie tej reakcji? Czy tę aktywność enzymatyczną można powiązać z konkretną funkcją w komórce? Odpowiadając na to pytanie należy rozpatrywać kilka aspektów. Po pierwsze, ponieważ Hint1 jest zdolny katalizować reakcję hydrolizy wiązania P-S w monotiofosforanach nukleozydów zarówno w serii rybo- jak i deoksy-, nukleozydów purynowych (adenozyny i guanozyny), ale również i pirymidynowych (czyli cytydyny, urydyny i tymidyny, chociaż ze znacznie gorszą wydajnością), pozwala to wysunąć hipotezę, iż enzym ten może brać udział w metabolizmie tiofosforanowych analogów nukleozydowych leków i proleków, np. antysensowych tiofosforanowych oligonukleotydów. 5'-O-Monotiofosforany nukleozydów w warunkach *in vivo* są produktami hydrolizy tiofosforanowych analogów oligonukleotydów, tj. oligonukleotydów, w których jedno lub więcej wiązań internukleotydu zostało zmodyfikowane atomem siarki (Rysunek 5). W warunkach fizjologicznych ulegają one powolnej hydrolizie katalizowanej przez nukleazy z wydzielaniem dNMPS i NMPS, związków które mogą wywierać toksyczny efekt wpływając na proliferację komórek, syntezę DNA lub RNA oraz inne nie poznane dotąd procesy [30]. Znane są enzymy odpowiedzialne za degradację tiofosforanowych analogów oligonukleotydów do (d)NMPS w warunkach *in vivo*, jednak mechanizm dalszych przemian produktów tej degradacji pozostaje dotychczas niejasny. Wspomniana wcześniej informacja o szerokim występowaniu białka Hint1 zarówno w organizmach prokariotycznych jak i eukariotycznych pozwala przypuszczać, że białko to może być odpowiedzialne za katalizowanie reakcji hydrolizy wiązania P-S w (d)NMPS w warunkach *in vivo* [H-2]. Właściwość taka nabiera szczególnego znaczenia w świetle odkryć wykazujących, że naturalne DNA z bakterii, między innymi *Streptomyces lividans* i *Streptomyces avermitilis* zawiera modyfikację tiofosforanową, czyli wiązanie internukleotydu bakterijnych DNA zawiera atom siarki w miejscu niemostrkowego atomu tlenu (Rysunek 5) [31]. Modyfikacja taka znana była wcześniej tylko w syntetycznych oligonukleotydach.

Rysunek 5. Tiofosforanowe wiązanie internukleotydu



Po drugie, uwalniany w wyniku katalizowanej przez Hint1 reakcji desulfuracji siarkowodor, jak wskazują obecne badania, uważany jest za trzeci nieorganiczny gazowy mediator w komórkach ssaczych [32]. H₂S jest wymagany w regulacji wielu procesów fizjologicznych. W organizmie, zarówno jego deficyt, jak i nadmiar może prowadzić do wystąpienia schorzeń. Wykazano, że siarkowodor jest fizjologicznym środkiem na rozszerzenie naczyń krwionośnych czyli może być regulatorem ciśnienia krwi [33]. Zwiększone stężenie siarkowodoru w ośrodkowym układzie

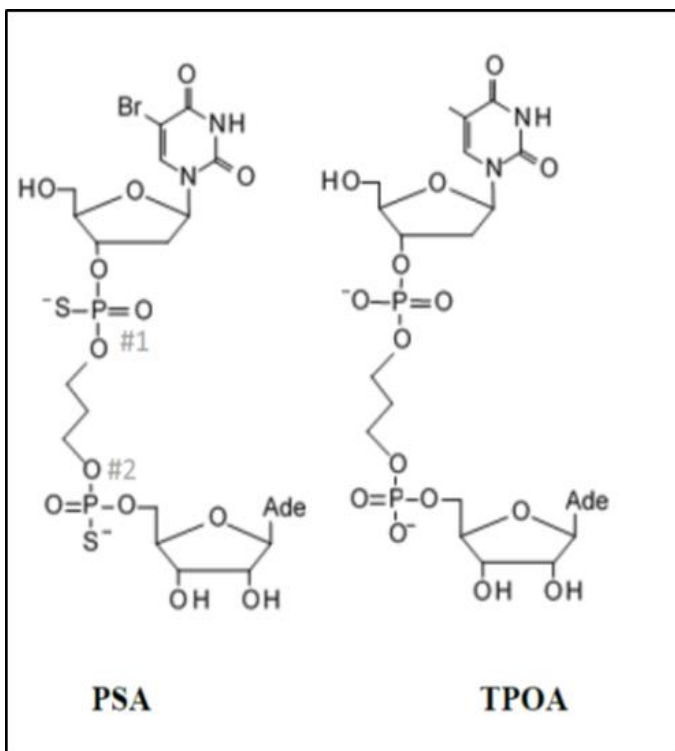
nerwowym towarzyszy zespołowi Downa i wstrząsowi septycznemu [34]. Natomiast zmniejszoną ilość H₂S zaobserwowano w mózgu w przypadku choroby Alzheimera oraz innych stanach patologicznych, takich jak rak [35] czy ostry stan zapalny trzustki [36]. Zatem regulacja procesu wytwarzania siarkowodoru może mieć znaczenie terapeutyczne. W szczególności aplikacja donorów H₂S zyskała szczególną uwagę, ze względu na możliwe cele ich zastosowania, jak np. nadciśnienie tętnicze, arterioskleroza, przerost mięśnia sercowego, zawał serca i wiele innych. Zatem z tego względu, uwolnienie cząsteczki H₂S wewnątrz komórek podczas przedstawionego wcześniej procesu desulfuracji katalizowanego przez białko Hint1 może nieść za sobą konsekwencje biologiczne.

Aby sprawdzić możliwość udziału Hint1 w procesie desulfuracji (d)NMPS wewnątrz komórki z udziałem białka występującego endogennie (czyli w niskim stężeniu), zaplanowałam eksperymenty na ekstraktach białkowych pozyskanych z linii komórkowych. W publikacji **H-4** przedstawione zostały wyniki badań nad desulfuracją AMPS katalizowaną przez komórkowy enzym Hint1. W tym celu zostały użyte lizaty komórkowe z linii A549ⁱ i HeLaⁱⁱ. Lizaty były otrzymane w taki sposób, aby obecna w nich była pula aktywnych białek komórkowych. Co istotne, obie te ludzkie, nowotworowe linie komórkowe charakteryzowały się obecnością białka Hint1, natomiast nie było w nich białka Fhit. Okazało się, że poziom desulfuracji AMPS był obniżony, gdy użyte zostały lizaty, w których ekspresja Hint1 była wyciszona (z użyciem siRNA skierowanych na mRNA białka Hint1) w porównaniu do kontrolnych lizatów, transfekowanych niespecyficznym siRNA (który nie powodował wyciszenia ekspresji białka Hint1). Wynik ten wskazuje, że wewnątrzkomórkowe białko Hint1 jest z dużym prawdopodobieństwem odpowiedzialne za desulfurację 5'-O-tiofosforanów nukleozydów wewnątrz komórki. Ponadto, stosując metodę fotozszywania i niehydrolizowalne pochodne (d)NMPS (analogi substratu, między innymi **PSA**, Rysunek 6), obserwowałam tworzenie się kompleksów zarówno z rekombinowanym, jak i komórkowym (z komórek A549) białkiem Hint1 [**H-4**]. Specyficzność oddziaływań między enzymem a badaną cząsteczką **PSA** została sprawdzona w eksperymencie fotozszywania przeprowadzonym w obecności kompetytora - związku **TPOA** (Rysunek 6), który konkurował z **PSA** o to samo miejsce wiązania w enzymie, którym jest prawdopodobnie miejsce katalityczne Hint1. Oznacza to, iż **PSA** nie wiąże się w sposób przypadkowy z badanym białkiem. Badania nad udowodnieniem wewnątrzkomórkowego procesu desulfuracji (d)NMPS z udziałem enzymu Hint1 są obecnie kontynuowane nie tylko na lizatach komórkowych ale również w warunkach *in vivo* (z zastosowaniem specyficznych i bardzo czułych sond fluorescencyjnych – indykatorów H₂S).

ⁱ A549 - (ang. *human lung carcinoma*), komórki nowotworu płuc

ⁱⁱ HeLa - (ang. *human epitheloid cervix carcinoma*) linia ludzkich komórek nabłonkowych wyprowadzonych z raka szyjki macicy, pobrana od Henrietty Lacks

Rysunek 6. Struktura związków użytych do badań fotosyzywania.



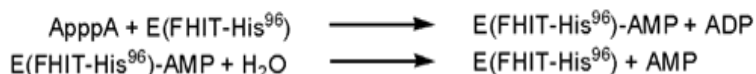
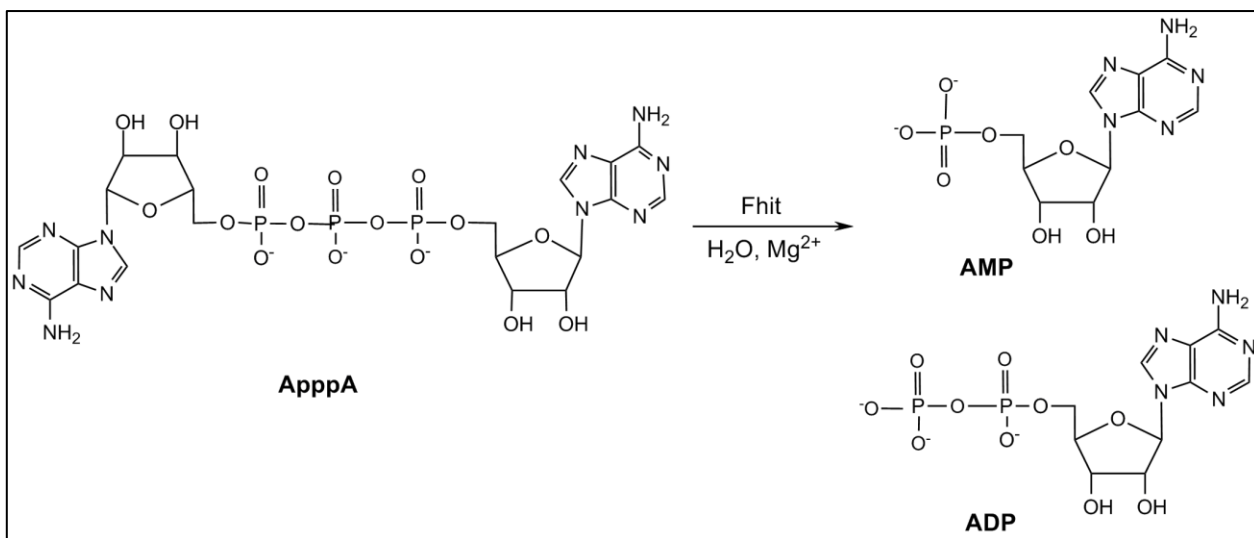
Trzeba tutaj wspomnieć, że białko Hint1 nie jest jedynym enzymem w komórce zdolnym do desulfuracji (d)NMPS. Innym bardzo podobnym strukturalnie białkiem do Hint1 jest Hint2, białko należące do tej samej gałęzi nadrodziny HIT (Rysunek 1). Również białko Fhit, jak wykazaliśmy, *in vitro* jest zdolne katalizować reakcję konwersji AMPS do AMP, jednakże ze znacznie mniejszą wydajnością niż Hint1 [H-1, H-2]. Jak dotychczas, na bazie tych wyników, w zespole prof. Jerzego Bełtowskiego z Lublina udowodniono, że AMPS i GMPS mogą być wykorzystane *in vivo* jako źródło siarkowodoru w badaniach eksperymentalnych lub nawet jako leki powoli uwalniające H₂S [37].

2.4.2 Białko Fhit

Białko Fhit (ang. *fragile histidine triad protein*) zbudowane jest z 147 aminokwasów, jego masa wynosi 17,6 kDa i, podobnie jak w przypadku białek Hint, jego formą aktywną enzymatycznie jest homodimer [38]. W warunkach *in vitro* Fhit wykazuje aktywność hydrolazy dinukleozydopolifosforanów (Ap_nA, n=3–6; Gp_nG, n=3–4; jak również Ap₃G, Ap₄G oraz m7GpppN), przy czym preferowanym substratem jest Ap₃A [39]. Fhit katalizuje hydrolizę Ap₃A zgodnie z przedstawionym schematem (Rysunek 7).

Białko Fhit kodowane jest przez gen zbudowany z 10 eksonów, znajdujący się w najbardziej łamliwym regionie ludzkiego chromosomu 3 (FRA3, 3p14.2) [40]. Położenie takie generuje dużą podatność genu FHIT na uszkodzenia (delecje, translokacje, inwersje, duplikacje), a utrata jego ekspresji jest odnotowana jako jedno z wcześniejszych wydarzeń wieloetapowego procesu karcynogenezy, ponieważ indukuje globalną niestabilność genomu [41]. Dlatego Fhit nazywany jest opiekunem genomu (ang. *genome caretaker*) [42].

Rysunek 7. Reakcja enzymatyczna katalizowana przez białko Fhit [43].



Ponadto Fhit bierze udział w wielu różnorodnych procesach komórkowych w tym, w kontroli cyklu komórkowego [44], odpowiedzi na stres oksydacyjny i genotoksyczny [45]. Może też modulować uwalnianie wapnia z mitochondriów [46], uczestniczyć w zapobieganiu spontanicznym uszkodzeń DNA [47] oraz działać jako supresor nowotworowy poprzez mechanizm związany z indukcją kaspazo-zależnej apoptozy [48]. Przy żadnej z tych powyższych funkcji nie stwierdzono aby niezbędna była jego aktywność hydrolityczna [49], natomiast właściwość ta jest kluczowa dla niedawno wykazanej funkcji Fhit jako *scavenger decapping enzyme* czyli hydrolazy biorącej udział w degradacji czapeczki z mRNA o strukturze dinukleozydotrifosforanu m7GpppN, powstającego w wyniku rozpadu mRNA [50].

Jak już wcześniej wspominałam w roku 2002, w ramach podoktorskiego stażu naukowego dołączyłam do grupy badawczej prof. Ch. Brennera, gdzie między innymi uczestniczyłam w badaniach, w których wykazano, że utrata aktywności pro-apoptotycznej białka Fhit jest związana z utratą jego zdolności wiązania substratu [51]. Komórki nowotworowe (A549 i SiHaⁱⁱⁱ) nie wykazujące ekspresji endogennego białka Fhit, a zawierające egzogenne mutanty Fhit o obniżonej zdolności wiązania się z substratem Ap₃A, czyli o dwukrotnie i siedmiokrotnie podwyższonej wartości K_m (obniżone powinowactwo białka do substratu), wykazywały znacząco obniżony poziom apoptozy w porównaniu z komórkami zawierającymi niezmutowane białko. Co więcej, komórki zawierające zmutowany Fhit o 30-krotnie podwyższonej wartości K_m zachowywały się podobnie jak komórki nowotworowe nie zawierające genu FHIT. Dlatego

ⁱⁱⁱ SiHa - *human cervical squamous cell carcinoma*

stanowi to dowód, iż kompleks enzym/substrat (np. Fhit/Ap₃A lub Fhit/Ap₄A) jest właściwym sygnałem do indukcji apoptozy, natomiast aktywność hydrolityczna Fhit nie ma wpływu na jego zdolności jako supresora nowotworowego.

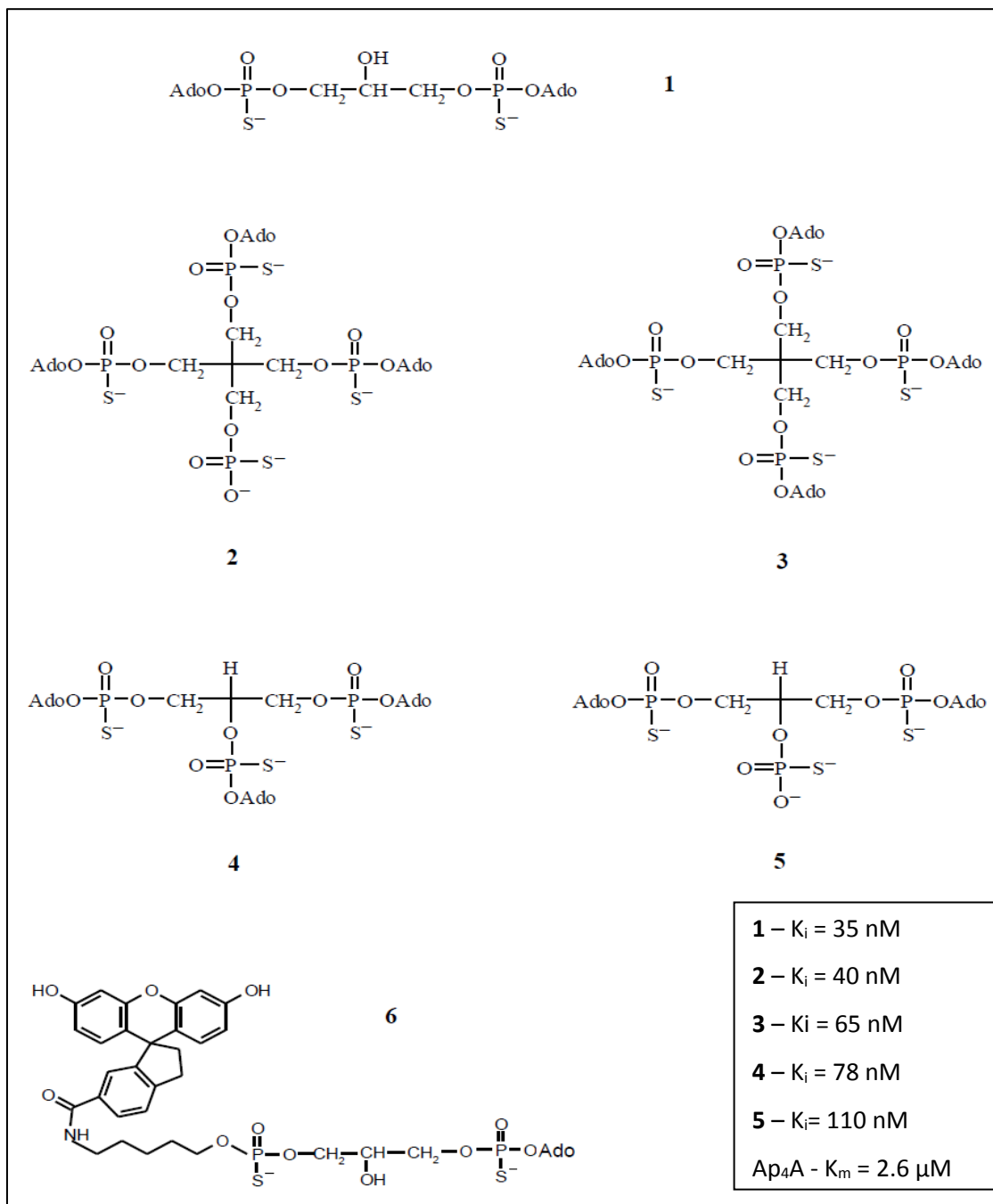
Po powrocie ze stażu pozostałam w nurcie tych badań i w dalszych pracach korzystałam z doświadczenia moich kolegów z ZCHB w syntezie efektywnych inhibitorów białka Fhit, tiofosforanowych analogów Ap_nA, które w centralnej części zamiast łańcucha polifosforanowego zawierały niejonowy linker [52]. Związki te są bardziej trwałe metabolicznie niż naturalnie występujące diadenozynopolifosforany, które są uważane za cząsteczki sygnałowe regulujące pewne procesy fizjologiczne [53]. W badaniach stosowałam przede wszystkim tiofosforanowe analogi Ap₄A. Związki te zostały otrzymane opracowaną w ZChB metodą oksatiafosfolanową, a ich własności inhibitorowe wobec Fhit zostały zbadane w 2001 roku we współpracy z zespołem prof. Brennera [52]. Spośród przebadanych ponad 20 związków, wybrałam 5 najbardziej efektywnych i poddałam je dalszym testom biologicznym [**H-3**]. Związki te były niehydrolizowalnymi, tiofosforanowymi analogami Ap₄A o ogólnym wzorze Aps_xpsA, gdzie x oznacza resztę glicerolu a PS wiązanie tiofosforanowe (Rysunek 8). Celem tych badań, było udowodnienie, iż związki hamujące aktywność enzymatyczną Fhit mogą wiązać się z białkiem w żywych komórkach, a dzięki temu że hamują jego aktywność hydrolityczną, przedłuża się czas życia cząsteczki sygnałowej do apoptozy (czyli kompleks Fhit-inhibitor) i tym samym poziom apoptozy jest wyższy.

W badaniach tych, w pierwszym etapie, testem MTT została zbadana toksyczność wybranych inhibitorów **1-5** wobec różnych linii komórkowych, charakteryzujących się genotypem FHIT⁺ (HEK293T^{iv}, HL-60^v) lub FHIT⁻ (A549, HeLa), a test na przeżywalność komórek wykonano po 24, 48 i 72h. W komórkach, które nie wykazywały ekspresji endogennego białka Fhit (A549 i HeLa) żaden z badanych związków **1-5** nie wykazywał znaczącej cytotoksyczności (IC₅₀ >80 μM). Z kolei w liniach komórkowych zawierających endogenne białko Fhit cytotoksyczność wykazał tylko związek Aps_xpsA-**1**, w którym x = CH₂CH(OH)CH₂ (IC₅₀ = 17.5 μM w komórkach HEK293T oraz IC₅₀ = 9 μM w HL-60). Związek **1** był jedynym izosterycznym analogiem Ap₄A spośród 5 zbadanych. Aps_xpsA **2-5** strukturalnie, w miejscu x charakteryzowały się dodatkowo ujemnie naładowaną dużą zawadą przestrzenną i prawdopodobnie dlatego, mimo iż były dobrymi inhibitorami Fhit, nie wykazywały w komórkach FHIT⁺ cytotoksyczności.

^{iv} HEK 293T – (ang. *human embryonic kidney cells 293 with stably express the SV40 large T antigen*) ludzkie embrionalne komórki nerki (transformowane adenowirusem 5) ze stabilną ekspresją antygeny SV40.

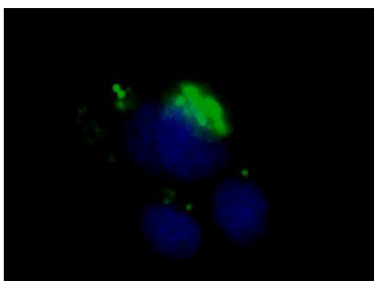
^v HL-60 – (ang. *Human promyelocytic leukemia cells*) komórki ostrej białaczki promielocytowej

Rysunek 8. Struktura analogów ApsxpsA 1-6 użytych do badań, jako mieszaniny diastereoizomerów. Podano wartości $K_m=K_i$ dla substratu Ap₄A oraz K_i dla inhibitorów Fhit [52].



Aby zbadać mechanizm cytotoxyczości ApsxpsA-1 w komórkach HEK293T, w dalszym etapie związek ten został poddany testom, w których badana była jego zdolność do indukcji apoptozy. W tym celu mierzony był poziom aktywacji indykatorów tego procesu czyli kaspaz. Otrzymane wyniki wykazały, że związek ten indukuje apoptozę na drodze aktywacji kaspaz (kaspaza 3/7), zarówno na drodze mechanizmu

zewnętrznego-receptorowego (kaspaza 8), jak i wewnętrznego-mitochondrialnego (kaspaza 9). Natomiast komórki HEK293T, w których wyciszono ekspresję Fhit za pomocą siRNA (69% obniżenia poziomu białka) nie były wrażliwe na badany związek i apoptoza nie zachodziła. Wynik ten wskazuje, iż związek **1** indukuje apoptozę w sposób zależny od Fhit, prawdopodobnie przez tworzenie kompleksu sygnałowego z tym białkiem. Jednocześnie wyklucza to możliwość, że badana cząsteczka działa zewnątrz-komórkowo (szczegółowa analiza w publikacji **H-3**). A zatem, związek ApsxpsA-1 jest zdolny migrować do komórki bez dodatku nośnika (tzw. transport gimnotyczny, ang. *gymnosis transport* [54]), a dodatkowy dowód na jego obecność w cytoplazmie komórek HEK 293T został uzyskany z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanego analogu, czyli związku **6** (Rysunek 9). Podsumowując, wprowadzony do cytoplazmy ApsxpsA-1 (analog izosteryczny) zachowuje się jak agonista Ap₃A i po utworzeniu kompleksu z białkiem Fhit obecnym w komórkach HEK293T, będzie mógł działać jako cząsteczka sygnałowa do apoptozy, bo nie zaburza oddziaływań z przypuszczalnymi cząsteczkami efektorowymi. Związki ApsxpsA (**2-5**) prawdopodobnie są antagonistami: wiążą się z białkiem Fhit ale nie dają sygnału do rozpoczęcia apoptozy, ponieważ zaburzają dalsze oddziaływania z białkami/cząsteczkami efektorowymi. Wyniki tych badań wskazują, że pewne analogi diukleozydopolifosforanów wprowadzone do komórek nowotworowych FHIT⁺ lub do komórek FHIT⁻ poddanych terapii genowej w celu uzyskania ekspresji białka Fhit, mogą być użyteczne w uzyskaniu/zwiększaniu poziomu indukcji apoptozy, co może być korzystne w leczeniu raka.

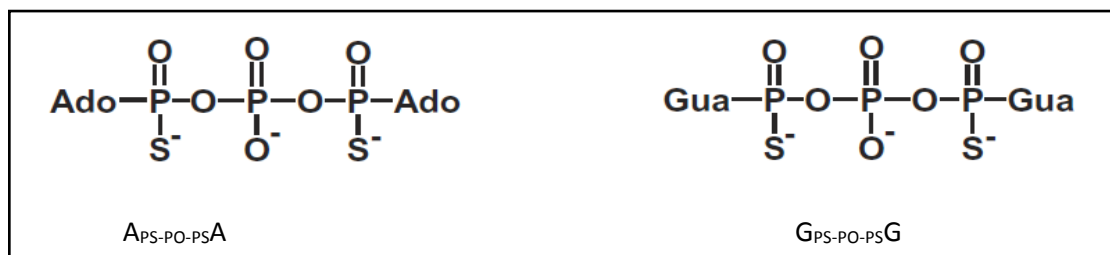


Rysunek 9 Wizualizacja (mikroskop fluorescencyjny) wnikania i wewnątrzkomórkowej dystrybucji analogu **6** (20 μ M) po 48h inkubacji z komórkami HEK293T. Barwienie jąder komórkowych DAPI (kolor niebieski). Znakowany fluoresceiną związek ApsxFL-6 (kolor zielony) jest obserwowany w cytoplazmie.

W powyższych badaniach, związki były używane jako mieszaniny P-diastereoizomerów (izomery ApsxpsA -1 o konfiguracji R_pR_p , S_pS_p , bądź R_pS_p). Niedawno, w ZCHB została opracowana metoda syntezy nowych tiofosforanowych analogów symetrycznych dinukleozydopolifosforanów ($N_{P_3}N$, Rysunek 10), przy czym pochodną adenozyiny otrzymano w postaci czystych diastereoizomerów [**H-5**]. Konfiguracja absolutna na atomach fosforu w substratach została określona enzymatycznie z zastosowaniem fosfodiesterazy z jadu węża (svpde), która jest enzymem R_p -specyficznym w stosunku do wiązań 5'-3' tiofosforanowych w dinukleozydach oraz w 5'-O-(α -tio)trifosforanie adenozyiny. Na podstawie analizy trawień tym enzymem, każdemu diastereoizomerowi $A_{PS-PO-PS}A$ przypisałam odpowiednią konfigurację absolutną na atomach fosforu: R_pR_p (dla slow), S_pS_p (dla fast) bądź R_pS_p (dla middle); gdzie fast, slow i middle

odpowiadają szybkości elucji (wyrażonej czasami retencji) tych związków w procesie oczyszczania za pomocą RP-HPLC (RP-HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa na złożu typu odwrotna faza). W następnym etapie zbadalam jak otrzymane związki, a w szczególności czyste diastereoizomery $A_{PS-PO-PSA}$ wpływają na aktywność białka Fhit.

Rysunek 10. Struktura nowych tiofosforanowych analogów N_{P_3N}



Jak można się było spodziewać, okazało się, iż tiofosforanowe analogi A_{P_3A} i G_{P_3G} są gorszymi substratami dla hydrolazy Fhit niż naturalne, niemodyfikowane substraty [H-5]. Najlepszym substratem spośród badanych diastereoizomerów był izomer $A_{PS-PO-PSA}$ o konfiguracji $R_P S_P$. Analiza zmierzonych parametrów kinetycznych K_m i k_{cat} pozwoliła stwierdzić, iż podstawienie atomu siarki na atomach P1 i P3 wpływa na stałą szybkości k_{cat} (zależnie od izomeru obniża ją odpowiednio około 4- i 5- rzędów wielkości w porównaniu do A_{P_3A}), natomiast ma niewielki wpływ na K_m czyli na powinowactwo badanego związku do enzymu (tabela 1). Oznacza to, że ilość obrotów enzymu jest znacznie ograniczona (czyli kontakt substratu z enzymem jest przedłużony), jeżeli w substracie są obecne atomy siarki na atomach fosforu P1 i P3. Natomiast powinowactwo do białka obniża się nieznacznie, ale tylko dla izomerów $R_P R_P$ i $S_P S_P$, a dla izomeru $R_P S_P$ pozostaje na takim samym poziomie jak dla substratu A_{P_3A} . Właśnie takie cechy, czyli przedłużenie czasu trwania/przeżycia kompleksu enzym-substrat są pożądane w odniesieniu do hipotezy, iż kompleks Fhit-substrat jest cząsteczką, rozpoczynającą kaskadę sygnałów do apoptozy, co związane jest z działaniem białka Fhit jako supresora nowotworowego.

Tabela 1. Kinetyczna charakterystyka diastereoizomerów $A_{PS-PO-PSA}$ wobec białka Fhit

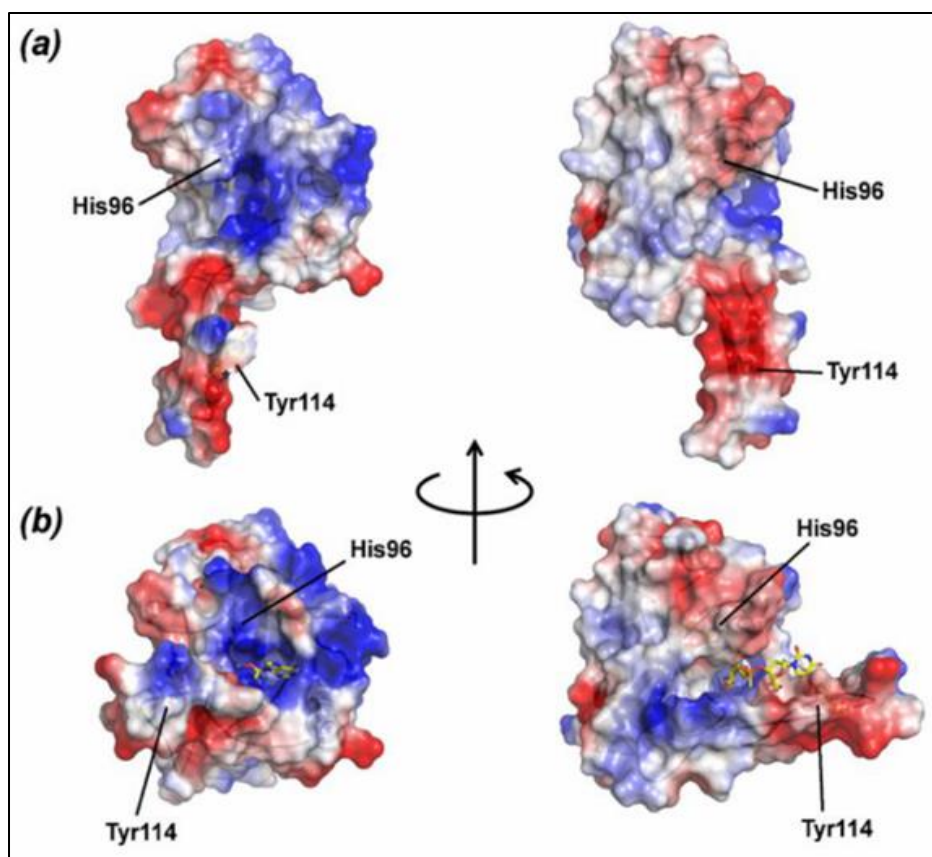
Compound	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$S_P S_P$	3.54 ± 1.01	$4.8 \times 10^{-4} \pm 0.3 \times 10^{-4}$	1.4×10^2
$R_P S_P$	1.25 ± 0.66	$29.9 \times 10^{-4} \pm 2.4 \times 10^{-4}$	24.0×10^2
$R_P R_P$	5.32 ± 0.88	$8.4 \times 10^{-4} \pm 0.3 \times 10^{-4}$	1.7×10^2
A_{P_3A} [55]	1.90 ± 0.2	73.0 ± 4.3	3.8×10^7

Rozszerzając temat oddziaływań substratu z białkiem Fhit, w kolejnych badaniach [H-6] zastosowałam dimer **PSA**, który był pochodną ApsxpsA-1, wcześniej stosowanego niehydrolizowalnego tiofosforanowego analogu Ap₃A [H-3] i jednocześnie zawierał resztę nukleozydową 5-bromo-deoksyurydyny (5BrdU), umożliwiającą przeprowadzenie reakcji fotozszywania przy użyciu UV o długości fali powyżej 308 nm (Rysunek 6). W tym przypadku, otrzymany w wyniku syntezy niesymetryczny związek był mieszaniną 4 diastereoizomerów (*R_pR_p*, *S_pS_p*, *R_pS_p*, bądź *S_pR_p*), które na etapie oczyszczania metodą HPLC udało mi się podzielić na czyste izomery. Następnie, za pomocą odpowiednich enzymów: *R_p*-specyficznej svpde oraz *S_p*-specyficznej nP1 (nukleaza P1) przypisałam konfigurację absolutną poszczególnym izomerom związku **PSA** [szczegóły zostały opisane w publikacji H-4]. Po przeprowadzeniu reakcji fotozszywania pomiędzy **PSA** i białkiem Fhit przy UV=312nm, a następnie analizie elektroforetycznej stwierdziłam, iż izomery **PSA-R_pS_p** i **PSA-S_pR_p**, tworzyły kompleksy najbardziej efektywnie. Wynik taki jest zgodny z otrzymanymi wcześniej i omawianymi wyżej danymi dla symetrycznego P¹,P³-bis-tio-di(adenozyno-5'-yl) trifosforanu [H-5], gdzie również izomer o konfiguracji *R_pS_p* (równoważny izomerowi *S_pR_p* dla symetrycznego substratu) wykazywał największe powinowactwo, czyli najniższą K_m (spośród trzech diastereoizomerów **PSA**) do enzymu Fhit. Specyficzność wiązania się **PSA** została sprawdzona przez zastosowanie w eksperymencie fotozszywania dodatkowo dwóch związków ApsxpsA-1 oraz **TPOA** (Rysunek 6 oraz Rysunek 8), które zachowywały się jak inhibitory kompetencyjne białka Fhit, czyli konkurowały z **PSA** o to samo miejsce wiązania w enzymie, którym jest prawdopodobnie miejsce katalityczne. Oznacza to, iż **PSA** nie wiąże się w sposób przypadkowy z badanym białkiem.

Tworzenie się kompleksu enzym-substrat(inhibitor) o trwałości wynikającej z połączenia wiązaniem kowalencyjnym tworzonym w wyniku fotozszywania ma dodatkowo tę zaletę, iż taki stabilny kompleks można wykorzystać do kolejnych badań, w których określiłam jakie fragmenty białka są zaangażowane w bezpośrednie oddziaływanie z substratem/analogiem substratu [H-6]. Chociaż znana jest struktura krystaliczna białka Fhit i to zarówno w formie apo, jak i w kompleksie z analogiem substratu, a także z produktem hydrolizy (tj. AMP lub GMP), to pewna ruchliwa część białka, zawarta w pętli 107-127aa pozostaje w tych strukturach niewidoczna [56,57]. Przeprowadzenie następującego ciągu eksperymentów: fotozszywanie **PSA** z białkiem Fhit, trawienie proteazą (w tym przypadku była to trypsyna) utworzonego kowalencyjnego kompleksu, a następnie analiza metodą spektrometrii masowej LC-MS powstałych fragmentów peptydowych pozwoliło na zidentyfikowanie peptydu NDSIYEELQK (aa 110-119) jako cząsteczki trwale połączonej z **PSA** wiązaniem kowalencyjnym pomiędzy 2'-deoksyurydynam (powstającą w wyniku eliminacji HBr z 5-bromodeoksyurydyny w reakcji fotozszywania) a prawdopodobnie resztą tyrozyny w peptydzie. Otrzymany wynik został porównany z rezultatem

podobnego ciągu doświadczeń otrzymanego dla białka Fhit bez dodatku dimeru **PSA**. Analiza regionów nieuporządkowania programem FoldIndex i porównanie wyników ze znanymi wcześniej strukturami Fhit określonymi rentgenograficznie pozwoliły stwierdzić, iż peptyd ten znajduje się w regionie nieustrukturyzowanym, w części białka niewidocznej w znanych strukturach krystalicznych (jest częścią pętli 107-127). W ten sposób, odkryty został nieobserwowany wcześniej region oddziaływań pomiędzy białkiem Fhit a jego substratem/analogiem substratu. Ruchliwość tego rejonu może mieć znaczenie w otwieraniu – zamykaniu kieszeni wiążącej, co wiąże się z możliwością wejścia/wyjścia substratu (Rysunek 11). Prawdopodobnie substrat po wejściu do kieszeni/miejsca aktywnego jest „zamykany” przez pętlę 107-127 zawierającą peptyd 110-119, a oddziaływania z aminokwasami tego regionu stabilizują kompleks aktywny Fhit-substrat. Zaobserwowane zjawisko może wpływać na funkcje pełnione przez białko Fhit w komórce. Wśród funkcji, gdzie znaczenie ma tworzenie, stabilizacja i czas życia kompleksu Fhit/substrat jest aktywność apoptotyczna tego białka, badana również wcześniej i opisywana w pracy [H-3].

Rysunek 11 Wizualizacja powierzchniowego potencjału elektrostatycznego proponowanej struktury kompleksu białka Fhit z ligandem **PSA**, który przedstawia również upakowanie/wypełnienie przestrzenne poszczególnych atomów (modelowanie komputerowe, ref. H-6). Zaznaczone zostały reszty aminokwasowe His96, Tyr114 oraz zadokowana w miejscu aktywnym cząsteczka **PSA**. (a) forma otwarta, czyli wolna od liganda, (b) forma zamknięta, czyli ze związanym ligandem. Widok z prawej strony przedstawia strukturę obróconą o 90°.



2.4.3 Posumowanie

Cykl prac wchodzących w skład odkrycia naukowo-badawczego zawiera opis badań nad aktywnością enzymatyczną dwóch białek z rodziny HIT, charakteryzujących się różnorodnymi funkcjami w komórce. Oprócz podobieństwa w strukturze (homodimery zbudowane z około 15 kDa podjednostek z jednym miejscem katalitycznym na każdej) i podobnego mechanizmu działania (atak na α -atom fosforu, reakcja zachodząca z retencją konfiguracji), białka Hint1 i Fhit jako enzymy łączy również fakt, iż do pełnienia ich funkcji jako supresory nowotworzenia nie jest niezbędna ich zdolność do hydrolizy substratu, a więc aktywność enzymatyczna. Jednakże aktywność ta została zachowana ewolucyjnie, co wskazuje iż może być niezbędna ze względu na inne pełnione w komórce funkcje. W przypadku białka Hint1, które występuje we wszystkich organizmach, począwszy od bakterii a skończywszy na Eukariontach, moje badania wskazują na udział tego białka w procesie desulfuracji w komórkach endo- i egzogennych tiofosforanowych nukleozydów (d)NMPS. Co więcej, odkrycie, iż siarkowodór jest jednym z produktów reakcji desulfuracji takich związków, wprowadza nowe możliwości ich zastosowania, gdyż gaz ten, jako przekaźnik sygnału w organizmie jest wymagany w regulacji wielu procesów fizjologicznych. Tym samym związki takie lub ich analogi mogą mieć wpływ na regulację tych procesów, co może mieć znaczenie terapeutyczne, między innymi poprzez użycie (d)NMPS jako donorów H_2S [37], np. w diagnostyce lub nawet jako leków np. w chorobie nadciśnieniowej [58,59].

Z kolei badania nad Fhit są związane raczej z lepszym zrozumieniem procesów w jakich uczestniczy to białko. Zastosowane przeze mnie tiofosforanowe analogi substratu $A_{P4}A$, będące inhibitorami Fhit umożliwiły wykazanie dodatkowych oddziaływań między białkiem a substratem. Z kolei oba typy analogów substratów użytych w moich badaniach, a więc te całkowicie hamujące aktywność hydrolazową Fhit, efektywne inhibitory (czyli pochodne $A_{P4}A$), jak i te które tylko obniżały szybkość reakcji hydrolizy, a nie miały znacząco pogorszonego powinowactwa do Fhit (czyli pochodne $A_{P3}A$), mogą być użyteczne w regulacji funkcji proapoptotycznej tego enzymu. Ich stosowanie może być wymienne, zależnie od intencji: czy sygnał do apoptozy ma być ciągły (inhibitory), czy tylko przedłużony (obniżona szybkość hydrolizy). W obu przypadkach istnieje możliwość ich zastosowania jako potencjalnych leków.

Podsumowując, zaplanowany i przeprowadzony cykl badań pozwolił na dodanie do ogólnej wiedzy pewnego związku pomiędzy aktywnością enzymatyczną a funkcją biologiczną obu badanych enzymów oraz umożliwia wykorzystanie pozyskanej wiedzy w planowaniu potencjalnych zastosowań praktycznych, w których tiofosforanowe analogi nukleozydów i dinukleotydy mogłyby działać jako związki terapeutyczne. W najbliższych planach naukowych mam zamiar kontynuować badania związane z udowodnieniem udziału białka Hint1 w desulfuracji tiofosforanów nukleozydów wewnątrz komórki. W tym celu planuję zastosować

związki będące indykatorami siarkowodoru i które można by użyć w hodowlach komórkowych. Z kolei w badaniach związanych z białkiem Fhit, związki które zastosowałam (niehydrolizowalne tiofosforanowe dimery, zawierające modyfikowane reszty nukleozydowe ułatwiające fotozszywanie) mogą zostać użyte przy poszukiwaniu nowych partnerów interakcyjnych dla tego białka (a dokładnie kompleksu Fhit/substrat) w warunkach *in vivo*, co pozwoliłoby na wyjaśnienie jakie białka/cząsteczki biorą udział w indukcji apoptozy przez to białko.

2.4.4 W toku realizacji rozprawy habilitacyjnej

1. Określono stereochemię reakcji hydrolizy wiązania P-N w nukleozydach 5'-O-amidotiofosforanowych, katalizowanej przez białko Hint1 oraz zauważono zdolność Hint1 do desulfuracji AMPS. [H-1]
2. Zaprezentowano zdolność białka Hint1 do katalizowania konwersji pozostałych (d)NMPS do (d)NMP, przy czym zauważono że w reakcji tej wydziela się siarkowodór. Określono także mechanizm tej reakcji. [H-2]
3. Wykazano zdolność komórkowego białka Hint1 do udziału w reakcji desulfuracji AMPS oraz przedstawiono istnienie kompleksów Hint1 z tiofosforanowymi analogami nukleozydów. [H-4]
4. Wykazano zdolność niehydrolizowalnych tiofosforanowych analogów $A_{P4}A$ (inhibitorów aktywności enzymatycznej białka Fhit) do indukcji apoptozy zależnej od białka Fhit. [H-3]
5. Zaprezentowano i scharakteryzowano biochemicznie nowe tiofosforanowe analogi $A_{P3}A$, będące nowymi substratami dla białka Fhit, które wykazuje zdolność do ich hydrolizy zależnie od konfiguracji absolutnej na atomach fosforu wiązań tiofosforanowych. [H-5]
6. Odkryto nowy region białka Fhit, który oddziałuje z substratem/analogiem substratu. [H-6]

2.5 Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze

Ukończyłam studia na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej w 1988 roku uzyskując stopień magistra inżyniera. W trakcie studiów, w 1987 roku dołączyłam do zespołu prof. Wojciecha Steca w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych (ZChB CBMiM) PAN w Łodzi. W tym czasie poznawałam nowoczesne metody stosowane w chemii (np. praca w warunkach super bezwodnych, technika HPLC, elektroforeza, synteza oligonukleotydów na fazie stałej), a które dostępne były w niewielu polskich laboratoriach, w tym w ZChB. Jednocześnie zostałam włączona w główny nurt badawczy zespołu związany z syntezą oligonukleotydów i ich tiofosforanowych analogów.

Początkowo uczestniczyłam w syntezie monomerów używanych w syntezie oligonukleotydów standardową metodą amidofosforynową na fazie stałej. Metodą tą wyprodukowane zostały m.in. 20-merowe oligonukleotydy, które następnie użyłam do sklonowania genu interleukiny 1 β metodą enzymatycznego łączenia syntetycznych fragmentów DNA. W dalszym etapie, otrzymany gen miał zostać użyty do otrzymania białka interleukiny 1 β w wyniku nadekspresji bakteriiach *E.coli*.

Na początku lat 90-tych ubiegłego wieku, w ZChB opracowana została pierwsza stereokontrolowana metoda syntezy tiofosforanowych analogów oligonukleotydów, tzw. metoda oksatiafosfolanowa.^{vi,vii} W odróżnieniu od powszechnie stosowanej metody amidofosforynowej, która daje jako produkt mieszaninę 2ⁿ diastereoizomerów (gdzie n oznacza liczbę tiofosforanowych wiązań internukleotydowych), metoda oksatiafosfolanowa umożliwia otrzymywanie tiofosforanowych analogów oligonukleotydów o zdefiniowanej konfiguracji absolutnej na atomach fosforu wiązań internukleotydowych. Dzięki tej metodzie stało się możliwe otrzymywanie odpowiednich, stereozdefiniowanych obiektów do badania wpływu przestrzennego ułożenia atomów siarki w wiązaniach internukleotydowych (czyli inaczej - wpływu stereochemii wiązań internukleotydowych) na aktywność enzymów biorących udział w metabolizmie kwasów nukleinowych.

W ramach zadań związanych z moją pracą doktorską, zsyntetyzowałam metodą oksatiofosfolanową 15-merowe tiofosforanowe (PS) analogi oligonukleotydów zawierające wszystkie wiązania tiofosforanowe o zdefiniowanej konfiguracji absolutnej R_P (all-R_P) i S_P (all-S_P). Związki te użyłam następnie do badania wpływu przestrzennego usytuowania atomu siarki w stereozdefiniowanych tiofosforanowych analogach oligodeoksyrybonukleotydów na aktywność RNazy H (pochodzącej z bakterii *E.coli*) oraz dwóch enzymów o aktywności odwrotnej transkryptazy (RT, ang. *reverse transcriptase*): z wirusa ptasiej białaczki (AMV RT) i ludzkiego wirusa zespołu nabytego braku odporności (HIV-1 RT). Szczegółowe badania nad mechanizmami działania tych enzymów były interesujące z uwagi na możliwość zastosowania PS-oligonukleotydów jako leków o działaniu przeciwwirusowym lub przeciwnowotworowym. RNaza H jest rybonukleazą, która rozpoznaje duplekisy RNA/DNA i w obrębie takiego heterodupleksu degraduje fragment RNA. Uważa się, że mechanizm działania oligonukleotydów antysensowych, zarówno tiofosforanowych jak i niemodyfikowanych, polega na aktywowaniu RNazy H przez duplekisy utworzone z ich udziałem. Z kolei odwrotna transkryptaza jest charakterystycznym dla retrowirusów wielofunkcyjnym enzymem, działającym jako polimeraza DNA i rybonukleaza H (retrowirusowa RNaza H). Zainteresowanie

vi Stec W. J., Grajkowski A., Koziółkiewicz M., Uznanski B., (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**: 5883-5888.

vii Stec W. J., Grajkowski A., Kobyłańska A., Karwowski B., Koziółkiewicz M., Misiura K., Okruszek A., Wilk A., Guga P., Boczkowska M., (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 12019-12029.

odwrotną transkryptazą ma związek z poszukiwaniem czynników przeciwdziałających rozwojowi wirusów we wczesnym etapie infekcji. Prace nad aktywnością nukleazową tych enzymów wykazały, że zarówno bakteryjna jak i retrowirusowa RNaza H charakteryzują się stereoselektywnością, tzn. wykazują zróżnicowaną aktywność w stosunku do dupleksów o przeciwnej stereochemii - wyższą dla dupleksu RNA/DNA utworzonego z udziałem oligomeru all-R_p niż do dupleksów utworzonych z izomerem all-S_p. Ponadto badania nad aktywnością polimerazową odwrotnej transkryptazy wykazały, że PS-oligonukleotydy o konfiguracji all-R_p są dobrymi starterami w reakcji elongacji łańcucha DNA na matrycy RNA. Oznacza to, iż PS-oligo mogą być wykorzystywane przez enzym jako startery inicjujące syntezę DNA na matrycy RNA, a jednocześnie mogą działać jako związki antysensowe tworzące dupleksy, które są zdolne do aktywacji retrowirusowej rybonukleazy H i w efekcie następuje degradacja RNA w obrębie utworzonego heterodupleksu. Ta podwójna rola PS-oligomerów jest zależna od stereochemii wiązań PS. W obecności izomeru all-R_p odwrotna transkryptaza wykazuje zarówno wyższą aktywność polimerazową jak i rybonukleolityczną niż w obecności izomeru all-S_p. Wykazałam również, że pewien tiofosforanowy oligonukleotyd o konfiguracji all-R_p i tworzący strukturę tetrapleksową wykazywał aktywność aptamerową i bezpośrednio wiązał się z odwrotną transkryptazą AMV RT i HIV RT hamując aktywność polimerazową tych enzymów. W tym przypadku wysokie powinowactwo PS-oligo do białka RT zależało od jego struktury trzeciorzędowej, którą warunkują długość, sekwencja nukleotydowa oraz konfiguracja absolutna na atomach fosforu tiofosforanowych wiązań internukleotydowych. Wyniki te mogły stanowić punkt wyjścia do poszukiwania wśród tiofosforanowych analogów oligonukleotydów efektywnego aptamerycznego inhibitora odwrotnych transkryptaz, w tym także odwrotnej transkryptazy wirusa HIV.

Pracę doktorską, opartą na wyżej omówionych badaniach, zatytułowaną „Badania wpływu stereochemii oligonukleozydotiofosforanów na aktywność RNazy H i odwrotnej transkryptazy” przygotowaną w ZChB CBMiM PAN w Łodzi obroniłam w roku 1999. Omówione wyniki badań, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych [spis publikacji, pozycje nr 1,3,5] i w jednym artykule przeglądowym „Oligonukleotydy o właściwościach aptamerycznych”, napisanym na podstawie części teoretycznej tej pracy [spis publikacji, pozycja nr 4]. Za tę publikację otrzymałam w 1998 roku nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w czasopiśmie „Postępy Biochemii”.

W następnych latach kontynuowałam badania nad mechanizmem działania RNazy H. Stosując opracowaną w ZChB nową metodę określania stereochemii reakcji enzymatycznych zaobserwowałam, że reakcja hydrolizy RNA w dupleksie RNA/DNA katalizowana przez RNazę H (a dokładnie hydroliza tiofosforanowego wiązania internukleotydowego o konfiguracji RP w RNA) zachodzi z inwersją konfiguracji

na atomie fosforu [spis publikacji, pozycja nr 7]. Wyniki uzyskane w tych badaniach umożliwiły dyskusję nad możliwą architekturą miejsca aktywnego w enzymie w kontekście znanych danych literaturowych i pozwoliły wyciągnąć wnioski na temat mechanizmu reakcji katalizowanej przez RNazę H. Podsumowaniem tego okresu badawczego było otrzymanie przeze mnie w 2000 roku Nagrody Prezydium Oddziału PAN w Łodzi i Konferencji Rektorów Państwowych Uczelni Łodzi w dziedzinie nauk ścisłych.

W latach 2002-2003 odbyłam staż doktorski w zespole profesora Charles'a Brennera (Filadelfia, USA) podczas którego zajmowałam się badaniami biochemicznymi wybranych białek enzymatycznych z rodziny triady histydynowej (HIT). W tym czasie nabrałam doświadczenia w metodyce ekspresji i izolowania białek w różnych systemach bakteryjnych (w tym również enzymów bardzo czułych na deaktywację), jak również poznałam podstawy krystalografii (otrzymywanie kryształów). W ramach realizowanych projektów przeprowadziłam między innymi ekspresję w bakteriach *E.coli* i wyizolowałam ludzkie białko Fhit oraz jego 5 mutantów, a następnie wyznaczyłam ich stałe kinetyczne K_m i k_{cat} . Mutanty wykazywały zmienioną charakterystykę enzymatyczną: (a) w szybkości hydrolizy (do 100 000-krotnego obniżenia wartości k_{cat}) oraz (b) obniżoną zdolność wiązania się z substratem (do 30-krotnego podwyższenia wartości K_m). Dane te były istotne przy weryfikowaniu hipotezy, iż proapoptotyczna funkcja białka Fhit w komórkach jest zależna od zdolności wiązania się tego białka z substratem i trwałości takiego kompleksu jako sygnału do inicjacji apoptozy, natomiast hydroliza substratu skraca czas życia cząsteczki sygnałowej [spis publikacji, pozycja nr 8].

Dcs-1 (białko pochodzące z nicienia *C. elegans*, ortolog Dcps-1), to kolejny enzym z rodziny HIT, którym się zajmowałam podczas stażu. Wyznaczone przeze mnie parametry kinetyczne dla enzymu oddziałującego z kilkunastoma różnymi związkami pozwoliły na określenie jego preferencji substratowych i potwierdzenie hipotezy, iż enzym ten może być zaangażowany w usuwanie czapeczki (ang. *cap*) z krótkich fragmentów RNA powstających w wyniku 3'→5'-egzonukleolitycznej degradacji mRNA. Tym samym, Dcp-1 został zakwalifikowany do oddzielnej, nowej gałęzi rodziny białek HIT [spis publikacji, pozycja nr 9].

Następnym białkiem, które badałam, był króliczy Hint1 (białko homologiczne do ludzkiego Hint1 w 93%). Białko to, podobnie jak Fhit, jest znane z wielu różnych funkcji w komórce, między innymi działa jako supresor nowotworzenia. Badania dotyczące Hint1 były związane z charakterystyką enzymu w stosunku do nowych substratów i inhibitorów, wygodnych modeli do badań mechanistycznych i biochemicznych, między innymi związków będących analogami stanu przejściowego, użytecznych w badaniach strukturalnych. Stosując substrat funkcjonalny w teście kolorymetrycznym, wykonałam miareczkowanie aktywności tego białka w obecności różnych stężeń różnych inhibitorów, co pozwoliło na wyznaczenie ich stałych inhibicji K_i , a następnie wybrałam najskuteczniejszy z nich do badań strukturalnych. Ponadto, dzięki

pomiarowi zależności aktywności enzymu od pH dla białka niezmutowanego i mutantu S107A, w połączeniu z badaniem rentgenograficznym struktury przestrzennej kryształu kompleksu najlepszego inhibitora z Hint1, wyznaczone zostały dodatkowe reszty aminokwasowe biorące udział w procesie katalizy (kataliza kwasowo-zasadowa) i zaproponowany został mechanizm reakcji, w której pośredniczy białko Hint1 [spis publikacji, pozycja nr 10].

Doświadczenia uzyskane w trakcie realizacji wcześniej omówionych zadań stały się, po powrocie ze stażu, podstawą do częściowo samodzielnych badań naukowych prowadzonych w ZCHB CBMiM. Kontynuowałam zatem badania nad białkami z rodziny HIT w kontekście zainteresowań i możliwości oferowanych przez ZCHB. Dlatego obecne badania koncentrują się na połączeniu mojej wiedzy enzymologa i biochemika z użytecznością w tych badaniach tiofosforanowych analogów nukleotydów i oligonukleotydów, w szczególności tych o stereo-zdefiniowanej konfiguracji absolutnej. Badania nad aktywnością enzymatyczną i mechanizmem działania enzymów Hint1 i Fhit, opisane w cyklu sześciu publikacji, stanowią podstawę wniosku postępowania habilitacyjnego.

Zajmowałam się również odrębnymi badaniami na zasadzie współpracy z badaczami z ZCHB, jak również z Politechniki Łódzkiej. I tak, pod kierunkiem prof. Barbary Nawrot z ZCHB powstało 5 publikacji. Część z nich dotyczyła badań poziomu mRNA w korelacji z poziomem białka Fhit i SSTR3 (receptor somatostatyny typu 3) w błonie śluzowej żołądka pacjentów obciążonych dziedzicznie rakiem żołądka i zainfekowanych bakterią *Helicobacter pylori* [spis publikacji, pozycje nr 11,12,13,14]. W badaniach tych wykonałam część eksperymentów dotyczących wyznaczania poziomu mRNA badanych białek metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym. Ponadto, uczestniczyłam w badaniach nad nowymi pochodnymi gemcytabiny jako potencjalnymi prolekami [spis publikacji, pozycja nr 18], gdzie przeprowadziłam doświadczenia biochemiczne z ludzką DNA polimerazą α , enzymem Hint1, jak również wykonałam badanie stabilności nowych związków w lizatach komórkowych.

Współpracowałam także z prof. Piotrem Gugą z ZCHB przy udowodnieniu możliwości zastosowania jednostek LNA do wzmocnienia trwałości termodynamicznej dupleksów i trypleksów równoległych tworzonych przez LNA/2'-OMe-RNA z homopurynowymi [All-R_p-PS]-oligodeoksyrybonukleotydami komplementarnymi nie tylko według schematu oddziaływań Watsona-Cricka, ale także oddziaływań zdefiniowanych przez Hoogsteena [spis publikacji, pozycja nr 19]. W badaniach tych prowadziłam testy, w których wykazałam lepsze własności inhibitorowe tworzących trypleks LNA-RNA w reakcji wydłużania łańcucha DNA katalizowanej przez odwrotną transkryptazę AMV RT na matrycy RNA niż RNA bez modyfikacji LNA.

Współpraca z dr Rafałem Dolotem z ZCHB zaowocowała 3 publikacjami [spis publikacji, pozycje nr 15,16,21] opisującymi struktury białka Hint1 (króliczy i ludzki), w których zostało wykorzystane moje doświadczenie między innymi w zakresie nadekspresji białka Hint1, jak również w analizie HPLC.

Z kolei moje doświadczenie w pracy z odwrotną transkryptazą (HIV-1 RT), a w szczególności z badaniem inhibitorów tego enzymu było przydatne we współpracy z Prof. Piotrem Panethem z Politechniki Łódzkiej [spis publikacji, pozycja nr 20]. W tym wypadku moim zdaniem było wyznaczenie stałych IC_{50} (stała oznaczająca stężenie dla którego zachodzi 50% zahamowanie aktywności badanego enzymu) dla kilkunastu związków, które były potencjalnymi inhibitorami HIV-1 RT.

Obecne fronty badawcze są kontynuacją badań prowadzonych wcześniej i koncentrują się na zrozumieniu procesów zachodzących z udziałem białek z rodziny HIT. W przyszłości planuję też rozwinięcie badań nad kompleksami białkowymi (białka Hint1, Fhit, ewentualnie inne) z analogami substratów/inhibitorami, wykorzystując do tego celu nowoczesną metodykę termoforezy (MST).

2.6 Bibliografia

- 1 Brenner C. (2002) Hint Fhit and GalT: Function, Structure, Evolution and Mechanism of Three Branches of the Histidine Triad Superfamily of Nucleotide Hydrolases and Transferases. *Biochemistry*. **41**: 9003-9014
- 2 Brenner C., Garrison P., Gilmour J., Peisach D., Ringe1 D., Petsko G., Lowenstein J. (1997) Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 231-238
- 3 Seraphin B., (1992) The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals. *DNA Seq.* **3**: 177-179.
- 4 Martin J., St-Pierre M., Dufour J.F. (2011) Hit proteins, mitochondria and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1807**: 626-32
- 5 Kijas A., Harris J., Harris J., Lavin M. (2006) Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. *J. Biol. Chem.* **281**: 13939-48
- 6 Robinson A.K., de la Peña C.E., Barnes L.D. (1993) Isolation and characterization of diadenosine tetraphosphate (Ap4A) hydrolase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1161**:139-148
- 7 Szablewski L, Skopińska A. (2004) Zaburzenia metabolizmu węglowodanów powodowane mutacjami i rola diety jako terapii i Galaktozemia. *Borgis - Medycyna Rodzinna.* **4**: 106-112
- 8 Liu H., Rodgers ND., Jiao X., Kiledjian M. (2002) The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* **21**: 4699-708

-
- 9 Bail S. and Kiledjian M. (2008) DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *RNA Biol.* **5**: 216-219
- 10 Pozycja 17 spisu publikacji
Krakowiak A.*, Fryc I.,
„Rodzina białek triady histydynowej (HIT) - aktywność enzymatyczna a funkcja biologiczna”
Postępy Biochem. **58**: 302-313 (2012)
- 11 Bieganowski P., Garrison P., Hodawadekar SC., Fayw G., Barnes LD., Brenner C. (2002) Adenosine Monophosphoramidase Activity of Hint and Hnt1 Supports Function of Kin28, Ccl1, and Tfb3. *J. Biol. Chem.* **277**: 10852-10860
- 12 Chou TF, Wagner CR. (2007) Lysyl-tRNA Synthetase-generated Lysyl-Adenylate is a Substrate for Histidine Triad Nucleotide Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **282**: 4719–4727
- 13 Guranowski A, Wojdyła A M, Zimny J, Wypijewska A, Kowalska J, Łukaszewicz M, Jemielity J, Darzynkiewicz E, Jagiełło A, Bieganowski P. (2010) Recognition of different nucleotidyl-derivatives as substrates of reactions catalyzed by various HIT-proteins. *New J. Chem.* **34**: 888–893
- 14 Zimon M, Baets J, Almeida-Souza L, De Vriendt E, Nikodinovic J, Parman Y, Battaloglu E, Matur Z, Guergueltcheva V, Tournev I, Auer-Grumbach M, De Rijk P, Petersen B-S, Muller T, Fransen E, Van Damme P, Loscher WN, Barisic N, Mitrovic Z, Previtali SC, Topaloglu H, Bernert G, Beleza-Meireles A, Todorovic S, Savic-Pavicevic D, Ishpekova B, Lechner S, Peeters K, Ooms T, Hahn AF, Zuchner S, Timmerman V, Van Dijck P, Rasic V M, Janecke AR, De Jonghe P, Jordanova A. (2012) Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat. Genet.* **44**, 1080–1083.
- 15 Martins-de-Souza D, Guest PC, Harris LW, Vanattou-Saifoudine N, Webster MJ, Rahmoune H, Bahn S. (2012) Identification of proteomic signatures associated with depression and psychotic depression in post-mortem brains from major depression patients. *Transl. Psychiatry* **2**: e87
- 16 Weiske J, Huber O. (2006) The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **281**: 27356–27366.
- 17 Weiske J, Huber O. (2005) The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF- β -catenin-mediated transcription. *J. Cell Sci.* **118**, 3117–3129.
- 18 Rodríguez-Muñoz M, Garzón J. (2013) Nitric oxide and zinc-mediated protein assemblies involved in mu opioid receptor signaling. *Mol. Neurobiol.* **48**, 769-782.
- 19 Linde CI, Feng B, Wang JB, Golovina VA. (2013) Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) regulates Ca(2+) signaling in mouse fibroblasts and neuronal cells via store-operated Ca(2+) entry pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**: C1098-104.
- 20 Korsisaari N, Makela T (2000) Interactions of Cdk7 and Kin28 with Hint/PKCI-1 and Hnt1 Histidine Triad proteins. *J. Biol. Chem.* **275**: 34837-34840
- 21 Yannay-Cohen N, Carmi-Levy I, Kay G, Yang CM, Han JM, Kemeny DM, Kim S, Nechushtan H, Razin E (2009) LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol. Cell.* **34**: 603-611

-
- 22 Carmi-Levy I, Yannay-Cohen N, Kay G, Razin E, Nechushtan H (2008) Diadenosine tetraphosphate hydrolase is part of the transcriptional regulation network in immunologically activated mast cells. *Mol. Cell Biol.* **28**: 5777-84
- 23 Chen Q, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Chen X. (2008) Is the histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) gene a candidate for schizophrenia? *Schizophr. Res.* **106**: 200–20.
- 24 Lima CD, Klein MG, Weinstein IB, Hendrickson WA. (1996) Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5357-62
- 25 Pozycja 10 spisu publikacji
Krakowiak A., Pace H.C., Blackburn G.M., Adams M., Mekhalfia A., Kaczmarek R., Baraniak J., Stec W.J., Brenner C.
"Biochemical, crystallographic, and mutagenic characterization of Hint, the AMP-lysine hydrolase, with novel substrates and inhibitors".
J. Biol. Chem. **279**,18711-18716 (2004).
- 26 Koziolkiewicz M, Owczarek A, Wójcik M, Domański K, Guga P, Stec WJ. (2002) Retention of Configuration in the Action of Human Plasma 3'-Exonuclease on Oligo(deoxynucleoside phosphorothioate). A New Method for Assignment of Absolute Configuration at Phosphorus in Isotopomeric Deoxyadenosine 5'-O-[18O]Phosphorothioate. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4623-4627
- 27 Pozycja 7 spisu publikacji
Krakowiak A., Owczarek A., Koziolkiewicz M., Stec W.J.
„Stereochemical course of Escherichia coli RNase H”
ChemBioChem, **3**, 1242-1250 (2002).
- 28 Beltowski J. (2015) Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine – An update. *Pharmacol. Rep.* **67**: 647-658.
- 29 Brenner C, Garrison P, Gilmour J, Peisach D, Ringe D, Petsko GA, Lowenstein JM. (1997) Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 231–238
- 30 Koziolkiewicz M, Gendaszewska E, Maszewska M, Stein CA, Stec WJ. (2001) The mononucleotide-dependent, nonantisense mechanism of action of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides depends upon the activity of an ecto-5'-nucleotidase. *Blood.* **98**: 995-1002
- 31 Liang J, Wang Z, He X, Li J, Zhou X, Deng Z. (2007) DNA modification by sulfur: analysis of the sequence recognition specificity surrounding the modification sites. *Nuc. Acids Res.* **35**: 2944–2954
- 32 Wang R. (2003) The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox. Signal.* **5**: 493–501
- 33 Yang G, Wu L, Bryan S, Khaper N, Mani S, Wang R. (2010) Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* **86**: 487-95
- 34 Coletta C, Szabo C. (2013) Potential role of hydrogen sulfide in the pathogenesis of vascular dysfunction in septic shock. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **11**: 208–21.

-
- 35 Szabo C, Coletta C, Chao C, Módis K, Szczesny B, Papapetropoulos A, Hellmich MR. (2013) Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**: 12474–12479.
- 36 Ang AD, Rivers-Auty J, Hegde A, Ishii I, Bhatia M. (2013) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**: G712–21.
- 37 Beltowski J, Guranowski A, Jamroz-Wiśniewska A, Korolczuk A, Wojtak A. (2014) Nucleoside monophosphorothioates as the new hydrogen sulfide precursors with unique properties. *Pharmacol. Res.* **81**: 34-43.
- 38 Lima CD, D'Amico KL, Naday I, Rosenbaum G, Westbrook EM, Hendrickson WA. (1997) MAD analysis of FHIT, a putative human tumor suppressor from the HIT protein family. *Structure* **5**: 763-774
- 39 Barnes LD, Garrison PN, Sibrashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K (1996) Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''- P1, P3 - triphosphate hydrolase. *Biochemistry* **35**: 11529–11535
- 40 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Sibrashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K (1996) The FHIT Gene, Spanning the Chromosome 3p14.2 Fragile Site and Renal Carcinoma-Associated t(3;8) Breakpoint, is Abnormal in Digestive Tract Cancers. *Cell* **84**: 587–597
- 41 Saldivar JC, Miuma S, Bene J, Hosseini SA, Shibata H, Sun J, Wheeler LJ, Mathews CK, Huebner K. (2012) Initiation of genome instability and preneoplastic processes through loss of Fhit expression. *PLOS Genet.* **8**: e1003077.
- 42 Waters CE, Saldivar JC, Hosseini SA, Huebner K. (2014) The FHIT gene product: tumor suppressor and genome "caretaker". *Cell Mol Life Sci.* **71**: 4577-4587.
- 43 Abend A, Garrison PN, Barnes LD, Frey PA (1999) Stereochemical Retention of the Configuration in the Action of Fhit on Phosphorus-Chiral Substrates. *Biochemistry* **38**: 3668–3676
- 44 Ishii H, Wang Y, Huebner K. (2007) A Fhit-ing role in the DNA damage checkpoint response. *Cell Cycle* **6**: 1044-1048.
- 45 Okumura H, Ishii H, Pichiorri F, Croce CM, Mori M, Huebner K. (2009). Fragile gene product, Fhit, in oxidative and replicative stress responses. *Cancer Sci.* **100**: 1145–1150.
- 46 Rimessi A, Marchi S, Fotino C, Romagnoli A, Huebner K, Croce CM, Pinton P, Rizzuto R. (2009). Intramitochondrial calcium regulation by the FHIT gene product sensitizes to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**: 12753–12758.
- 47 Saldivar JC, Bene J, Hosseini SA, Miuma S, Horton S, Heerema NA, Huebner K. (2013) Characterization of the role of Fhit in suppression of DNA damage. *Adv. Biol. Regul.* **53**: 77-85.
- 48 Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM, Sozzi G (2002) Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 3615–3620

-
- 49 Huebner K, Saldivar JC, Sun J, Shibata H, Druck T (2011) Hits, Fhits and Nits: beyond enzymatic function. *Adv. Enzyme Regul.* **51**: 208-217
- 50 Taverniti V, Séraphin B. (2015) Elimination of cap structures generated by mRNA decay involves the new scavenger mRNA decapping enzyme Aph1/FHIT together with DcpS. *Nucl. Acids Res.* **43**: 482-492
- 51 Spis publikacji, pozycja nr 8.
Trapasso F., Krakowiak A., Cesari R., Arkles J., Yendamuri S., Ishii H., Vecchione A., Kuroki T., Bieganski P., Pace H.C., Huebner K., M.Croce C., Brenner C.
"Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**,1592-1597 (2003).
- 52 Varnum J M, Baraniak J, Kaczmarek R, Stec WJ, Brenner C. (2001) Di-, tri- and tetra-5'-O-phosphorothioadenosyl substituted polyols as inhibitors of Fhit: Importance of the alpha-beta bridging oxygen and beta phosphorus replacement. *BMC Chem. Biol.* **1**: 3.
- 53 Kisselev L, Justensen J, Wolfson A D, Frolova LY. (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett.*, **427**: 157-163.
- 54 Soifer HS, Koch T, Lai J, Hansen B, Hoeg A, Oerum H, Stein CA.(2012) Silencing of gene expression by gymnotic delivery of antisense oligonucleotides. *Methods Mol Biol.* **815**: 333-346.
- 55 Draganescu A, Hodawadekar SC, Gee KR, Brenner C. (2000) Fhit-nucleotide specificity probed with novel fluorescent and fluorogenic substrates. *J. Biol. Chem.* **275**: 4555.
- 56 Lima CD, Klein MG, Hendrickson WA. (1997). Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science* **278**: 286-290
- 57 Pace H C, Garrison PN, Robinson AK, Barnes LD, Draganescu A, Rösler A, Blackburn GM, Sipsashvili Z, Croce CM, Huebner K, BrennerC. (1998). Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of Fhit-substrate complexes as the active signaling form of Fhit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **95**: 5484–5489.
- 58 Wang R. (2010) Toxic Gas, Lifesaver. *Scientific American*, **302**: 66-71.
- 59 Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder S H, Wang R. (2008) H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, **322**: 587–590.



Podpis habilitanta