

Metabolizm tiofosforanowych leków i proleków - identyfikacja białek wiążących 5'-monotiofosforany nukleozydów z zastosowaniem metody fotozszywania.

Kierownik grantu dr hab. Agnieszka Krakowiak

Grant KBN No: NN204130137 (2009-2012)

Opis projektu

W ramach projektu zsyntezowano następujące związki: X-(3')-PS-OCH₂-CH₂-CH₂O-(5')-NMPS (gdzie N=A lub dC; natomiast X= 5-bromo-2'-deoxyurydyna, 5-jodo-2'-deoxyurydyna lub 4-tio-2'-deoxyurydyna), a następnie enzymatycznie (svpde i nP1) określono konfigurację absolutną poszczególnych izomerów (możliwe konfiguracje dla każdego dimeru to: SpSp, SpRp, RpSp, RpRp). Poszczególne izomery po wyznakowaniu za pomocą ³²P użyto w eksperymentach fotozszywania z białkami Fhit i Hint1 (białka rekombinowane, otrzymane w wyniku ekspresji z odpowiednich plazmidów w bakteriach E.coli), a następnie przeprowadzono analizę tworzenia kompleksów metodą elektroforetyczną (żel niedenaturujący). Stwierdzono obecność kompleksów badanych dinukleotydów w przypadku obu badanych białek. W przypadku białka Hint1, największa ilość kompleksu powstaje z udziałem izomeru RpSp. W przypadku białka Fhit, największe powinowactwo wykazuje RpSp i SpRp. Dla obu białek, izomer RpRp dinukleotydu tworzy kompleksy najmniej wydajnie.

Aby dokładniej określić region(y) interakcji pomiędzy dinukleotydem i białkiem Fhit, fotosieciovany kompleks (z udziałem nieoznakowanego izotopowo dinukleotydu RpSp) został zhydrolizowany z pomocą trypsyny, a następnie poddany analizie LC-MS/MS. Stwierdzono, że Tyr114, znajdujący się w pętli 107–127, zlokalizowanej w nieuporządkowanym regionie Fhit niedaleko miejsca aktywnego, jest najbardziej prawdopodobnym aminokwasem biorącym udział w reakcji fotozszywania enzymu Fhit z badanym dinukleotydem.

W związku z tym stwierdzamy, że w warunkach komórkowych interakcje między Hint1 oraz Fhit a tiofosforanowymi analogami nukleozydów są możliwe, co wskazuje na prawdopodobieństwo występowania takich efektów in vivo.

Publikacje:

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., **2010**; 285: 40809-18.

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: 5053-5060.

Krakowiak A, Fryc I. Rodzina białek triady histydynowej (HIT) – aktywność enzymatyczna a funkcja biologiczna. Postępy Biochemii, **2012**; 3: 302-313.

Krakowiak A, Pawłowska R, Kocoń-Rębowska B, Dolot R, Stec WJ. 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 - Gen. Phys.*, **2014**; 1840: 3357.

Krakowiak A, Kocoń-Rębowska B, Dolot R, Piotrkowska D. New interactions between tumor suppressor Fhit protein and a nonhydrolyzable analog of its Ap4A substrate. *FEBS Letters*, **2017**; 591: 548-559.