

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**A computational model of molecular mechanism behind
the half-the-sites activity of thymidylate synthase**

Tytuł w języku polskim:

Model obliczeniowy molekularnego mechanizmu aktywności typu half-the-sites
syntazy tymidylanowej

Promotorzy: prof. dr hab. Andrzej Leś
dr Nina Pastor, UAEM, Cuernavaca, Meksyk

Białka są przedmiotem zainteresowania wielu prac eksperymentalnych i teoretycznych z uwagi na różne aspekty ich budowy i funkcji, np.: przewidywanie struktury trzeciorzędowej białek, rozpoznawanie substratu przez białko, allosteryczność, zwijanie/rozwijanie białek, wiązanie przez nie RNA czy badanie ich zmian konformacyjnych.

Badania zespołu prof. Wojciecha Rode z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN dotyczące różnych aspektów biosyntezy tymidylanu, a w szczególności enzymologii, regulacji oraz inhibicji tego procesu, jak również modyfikacji potranslacyjnych oraz ich wpływu na właściwości enzymów, ze szczególnym zainteresowaniem skierowanym na syntazę tymidylanową – poszukiwanie nowych leków skierowanych przeciwko niej, selektywność i mechanizm działania, mechanizmy inhibicji tego enzymu oraz jej specyficzności – stały się inspiracją do podjęcia badań teoretycznych. Tematyka obecnej rozprawy została zainicjowana licznymi dyskusjami na temat podstaw molekularnych funkcjonowania tego enzymu.

Syntaza tymidylanowa (TS) jest dimerycznym enzymem katalizującym metylowanie deoksyurydino-5'-monofosforanu (dUMP) przy pomocy 5,10-metyleno-5,6,7,8-tetrahydrofolianu (CH_2THF) jako kofaktora do deoksytymidino-5'-monofosforanu (dTMP) i dihydrofolianu (DHF). W ten sposób syntaza tymidylanowa odgrywa ogromną rolę w replikacji DNA, dostarczając prekursor jednego z nukleotydów – deoksytymidino-5'-trifosforanu (dTTP). Z uwagi na to, że jest jedynym źródłem dTMP w komórce, stanowi cel

w chemioterapii przeciwnowotworowej, przeciwwirusowej, przeciwgrzybiczej i przeciwprzeczynowej. Budowa oraz mechanizm reakcji katalizowanej przez TS wraz z innymi aspektami jej funkcjonowania zostały przedstawione w rozdziale 2. dysertacji.

Kilkanaście lat temu postawiono hipotezę, że syntaza tymidylanowa jest enzymem o aktywności typu half-the-sites, tzn. że jej oba miejsca aktywne (każde na jednej z podjednostek dimeru) nie są równocenne i nie działają jednocześnie w tym samym czasie. Takie założenie implikuje wzajemne komunikowanie się obu podjednostek w czasie przyłączania substratu i kofaktora podczas przebiegu katalizowanej reakcji. Prezentowana praca jest próbą rozwiązania tego problemu przy pomocy dwóch różnych metod.

W pierwszym podejściu badano niskoczęstotliwościowe drgania normalne syntazy tymidylanowej pozbawionej ligandu. Takie drgania odpowiadają zbiorowym ruchom większych fragmentów białka i mają duże znaczenie biologiczne, np. odpowiadając za otwieranie się i zamykanie dostępu do miejsca aktywnego. Im mniej zlokalizowany jest to ruch, tym większe fragmenty białka są zaangażowane w jego wykonanie.

Drgania normalne o niskich częstotliwościach zostały obliczone przy pomocy programu Elastic Network Model i nakładki internetowej do niego – ElNémo. Uzyskano w ten sposób wiele symetrycznych i asymetrycznych drgań. Ich analiza pokazała różnice w zachowaniu się obu miejsc aktywnych enzymu, wskazując, że pomimo identycznej budowy nie są równocenne. Dla wybranych siedmiu symetrycznych i dziewięciu asymetrycznych drgań normalnych obliczono wartości powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika w miejscu aktywnym, SASA (ang. *solvent-accessible surface area*). Wartości te były przeważnie większe dla jednej podjednostki i równolegle towarzyszyły im zmiany wartości odległości między wybranymi aminokwasami.

Analiza drgań pokazała, że najbardziej ruchliwymi częściami syntazy tymidylanowej są pętle wyściełające wejście do miejsca aktywnego, jak również jedna z helis (helisa K) – uczestniczą niemal w każdym drganiu normalnym i mają swój udział w zamykaniu się miejsca aktywnego po tym, jak zwiąże się ono z ligandem. Jedna z tych pętli zawiera specyficzną wstawkę występującą tylko u ssaków i może wykonywać zarówno ruch ścinający (ang. *shear motion*), jak i ruch zawiasowy (ang. *hinge motion*). Druga z tych pętli stanowi fragment N-końca i służy jako wieczko przy zamykaniu się miejsca aktywnego. Jednocześnie zawiera aminokwasy, które jako pierwsze „wyczuwają” obecność substratu oraz biorą udział w komunikowaniu się obu podjednostek enzymu. Śledząc różnice w upakowaniu aminokwasów w badanym enzymie na krawędziach β -kartek budujących interfejs, czyli miejscu styku dwóch podjednostek, oraz opierając się o dane literaturowe, nasze badania potwierdzają, że przekazywanie zmian strukturalnych między jednym miejscem aktywnym a drugim może się odbywać przez interfejs. Ponadto w czasie wykonywania drgań normalnych, zwłaszcza asymetrycznych, syntaza tymidylanowa ułatwia dostęp do jednego centrum aktywnego, jednocześnie utrudniając dojdzie do drugiego. Jest to ważna

cecha dynamiczna enzymu, która – wraz z jego budową – prawdopodobnie odpowiada za jego aktywność typu half-the-site.

Nierównocенność w działaniu obu podjednostek dimeru oraz jego centrów aktywnych została również rozpoznana w badaniach z zastosowaniem dynamiki molekularnej prowadzonych w środowisku denaturującym – w 8-molowym roztworze mocznika lub 6-molowym roztworze chlorowodoru guanidyny (GuHCl). Badania były przeprowadzone dla dwóch wersji dimeru TS (AB i CD) o różnych gęstościach elektronowych.

Mimo tak drastycznych warunków znaczna część struktury syntazy tymidylanowej pozostała uporządkowana. Jednocześnie trzy wspomniane wyżej fragmenty enzymu mające swój udział w zamykaniu się miejsca aktywnego (dwie pętle i helisa) okazały się najbardziej ruchliwymi częściami białka. W czasie symulacji w roztworze mocznika rozwijały się i wyginały w różnych kierunkach, przy czym ten ruch zachodził inaczej w obu podjednostkach. Przemieszczenia podanych fragmentów były zawsze większe w monomerze A lub C i prowadziły do częściowego zniszczenia struktury trzeciorzędowej tych miejsc, jednak zmiany w strukturze drugorzędowej (rozwijanie się helis i degradacja β -krotek) były większe w monomerach B i D.

Przeprowadzone symulacje pozwoliły również na zaobserwowanie początkowej fazy rozwijania się syntazy tymidylanowej. Zastosowane warunki (8 M roztwór mocznika lub 6 M roztwór chlorowodoru guanidyny i temperatura 310 K) pozwoliły wprawdzie dostrzec skromne zmiany zachodzące w enzymie, jednak ukazują one wyłącznie wpływ czynników denaturujących na strukturę białka bez udziału wysokiej temperatury. Rozwijaniu się białka, które zachodziło inaczej w obu podjednostkach, towarzyszył wzrost wartości RMSD oraz SASA. Zmiany były zawsze większe w jednej z nich i były nieporównywalne w obu. Konsekwencją były zmiany w układzie aminokwasów zaangażowanych w tworzenie miejsc aktywnych – niektóre z nich znajdowały się daleko od ich pierwotnej lokalizacji. Tak zachodzące zmiany w pierwszym etapie denaturacji syntazy tymidylanowej są argumentem wspierającym hipotezę, że TS jest enzymem o aktywności typu half-the-site.

Bogate dane literaturowe dotyczące tematu rozwijania białek ujawniają, że denaturacja białek przebiega znacznie łatwiej w GuHCl niż w moczniku, nawet jeśli stosuje się mniejsze stężenia GuHCl niż mocznika. Nasze wyniki pokazują jednak coś przeciwnego. Chlorowodorek guanidyny powodował jedynie małą zmianę w strukturze białka, podczas gdy mocznik spowodował, że białko straciło lokalnie swoją trzeciorzędową strukturę, wskazując w ten sposób, że mocznik jest silniejszym czynnikiem denaturującym niż GuHCl, przynajmniej w zastosowanych stężeniach i warunkach symulacji. Jednakże objaśnienie podstaw molekularnych eksperymentalnie stwierdzonej łatwiejszej denaturacji białek przez GuHCl niż przez mocznik wymaga dalszych badań symulacyjnych, w tym m.in. zastosowanie szerszego spektrum stężeń czynników denaturujących, wydłużonych czasów symulacji czy też zbadanie efektu temperaturowego.

Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim. Wyniki badań opublikowane zostały w dwóch oryginalnych artykułach naukowych. Prezentowane były także na kilku konferencjach międzynarodowych i krajowych, zarówno w formie referatów, jak i plakatów.