

**Autoreferat**

**Znaczenie oligomeryzacji dla aktywności enzymatycznej  
trimerycznych fosforylaz nukleozydów purynowych –  
badania biofizyczne z wykorzystaniem klasy inhibitorów  
multisubstratowych**

**Beata Wielgus-Kutrowska**

**Wydział Fizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Zakład Biofizyki**

**Uniwersytet Warszawski**

## Spis treści

1.	Imiona i nazwisko .....	2
2.	Posiadane stopnie naukowe.....	2
3.	Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych .....	2
4.	Publikacje naukowe opisane w bazie danych Web of Science.....	2
5.	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
5.1	Tytuł osiągnięcia naukowego .....	2
5.2	Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe .....	3
5.3	Omówienie celu naukowego wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z ich ewentualnym wykorzystaniem.....	5
	Wstęp .....	5
	Prezentacja osiągnięcia naukowego.....	9
	Podsumowanie .....	17
	Literatura .....	18
6.	Pozostała działalność naukowa .....	19
6.1.	Wstęp .....	19
6.2.	Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora .....	21
6.3.	Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora .....	29

## 1. Imiona i nazwisko

**Beata Maria Wielgus-Kutrowska**

## 2. Posiadane stopnie naukowe

- Dyplom magistra fizyki, w zakresie biofizyki, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, 13 października 1993, tytuł pracy magisterskiej: „*Badanie oddziaływania fosforylasy nukleozydów purynowych z rybozydem nikotynamidu. Badania metodami spektroskopowymi*”, opiekun dr hab. Ewa Kulikowska.
- Dyplom doktora nauk fizycznych w zakresie fizyki, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, 6 grudnia 1999, tytuł rozprawy doktorskiej: „*Fosforylasy nukleozydów purynowych – właściwości fizykochemiczne oraz mechanizm oddziaływania z ligandami*”, promotor prof. David Shugar.

## 3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

- Od 1993 – Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego:
  - 1993 - 1998 - Studia doktoranckie,
  - 1999 - Etat inżynieryjno-techniczny,
  - 2000 - 2004 - Adiunkt, umowa na czas określony,
  - od 2004 - Adiunkt, zatrudnienie na podstawie mianowania.

## 4. Publikacje naukowe opisane w bazie danych Web of Science

(wg. wzorca „Wielgus-Kutrowska\*, B\*)

- Indeks #H 9
- Liczba publikacji: 33 (+3 opublikowane w latach 1996, 2014, 2014 nie widniejące w bazie WoS)
- Liczba cytowań: 292
- Liczba cytowań z wyłączeniem własnych autocytań 224

Lista publikacji (36) z podziałem na publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, pozostałe, znajdujące się w bazie Journal Citation Reports i inne znajduje się w Załączniku 3.

## 5. 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.)

### 5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

**„Znaczenie oligomeryzacji dla aktywności enzymatycznej trimerycznych fosforylaz nukleozydów purynowych – badania biofizyczne z wykorzystaniem klasy inhibitorów multisubstratowych”**

## 5.2 Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

1. A. Bzowska, G. Koellner, B. Wielgus-Kutrowska, A. Stroh, G. Raszewski, A. Holý, T. Steiner, J. Frank (2004) „*Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase with two full trimers in the asymmetric unit: important implications for the mechanism of catalysis*” J. Mol. Biol. 342, 1015-1032.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu i wykonaniu badań spektroskopowych (fluorescencyjnych i absorpcyjnych, przedstawionych na rysunkach 7 i 8A oraz w tabeli 2B),
- analizie statystycznej wyników pomiarów spektroskopowych,
- opracowaniu wyników badań spektroskopowych w postaci rysunków i tabeli,
- udziale w dyskusjach dotyczących wszystkich wyników umieszczonych w publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 20%.

2. B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska (2006) „*Probing the mechanism of purine nucleoside phosphorylase by steady-state kinetic studies and ligand binding characterization determined by fluorimetric titrations*” Biochim. Biophys. Acta. 1764, 887-902.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- wykonaniu wszystkich badań doświadczalnych,
- analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników,
- przygotowaniu rysunków i tabel (poza schematem 1),
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. B. Wielgus-Kutrowska, J.M. Antosiewicz, M. Długosz, A. Holý, A. Bzowska (2007) „*Towards the mechanism of trimeric purine nucleoside phosphorylases: stopped-flow studies of binding of multisubstrate analogue inhibitor - 2-amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]-6-sulfanylpurine*” Biophys. Chem. 125, 260-268.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- wykonaniu wszystkich badań doświadczalnych,
- analizie i interpretacji uzyskanych wyników wraz ze współautorami,
- przygotowaniu wszystkich rysunków i tabel,
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

4. K. Breer, A. Girstun, B. Wielgus-Kutrowska, K. Staroń, A. Bzowska (2008) „*Overexpression, purification and characterization of functional calf purine nucleoside phosphorylase (PNP)*” Protein Expr. Purif. 61, 122-130.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zorganizowaniu zakupu biblioteki cDNA i zaproszeniu do współpracy pracowników Wydziału Biologii UW,
- współudziale w projektowaniu wektorów i warunków ekspresji fosforylasy nukleozydów purynowych ze śledziona cielęcej w bakterii *E. coli*,
- opiece merytorycznej nad metodyką oczyszczania i badaniami spektroskopowymi, mającymi na celu scharakteryzowanie właściwości uzyskanego białka, których wyniki są przedstawione w tabelach 1, 2, 3, 4, 5 i na rysunkach 1, 2, 4, 5, 6.
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 30%.

5. K. Breer, L. Glavas-Obrovac, M. Suver, S. Hikishima, M. Hashimoto, T. Yokomatsu, B. Wielgus-Kutrowska, L. Magnowska, A. Bzowska (2010) „*9-Deazaguanine derivatives connected by a linker to difluoromethylene phosphonic acid are slow-binding picomolar inhibitors of trimeric purine nucleoside phosphorylase*” FEBS J. 277, 1747-1760.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- wykonaniu (samodzielnie lub z pomocą technika) doświadczeń których wyniki są umieszczone na rysunkach 2, 3, 4, 7 i, częściowo, w tabeli 1,
- analizie danych lub pomocy w analizie danych wykonanej przez doktorantkę,
- dyskusji wyników badań,
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 30%.

6. G. Chojnowski, K. Breer, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, H. Czapinska, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, M. Bochtler, A. Girstun, K. Staron, A. Bzowska (2010) „*1.45 . resolution crystal structure of recombinant PNP in complex with a pM multisubstrate analogue inhibitor bearing one feature of the postulated transition state*” Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 703-708.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na

- zaprojektowanie i pomoc w analizie doświadczenia którego wyniki znajdują się na rysunku 1,
- dyskusji wyników badań,
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

7. K. Breer, B. Wielgus-Kutrowska, A. Girstun, K. Staroń, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, A. Bzowska (2010) „*Overexpressed proteins may act as mops removing their ligands from the host cells: a case study of calf PNP*” Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 1203-1209.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaprojektowaniu części doświadczeń, w tym potwierdzających hipotezę, tłumaczącą niektóre, zaskakujące wyniki badań,

- wykonaniu i analizie doświadczeń lub pomocy doktorantce w wykonaniu i analizie doświadczeń, w przypadku prezentowanych w pracy wyników badań kalorymetrycznych i spektroskopowych oraz symulacji (rysunki 1 - 4, tabela 1),
- interpretacji wyników badań wraz ze współpracownikami,
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

8. B. Wielgus-Kutrowska, K. Breer, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, M. Narczyk, A. Dyzma, A. Girstun, K. Staroń, A. Bzowska, (2012) „*Trimeric purine nucleoside phosphorylase: exploring postulated one-third-of-the-sites binding in the transition state*” *Bioorg. Med. Chem.* 20, 6758-6769.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- wykonaniu pracy doświadczalnej, której wyniki są przedstawione na rysunkach 4, 5, 6,
- planowaniu i pomocy w pracy doświadczalnej doktorantek i opracowaniu danych w przypadku części prezentowanych w pracy wyników badań (rysunki 1,2,3, tabela 2 i 3),
- opracowaniu wyników badań w postaci tabel i rysunków,
- interpretacji wyników badań,
- udziale w pisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

9. B. Wielgus-Kutrowska, A. Modrak-Wójcik, A. Dyzma, K. Breer, M. Żółkiewski, A. Bzowska (2014) „*Purine nucleoside phosphorylase activity decline is related to the decay of the enzyme in the trimeric form*” *Arch. Biochem. Biophys.* 549, 40–48 (DOI 10.1016/j.abb.2014.03.009).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- określeniu pomysłu i koncepcji pracy,
- planowaniu i wykonaniu pracy doświadczalnej (w tym wszystkich badań wstępnych), której wyniki są przedstawione w tabeli 1 i na rysunkach 2B, 3, 5, 6 (do rys. 2 i 4, wykonałam badania wstępne),
- opracowaniu wyników badań w postaci tabel i rysunków (poza rysunkiem 2),
- interpretacji wyników badań,
- napisaniu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

### 5.3 Omówienie celu naukowego wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z ich ewentualnym wykorzystaniem

#### Wstęp

Jako osiągnięcie naukowe przedstawiam monotematyczny zestaw publikacji na temat biofizycznych podstaw funkcjonowania szerokiej klasy białek enzymatycznych – trimerycznych fosforylaz nukleozydów purynowych (PNP, ang. *purine nucleoside phosphorylase*). Badania opisane w tych pracach doprowadziły do:

- Rozstrzygnięcia problemu komunikacji pomiędzy podjednostkami PNP ze źródeł ssących prowadzącej, zdaniem niektórych badaczy, do bardzo silnej negatywnej kooperacji, czyli utrudnionego wiązania kolejnych cząsteczek ligandów po związaniu pierwszej,
- Scharakteryzowania powinowactwa do PNP inhibitorów mulisubstratowych – potencjalnych leków, które mogą znaleźć zastosowanie tam, gdzie korzystne jest zablokowanie aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych, np. przy zapobieganiu odrzutom przeszczepów,
- Wyjaśnienia dlaczego PNP jest białkiem aktywnym biologicznie tylko jako cząsteczka trimetryczna, złożona z trzech monomerów o jednakowej sekwencji aminokwasowej.

Badania prowadziłam w grupie prof. Agnieszki Bzowskiej, której pomoc w wielu aspektach pracy była nie do przecenienia. Dzięki jej wcześniejszym badaniom ze współpracownikami z Instytutu Krystalografii Wolnego Uniwersytetu Berlińskiego, w szczególności z dr Getraud Koellner stało się możliwe zainicjalizowanie opisanych niżej badań. Mogły one być prowadzone dzięki współpracującym z nami chemikom – początkowo dzięki prof. Antoninowi Holemu, a następnie grupie prof. Tsutomu Yokomatsu, oraz biologom – prof. Krzysztofowi Staroniowi i dr Agnieszce Girstun. Nieoceniony wkład w realizację tematyki wnieśli doktoranci, w szczególności dr Katarzyna Breer. Bez ich udziału znacząco wydłużyłby się czas uzyskania przedstawionych rezultatów badań, a część mogłaby w ogóle nie powstać.

### *Oligomeryzacja enzymów*

Wśród około 60 000 struktur enzymów zdeponowanych w Protein Data Bank znaczna część (prawie 40%) to obiekty zbudowane z kilku podjednostek o identycznej sekwencji aminokwasów w łańcuchu białkowym. Są to homooligomery sekwencyjne. Oligomeryzacja umożliwia tworzenie dużych struktur białkowych bez zwiększania rozmiaru genomu, budowę miejsca wiążącego substraty i inhibitory katalizowanej reakcji na granicy podjednostek, pozwala na allosteryczną regulację aktywności enzymów i przyczynia się do większej stabilizacji oligomeru w porównaniu z monomerem [Hashimoto K., et al. 2011].

W przypadku białek homooligomerycznych znane jest zjawisko różnego powinowactwa podjednostek do ligandów. W szczególnej sytuacji w enzymie może być tylko jedna aktywna podjednostka. Pozostałe mogą występować w konformacji utrudniającej lub uniemożliwiającej wiązanie ligandów. Może to wynikać z aranżacji struktury czwartorzędowej białka, która, pomimo jednakowej sekwencji monomerów, przybiera postać asymetrycznego heterooligomeru konformacyjnego już w formie apo, czyli bez związanych ligandów. W takiej strukturze podjednostki nigdy nie są równocenne. Jest to tzw. „preexistent asymmetry” lub „site heterogeneity” [Malhorta O.P., et al. 1987].

Zgodnie z drugą hipotezą oligomeryczny enzym w formie apo jest symetryczny, a asymetria jest indukowana dzięki oddziaływaniu z ligandem i komunikacji pomiędzy podjednostkami. Może to prowadzić do kooperacji objawiającej się ułatwionym (w przypadku kooperacji pozytywnej) lub utrudnionym (w przypadku kooperacji negatywnej) wiązaniem kolejnych cząsteczek ligandu po związaniu pierwszej.

W granicznej sytuacji kooperacja negatywna może być tak silna, że wiązanie jednej cząsteczki inhibitora prowadzi do całkowitego zablokowania oligomeru. W literaturze anglojęzycznej zjawisko

to opisuje się, dla dimerów, jako „half-of-the-sites binding” lub „half-of-the-sites reactivity” (gdy białko wykazuje aktywność enzymatyczną) lub, dla trimerów, jako „third-of-the-sites binding/reactivity”.

Fakt istnienia kooperacji negatywnej został udowodniony dla kilku homooligomerów z różnych źródeł, np. syntazy tymidylanowej [Saxl R.L., et al. 2001, Pozzi C., et al. 2012], fosfatazy alkalicznej [Papaleo E., et al. 2013, Cathala G., Brunel C., 1975], dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu [Nagradova N.K. 2002, Song S.Y., et al. 1999]. Dla innych białek pojawiły się pojedyncze doniesienia dotyczące tego zagadnienia. W niektórych przypadkach zablokowanie enzymu okazywało się artefaktem, np. dla enzymu z mikroorganizmu *Rhodospirillum rubrum* pełniącego podwójną funkcję karboksylazy i oksygenazy rybulozobifosforanu [Herndon C.S., et al. 1982], dla transaldolazy z bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*) [Schörken U., et al. 1998] i transketolazy z *Saccharomyces cerevisiae* [Fiedler E., et al. 2002].

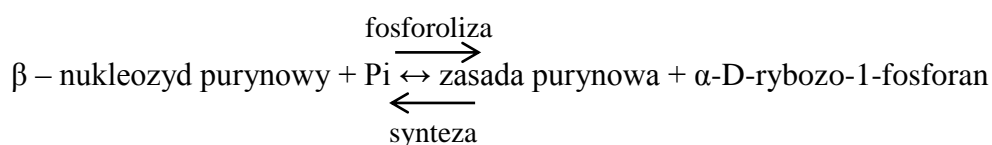
W znacznej większości udowodnionych przypadków doniesienia dotyczą białek złożonych z parzystej liczby monomerów, dla której połowa podjednostek zostaje wyłączona po zajęciu przez ligandy drugiej ich połowy. Tym bardziej interesujące wydawały się prace grupy prof. Verna Schramma, które sugerują możliwość zablokowania w pewnych warunkach całej cząsteczki PNP o nieparzystej liczbie jednakowych podjednostek (trzy) przez jedną cząsteczkę substratu reakcji syntezy nukleozydów – hipoksantyny (Hx), lub silnych inhibitorów o cechach stanu przejściowego - Immucyliny H i G (ImmH, ImmG). Wyniki badań są zawarte w publikacjach [Kline P.C., Schramm V.L., 1992] i [Miles R.W., et al. 1998]. W kolejnej pracy wykazano istnienie silnej kooperacji negatywnej dla Immucyliny H o stałych dysocjacji 23 pM dla pierwszej molekule wiązanej przez trimer, <5 μM, dla drugiej i ~100 μM dla trzeciej [Wang F., et al. 2000].

Istnienie bardzo silnej kooperacji negatywnej stawia przed badaczami wiele pytań. Związanie jednej cząsteczki blokuje praktycznie cały oligomer - jaki jest cel istnienia zjawiska, w którym, po związaniu ligandu w jednym miejscu aktywnym pozostałe stają się bezużyteczne? Czy, w przypadku PNP, poza Imm H i Hx obserwujemy je dla innych ligandów? Jeśli tak, to jak komunikują się podjednostki białka i jakie charakterystyczne cechy ligandów odpowiadają za ten efekt?

### **Trimeryczne fosforylasy nukleozydów purynowych**

Przedmiotem mojej pracy były fosforylasy nukleozydów purynowych należące do klasy fosforylaz o niskiej masie cząsteczkowej, ok. 90 kDa, tzw. „low molecular mass”, zbudowane w formie aktywnej z trzech jednakowych pod względem sekwencji podjednostek (monomerów). Do tej grupy fosforylaz należy m. in. PNP ze śledziona cielęcej, z erytrocytów ludzkich i z mikroorganizmu *Cellulomonas*.

Fosforylasy nukleozydów purynowych katalizują odwracalną fosforolizę wiązania glikozydowego rybo- i deoksyrybonukleozydów z udziałem fosforanu nieorganicznego, zgodnie za schematem:





Substratami fosforylaz o niskiej masie cząsteczkowej są nukleozydy 6-oxo-puryn.

W 1975 roku Eloiza Giblett ze współpracownikami stwierdziła, że brak aktywności fosforylazy prowadzi do upośledzenia odporności komórkowej – spadku liczby limfocytów T [Giblett E.R., et al. 1975]. W przypadkach chorób układu odpornościowego takich jak białaczki związane z wysokim poziomem przeciwciał typu T lub w sytuacjach, gdy brak odporności jest pożądany, np. przy przeszczepach organów, a także w wielu chorobach autoagresywnych, wydajne inhibitory PNP ludzkiego mogą być pożadanymi lekami immunosupresyjnymi. Dlatego też badania nad mechanizmem reakcji katalizowanej przez PNP są prowadzone od wielu lat w związku ze znaczeniem medycznym ich wyników, które są pomocne w projektowaniu silnych inhibitorów enzymu.

Do chwili obecnej zaproponowano 3 modele sposobu prowadzenia katalizy enzymatycznej przez trimeryczne PNP. Wszystkie są zgodne w dwóch kwestiach dotyczących: 1) przekształcenia w stanie przejściowym fragmentu pentozowego w dodatnio naładowany jon oksokarboniowy oraz 2) kluczowego znaczenia aminokwasów Asn243 i Glu201, różnią się natomiast między sobą rozkładem gęstości elektronowej i rodzajem formy tautomerycznej pierścienia purynowego występującej w stanie przejściowym katalizowanej reakcji. Najstarsza z hipotez, zakładająca wiązanie neutralnej formy zasady purynowej i protonację pozycji N<sup>7</sup> w trakcie katalizy stała się podstawą zaprojektowania inhibitorów naśladujących stan przejściowy ligandów. Drugi model zakłada pojawienie się ujemnego ładunku rozłożonego pomiędzy pozycjami N<sup>7</sup> i N<sup>9</sup> puryny i wiązanie w początkowym etapie reakcji ujemnie naładowanej formy zasady. Trzeci proponuje wiązanie zasady w formie neutralnej i pojawienie się rzadkiej formy enolowej puryny z ładunkiem ujemnym rozmieszczonym w okolicy tlenu O<sup>6</sup>.

Na podstawie obecnego stanu wiedzy można było postawić hipotezę, że potencjalne silne inhibitory, a co za tym idzie leki immunosupresyjne, mogą być następującymi związkami:

- a) inhibitorami stanu przejściowego - naśladującymi ligandy w stanie przejściowym, charakteryzującym się dodatnim ładunkiem zlokalizowanym na rybozie oraz uprotonowanym azotem w pozycji N<sup>7</sup> pierścienia purynowego. Imitują one układ nukleozyd purynowy – fosforan, który tworzy się w momencie rozrywania wiązania glikozydowego (C-N) w reakcji fosforolizy. Wiązanie to powinno być jednak znacznie silniejsze, aby nie uległo rozerwaniu po związaniu ligandu i takie powinno występować w przypadku inhibitorów stanu przejściowego (np. C-C),
- b) inhibitory mulisubstratowe - związki trójczłonowe, złożone z pochodnej zasady purynowej, acyklicznego łańcucha oraz grupy zawierającej fosforan (fosfometylowej lub fosfonianowej), które jednocześnie udają dwa substraty reakcji katalizowanej przez PNP - zasadę purynową i rybozo-1-fosforan (reakcja prowadzona w kierunku syntezy) lub nukleozyd purynowy i fosforan (dla reakcji prowadzonej w kierunku fosforolizy).

W latach 90-tych zsyntetyzowano i opisano właściwości Immucyliny H - bardzo silnego inhibitora fosforylaz ze źródeł ssaczych, z grupy inhibitorów stanu przejściowego. Został on zarejestrowany jako lek (pod nazwą forodezyna) i obecnie jest w fazie badań klinicznych [Al-Kali A., et al. 2010]. Poza stałą inhibicji (23 pM), zdaniem autorów, charakteryzował się bardzo silną kooperacją negatywną prowadzącą praktycznie do zablokowania trimerycznej cząsteczki PNP po związaniu jednej cząsteczki ImmH.

## Prezentacja osiągnięcia naukowego

W badaniach opisanych w pracach z lat 2004 – 2014 poszukując silnych inhibitorów PNP – potencjalnych leków, zajęłam się badaniem właściwości inhibitorów mulisubstratowych oraz, z wykorzystaniem tychże ligandów, weryfikacją zagadnienia występowania nieskończonej kooperacji negatywnej („third-of-the-sites binding”) w przypadku fosforylaz trimerycznych. Badania opierały się na stosowaniu przeze mnie, lub przez doktorantki, z moją pomocą, szeregu omawianych poniżej, metod biofizycznych w stosunku do złożonych obiektów biologicznych, jakimi są enzymy.

Pierwszą publikacją należącą do grupy prac charakteryzujących osiągnięcie badawcze, będącą jednocześnie punktem wyjścia do dalszych badań jest:

**A. Bzowska, G. Koellner, B. Wielgus-Kutrowska, A. Stroh, G. Raszewski, A. Holý, T. Steiner, J. Frank (2004) “Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase with two full trimers in the asymmetric unit: important implications for the mechanism of catalysis” J. Mol. Biol. 342, 1015-1032.**

W pracy przedstawiliśmy wyniki badań zjawiska ewentualnej komunikacji pomiędzy podjednostkami fosforylasy nukleozydów purynowych ze śledziona cielęcej, która mogłaby towarzyszyć wiązaniu analogów stanu podstawowego, czyli ligandów nieposiadających wymienionych wyżej cech stanu przejściowego. W tym celu przeprowadziliśmy badania dyfrakcyjne na kryształach białka oraz badania kalorymetryczne i spektroskopowe w roztworze.

Wiarygodny opis struktury przestrzennej PNP i wyznaczenie rozkładu wiązań wodorowych utworzonych w procesie oddziaływania z ligandami wymaga uzyskania kryształu, który będzie rozpraszał promieniowanie rentgenowskie z odpowiednią rozdzielczością, przynajmniej 2.5 Å. Niezbędnym etapem było wykonanie wstępnych doświadczeń krystalizacyjnych, by następnie dzięki właściwemu poruszaniu się po diagramie fazowym dla PNP otrzymać dobrze rozpraszające kryształy. Po ich uzyskaniu i przeprowadzeniu badań dyfrakcyjnych opisaliśmy strukturę przestrzenną kompleksu podwójnego: trimery fosforylasy z mulisubstratowym inhibitorem - fosfonianem 2,6-diamino-(S) -9 - [2 - (fosfonometoksy) propylo]puryny ((S) - PMPDAP) z rozdzielczością 2.3 Å oraz strukturę kompleksu potrójnego PNP z inhibitorem (S)-PMPDAP i fosforanem z rozdzielczością 2.05 Å. Po raz pierwszy otrzymaliśmy kryształ PNP ze śledziona cielęcej, w którym w podjednostce asymetrii znajdowały się dwa trimery białka. Do tej pory uzyskiwano kryształy z monomerem w jednostce asymetrii i w oparciu o operacje symetrii budowano całkowicie symetryczny oligomer (dla białka ludzkiego zaobserwowano wcześniej trimer w jednostce asymetrii, ale z niską rozdzielczością). Możliwość opisu struktury oligomerycznej cząsteczki enzymu pozwala na wykrycie ewentualnych różnic w przestrzennej budowie podjednostek. Takich różnic spodziewalibyśmy się ze względu na zjawisko „third-of-the-sites binding” opisane dla inhibitorów stanu przejściowego [Miles R.W., et al. 1998]. Nie zaobserwowaliśmy jednak wyraźnych różnic w trójwymiarowej strukturze monomerów w jednej cząsteczce białka. Z trimerym PNP wiązały się trzy cząsteczki inhibitora (3:3). Nie wykryto także znaczących różnic strukturalnych w białku pomiędzy kompleksami PNP z inhibitorem różniącymi się obecnością nieorganicznego fosforanu. Takie różnice mogłyby być przyczyną odmiennej stechiometrii wiązania hipoksantyny. Zgodnie z [Kline, P.C., Schramm, V.L., 1992] wynosi ona 1:3 w przypadku braku fosforanu i 3:3 w jego obecności. Zauważono jedynie, że wiązanie wodorowe pomiędzy arginina Arg84 a grupą fosfonianową inhibitora, jest widoczne tylko w trzech z

sześciu niezależnych monomerów w kompleksie PNP-inhibitor uzyskanym w obecności fosforanu nieorganicznego.

Równolegle przeprowadzone badania w roztworze przy użyciu techniki izotermicznego miareczkowania kalometrycznego (ITC, ang. *isothermal titration calorimetry*) i miareczkowania spektrofluorometrycznego były zgodne z danymi krystalograficznymi. Wyzaczyliśmy stechiometrię wiązania inhibitora (S)-PMPDAP przez PNP. Przeprowadziliśmy pomiary dla białka o różnej aktywności (aktywnego w pełni i w różnym stopniu zdezaktywowanego). Naniesienie poprawki związanej z dezaktywacją pokazało, że prawdziwa stechiometria w każdym przypadku to 3 cząsteczki inhibitora na trimer białka. Wiązanie ligandu jest dobrze opisane modelem jednego typu miejsca wiążącego („one-binding site model”).

Możemy więc stwierdzić, że:

- mulisubstratowy inhibitor, analog stanu podstawowego, (S)-PMPDAP, w przeciwieństwie do immucylin H i G – analogów stanu przejściowego, wiąże się z PNP do wszystkich miejsc aktywnych w trimerze,
- nie mamy dowodów na to, że, w przypadku wiązania (S)-PMPDAP istnieje komunikacja pomiędzy podjednostkami enzymu prowadząca do kooperacji negatywnej. Związanie jednej cząsteczki inhibitora nie powoduje zmiany konformacji białka utrudniającej wiązanie następnych cząsteczek inhibitora.

Kolejna praca:

**B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska (2006) „Probing the mechanism of purine nucleoside phosphorylase by steady-state kinetic studies and ligand binding characterization determined by fluorimetric titrations” *Biochim Biophys Acta*. 1764, 887-902,**

zawiera wyniki badań, które zostały przeprowadzone przeze mnie dla trimerycznego enzymu z mikroorganizmu *Cellulomonas*.

W badaniach przedstawionych w tej pracy wykorzystałam spektroskopowe metody pomiarów właściwości enzymów - absorpcyjne i emisyjne. W trakcie zachodzącej reakcji katalizowanej enzymatycznie rozerwaniu ulega wiązanie glikozydowe. Powstająca zasada purynowa ma inne widmo absorpcyjne (spowodowane zmianą rozkładu ładunku elektronowego na purynie po rozcięciu wiązania glikozydowego) niż wyjściowy nukleozyd. Wybierając długość fali tak, aby różnica współczynników ekstynkcji pomiędzy substratem i produktem reakcji była jak największa, można obserwować postęp fosforolizy wiązania glikozydowego w obecności enzymu, w funkcji stężenia ligandów (substratów i inhibitorów reakcji), by następnie określić wartość parametrów charakteryzujących reakcję enzymatyczną (stałe Michaelisa-Menten, stałe inhibicji, prędkości maksymalne reakcji).

Z kolei w pomiarach fluorescencyjnych wykorzystywałam właściwości emisyjne PNP, wynikające z obecności w jego strukturze aminokwasów aromatycznych. Oddziaływanie białko-ligand wzmacniało, bądź wygaszało naturalną fluorescencję enzymu. Wykonując miareczkowanie PNP ligandem, czyli obserwując zmiany fluorescencji w wybranej długości fali towarzyszące stopniowemu dodawaniu niewielkich porcji ligandu do roztworu białka, można było określić wartości stałych asocjacji, dysocjacji i stechiometrię wiązania białko-ligand.

Za pomocą powyższych metod spektroskopowych wykonałam charakterystykę odwracalnej reakcji fosforolizy przebiegającej dla typowych i nietypowych substratów, przedyskutowałam inhibicję produktami, mechanizm reakcji (w tym kluczowe znaczenie tworzenia wiązania wodorowego N<sup>1</sup>-H...Glu204 dla katalizy) oraz odstępstwa od prostego modelu Michaelisa-Menten.

Z punktu widzenia badania zagadnienia komunikacji pomiędzy podjednostkami prowadzącej do silnej negatywnej kooperacji istotne znaczenie miał fakt, że dla hipoksantyny (podobnie jak dla guaniny) wyniki miareczkowań fluorescencyjnych były wystarczająco dobrze opisane przez model jednego miejsca wiążącego. Wynika stąd, że trimer może posiadać albo jedno miejsce wiążące, albo trzy identyczne miejsca wiążące opisane przez jedną stałą dysocjacji. Na obecność trzech jednakowych miejsc wiążących wskazuje stechiometria wiązania ligandów, która wynosi 3 cząsteczki na trimer dla guaniny w i bez obecności fosforanu. Wartość uzyskana dla hipoksantyny w warunkach braku fosforanu to  $2.2 \pm 0.6$ , a więc niższa niż trzy, ale znacząco wyższa niż jedna cząsteczka ligandu na trimer białka (podjęliśmy próbę wytłumaczenia niższej stechiometrii dla Hx jako wynik pewnych cech jej stanu przejściowego w nieobecności fosforanu. Podobnie twierdził [Kline, 1992]).

Przedmiotem badań zawartych w pracy jest również hamowanie reakcji fosforolizy przez inhibitory mulisubstratowe: 2-amino-9-[3-hydroksy-2-(fosfonometoksy)propylo]-purynę ((S)-HPMP-6-Gua), 2-amino-9-[2-(fosfonometoksy)etylo]-6-sulfanylo-purynę (PME-6-thioGua) i 2,6-diamino-9-[2-(fosfonometoksy)etylo]-8-azapurynę (PME-8-aza-DAP). Wyznaczone dla PME-6-thioGua i PME-8-aza-DAP stałe inhibicji wynoszą odpowiednio 0.16  $\mu$ M i 0.28  $\mu$ M. Dla PME-6-thioGua wykonałam miareczkowania fluorescencyjne, które udowodniły, że z trimerelem PNP wiążą się 3 cząsteczki inhibitora. Nie obserwujemy w tym przypadku wyraźnej komunikacji pomiędzy podjednostkami PNP i silnej kooperacji negatywnej przy wiązaniu inhibitorów mulisubstratowych.

Wnioski:

- oddziaływanie podjednostek może być zaniedbywalne w przypadku inhibitorów stanu podstawowego, dla których stechiometria wynosi 3 cząsteczki inhibitora na trimer białka.
- Hx może mieć cechy stanu przejściowego w nieobecności fosforanu powodujące niższą stechiometrię wiązania dla tego ligandu.

Następnie w ramach współpracy z grupą profesora Antosiewicza rozszerzyłam badania komunikacji pomiędzy podjednostkami PNP o technikę zatrzymanego przepływu („stopped-flow”). Pomiary polegały na inicjalizacji reakcji wiązania inhibitora poprzez gwałtowne mieszanie roztworów znajdujących się w dwóch strzykawkach, z których jedna zawierała enzym, a druga ligand. Śledzenie procesu odbywało się dzięki obserwacji zmian fluorescencji powyżej 320 nm (wykorzystywałam filtry cut-off) wzbudzanej w 290 nm. Zmieniając wyjściowe stężenie ligandu lub białka w strzykawce zmieniałam warunki eksperymentu. Zarejestrowane w zakresie milisekund przebiegi reakcji wiązania inhibitora analizowałam, przy założeniu różnych modeli asocjacji białko-ligand, za pomocą metody analizy danych opracowanej przez Macieja Długosza, z wykorzystaniem procedury opartej na numerycznym całkowaniu równań kinetycznych odpowiednich dla danego modelu reakcji. Rozważałam modele, w których po związaniu ligandu następowała izomeryzacja konformacyjna białka (tzw. model dwuetapowy), lub taka izomeryzacja nie zachodziła (model jednoetapowy). Dodatkowo, w przypadku każdego modelu zakładałam istnienie lub brak komunikacji pomiędzy miejscami aktywnymi. Analizowałam dane przy założeniu, że w każdym momencie obserwowana

fluorescencja jest sumą wkładów pochodzących od pojawiających się w roztworze indywiduów: wolnego białka i ligandu oraz kompleksów jakie mogą ze sobą utworzyć.

Wynikiem pracy była publikacja:

**B. Wielgus-Kutrowska, J.M. Antosiewicz, M. Dlugosz, A. Holý, A. Bzowska (2007) „Towards the mechanism of trimeric purine nucleoside phosphorylases: stopped-flow studies of binding of multisubstrate analogue inhibitor - 2-amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]-6-sulfanylpurine” *Biophys Chem.* 125, 260-268**

prezentująca rezultaty badań wiązania inhibitora PME-6-thioGua (2-amino-9-[2-(fosfonometoksy)etylo]-6-sulfanylopuriny) przez trimeryczne PNP z *Cellulomonas sp.* Po przeanalizowaniu wykonanych pomiarów stwierdziłam, że, w przeciwieństwie do opisanych przez grupę profesora Schramma immucylin, inhibitory mulisubstratowe nie posiadające cech stanu przejściowego nie prowadzą do zmian konformacyjnych białka.

- Stwierdziłam, że wiązanie inhibitora dobrze opisuje proces jednoetapowy.
- Nie zaobserwowałam kooperacji negatywnej w wiązaniu inhibitora, podejrzewałam wręcz istnienie kooperacji pozytywnej, jednak był to ostrożny wniosek, i, moim zdaniem, ostateczna konkluzja wymagała dodatkowego potwierdzenia.
- Potwierdziłam, że w enzymie z bakterii *Cellulomonas* oddziaływanie N<sup>1</sup>-H...Glu204 jest kluczowe dla katalizy.

Najodpowiedniejszym do naszych badań przedstawicielem fosforylaz trimerycznych był enzym pochodzący ze śledziona cielęcej. Wykazuje on bardzo wysokie podobieństwo do PNP z erytrocytów ludzkich (w 88% identyczna sekwencja, zgodna budowa trzecio- i czwartorzędowa, całkowicie zakonserwowane miejsce aktywne i ten sam mechanizm reakcji). Fosforylaza cielęca może być obiektem „zastępczym” dla nietrwałego i niehomogenicznego enzymu ludzkiego oraz dla egzotycznego, z mikroorganizmu *Cellulomonas*. Jednak, w trakcie naszej pracy, dostępne handlowo PNP zostało wycofane ze sprzedaży. Ponieważ zdawałam sobie sprawę, że prowadzone badania biofizyczne wymagają dużych ilości materiału oraz wykonywania doświadczeń z odpowiednio zmodyfikowanymi mutantami, a w trakcie pobytu na stażu w laboratorium prof. Patrycji Clark nauczyłam się otrzymywać wybrane białka i ich mutanty, postanowiłam uzyskać rekombinowane PNP ze śledziona cielęcej w Polsce. W związku z tym kupiliśmy bibliotekę cDNA i nawiązałyśmy współpracę z Wydziałem Biologii UW. We współpracy z laboratorium profesora Staronia sklonowałyśmy białko, opracowałyśmy dwuetapową metodę nadekspresji i oczyszczania z dużą wydajnością (35 mg białka z 1 l hodowli bakteryjnej, oczyszczanie do 92% czystości) oraz zbadaliśmy podstawowe właściwości uzyskanego PNP. Wszystkie dane zamieściliśmy w pracy:

**K. Breer, A. Girstun, B. Wielgus-Kutrowska, K. Staroń, A. Bzowska (2008) „Overexpression, purification and characterization of functional calf purine nucleoside phosphorylase (PNP)” *Protein Expr Purif.* 61, 122-130.**

Otrzymane PNP miało takie same cechy jak fosforylaza ze śledziona cielęcej, dostępna do tej pory handlowo: identyczną sekwencję, takie same właściwości kinetyczne w stosunku do substratów (Ino, Guo, m<sup>7</sup>Guo), wzmacniało fluorescencje guaniny, a jego wiązanie dobrze opisywał model miejsc

nieoddziałujących. W takiej sytuacji białko cielęce uzyskiwane metoda nadekspresji w bakteriach *E. coli*, ze względu na wysoką wydajność hodowli i oczyszczania było dobrym obiektem do wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania podjednostek w przypadku wiązania inhibitorów stanu przejściowego i podstawowego. Umożliwiło to wykorzystanie technik, które wymagały dużych ilości materiału, jak kalorymetria. Dlatego enzym ekspresyjowany w bakteriach stał się podstawą dalszego postępowania mającego na celu zbadanie zjawiska „third-of-the-sites binding/reactivity” i poszukiwań silnych inhibitorów mulisubstratowych.

Ponieważ sprawdziliśmy, że PNP rekombinowane krystalizuje w warunkach takich samych jak białko izolowane ze śledziona cielęcej, uzyskaliśmy kryształy, które stały się podstawą wyznaczenia struktury przestrzennej metodą dyfrakcyjną. Wyniki zawarliśmy w następniej, opublikowanej pracy:

**G. Chojnowski, K. Breer, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, H. Czapinska, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, M. Bochtler, A. Girstun, K. Staroń, A. Bzowska (2010) „1.45 Å resolution crystal structure of recombinant PNP in complex with a pM multisubstrate analogue inhibitor bearing one feature of the postulated transition state” Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 703-708.**

Strukturę krystalograficzną enzymu, dla którego, podobnie jak w pracy z 2004 roku w jednostce asymetrii znajdował się trimer, uzyskano, z najwyższą do tej pory uzyskaną rozdzielczością 1.45 Å. Pozwoliło to na precyzyjny opis struktury białka i rozkładu wiązań wodorowych w miejscu aktywnym. Wyznaczenie tej struktury było tematem pracy doktorskiej jednego ze współautorów, ja uczestniczyłam w badaniach spektroskopowych inhibitora – difluoro-5'-fosfonopentylo)-9-deazaguaniny (DFPP-DG). W pracy przedstawiliśmy charakterystykę kompleksu PNP z DFPP-DG. Jest to silnie wiążący się inhibitor (stała dysocjacji  $K_d = 190 \pm 90$  pM), który, podobnie jak immucylina H posiada proponowaną pozycję N<sup>7</sup>, a więc jedną z cech stanu przejściowego, a jednocześnie wiąże się w miejscu wiązania zasady purynowej i rybozy – jest więc inhibitorem mulisubstratowym. Jednak, podobnie jak poprzednio w strukturze kryształu zaobserwowaliśmy wiązanie trzech cząsteczek DFPP-DG przez trimeryczną cząsteczkę enzymu. Miareczkowania fluorymetryczne były zgodne z danymi krystalograficznymi i pokazały, że zjawisko „third-of-the-sites binding” nie występuje w przypadku tego ligandu. Ze względu na te wyniki i wcześniejsze prace, dla których nie udało się nam uzyskać wiązania jednej cząsteczki inhibitora na trimer białka, sugerowaliśmy, że, jeśli ImmH wiąże się w stosunku ligand : PNP jak 1 : 3, to jest to związane z drugą cechą stanu przejściowego – powstawaniem jonu ryboosokarboniowego, lub ze współlistnieniem obydwu cech stanu przejściowego.

Ponieważ DFPP-DG okazał się bardzo silnym inhibitorem, w pracy:

**K. Breer, L. Glavas-Obrovac, M. Suver, S. Hikishima, M. Hashimoto, T. Yokomatsu, B. Wielgus-Kutrowska, L. Magnowska, A. Bzowska (2010) „9-Deazaguanine derivatives connected by a linker to difluoromethylene phosphonic acid are slow-binding picomolar inhibitors of trimeric purine nucleoside phosphorylase” FEBS J. 277, 1747-1760,**

poszerzyliśmy badania mechanizmu jego wiązania przez PNP ze śledziona cielęcej. Pomiarzy prowadziliśmy metodami spektroskopowymi (absorpcyjnymi i fluorymetrycznymi). Stała inhibicji w obecności 1 mM fosforanu ( $85 \pm 13$  pM) była tego samego rzędu co dla immucyliny H (23 pM).

Metodą zatrzymanego przepływu pokazaliśmy, że wiązanie inhibitora najlepiej opisuje model dwuetapowy:



Zgodnie z tym modelem w pierwszym etapie następuje utworzenie kompleksu enzym-inhibitor (EI), który, dzięki zmianom konformacyjnym prowadzi do powstania silnego wiązania enzym-inhibitor (EI)\*. Sprawdziliśmy jak obecność DFPP-DG w pożywce wpływa na zahamowanie wzrostu linii komórkowych wrażliwych na hamowanie aktywności PNP, takich jak ludzkie komórki białaczki i chłoniaka (Jurkat i HuT78 CCRF-CEM). Inhibitor wykazuje słaby, lecz istotny statystycznie wpływ na zahamowanie wzrostu tych linii komórkowych. Obserwowana słaba cytotoksyczność może być wynikiem złej przepuszczalności naładowanego inhibitora przez błony komórkowe.

W dalszych badaniach oddziaływania PNP z inhibitorami mulisubstratowymi, zmierzaliśmy metodą miareczkowania kalorymetrycznego wiązanie DFPP-DG przez enzym nadekspymowany w bakteriach. Polegała ona na stopniowym wprowadzaniu niewielkich ilości roztworu ligandu do celki z PNP, w stałych odstępach czasowych, aż do zajęcia wszystkich miejsc wiążących enzymu przez inhibitor. Zastosowano metodę kompensacji mocy - sygnałem pomiarowym była wartość mocy potrzebna do utrzymania celki w stałej temperaturze w trakcie zachodzącej reakcji endo- lub egzotermicznej, takiej samej jak temperatura celki referencyjnej. Wynikiem pomiaru była zmiana entalpii spowodowana wiązaniem ligandu.

Miareczkowanie kalorymetryczne początkowo dawało sygnał endotermiczny, by następnie przejść w egzotermiczny. Takiego zjawiska nie obserwowaliśmy w przypadku PNP izolowanego ze śledziony cielęcej dostępnego handlowo, gdzie był obecny tylko sygnał endotermiczny. W celu wyjaśnienia nietypowego zjawiska przeprowadziliśmy szersze badania, a uzyskane wyniki, ich analizę i interpretację umieściliśmy w pracy:

**K. Breer, B. Wielgus-Kutrowska, A. Girstun, K. Staroń, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, A. Bzowska (2010) „Overexpressed proteins may act as mops removing their ligands from the host cells: a case study of calf PNP” Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 1203-1209.**

Analiza miareczkowań kalorymetrycznych PNP rekombinowanego za pomocą wybranych inhibitorów opisanych w pracy, wskazywała na dwa typy miejsc wiążących. Mogliśmy mieć do czynienia albo z negatywną kooperacją, albo z dwiema, różnymi formami enzymu. Zakładając istnienie dwóch form białka (słabiej i silniej wiążącej) podjęliśmy udaną próbę ich rozseparowania metodą chromatografii powinowactwa, ale także, co ciekawe, za pomocą dializy. Do interpretacji dodatkowych pomiarów kalorymetrycznych wykonanych na silniej wiążącej formie PNP wystarczył model z jednym miejscem wiążącym.

Następnie przeprowadziliśmy pomiary widm absorpcyjnych, które potwierdziły hipotezę, że część cząsteczek rekombinowanej fosforylazy utworzyła kompleks z produktem fosforolizy – hipoksantyną. Wolny enzym był silniej wiążącą formą białka, a kompleks enzym-Hx - słabiej wiążącą. Silny inhibitor wiązał się z wolnym miejscem, z jedną stałą wiązania, a z drugiego wypychał związaną hipoksantynę z pozorną inną stałą wiązania. Ponieważ wiązaniu Hx towarzyszyła duża ujemna zmiana entalpii, dlatego wypchnięcie jej przez ligand charakteryzujący się mniejszą zmianą entalpii wiązania przez

PNP skutkowało pojawieniem się dodatniego sygnału. Hipoksantyna nie pojawiała się jednak na żadnym etapie oczyszczania białka, występowała jedynie naturalnie w komórkach bakterii *E. coli*, w których PNP było eksprymowane. Wygląda więc na to, że fosforylaza wiązała obecną w komórkach bakterii hipoksantynę, która była dalej obecna na wszystkich etapach oczyszczania enzymu, wpływając na wyniki pomiarów jego wiązania z ligandami.

Pokazaliśmy, że w prowadzonych badaniach musimy brać pod uwagę, iż obecne w komórkach gospodarza związki mogą wiązać się z enzymem. Jest to wniosek ogólny ponieważ podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku innych białek z dużą wydajnością nadekspresji, które uzyskuje się w komórkach innych niż te, z których pierwotnie pochodziło białko.

To odkrycie, w świetle naszych wcześniejszych badań, zasugerowało nam, że być może opisywane w przypadku inhibitorów stanu przejściowego zjawisko „third-of-the-sites binding” nie występuje. Dlatego przeprowadziliśmy obszerne badania wiązania przez PNP immucyliny H, a następnie inhibitorów mulisubstratowych charakteryzujących się: (1) brakiem, (2), jedną lub (3) dwiema cechami stanu przejściowego. Wyniki badań zawarte zostały w pracy:

**B. Wielgus-Kutrowska, K. Breer, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, M. Narczyk, A. Dyzma, A. Girstun, K. Staroń, A. Bzowska (2012) „Trimeric purine nucleoside phosphorylase: exploring postulated one-third-of-the-sites binding in the transition state” Bioorg. Med. Chem. 20, 6758-6769.**

Badania opisane w publikacji prowadziliśmy za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkującej, miareczkowań fluorescencyjnych i inżynierii genetycznej. Ponieważ odpowiedź fluorescencyjna PNP na wiązanie immucyliny H jest nieznaczna, skonstruowaliśmy nowe mutanty o właściwościach kinetycznych zbliżonych do PNP typu dzikiego, ale o intensywniejszej odpowiedzi fluorescencyjnej na wiązanie ligandów (Phe159Trp-PNP i Phe200Trp-PNP). Zbadaliśmy właściwości kinetyczne inhibitorów nie posiadających (DFPP-G, DFTHPEP-H, (S)-PMP-DAP), lub posiadających jedną (Hx, Gua, 9-deaza-Gua), lub dwie (aza-DFPP-DG) cechy stanu przejściowego. Pomiarów wykonaliśmy w warunkach, w których przeprowadzono badania donoszące o istnieniu zjawiska „third-of-the-sites binding”. Dużą uwagę przywiązywaliśmy do właściwego oddializowania hipoksantyny.

W pomiarach kalorymetrycznych nie zaobserwowaliśmy negatywnej kooperacji. Wiązanie immucyliny H jest zgodne z modelem wiązania trzech cząsteczek ligandu przez trimer enzymu. Podobne wyniki uzyskaliśmy za pomocą fluorymetrycznego miareczkowania białka przez immucylinę H. Taka sama sytuacja pojawiła się w przypadku miareczkowania innymi inhibitorami posiadającymi cechy stanu przejściowego. Jednocześnie, w przypadku wykorzystania rekombinowanego enzymu nie w pełni oczyszczonego od hipoksantyny pochodzącej z komórek gospodarza, bakterii *E. coli*, wyniki pomiarów sugerowały kooperację między podjednostkami enzymu i pozornie niższą stechiometrię. Rezultaty badań obalają hipotezę całkowitej inhibicji trimeru PNP przez jedną cząsteczkę silnego inhibitora. Zaproponowałam prawdopodobne wyjaśnienie przyczyn, dla których wcześniejsze doświadczenia były błędnie interpretowane.

Wiązanie ImmH H generuje więcej ciepła niż wiązanie Hx, dlatego zastąpienie Hx przez immucylinę H daje wkład egzotermiczny. W doświadczeniach widzimy zmianę kształtu krzywej miareczkowania,



co prowadzi do niewłaściwych wniosków dotyczących opisanego wiązania modelem dwóch miejsc wiążących.

W warunkach wiązania słabego inhibitora przez PNP z częścią miejsc wiążących zajętych przez Hx wydaje się, że model jednego miejsca wiążącego dobrze opisuje eksperyment. Jednak stechiometria jest niższa niż 1, co wynika z tego, że słaby inhibitor nie wypycha z miejsca wiążącego hipoksantyny. Stąd może, odnotowana we wcześniejszych pracach (patrz: *B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska (2006) Biochim Biophys Acta., 1764:887-902*), niższa stechiometria wiązania Hx przez enzym z częścią miejsc zajętych przez ten ligand.

Sprawdziliśmy, że w niektórych próbkach, dostępnych do niedawna handlowo była lekko podniesiona absorpcja w 250 nm, co może świadczyć o tym, że one również zawierały hipoksantynę.

Następnie potwierdziliśmy wyniki ITC za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej dla różnych ligandów (DFPP-G, DFPP-DG, aza-DFPP-DG, ImmH, Gua, 9-deazaGua, Hx), białka typu dzikiego i mutantów: Phe200Trp-PNP i Phe159Trp-PNP. Analiza danych fluorescencyjnych potwierdziła, że we wszystkich przypadkach model z jednym miejscem wiążącym i stechiometria wiązania jednego ligandu na podjednostkę enzymu wystarcza do opisu wyników miareczkowania.

Ponieważ zgodnie z literaturą wiązanie jednej cząsteczki immucyliny H praktycznie uniemożliwia wiązanie ligandów do pozostałych miejsc wiążących w trimerze PNP postanowiliśmy to również sprawdzić. Przygotowaliśmy kompleks 1 cząsteczka ImmH na trimer PNP a następnie miareczkowaliśmy taki układ guaniną. Okazało się, że wiązanie jednej cząsteczki immucyliny H nie blokuje wiązania innych ligandów przez pozostałe miejsca wiążące trimerycznego PNP.

W związku z powyższymi wynikami podaliśmy ostateczne wnioski dotyczące weryfikacji występowania zjawiska „third-of-the-sites binding” dla trimerycznego PNP.

- Nie zauważyliśmy zjawiska „third-of-the-sites binding” dla różnych ligandów, w tym mających dwie cechy stanu przejściowego. Błędne doniesienia o istnieniu tego zjawiska mogą być spowodowane obecnością hipoksantyny blokującej część miejsc wiążących (pochodzącej z organizmu w którym białko było eksprymowane, lub obecna ze względu na metodę oczyszczania).
- Możemy stwierdzić, że w przypadku PNP trimerycznego (z *Cellulomonas sp.*, ze śledziona cielej i prawdopodobnie z erytrocytów ludzkich) monomery białka prowadzą reakcje enzymatyczną niezależnie.

Jeśli tak, to pojawia się pytanie dlaczego PNP aktywne biologicznie jest trimerem, skoro nie istnieje komunikacja pomiędzy podjednostkami i każdy z monomerów pracuje „samodzielnie”? Chcąc odpowiedzieć na tak postawione pytanie postanowiłam wykonać badania, których wyniki są zawarte w następującej publikacji:

**B. Wielgus-Kutrowska, A. Modrak-Wójcik, A. Dyzma, K. Breer, M. Zolkiewski, A. Bzowska (2014) „Purine nucleoside phosphorylase activity decline is related to the decay of the enzyme in the trimeric form” Arch. Biochem. Biophys 549, 40–48 (DOI 10.1016/j.abb.2014.03.009).**

Badania prowadziliśmy różnymi technikami biofizycznymi, w tym metodą ultrawirowania analitycznego, spektroskopii dichroizmu kołowego i różnicowej kalorymetrii skaningowej.

Metoda ultrawiwiania analitycznego polega na analizie ruchu biomolekuł w polu siły odśrodkowej z przyspieszeniem przewyższającym przyspieszenie ziemskie do 290 000 razy. Charakterystyczną wielkością opisującą ruch biomolekuły w cieczy, w polu siły odśrodkowej, jest współczynnik sedymentacji, który wiąże się ściśle z masą i kształtem cząsteczki, temperaturą, współczynnikiem dyfuzji i właściwościami cieczy, takimi jak lepkość i gęstość. Umożliwia on określenie w jakiej formie (monomer, trimer, lub większe kompleksy) występują w roztworze badane cząsteczki.

Spektroskopia dichroizmu kołowego, ze względu na chiralność cząsteczek biologicznych związaną z zawartością struktur  $\alpha$ -helikalnych i  $\beta$ -karkowych umożliwia określenie zawartości procentowej charakterystycznych elementów struktury drugorzędowej białka.

Z kolei różnicowa kalorymetria skaningowa opisuje zmiany fazowe w biopolimerach inicjowane dostarczeniem ciepła i jest przydatna w badaniach stabilności białek.

Pokazaliśmy, że, w przypadku białka typu dzikiego i dwóch mutantów, wraz z utratą aktywności enzymatycznej, związanej ze starzeniem się białka, ubywa formy trimerycznej PNP oraz przybywa wielkocząsteczkowych agregatów. Nie udało się nam zaobserwować pojawiania się formy monomerycznej - białko nie dysocjowało na stabilne, aktywne lub nieaktywne monomery. Wraz ze spadkiem aktywności zauważyliśmy także zanik struktur helikalnych enzymu, co może czynić go podatnym na agregację. Pokazaliśmy, że obecność fosforanu stabilizuje PNP, ale prowadzi do intensywnej agregacji powyżej temperatury topnienia ( $T_m$ ).

Wyniki badań potwierdziły znaczenie oligomeryzacji trimerycznej fosforylasy nukleozydów purynowych. Jej rolą jest stabilizacja struktury białka, a dzięki temu umożliwienie pełnienia funkcji biologicznej. Monomery nie są stabilne i samodzielnie nie występują w roztworach wodnych.

## Podsumowanie

W ramach pracy, która doprowadziła do zrewidowania występowania zjawiska kooperacji negatywnej dla PNP trimerycznego z wykorzystaniem inhibitorów mulisubstratowych, które mogą być podstawą projektowania leków, skutecznych tam, gdzie pożądane jest obniżenie aktywności PNP razem ze współpracownikami:

- Opracowałam sposób uzyskiwania PNP ze śledziona cielej i jego mutantów metodą nadekspresji w bakteriach *E. coli*. Obecnie możemy uzyskiwać białko w ilościach wystarczających do przeprowadzenia eksperymentów biofizycznych różnego typu, co nabrało znaczenia po wycofaniu ze sprzedaży białka ekstrahowanego bezpośrednio ze śledziona cielej.
- Zbadałam właściwości mutantów PNP: Phe159Trp-PNP i Phe200Trp-PNP o zwiększonej odpowiedzi fluorescencyjnej na wiązanie ligandów.
- Scharakteryzowałam bardzo silny inhibitor PNP trimerycznego o stałej inhibicji porównywalnej ze stałą uzyskaną dla immucyliny H, która została zarejestrowana jako lek. DFPP-DG, niestety, nie przenika przez błony komórkowe, stanowi natomiast obiekt wyjściowy do dalszych poszukiwań skutecznych leków - inhibitorów PNP.
- Zrewidowałam obecną w literaturze hipotezę bardzo silnej negatywnej kooperacji pomiędzy podjednostkami PNP. Zjawisko to nie występuje. Podobnie jak inne ligandy, hipoksantyna i

inhibitory stanu przejściowego, dla których je sugerowano, nie blokują wiązania cząsteczek do niezajętych miejsc aktywnych enzymu.

- Wyjaśniłam, co mogło być przyczyną błędnego postulowania występowania zjawiska „third-of-the-sites binding”. Powszechnie stosowana metoda nadekspresji białek w komórkach bakterii *E. coli* może prowadzić do uzyskania materiału, który zawiera ligandy wyłapane z komórek gospodarza. W naszym przypadku takim ligandem była hipoksantyna. Związany z enzymem ligand pojawia się również w trakcie oczyszczania metodą chromatografii powinowactwa. Jeśli badacz będzie nieświadomy obecności związanych z białkiem ligandów może uzyskać niewłaściwie wnioski z prowadzonych badań. Istotne jest zwrócenie uwagi na taką przyczynę potencjalnych błędów w przypadku nadekspresji i sposobów oczyszczania innych białek.
- Rozwijając nową metodę badawczą, ultrawirowania analitycznego, stwierdziłam, że enzymy należące do grupy fosforylaz nukleozydów purynowych o niskiej masie cząsteczkowej są białkami aktywnymi biologicznie tylko jako cząsteczki trimetryczne, a rolą oligomeryzacji jest stabilizacja natywnej formy białka.

## Literatura

1. A. Al-Kali, V. Gandhi, M. Ayoubi, M. Keating, F. Ravandi (2010) „Forodesine: review of preclinical and clinical data” *Future Oncol.* 6, 1211-1217.
2. K. Hashimoto, H. Nishi, S. Bryant, A.R. Panchenko (2011) „Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization” *Phys. Biol.* 8, 035007.
3. O.P. Malhotra, L.R. Singh, Srinivasan (1987) „Half site reactivity is not a case of negative cooperativity” *Indian J. Biochem. Biophys.* 24, 71-74.
4. R.L. Saxl, L.M. Changchien, L.W. Hardy, F. Maley (2001) „Parameters affecting the restoration of activity to inactive mutants of thymidylate synthase via subunit exchange: further evidence that thymidylate synthase is a half-of-the-sites activity enzyme” *Biochemistry* 40, 5275-5282.
5. C. Pozzi, S. Ferrari, D. Cortesi, R. Luciani, R.M. Stroud, A. Catalano, M.P. Costi, S. Mangani (2012) „The structure of *Enterococcus faecalis* thymidylate synthase provides clues about folate bacterial metabolism” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68, 1232-1241.
6. E. Papaleo, G. Renzetti, G. Invernizzi, B. Asgeirsson (2013) „Dynamics fingerprint and inherent asymmetric flexibility of a cold-adapted homodimeric enzyme. A case study of the *Vibrio* alkaline phosphatase” *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2970-2980.
7. G. Cathala, C. Brunel (1975) „Bovine kidney alkaline phosphatase. Catalytic properties, subunit interactions in the catalytic process, and mechanism of Mg<sup>2+</sup> stimulation” *J. Biol. Chem.* 250, 6046-6053.
8. N.K. Nagradova (2001) „Study of the properties of phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” *Biochemistry (Mosc.)* 66, 1067-1076.
9. S.Y. Song, Y.B. Xu, Z.J. Lin, C.L. Tsou (1999) „Structure of active site carboxymethylated D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor*” *J. Mol. Biol.* 287, 719-725.
10. C.S. Herndon, I.L. Norton, F.C. Hartman (1982) „Reexamination of the binding site for pyridoxal 5'-phosphate in ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*” *Biochemistry* 21, 1380-1385.
11. Schörken, J. Jia, H. Sahn, G.A. Sprenger, G. Schneider (1998) „Disruption of *Escherichia coli* transaldolase into catalytically active monomers: evidence against half-of-the-sites mechanism” *FEBS Lett.* 441, 247-250.
12. E. Fiedler, S. Thorell, T. Sandalova, R. Golbik, S. König, G. Schneider (2002) „Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis: crystal structure of the alpha-carbanion of (alpha,beta-dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 591-595.
13. P.C. Kline, V.L. Schramm (1992) „Purine nucleoside phosphorylase. Inosine hydrolysis, tight binding of the hypoxanthine intermediate, and third-of-the-sites reactivity” *Biochemistry* 31, 5964-5973.
14. R.W. Miles, P.C. Tyler, R.H. Furneaux, C.K. Bagdassarian, V.L. Schramm (1998) „One-third-the-sites transition-state inhibitors for purine nucleoside phosphorylase” *Biochemistry* 37, 8615-8621.
15. F. Wang, R.W. Miles, G. Kicska, E. Nieves, V.L. Schramm, R.H. Angeletti (2000) „Immucillin-H binding to purine nucleoside phosphorylase reduces dynamic solvent exchange” *Protein Sci.* 9, 1660-1668.
16. E.R. Giblett, A.J. Ammann, D.W. Wara, R. Sandman, L.K. Diamond (1975) „Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity” *Lancet* 1, 1010-1013.

## 6. Pozostała działalność naukowa

### 6.1. Wstęp

W 1987 roku, po ukończeniu szkoły średniej (XIV L.O. im. K. Gottwalda, obecnie S. Staszica, w Warszawie) rozpoczęłam studia na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego. Ukończyłam je po 3 latach studiów ogólnych i 2,5 roku wybranych przeze mnie studiów specjalistycznych w dziedzinie Biofizyki. Pracę magisterską pt.: „*Badanie oddziaływania fosforylasy nukleozydów purynowych z rybozydem nikotynamidu. Badania metodami spektroskopowymi*” napisałam pod kierunkiem dr hab. Ewy Kulikowskiej. Zawarłam w niej wyniki badań kinetyki reakcji fosforolizy nietypowego substratu, rybozydu nikotynamidu, katalizowanej przez fosforylase nukleozydów purynowych (PNP) ze śledzonymi cielőcej i bakterii *E. coli*, prowadzonych metodami spektroskopii absorpcyjnej w zakresie UV.

W 1993 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Fizyki UW pod kierunkiem prof. Davida Shugara. Do badań nad PNP ze śledzonymi cielőcej i bakterii *E. coli* dołączyłam nową fosforylase z bakterii *Cellulomonas*. Poza spektroskopię absorpcyjną w zakresie UV rozpoczęłam badania metodami stacjonarnej spektroskopii fluorescencyjnej i nauczyłam się uzyskiwać kryształy biomolekuł odpowiednie do badań dyfrakcyjnych. Badania oddziaływania z ligandami oraz właściwości fizykochemicznych fosforylaz prowadziłam w Zakładzie Biofizyki, natomiast w Instytucie Krystalografii Wolnego Uniwersytetu Berlińskiego w ramach współpracy z grupą prof. Saengera (w szczególności z dr Getraud Koellner i mgr Janem Tebbe) uczestniczyłam w projekcie, w wyniku którego otrzymaliśmy kryształy białka i przeprowadziliśmy badania dyfrakcyjne. Rezultatem kilkuletniej pracy było uzyskanie struktury przestrzennej nowej fosforylasy, zaproponowanie mechanizmu reakcji katalizowanej przez PNP z *Cellulomonas*, który tłumaczy również zachowanie fosforylaz ze źródeł ssaczych oraz charakterystyka oddziaływania fosforylaz z różnymi źródeł z pochodnymi 8-azapuryn. Wyniki moich badań zostały umieszczone w pracy doktorskiej pt. „*Fosforylasy nukleozydów purynowych – właściwości fizykochemiczne oraz mechanizm oddziaływania z ligandami*”.

Po uzyskaniu tytułu doktora (w roku 1999) zostałam, w 2000 roku, zatrudniona na czas określony na stanowisku adiunkta, w 2003 roku odbyłam 11 miesięczny staż w laboratorium prof. Patrycji Clark, na Wydziale Chemii i Biochemii Uniwersytetu Notre Dame w USA, a następnie w 2004 roku zostałam mianowana na stanowisko adiunkta w Zakładzie Biofizyki. Obecnie pracuję w grupie prof. Agnieszki Bzowskiej. W latach 2007 – 2012 odbyłam krótkoterminowe staże w grupie dr hab. Andrzeja Sienkiewicza na Wydziale Fizyki Ecole Polytechnique Federale de Lausanne w Szwajcarii (pobyt dwukrotny w latach 2007 i 2010) i w grupie prof. Michała Żółkiewskiego na Wydziale Biochemii i Biofizyki Kansas State University w USA (w roku 2012).

Tematyka moich zainteresowań naukowych obejmuje badania mechanizmów oddziaływania białko-ligand, badania mechanizmów przyjmowania przez białka prawidłowej, aktywnej biologicznie struktury przestrzennej i jej opis, oraz przyczyny agregacji białek.

Jest to praca interdyscyplinarna, w której stosuję nowoczesne metody biofizyki molekularnej, biologii molekularnej i biochemii. W związku z tym, w badaniach naukowych korzystam z technik, takich jak: stacjonarne pomiary absorpcyjne i fluorescencyjne w zakresie UV-VIS, pomiary spektroskopowe

metodą zatrzymanego przepływu, umożliwiające śledzenie zjawisk zachodzących w układach biologicznych w czasie milisekund, dwa rodzaje kalorymetrii: izotermiczna kalorymetria miareczkująca i różnicowa kalorymetria skaningowa, spektroskopia dichroizmu kołowego, elektronowy rezonans paramagnetyczny i ultrawierowanie analityczne. Nauczyłam się uzyskiwać sklonowane białka i dokonywać ich nadekspresji w bakteriach oraz wykonywać mutacje na potrzeby prowadzonych badań.

Do 2006 roku nasza grupa badawcza dysponowała jednym laboratorium. Nie mieliśmy możliwości oczyszczania białek do stopnia zadowalającego w przypadku badań spektroskopowych (aby uzyskać takie białka korzystaliśmy początkowo z laboratorium prof. Saengera w Berlinie, a następnie prof. Darżynkiewicza w Zakładzie Biofizyki UW). Zdając sobie sprawę, że do prowadzenia dalszych badań niezbędna jest rozbudowa warsztatu badawczego, po powrocie do pracy z urlopu macierzyńskiego i odbyciu stażu w laboratorium prof. Patrycji Clark zaczęłam, wspólnie z prof. Agnieszką Bzowską, budować od podstaw laboratorium (począwszy od ich projektowania, poprzez aplikacje o fundusze, tzw. „granty budowlane” i organizowanie przetargów budowlanych, kończąc na odbiorze pomieszczeń): spektroskopowe (2006 rok), w zaadaptowanej piwnicy budynku, następnie dwa laboratoria biotechnologiczne umożliwiające pozyskiwanie białek rekombinowanych (2008 rok) oraz laboratorium kalorymetryczne i ultrawierowania analitycznego (2010 rok), w których możemy korzystać z nowoczesnych technik pomiarowych takich jak kalorymetria i ultrawierowanie analityczne. Zadałam o wyposażenie laboratoriów w odpowiednią, specjalistyczną aparaturę badawczą (od rozeznania rynku, poprzez aplikacje o fundusze, do zaangażowania się, jako osoba odpowiedzialna merytorycznie, w organizację przetargów na mikrokalorymetr ITC, wirówkę, stację FPLC do oczyszczania białek, komorę laminarną, autoklaw oraz drobniejszy sprzęt). Na szczególną uwagę zasługuje zakup ultrawirówki analitycznej w ramach projektu Krajowe Laboratorium Multidyscyplinarne Nanomateriałów Funkcjonalnych - NanoFun, finansowanego z funduszy europejskich, którego koordynatorami są dr Anna Niedźwiecka i dr Jerzy Trzeciński. Gdy aplikowaliśmy o fundusze nie było w Polsce żadnej tego typu wirówki. Obecnie znajdują się one w trzech ośrodkach badawczych, ale tylko nasza posiada poza detekcją absorpcyjną i interferencyjną również możliwość detekcji fluorescencyjnej. Uczestniczyłam w szkoleniach, dotyczących obsługi zakupionych urządzeń, organizowanych zarówno w Zakładzie Biofizyki, jak i za granicą (np. kurs wirowania analitycznego i analizy danych w National Institute of Health, Bethesda, USA). Jednocześnie dbałam o rozbudowę naszej grupy badawczej – prowadziłam prace magisterskie (4) i licencjackie (4), a trzy z moich czterech magistrantek nadal pracują z nami jako doktorantki. Częściowo opiekowałam się jedną z doktorantek, w przypadku drugiej kieruję projektem, w ramach którego wykonuje ona pracę doktorską.

Jako wieloletni nauczyciel akademicki łączę badania naukowe z pracą dydaktyczną prowadząc zajęcia na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego dla studentów kierunku Fizyka oraz Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie. Coroczne prowadzenie i aktualizowanie autorskiego wykładu „Metody Biofizyki Molekularnej” pozwala mi na utrzymanie ciągłego kontaktu z najnowszymi osiągnięciami dziedziny, w której pragnę pozostać specjalistą. Aktywnie uczestniczę w popularyzacji nauki, prowadząc wykłady w szkołach, czy w ramach Letniej Szkoły Fizyki, pisząc artykuły do czasopisma popularnonaukowego „Wiedza i Życie”, uczestnicząc bądź koordynując zajęcia w ramach Festiwalu Nauki na Wydziale Fizyki. Jako przedstawiciel z grupy niesamodzielných pracowników naukowych

byłam członkiem Rady Naukowej Wydziału. Nawiązałam wiele kontaktów naukowych z innymi wydziałami i instytucjami w Polsce i za granicą. Byłam kierownikiem jednego i głównym wykonawcą wielu projektów badawczych. Jestem współautorką 36 prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Moja łączna liczba cytowań to 292, a mój indeks Hirscha wynosi 9. Wyniki naszych prac były prezentowane przeze mnie lub doktorantów na wielu konferencjach międzynarodowych.

## 6.2. Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Inne prace, nie zaklasyfikowane jako osiągnięcie, opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora mogą podzielić na następujące części:

### I. *Badania fałdowania i agregacji mutantów Zielono Fluoryzującego Białka (GFP)*

Po powrocie ze stażu w 2003 roku rozpoczęłam badania nad przyjmowaniem przez białka struktury aktywnej biologicznej i konkurencyjnym procesem – agregacją. Obiektem prowadzonych badań są mutanty zielono fluoryzującego białka (GFP, *Green Fluorescent Protein*), pochodzącego z meduzy północnopacyficznej, *A. victoria*. Unikalną cechą tej biomolekuły jest możliwość emisji fluorescencji w zakresie widzialnym. Jej źródłem jest unikalny chromofor budowany spontanicznie przez trzy kolejne w łańcuchu białkowym aminokwasy: serynę, tyrozynę i glicynę, po utworzeniu przez białko prawidłowej struktury natywnej. Co ciekawe, te trzy aminokwasy znajdują się obok siebie również w wielu innych biomolekułach, jednak nie tworzą tam chromoforu.

GFP jest stosowane jako marker biologiczny w biologii, medycynie i biotechnologii, a jego odkrycie, badania właściwości i pomysł wykorzystania zostały docenione przez komitet noblowski przyznaniem trzem naukowcom w 2008 roku Nagrody Nobla w dziedzinie chemii. Historię odkrycia i właściwości GFP opisałam w popularnonaukowym artykule opublikowanym dwukrotnie w „Wiedzy i Życiu” - w maju 2009 r. i w numerze specjalnym „Światło” w 2011 roku. GFP może być łatwo przyłączone do dowolnego białka i może być eksprymowane wraz z nim w komórkach. Jego fluorescencja jest następnie znacznikiem opisującym rozkład, transport i agregację białek w komórce. Jednakże GFP ma również tendencję do agregacji w trakcie zwijania do struktury natywnej, a powstawanie charakterystycznego chromoforu zależy w obecności środków redukujących.

Wstępne badania zwijania i agregacji GFP opisałyśmy w komunikacie:

### **B. Wielgus-Kutrowska, P.L. Clark (2004) „*Folding and aggregation of GFP, an anti-parallel beta-barrel protein with a complex strand topology*” *Biophys. J.*, 86 Suppl. 266A-267A.**

Po utworzeniu, chromofor jest bardzo stabilny i pozostaje nienaruszony podczas rozwijania białka, co oznacza, że rozwijanie GFP nie jest odwróceniem zwijania *de novo*. Skonstruowaliśmy mutantą GFP - S65T/G67A-GFP, który nie tworzy funkcjonalnego chromoforu, w celu porównania procesów zwijania, rozwijania i konkurencyjnej agregacji GFP w przypadku powstawania i braku fluorescencyjnego chromofora. Nasze badania zostały przeprowadzone w obecności GdnHCl. Zmiany konformacji GFP monitorowano za pomocą fluorescencji tryptofanu i fluorescencji bis-ANS (4,4'-dianilino 1,1'-binaftaleno 5,5'-kwas disulfonowy). Badanie rozpraszania światła przez agregaty zastosowano do pomiarów agregacji GFP. Zwijanie S65T/G67A-GFP okazało się w dużej mierze

odwracalne. Wydaje się, że podczas zwijania równowagowego, pierwszym krokiem jest tworzenie tzw. „stopionej globuli”, ze skłonnością do agregacji.

Wyniki badań opisaliśmy w pracy:

**B Wielgus-Kutrowska, M Narczyk, A Buszko, A. Bzowska, P.L. Clark (2007) „Folding and unfolding of a non-fluorescent mutant of green fluorescent protein” J. Phys. Condens. Matt. 19, 285223.**

Ponieważ GFP mają tendencję do agregacji, a powstawanie chromoforu zależy od obecności środków redukujących, podjęliśmy spektroskopowe badania kinetyczne zwijania i agregacji mutantu GFP - EGFP (Phe64Leu/Ser65Thr-GFP, ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*) oraz konkurencji pomiędzy tymi dwoma procesami w zależności od pH, w obecności różnych środków redukujących. Najlepsze warunki zwijania zapewnia EGFP obecność  $\beta$ -merkaptoetanolu jako środka redukującego. Agregacja EGFP silnie zależy od wartości pH, oraz od stężenia białka. Wnioskujemy, że, podczas badań białek połączonych z EGFP muszą być wykonywane staranne doświadczenia kontrolne.

Wyniki badań opisaliśmy w pracy:

**J. Krasowska, M. Olasek, A. Bzowska, P.L. Clark, B. Wielgus-Kutrowska (2010) „The comparison of aggregation and folding of enhanced green fluorescent protein (EGFP) by spectroscopic studies” Spectroscopy 24, 343-348.**

W kolejnej pracy:

**J. Krasowska, K.G. Urganov, P.L. Clark, A. Sienkiewicz, A. Bzowska, B. Wielgus – Kutrowska (2014) „Spectroscopic properties of two single-cysteine mutants of EGFP: C48S-EGFP and C70S-EGFP” Biomedical Spectroscopy and Imaging, przyjęta do druku,**

opisaliśmy uzyskanie, stabilność i właściwości spektroskopowe dwóch jednocysteinowych mutantów EGFP - C48S-EGFP i C70S-EGFP. Wydaje się, że takie mutanty byłyby dobrymi obiektami do badania mechanizmu i dynamiki fałdowania EGFP metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego ze względu na możliwość wyznakowania za pomocą odpowiednich etykiet wiążących się z cysteinami tylko jednego miejsca w białku.

Widmo absorpcyjne wzbudzenia i emisji chromoforu mutantów są podobne do widm EGFP. Jednocysteinowe mutanty były bardziej podatne na agregację niż EGFP w trakcie nadekspresji w *E. coli*. C48S-EGFP wykazywał podobną odporność na denaturację chemiczną jak EGFP, natomiast C70S-EGFP było mniej odporne na denaturację w chlorowodoru guanidyny, a jego fałdowanie przebiegało mniej wydajnie. Dlatego C48S-EGFP wydaje się bardziej odpowiednim mutantem do badania procesów fałdowania białka za metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego niż C70S-EGFP.

## II. *Pozostałe badania z wykorzystaniem fosforylaz nukleozydów purynowych nie zaklasyfikowane jako osiągnięcie naukowe z związku z postępowaniem habilitacyjnym.*

### a. *Badania struktury i mechanizmu katalizy przez heksameryczną fosforylazę nukleozydów purynowych z *Escherichia coli**

W pracy badawczej zajmowałam się również fosforylazą z bakterii *E. coli* różniącą się sekwencją, strukturą i specyficznością substratową od fosforylaz trimerycznych.

Fosforylaza nukleozydów purynowych z bakterii *E. coli* jest heksamerem (o masie 156 kDa). Należy do grupy fosforylaz o wysokiej masie cząsteczkowej i charakteryzuje się szeroką specyficznością, katalizując nie tylko fosforolizę nukleozydów 6-oksopuryn, ale również nukleozydów 6-aminopuryn. To odróżnia ją od fosforylaz o niskiej masie cząsteczkowej, dla których pochodne 6-aminopuryn nie są substratami. Ze względu na różną specyficzność PNP ze źródła ssaczego i bakteryjnego można zsyntetyzować proleki, które, wprowadzone do komórek nowotworowych, ulegają aktywacji w obecności PNP z *E. coli*, ale nie PNP ze źródeł ssaczych. Dlatego PNP z *E. coli* jest obiecującym kandydatem do zastosowania w ukierunkowanej terapii genowej.

W pierwszej pracy, której jestem współautorką, dotyczącej badań nad fosforylazą nukleozydów purynowych z *E. coli*, opisaliśmy strukturę krystalograficzną, uzyskaną z rozdzielczością 2.0 Å, kompleksu potrójnego enzymu z pochodnymi formycyny A oraz fosforanowymi lub siarczanowymi jonami. Heksamer widoczny w tej strukturze jest trimerem niesymetrycznych dimerów, utworzonych przez pary monomerów z miejscami aktywnymi o różnych konformacjach. Różnica konformacyjna wynika ze struktury helisy H8 złożonej z reszt aminokwasowych od 214 do 236, która jest ciągła w jednym z monomerów tworzących dimer i podzielona na segmenty w drugim. W monomerze zawierającym ciągłą helisę, wejście do kieszeni miejsca aktywnego jest szeroko otwarte, a ligandy związane są luźno (konformacja otwarta). Dzięki podziałowi helisy na segmenty w drugim monomerze, wejście do miejsca aktywnego jest częściowo zamknięte, kieszeń jest zwężona i ligandy związane są znacznie mocniej (konformacja zamknięta). Poza tym, łańcuch boczny jednego z istotnych dla katalizy aminokwasów - Arg217 - jest wprowadzony do miejsca aktywnego w konformacji zamkniętej. Arginina 217 odgrywa ważną rolę w zaproponowanym przez nas mechanizmie katalizy obejmującym etapy:

- 1) tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy donorem - łańcuchem bocznym Asp204 i akceptorem - azotem zasady purynowej w pozycji N<sup>7</sup>,
- 2) wiązanie fosforanu w miejscu aktywnym, co stabilizuje łańcuch boczny Arg24 i powoduje segmentację helisy H8,
- 3) zmiany konformacyjne powodujące przesunięcie łańcucha bocznego Arg217 na odległość wiązania wodorowego do Asp204,
- 4) zerwanie wiązania wodorowego pomiędzy Asp204 i azotem zasady purynowej oraz utworzenie wiązań Asp204-Arg217. Zasada purynowa z dołączonym protonem staje się dodatnio naładowanym jonom oksokarboniowym o cechach stanu przejściowego.

Dwa typy miejsc wiązania zaobserwowane w opisanej strukturze białka wydawały się potwierdzać wyniki z eksperymentów w roztworze, w których obserwowano negatywną kooperację pomiędzy monomerami w dimerze lub miejsca silne i słabo wiążące fosforan i nukleozydowy inhibitor.



Wyniki tych badań zawarto w publikacji:

**G. Koellner, A. Bzowska, B. Wielgus-Kutrowska, M. Luić T. Steiner, W. Saenger, J. Stępiński (2002) „Open and Closed Conformation of the *E. coli* Purine Nucleoside Phosphorylase. Active Center and Implications for the Catalytic Mechanism” J. Mol. Biol. 315, 351-371.**

Aby potwierdzić zaproponowany mechanizm reakcji przeprowadziliśmy dodatkowe badania w tym mutagenezę ukierunkowaną, spektroskopowe badania wiązania ligandów i katalizy oraz dalsze badania krystalograficzne.

Do tej pory w badaniach używaliśmy PNP, które otrzymaliśmy dzięki uprzejmości dr George'a Koszalki (Wellcome Research Labs). Ponieważ, jak wspomniałam, PNP z *E. coli* jest kandydatem do zastosowania w ukierunkowanej terapii genowej, nasze wyniki mogą pomóc w projektowaniu efektywnych mutantów przydatnych w tej w terapii. W związku z tym musieliśmy mieć dostęp do białka umożliwiający prowadzenie szeroko zakrojonych badań, w tym wymagających jego dużej ilości.

Chciliśmy uzyskać PNP samodzielnie dzięki nadekspresji w *E. coli*. Ponieważ taka nadekspresja jest opisana w literaturze [J. Lee, S. Filosa, J. Bonvin, S. Guyon, R.A. Aponte, J.L. Turnbull (2001) Protein Expr. Purif. 22, 180-188] nawiązałyśmy kontakt z dr Turnbull otrzymując od niej plazmid PNP. We współpracy z grupą prof. Mariji Luić z Rudjer Bosković Institut w Chorwacji uzyskaliśmy rekombinowany enzym z *E. coli* oraz szereg mutantów. Umożliwiło to prowadzenie dalszych badań zaproponowanego mechanizmu katalizy reakcji pod wpływem fosforylasy nukleozydów purynowych z bakterii *E. coli*.

Ponieważ do tej pory brak było informacji na temat roli wybranych aminokwasów w katalizie, zaprojektowano następujące mutanty: Arg24Ala, Asp204Ala, Asp204Asn, Arg217Ala i Asp204Ala/Arg217Ala. Badania aktywności mutantów w stosunku do naturalnych substratów i nietypowego – 7-metyloguanozyny potwierdziły wcześniejsze hipotezy, mówiące o tym, że kataliza polega na protonowaniu zasady purynowej w pozycji N<sup>7</sup> przez Asp204 z udziałem Arg217. Dla PNP typu dzikiego i mutantu Arg24Ala zaobserwowaliśmy zjawisko negatywnej kooperacji w przypadku wiązania fosforanu.

Określono jak wyglądają struktury krystalograficzne PNP typu dzikiego w kompleksie z fosforanem i siarczanem amonu oraz mutantu Arg24Ala w kompleksie z fosforanem lub siarczanem. Struktura PNP typu dzikiego w kompleksie z fosforanem, bez obecności siarczanu amonu uzyskana z rozdzielczością 2.0 Å, zawierała w jednostce asymetrii trzy cząsteczki (heksamery) PNP. W przeciwieństwie do wcześniej uzyskanej struktury, dla której liczba miejsc aktywnych w konformacji zamkniętej i otwartej była taka sama, w tym przypadku każda z cząsteczek miała dwa miejsca aktywne w zamkniętej i 4 miejsca aktywne w otwartej konformacji. Dane krystalograficzne pokazały, że obserwowana wcześniej [G. Koellner et al, (2002) J. Mol. Biol. 315, 351-371] zmiana konformacyjna białka prowadząca do umieszczenia Arg217 w pobliżu Asp204, istotna dla katalizy, jest spowodowana wiązaniem fosforanu oraz jego oddziaływaniem z Arg24.

Wyniki tych badań zawarto w pracy:

**G. Mikleušević, Z. Štefanić, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić (2011)** „*Validation of the catalytic mechanism of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase by structural and kinetic studies*” *Biochimie* **93**, 1610-1622.

W następnej pracy przedstawiliśmy strukturę krystaliczną kompleksu potrójnego enzymu z jonem fosforanowym i formycyną A.

W jednostce asymetrii znajdowały się trzy różniące się monomery, oznaczone jako A, B i C. Monomery A i C tworzyły dimer, natomiast monomer B tworzył dimer z monomerem B' zyskanym dzięki operacjom symetrii. Zidentyfikowano dwa typy miejsc wiążących – otwarte (w monomerze B i C) i zamknięte (w monomerze A). Monomer A zawierał jedną związaną cząsteczkę fosforanu. W monomerach B i C nieoczekiwane zaobserwowano (co do tej pory nigdy nie miało miejsca) dodatkowe miejsce wiązania fosforanu i stechiometrię wiązania dwóch cząsteczek fosforanu na podjednostkę enzymu.

Przeprowadzono miareczkowania PNP fosforanem. Widoczne w krystalografii dodatkowe, słabo wiążące fosforan miejsce, dające stechiometrię dwóch cząsteczek fosforanu na monomer nie znalazło potwierdzenia w badaniach w roztworze.

Wyniki tych badań zawarto w pracy:

**Z. Štefanić, M. Narczyk, G. Mikleušević, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić (2012)** „*New phosphate binding sites in the crystal structure of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase complexed with phosphate and formycin A*” *FEBS Letters* **586**, 967-971.

Następnie, w formie przeglądowej, napisana została publikacja:

**Z. Štefanić, G. Mikleušević, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić (2013)** „*Still a Long Way to Fully Understanding the Molecular Mechanism of Escherichia coli Purine Nucleoside Phosphorylase*” *Croat. Chem. Acta* **86**, 117–127,

opisująca badania mechanizmu katalizy reakcji fosforolizy katalizowanej przez PNP z *E. coli*. Podsumowaliśmy w niej wyniki badań prezentowanych w wyżej wymienionych, wcześniejszych pracach, dotyczące określenia mechanizmu katalizy reakcji w obecności PNP z *E. coli*. Przedyskutowaliśmy nietypową stechiometrię wiązania fosforanu (dwie cząsteczki na monomer), która może wynikać z bardzo dużego stężenia fosforanu lub z długiego okresu krystalizacji białka. Odnieśliśmy się też do badań kooperacji negatywnej pomiędzy podjednostkami w oligomerycznym enzymie. Aby jednoznacznie określić stechiometrię wiązania ligandów w roztworze, w szczególności fosforanu i opisać występowanie zjawiska kooperacji pomiędzy podjednostkami PNP i/lub nieidentyczność miejsc aktywnych należy wykonać dalsze badania.

Jak wspomniałam, fosforylaza nukleozydów purynowych z bakterii *E. coli* jest heksamerem, który można rozważać jako trimer dimerów. Wydaje się, że dimer jest najmniejszą jednostką zdolną do katalizowania reakcji enzymatycznej. Chcąc badać zjawisko komunikacji pomiędzy podjednostkami i poszukując uzasadnienia dlaczego w formie aktywnej biologicznie enzym występuje w postaci heksameru podjęliśmy próbę uzyskania dimerów PNP z *E. coli*. W pierwszym etapie metodami modelowania molekularnego sprawdziliśmy jakie mutacje na powierzchni kontaktu pomiędzy dimerami mogą

spowodować destabilizację heksameru. Następnie, metodami inżynierii genetycznej, skonstruowaliśmy mutanty PNP ale nie udało się uzyskać stabilnych dimerów. Modelowanie pokazało, że izolowany dimer nie posiada właściwej trójwymiarowej struktury. Zgodnie z tymi wynikami pomiary metodą dichroizmu kołowego pokazały zmiany struktury drugorzędowej białka po wykonaniu mutacji. Wirowanie analityczne natomiast udowodniło, że mutanty nie tworzą stabilnych dimerów, a raczej chętnie dysocjują do postaci monomerów. Aktywność katalityczna mutantów jest zaniedbywalna, sześć rzędów wielkości mniejsza niż aktywność białka typu dzikiego.

Opis naszej pracy zawarliśmy w publikacji :

**B. Bertoša, G. Mikleušević, B. Wielgus-Kutrowska, M. Narczyk, M. Hajnić, I. Lešćić Ašler, S. Tomić, M. Luić, A. Bzowska (2014) „Homooligomerization is needed for stability: molecular modeling and solution study of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase”, FEBS J. 281, 1717–1930.**

***b. Badania struktury i mechanizmu katalizy przez trimeryczną fosforylaze nukleozydów purynowych ze śledziona cielęcej i bakterii *Cellulomonas*.***

Większość wyników badań nad fosforylazami trimerycznymi jest przedstawionych jako osiągnięcie badawcze. Prace, które nie zostały w tym celu wybrane to kilka komunikatów dotyczących oddziaływania PNP z *Cellulomonas* i ze śledziona cielęcej z różnymi ligandami.

I tak:

Opisaliśmy badania nad fosforolizą katalizowaną przez PNP z *Cellulomonas sp.* z typowymi substratem nukleozydowym, inozyną (Ino) i nietypowym 7-metylguanozyną (m7Guo) oraz fosforanem. Zbadaliśmy kinetykę reakcji odwrotnej syntezy z guaniną (Gua) i rybozo-1-fosforanem (R1P) jako substratami i inhibicję produktową syntezy.

Wyniki opublikowałyśmy w komunikacie:

**B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska (2005) „Kinetic properties of *Cellulomonas sp.* purine nucleoside phosphorylase with typical and non-typical substrates: implications for the reaction mechanism” Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 24, 471-476.**

Wyznaczyliśmy stałe dysocjacji i stechiometrię wiązania dla oddziaływania trimerycznego PNP ze śledziona cielęcej i PNP z *Cellulomonas Sp.* z analogami stanu podstawowego (substraty i inhibitory).

Wyniki tych badań są zawarte w komunikacie:

**B. Wielgus-Kutrowska, A. Holý, J. Frank, G. Koellner, A. Bzowska (2003) „Interactions of trimeric purine nucleoside phosphorylases with ground state analogues - calorimetric and fluorimetric studies” Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 22, 1695-1698.**

Zbadaliśmy tworzenie kompleksu mulisubstratowego inhibitora - 2-amino-9-[2-(fosfonometoksy)etylo]-6-sulfanylpuryną z trimeryczną fosforylazą nukleozydów purynowych z *Cellulomonas Sp.*

Wyniki badań zawiera komunikat:

**J.M. Antosiewicz, B. Wielgus-Kutrowska, M. Długosz, A. Holý, A. Bzowska (2007) „Kinetics of binding of multisubstrate analogue inhibitor (2-amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]-6-sulfanylpurine) with trimeric purine nucleoside phosphorylase” Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 26, 969-974.**

Opisaliśmy wstępne wyniki badań dotyczących amplifikacji PCR fosforylasy z biblioteki cDNA ze śledziona cielęcej, klonowania, nadekspresji PNP, aktywności enzymatycznej i oddziaływania z podstawowymi ligandami.

Wstępne wyniki tych badań zawarto w komunikacie:

**K. Stepniak, A. Girstun, B. Wielgus-Kutrowska, K. Staron, A. Bzowska (2007) „Cloning, expression, purification, and some properties of calf purine nucleoside phosphorylase” Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 26, 855-859.**

Wyznaczyliśmy wkład entropowy/entalpowy do oddziaływania fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP) ze śledziona cielęcej z dwusubstratowymi analogami DFPP-DG, DFPP-G i (S)-PMP-DAP.

Wstępne wyniki tych badań zawarto w komunikacie:

**K. Breer, B. Wielgus-Kutrowska, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, R.H. Szczepanowski, M. Bochtler, A. Girstun, K. Staron, A. Bzowska (2008) „Thermodynamic studies of interactions of calf spleen PNP with acyclic phosphonate inhibitors” Nucleic Acids Symp. Ser. 52, 663-664.**

Wykonaliśmy testy programu Dynafit służącego do analizy danych opisujących oddziaływanie enzym-ligandy.

Wyniki tych badań zawarto w komunikacie:

**J.M. Antosiewicz, K. Breer, A. Bzowska, B. Wielgus-Kutrowska (2008) „On the analysis of fluorimetric titration curves of purine nucleoside phosphorylase” Nucleic Acids Symp Ser. 52, 671-672.**

Zbadaliśmy zmiany stanu oligomerycznego PNP w czasie kontrolowanej dezaktywacji enzymu.

Wyniki tych badań zawarto w komunikacie:

**B. Wielgus-Kutrowska, A. Modrak-Wojcik, A. Dyzma, M. Zolkiewski, A. Bzowska (2013) „Inactivation of trimeric purine nucleoside phosphorylase: analytical ultracentrifugation studies” Eur. Biophys. J. 42 Suppl. S72-S72.**

**c. *Badanie właściwości pochodnych 8-azapuryn z punktu widzenia ich oddziaływania nisko- i wysokocząsteczkowymi fosforylazami nukleozydów purynowych.***

Możliwość uzyskania rekombinowanego PNP ze śledziona cielęcej i bakterii *Escherichia coli* w praktycznie dowolnej ilości umożliwiło rozszerzenie badań nad fluorescencyjnymi właściwościami pochodnych 8-azapuryn. Dzięki temu, współpracująca z nami grupa dr hab. Jacka Wierzchowskiego zbadała oddziaływanie PNP z tymi ligandami.

Ustalono, że PNP ze śledziona cielęcej katalizuje rybozylację 2,6-diamino-8-azapuryny w środowisku wolnym od fosforanu, z rybozo-1-fosforanem jako donorem rybozy. Rybozylacja zachodzi w pozycji N<sup>8</sup> lub N<sup>7</sup> pochodnej zasady, a proporcja między dwoma formami (N<sup>7</sup>/N<sup>8</sup>) zależy znacząco od warunków reakcji. Oba produkty reakcji mają właściwości fluorescencyjne.

W przypadku zastosowania PNP z *E. coli* uzyskano mieszaninę N<sup>8</sup> i N<sup>9</sup>-podstawionych rybozylowanych pochodnych 8-azapuryn. Scharakteryzowano fluorescencję rybozylowanej 2,6-diamino-8-azapuryny. Wysoka wydajność kwantowa (w maksimum emisji) ~0.9, uzyskana została dla N<sup>9</sup>-β-D-rybozydu, a dla N<sup>8</sup>-β-D-rybozydu była bliska 0.4.

Rybozylacja 8-azaguaniny katalizowana przez PNP ze śledziona cielęcej następuje w pozycji N<sup>9</sup>. PNP z *E. coli* katalizuje rybozylację 8-azaGua głównie w pozycji N<sup>9</sup>, ale z dodatkiem silnie fluoryzującego produktu rybozylowanego w pozycjach N<sup>8</sup>/N<sup>7</sup>.

Wyniki pomiarów są zawarte w pracy:

**A. Stachelska-Wierzchowska, J. Wierzchowski, B. Wielgus-Kutrowska, G. Mikleušević (2013)**  
**„Enzymatic Synthesis of Highly Fluorescent 8-Azapurine Ribosides Using a Purine Nucleoside Phosphorylase Reverse Reaction: Variable Ribosylation Sites”** *Molecules* **18**, 12587-12598.

Ustalono, że dwa nietypowe nukleozydy, 7-b-D-rybozylo-2,6-diamino-8-azapuryna i 8-b-D-rybozylo-2,6-diamino-8-azapuryna, są substratami reakcji fosforolizy katalizowanej przez PNP ze śledziona cielęcej i bakterii *E. coli*. Oba związki mają właściwości fluorescencyjne podobnie jak produkt reakcji, 2,6-diamino-8-azapuryna.

Wyniki badań fluorescencyjnych przedstawiono w pracy:

**J. Wierzchowski, A. Stachelska-Wierzchowska, B. Wielgus-Kutrowska, G. Mikleušević (2014)**  
**„Two fluorogenic substrates for purine nucleoside phosphorylase, selective for mammalian and bacterial forms of the enzyme”** *Anal. Biochem.* **446**, 25–27.

### 6.3. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Główne wyniki pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora to:

#### *I. Opis właściwości spektralnych, w szczególności emisyjnych 8-aza-puryn i ich nukleozydów oraz scharakteryzowanie ich właściwości substratowo-inhibitorowych w oddziaływaniach z enzymami ze śledziona cielęcej i bakterii *Escherichia coli*.*

Wykonaliśmy obszerne badania właściwości emisyjnych w środowisku wodnym 8-azapuryn 8-azaadeniny (8-azaA), 8-azahipoksantyny (8-azaH), 8-azaguaniny (8-azaG) i ich nukleozydów: 8-azaadenozyny (8-azaAdo), 8-azainozyny (8-azaIno), 8-azaguanozyny (8-azaGuo). Stwierdziliśmy, że fluorescencja 8-azaGuo i 8-azaIno w pH 7 pochodzi od formy anionowej, natomiast silna emisja 8-azaAdo pochodzi od formy obojętnej. Odpowiadające powyższym nukleozydom 8-azapuryny mają słabe właściwości fluorescencyjne w środowisku wodnym, z wyjątkiem 8-azaG.

Zbadaliśmy właściwości substratowo-inhibitorowe 8-azapuryn i ich nukleozydów.

- 8-azaG i 8-azaHx są substratami dla PNP ze śledziona cielęcej w reakcji syntezy nukleozydów 8-azapuryn. W przypadku PNP z *E. coli* dodatkowym substratem jest 8-azaA, co jest zgodne z faktem, że adenozyne ulega fosforolizie pod wpływem PNP z *E. coli*, natomiast nie jest substratem fosforylasy ze śledziona cielęcej.
- Nukleozydy 8-azapuryn są dość dobrymi inhibitorami fosforolizy inozyny (Ino) i guanozyny (Guo) przez PNP z *E. coli*. Najsilniejszym inhibitorem jest 8-azaIno ( $K_i$  ok. 20  $\mu\text{M}$ ). Jest to jedyny inhibitor reakcji fosforolizy katalizowanej przez enzym ze śledziona cielęcej ( $K_i$  ok. 40  $\mu\text{M}$ ).

Wyniki pomiarów opublikowano w pracy:

**J. Wierzchowski, B. Wielgus-Kutrowska, D. Shugar (1996) „Fluorescence emission of 8-azapurines and their nucleosides, and application to the kinetic reverse synthetic reaction of purine nucleoside phosphorylase” *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 9-17.**

#### *II. Scharakteryzowanie właściwości substratowo-inhibitorowych rybozydu nikotynamidu wobec fosforylaz nukleozydów purynowych oraz propozycja modelu wiązania rybozydu nikotynamidu w miejscach aktywnych PNP ze śledziona cielęcej i bakterii *E. coli*.*

Obiektem badań tej części mojej pracy naukowej był rybozyd nikotynamidu (NIR), który różnił się od naturalnych substratów tym, że jest obdarzoną dodatnim ładunkiem pochodną pirydyny, podczas, gdy naturalne substraty są pochodnymi puryn. W celach porównawczych przeprowadziłam pomiary dla naturalnego substratu PNP – inozyny.

Udowodniłam, że NIR jest substratem zarówno enzymu ze źródła ssaczego jak i bakteryjnego. Wiąże się on w tym samym rejonie miejsca aktywnego co naturalne substraty, z wysoką stałą Michaelisa ( $K_M=1.48$  mM dla PNP ze śledziona cielęcej i 0.62 mM dla PNP z *E. coli* w pH 7). Są to wartości o 1-2 rzędy wielkości wyższe niż w przypadku inozyny. NIR charakteryzuje się wysoką prędkością maksymalną fosforolizy odpowiednio 96% i 35% wartości uzyskanej dla Ino, dla, odpowiednio, enzymu ze śledziona cielęcej i *E. coli*.

Zbadałam właściwości inhibitorowe NIR. Okazało się, że jest on słabym inhibitorem kompetycyjnym fosforolizy inozyny katalizowanej przez obydwa badane enzymy. Pokazałam, że fosforoliza dodatnio

naładowanego substratu 7-metyloguanozyny jest także hamowana w sposób kompetycyjny przez Ino i NIR. Zbadałam zależność stałych kinetycznych fosforolizy NIR i inozyny w funkcji pH. W pH alkalicznym zachowanie NIR znacząco odbiega od obserwowanego dla inozyny. Spadek prędkości maksymalnej fosforolizy inozyny wynika najprawdopodobniej albo z niekorzystnej formy jonowej Ino, albo ze zmiany stanu zjonizowania reszt aminokwasowych obecnych w miejscu aktywnym PNP i mających wpływ na przebieg fosforolizy.

Na podstawie wyników spektroskopowych badań kinetycznych oraz danych literaturowych zaproponowałam model wiązania NIR w miejscu aktywnym PNP cielęcego. NIR najprawdopodobniej tworzy wiązanie wodorowe z Asn243 i Glu201, dzięki obecności w jego strukturze grupy imitującej fragmenty Ino i Guo ( $C^6=O$  i  $N^1-H$ ).

Wyniki są zebrane w publikacji:

**B. Wielgus-Kutrowska, E. Kulikowska, J. Wierzchowski, A. Bzowska, D. Shugar (1997)**  
**„Nicotinamide riboside - an unusual, non-typical substrate of purified purine nucleoside phosphorylases” Eur. J. Biochem. 243, 408-414.**

### **III. Określenie struktury przestrzennej, charakterystyka oddziaływania z typowymi substratami i inhibitorami oraz propozycja mechanizmu wiązania i fosforolizy nukleozydów pod wpływem PNP z *Cellulomonas*.**

Dostępne handlowo PNP z *Cellulomonas* było znacznie zanieczyszczone stanowiąc ok. 20% próbki. Zaprojektowaliśmy metodę „doczyszczania” PNP techniką chromatografii jonowymiennej. Uzyskaliśmy kryształy białka w podwójnym i potrójnym kompleksie z ligandami, rozpraszające promieniowanie rentgenowskie z rozdzielczością, odpowiednio, 2.2 Å i 2.4 Å. Kompleks podwójny enzymu z fosforanem wykrył się w grupie przestrzennej P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. W jednostce asymetrycznej znajdował się aktywny trimer. Strukturę rozwiązano metodą podstawienia molekularnego wykorzystując jako model PNP ze śledziona cielęcej. Potrójny kompleks enzymu z fosforanem i 8-jodoguaniną uzyskano przez wprowadzenie kryształu kompleksu podwójnego z ortofosforanem do roztworu 8-jodoguanozyny. Struktura przestrzenna PNP pokazała zachowanie, w stosunku do PNP cielęcego, większości ważnych dla katalizy aminokwasów w miejscu aktywnym.

Zbadaliśmy kinetykę oddziaływania PNP z fosforanem nieorganicznym i z nukleozydem. Stwierdziliśmy, że pomimo podobieństw w składzie aminokwasowym miejsca aktywnego do enzymów ssaczych, specyficzność PNP z *Cellulomonas* odbiega od danych dotyczących PNP ze śledziona cielęcej i erytrocytów ludzkich, ponieważ:

- adenozyna okazała się inhibitorem badanego PNP, podczas gdy nie wiąże się (lub wiąże bardzo słabo) z enzymami ze źródeł ssaczych, a jest substratem PNP z *E. coli*,
- inhibitory wiążące się tylko z fosforylazami ssaczymi oraz wiążące się tylko z PNP z *E. coli* okazały się inhibitorami enzymu z *Cellulomonas*.

Struktura krystalograficzna PNP z *Cellulomonas* oraz właściwości inhibitorowe adenozyliny i formycyny A umożliwiły zaproponowanie mechanizmu fosforolizy, w którym kluczową rolę odgrywa Glu204 (Glu201 w cielęcym i ludzkim enzymie) podczas gdy Asn246 (Asn243 w ssaczych enzymach) umożliwia raczej wiązanie 6-oxopuryn niż katalizę. Mechanizm ten nie jest sprzeczny z

właściami fosforylaz ze źródeł ssaczych i tłumaczy właściwości substratowe NIR i N(7)-postawionych nukleozydów purynowych wobec trimerycznych fosforylaz. Jest też zgodny z ich specyficznością w stosunku do nukleozydów 6-oxopuryn i właściwościami kinetycznymi mutantów Glu201/Ala Asn243/Ala PNP z erytrocytów ludzkich.

Wyniki badań dotyczących enzymu z *Cellulomonas* zostały zawarte w następujących komunikatach i publikacjach:

**J. Tebbe, B. Wielgus-Kutrowska, W. Schröder, M. Luić, D. Shugar, W. Saenger, G. Koellner, A. Bzowska (1996)** „*Purine nucleoside phosphorylase (PNP) from Cellulomonas sp., a third class of PNP different from both „low-molecular weight” mammalian and „high-molecular weight” bacterial PNPs*” *Miami, Nature Biotechnology, Short Reports*, 8, 90.

**B. Wielgus-Kutrowska, J. Tebbe, W. Schröder, M. Luić, D. Shugar, W. Saenger, G. Koellner, A. Bzowska (1998)** „*Cellulomonas sp. Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP): Comparison with Human and E. coli Enzymes*” *Adv. Exp. Med. Biol.* 431, 259-264.

**A. Bzowska, J. Tebbe, M. Luić, B. Wielgus-Kutrowska, W. Schröder, D. Shugar, W. Saenger, G. Koellner (1998)** „*Crystallization and preliminary studies of purine nucleoside phosphorylase from Cellulomonas sp.*” *Acta Cryst.* D54, 1061-1063.

**J. Tebbe, A. Bzowska, B. Wielgus-Kutrowska, W. Schröder, Z. Kazimierczuk, D. Shugar, W. Saenger, G. Koellner (1999)** „*Crystal structure of the Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) from Cellulomonas sp. and its implication for the mechanism of trimeric PNPs*” *J. Mol. Biol.* 294, 1239-1255.

**B. Wielgus-Kutrowska, J. Tebbe, J. Wierzchowski, D. Shugar, W. Saenger, G. Koellner, A. Bzowska (1999)** „*Binding of substrates by purine nucleoside phosphorylase (PNP) from Cellulomonas sp. – kinetic and spectrofluorimetric studies*” *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 18, 871-872.

Metodami spektroskopii emisyjnej zbadalam oddziaływanie substratów i produktów reakcji fosforolizy z PNP z bakterii *Cellulomonas*. Pokazałam, że zasady purynowe, R1P i fosforan zwiększają wewnętrzną fluorescencję PNP, co oznacza, że powstawanie kompleksów podwójnych indukuje zmiany konformacyjne białka w otoczeniu tryptofanów. Efekt wzmocnienia fluorescencji w przypadku wiązania guaniny (Gua) jest znacznie silniejszy niż wywołany przez inne ligandy, co sugeruje, że enzym preferencyjnie wiąże tautomeryczną rzadką fluorescencyjną formę anionową Gua. Guanozyna (Guo) i inozyna (Ino) o stężeniu 100 µM wykazują niewielki wpływ lub jego brak na wewnętrzną fluorescencję enzymu, ale badanie termicznej inaktywacji enzymów w kompleksie z tymi nukleozydami udowodniły, że tworzą słabo związane kompleksy podwójne z PNP. Wiązanie Gua, Hx i R1P przez trimer PNP jest opisane przez jedną stałą dysocjacji,  $K_d = 0,46 \mu\text{M}$  dla Gua,  $3.0 \mu\text{M}$  dla Hx i  $60 \mu\text{M}$  dla R1P. Sprawdziłam, że stechiometria wiązania dla Gua wynosi trzy cząsteczki ligandu na trimer. Wpływ fosforanu na wewnętrzną fluorescencję enzymu wynika nie tylko z wiązania, ale również ze zwiększenia siły jonowej, co pokazano poprzez miareczkowania enzymu przez KCl. Po uwzględnieniu wpływu siły jonowej, dane miareczkowania fosforanem są najbardziej zgodne z jedną stałą dysocjacji,  $K_d = 270 \mu\text{M}$ , ale istnienia bardzo słabych miejsc wiązania z  $K_d > 50 \text{ mM}$  nie można



jednoznacznie wykluczyć. Wiązanie Gua do kompleksu podwójnego PNP/fosforan jest słabsze ( $K_d = 1,7 \mu\text{M}$ ) niż do wolnego enzymu ( $K_d = 0,46 \mu\text{M}$ ), co sugeruje, że fosforan pomaga uwolnić zasadę purynową w katalitycznym procesie fosforolizy. Wyniki wskazują, że nieliniowe kinetyczne wykresy zależności prędkości początkowej od stężenia ligandów, typowe dla PNP, w tym PNP z *Cellulomonas*, nie są, jak to na ogół się przyjmuje, spowodowane oddziaływaniem pomiędzy monomerami tworzącymi trimer, ale wynikają z bardziej złożonego mechanizmu kinetycznego.

W wyniku tych badań powstała następująca praca, opublikowana już po uzyskaniu stopnia doktora:

**B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, J. Tebbe, G. Koellner, D. Shugar (2002) „Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) from *Cellulomonas sp.*: physicochemical properties and binding of substrates determined by ligand – dependent enhancement of enzyme intrinsic fluorescence, and by protective effects of ligands on thermal inactivation of the enzyme” Biochim. Biophys. Acta 1597, 320-334.**

**IV. Badanie oddziaływania trimerycznego i heksamerycznego PNP z zsyntetyzowanymi 2-chloro-6-aryloksy-i 2-chloro-6-alkoxyarylpurynami**

Zbadaliśmy właściwości kinetyczne w reakcji katalizowanej przez fosforylazę nukleozydów purynowych (PNP) z *Cellulomonas sp.* i bakterii *E. coli* serii zsyntetyzowanych 2-chloro-6-aryloksy-i 2-chloro-6-alkoxyarylpuryn. Wszystkie związki wykazują aktywność jako inhibitory ( $IC_{50}$  w zakresie  $0.5-76 \mu\text{M}$ ) w stosunku do PNP z *E. coli*, nie zauważono natomiast hamowania reakcji katalizowanej przez PNP z *Cellulomonas*.

Wyniki opublikowaliśmy w komunikacie:

**A. Bzowska, L. Magnowska, B. Wielgus-Kutrowska, Z. Kazimierczuk (1999) „Synthesis of 2-chloro-6-aryloxy- and 2-chloro-6-alkoxyarylpurines and their properties in purine nucleoside phosphorylase (PNP) system” Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 18, 873-874.**

