

Enzymy są to białka produkowane w żywych organizmach i katalizują przebieg szeregu reakcji metabolicznych. Reakcje katalizowane przez enzymy odgrywają ważną rolę we wszystkich procesach życiowych komórki. Każda z nich zajmuje określone miejsce i pełni określoną funkcję w organizmie a zaburzenia w jego funkcjonowaniu mogą być fatalne w skutkach. Jednym z rodzajów enzymów są kinazy białkowe, czyli enzymy katalizujące reakcje fosforylacji (przenoszenia grupy fosforanowej) których substratami są białka. Pełnią one wiele kluczowych funkcji w wielu szlakach sygnałowych a zaburzenie w ich działaniu czy wystąpienie może prowadzić do powstawania komórek rakowych. Dlatego te kinazy białkowe pozostają jednym z głównych celów w nowych terapiach przeciwnowotworowych.

Stale poszukuje się nowych związków blokujących aktywność (inhibitorów) tych kinaz wykorzystując wiele różnych podejść w tym celu. Najczęściej wykorzystywane są związki, które budową przypominają cząsteczkę ATP (która jest różniem grupy fosforanowej niezbędnej do procesu fosforylacji) i wiążą się w miejscu wiązania ATP blokując w ten sposób możliwość wiązania właściwej cząsteczki ATP. Innym sposobem jest wykorzystanie cząsteczki która ma za zadanie imitować białko będące substratem danej kinazy i wiąże się w miejscu wiązania substratu. Jest to możliwe, ponieważ każda kinaza rozpoznaje specyficzne sekwencje białka substratowego, a wiązająca się cząsteczka posiadająca ten fragment sekwencji będzie również przez tą kinazę rozpoznawana.

Podejściem łączącym dwie powyższe metody jest wykorzystanie cząsteczki będącej połączeniem tych dwóch (tzw. inhibitor bi-substratowy). W ten sposób powstała cząsteczka blokuje zarówno miejsce wiązania ATP jak i substratu. Dobrze zaprojektowana cząsteczka powinna wiązać się mocniej niż każda z poszczególnych elementów i być bardziej specyficzna względem konkretnej kinazy.

Podejście to jednak zostało zaniedbane, a kilka znanych inhibitorów tego rodzaju powstało bez dokładnej analizy i szczegółowego zdiagnozowania problemu. Dlatego też, w tym projekcie mam zamiar przetestować sposób zaproponowanego przez nas projektowania takich inhibitorów.

W tym celu wykorzystam modele kinaz białkowych jak jest kinaza białkowa CK2. Jest to stale aktywna, wszechobecna w organizmach eukariotycznych kinaza. Odgrywa ona kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmu i wiele grup badawczych za cel obrało sobie znalezienie silnych, specyficznych inhibitorów CK2. Została ona testowana bez powodzenia z wystąpieniem nowotworów. Zaobserwowano, że w wielu rodzajach komórek nowotworowych występuje podwyższony jej poziom.

Aby zaprojektować odpowiedni inhibitor bi-substratowy będzie nieposzukiwana cząsteczka wiążąca się w miejscu wiązania ATP i cząsteczka wiążąca się w miejscu wiązania substratu białkowego. Wybrane zostaną tylko związki o budowie umożliwiającej ich połączenie w przyszłości. Następnie znalezione w ten sposób związki zostaną przebadane wspólnie by wykluczyć wpływ wiązania jednego składnika na wiązanie drugiego. Związki te muszą wiązać się całkowicie niezależnie by

w przyszłości mogły utworzyć jeden silnie wiążący się cząsteczkę. Następnie sprawdzone zostaną sposoby połączenia tych dwóch cząsteczek. Zostanie to wykonane poprzez zmierzenie siły wiązania inhibitorów wiążących się w miejscu wiązania ATP przedłożonych o fragment drugiego inhibitora. Ostatnim etapem będzie synteza wybranego w ten sposób inhibitora bi-substratowego (składającego się z dwóch wybranych cząstelek i odpowiedniego połączenia) i przebadanie jego siły wiązania do kinazy CK2. Będzie to sposób na sprawdzenie skuteczności zaproponowanego podejścia.

Silność wiązania zarówno poszczególnych fragmentów jak i całego inhibitora będzie mierzona za pomocą trzech różnych metod. Dwie z nich pozwalają na bezpośredni pomiar siły wiązania, natomiast metoda którą będzie wykorzystywała jako pierwszy sposób na odrzucenie słabo wiążących się związków będzie pomiar temperatury w jakiej kompleks inhibitora z kinazą CK2 zmienia strukturę (denaturuje). Porównanie temperatury denaturacji kompleksu z temperaturą denaturacji samego białka, w naszym przypadku kinazy CK2, daje pośrednio informację o sile wiązania inhibitora do tej kinazy (im silniej się wiąże tym temperatura wyższa).

Jeśli przedstawiony sposób poszukiwania nowych inhibitorów bi-substratowych (poprzez szukanie każdej jego cząsteczki osobno i połączenie ich na koniec po dokładnej analizie) okaże się skutecznym będzie to platforma dla szybkich badań przesiewowych prowadzonych bez konieczności kłopotliwej syntezy finalnego inhibitora bi-substratowego. Znacznie ułatwi i przyspieszy to poszukiwanie i konstrukcje nowych inhibitorów dla kinaz białkowych. Otrzymane wyniki mogą stać się punktem wyjściowym do zaprojektowania nowego, bardziej specyficznego inhibitora kinazy CK2.