

Enzym syntaza tymidylanowa (ST) katalizuje reakcję zależnego od metylenotetrahydrofolianu przekształcenia dezoksyurydino-5'-monofosforanu (dUMP), prowadzącą do powstania tymidyno-5'-monofosforanu, należącego do kluczowych substratów w biosyntezie komórkowego DNA. Najwcześniejsze próby selektywnego zwalczania komórek nowotworowych polegały na ingerencji w proces biosyntezy DNA. Dlatego inhibicja ST jest od ponad 50 lat wykorzystywana w chemioterapii nowotworów. Pierwszym i do dziś bardzo często stosowanym lekiem, powodującym inhibicję ST w komórce, jest fluorouracyl, przekształcany w komórce do postaci dezoksynukleotydu, fluorodezoksyuryduno-5'-monofosforanu (FdUMP). FdUMP jest silnym inhibitorem ST, który jest przez enzym "rozpoznawany" jako substrat, podlega normalnej reakcji katalizowanej przez ten enzym, ale tylko do pewnego etapu, gdy reakcja ta ulega zablokowaniu na skutek obecności atomu fluoru w cząsteczce inhibitora. Na tym etapie enzym, inhibitor oraz metylenotetrahydrofolian stanowią kompleks powiązany kowalencyjnie. Wyniki badań krystalograficznych tego kompleksu stały się kamieniem milowym na drodze do poznania mechanizmu reakcji katalizowanej przez ST.

$N^4$ -hydroksy-dCMP ( $N^4$ -OH-dCMP) jest także silnym inhibitorem ST, podlegającym normalnej reakcji katalizowanej przez ten enzym przy udziale metylenotetrahydrofolianu. Prowadzi to do inaktywacji enzymu, której mechanizm nie został dokładnie poznany. Zaangażowani byliśmy od dawna w badania tego zjawiska i udało nam się wcześniej znacząco pogłębić wiedzę na jego temat, odkrywając pewne fakty, wskazujące na różnice w stosunku do znanego mechanizmu działania FdUMP. Sugerowało to, że rozwiązanie mechanizmu może pomóc zrozumieć nieznane dotąd elementy mechanizmu reakcji katalizowanej przez ST (podobnie, jak wcześniej pomogło w tym poznanie mechanizmu inhibicji przez FdUMP), ale także umożliwić zaprojektowanie nowych inhibitorów enzymu, potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

Celem projektowanych badań jest weryfikacja hipotezy, dotyczącej mechanizmu inhibicji syntazy tymidylanowej przez  $N^4$ -OH-dCMP, postawionej w konsekwencji naszych badań krystalograficznych, których wyniki rzuciły na ten mechanizm nowe i zaskakujące światło. Wcześniej przypuszczano, że inhibitor tworzy, podobnie jak FdUMP, kompleks z enzymem i metylenotetrahydrofolianem, co prowadzi z nieznanymi powodów do inaktywacji. Jednak przeczą temu wyniki naszych wspomnianych już badań krystalograficznych, a w szczególności rozwiązana z bardzo wysoką rozdzielczością struktura przestrzenna kompleksu ST, który wykrył w obecności  $N^4$ -OH-dCMP i metylenotetrahydrofolianu. Struktura ta sugeruje, że w obecności  $N^4$ -OH-dCMP i metylenotetrahydrofolianu enzym katalizuje reakcję poronną, prowadzącą do inaktywacji enzymu w wyniku nieodwracalnego związania samego inhibitora (w przypadku FdUMP inaktywacja zachodzi poprzez związanie inhibitora przy udziale metylenotetrahydrofolianu, z utworzeniem kowalencyjnie powiązanego kompleksu enzym-FdUMP-metylenotetrahydrofolian), któremu w centrum aktywnym towarzyszy niekowalencyjnie związany dihydrofolian. Wspomnieć należy, że syntaza tymidylanowa katalizuje reakcję, obejmującą dwa sprzężone elementy: (i) przeniesienie grupy metylenowej z metylenotetrahydrofolianu na piąty atom węgla pierścienia pirymidynowego dUMP i (ii) redukcję tej grupy na koszt pozostałego tetrahydrofolianu, niekowalencyjnie związanego z białkiem, ulegającego przy tym utlenieniu do dihydrofolianu. Analiza wspomnianej struktury wskazuje na rozprężenie tych elementów w warunkach obecności w centrum aktywnym cząsteczki  $N^4$ -OH-dCMP, na którą nie jest przenoszona grupa metylenowa (albo produkt takiego przeniesienia jest nietrwały i dlatego nie ma po nim śladu), a mimo to piąty atom węgla pierścienia pirymidynowego ulega redukcji, co widoczne jest dzięki wspomnianej wysokiej rozdzielczości. Tak więc  $N^4$ -OH-dCMP zaburza katalizowaną reakcję w zupełnie inny sposób niż FdUMP, stanowiąc tym samym potencjalnie bardzo użyteczne narzędzie badania mechanizmu tej reakcji, a w szczególności tego jej etapu, na którym następuje utlenienie tetrahydrofolianu. Ten ostatni szczegół jest tym bardziej istotny, że mechanizm tego właśnie etapu reakcji nie jest dobrze poznany.

Tak więc projektowane badania mają na celu, poza lepszym zrozumieniem mechanizmu inhibicji enzymu przez tytułowy inhibitor, wykorzystanie tej wiedzy przy projektowaniu nowych inhibitorów, ale także wykorzystanie  $N^4$ -OH-dCMP jako narzędzia przy badaniu mechanizmu reakcji katalizowanej przez ST. W tym celu planowane jest zastosowanie cząsteczek  $N^4$ -OH-dCMP oraz metylenotetrahydrofolianu, których wybrane atomy zostaną zastąpione izotopami (atomy tego samego pierwiastka o różnej liczbie neutronów w jądrze) trwałymi lub promieniotwórczymi. Zastosowanie tak „znakowanych” związków w reakcji katalizowanej przez enzym pozwoli śledzić losy wybranych grup chemicznych i odpowiedzieć na szereg pytań, dotyczących przebiegu reakcji. Ponadto, w celu sprawdzenia roli reszt aminokwasowych podejrzewanych o udział we wiązaniu tytułowego inhibitora, zbadana będzie kinetyka inhibicji przez  $N^4$ -OH-dCMP 5 zmutowanych białek syntazy tymidylanowej, z których w każdym jeden z tych aminokwasów został wymieniony (metodami inżynierii genetycznej) na inny. Ponadto, zostanie sprawdzona zdolność zmutowanych białek do katalizy zależnego od metylenotetrahydrofolianu przekształcenia  $N^4$ -OH-dCMP, prowadzącego do trwałej inaktywacji enzymu. Dodatkowo, w uzupełnieniu badań eksperymentalnych, przewidziane są badania obliczeniowe, polegające na modelowaniu molekularnym z zastosowaniem mechaniki kwantowej oraz mechaniki i dynamiki molekularnej, mające na celu zbadanie kolejnych etapów mechanizmu reakcji, prowadzącej do uformowania kompleksu ST- $N^4$ -OH-dCMP-DHF, zaobserwowanego w strukturze krystalicznej.