

## 1 Cel projektu

Rozpowszechniony enzym (białko przyspieszające daną reakcję) jakim jest syntaza tymidylanowa (TS) pełni wyjątkowo ważną rolę. Odpowiedzialny jest za syntezę dTMP, czyli cząsteczki, która służy do budowy DNA. W komórkach ludzkich i zwierzęcych jest jedynym źródłem tejże molekuly. Ze względu na funkcję jaką pełni jest celem wielu terapii przeciwnowotworowych, przeciwwirusowych czy przeciw-pasożytniczych. Z tego względu, również znalazła się w centrum zainteresowań badań proponowanych w tym projekcie. TS posiada specyficzne aminokwasy (cząsteczki budulcowe białek), które po naświetleniu promieniowaniem UV same mogą świecić (fluorescencja). Dzięki specjalnej aparaturze fluorescencję można rejestrować. Co więcej, pod wpływem wiązania czy oddziaływań z innymi cząsteczkami, substratami czy inhibitorami, właściwości fluorescencyjne mogą się zmieniać. Pozwala to na interpretację danych w postaci np. zmian strukturalnych badanego białka. Co za tym idzie, na lepsze poznanie mechanizmu działania, który w przypadku TS jest dość skomplikowany i do tej pory całkowicie nie poznany. Co więcej niedawne badania wykazały, że enzym ten może przeprowadzać część reakcji przy użyciu innej niż substrat cząsteczki. Celem tego projektu jest zbadanie tych zaskakujących właściwości. Kolejnym celem jaki przyświeca temu projektowi to analiza hamowania reakcji przez inhibitor- $N^4$ -OH-dCMP, który charakteryzuje się bardzo nietypowym i zadziwiającym mechanizmem prowadzącym do reakcji poronnej. Dzięki porównaniu danych pochodzących z kompleksów enzymu z  $N^4$ -OH-dCMP z danymi z innym inhibitorem -FdUMP - którego mechanizm jest poznany, prawdopodobnie uda się odpowiedzieć na nurtujące nas pytania związane z mechanizmem działania  $N^4$ -OH-dCMP. Dodatkowo, dzięki rozwiązaniom strukturalnym trójwymiarowym białka, które są dostępne w bazie PDB, planowane jest powiązanie zmian fluorescencyjnych z wynikającymi ze wspomnianych struktur zmian w aranżacji cząsteczek. Co więcej, znajomość wpływu zmian w aranżacji struktury na fluorescencję pozwoli również na sprawdzenie czy wyniki w istocie są równoważne z danymi krystalograficznymi i *vice versa*. Połączenie rezultatów ze strukturami 3D umożliwi stworzenie szeroko analitycznego projektu, który posłuży jako model do interpretacji danych pochodzących z doświadczeń z TS z innych źródeł.

Syntazy tymidylanowe to grupa białek pochodzących z różnych organizmów która jest niezwykle konserwatywna (tzn. że białka są do siebie bardzo podobne). W związku z tym do badań wybrany został enzym pochodzący od myszy (mTS) jako model do studiowania zmian parametrów fluorescencyjnych pod wpływem wiązania cząsteczek.

## 2 Realizowane badania

Cele zostaną zrealizowane przy użyciu spektroskopii absorpcyjnej, emisyjnej oraz czasowo-rozdzielczej. Wszystkie te metody związane są ze wspomnianą fluorescencją. Aby cząsteczka mogła emitować foton (świecić) musi najpierw pochłoniąć światło. Do badania ilości światła pochłoniętego służy spektroskopia absorpcyjna. Dzięki zmianie pochłaniania światła, pod wpływem łączenia się dwóch cząsteczek (np. enzym i inhibitor, enzym i substrat) lub większej ilości cząsteczek, mamy możliwość obserwowania oddziaływań i ich interpretacji. Podobnie, technika wykorzystująca wspomnianą fluorescencję i jej zmiany w wyniku tworzenia kompleksów (spektroskopia emisyjna), ułatwi wyjaśnienie frapujących nas problemów. Trzecia metoda (spektroskopia czasowo-rozdzielcza) służy do pomiarów czasu, w którym badana cząsteczka emituje (czas życia fluorescencji). Takie pomiary są bardzo czułe i dostarczają wielu cennych informacji na temat siły czy rodzaju oddziaływań, które posłużą do analizy przedstawionego problemu.

Wspomniana wcześniej analiza struktur białek będzie wykonana z pomocą dostępnego programu VMD i narzędzia MultiSeq. Program ten służy do analizy i porównań sekwencji oraz struktur białek.

## 3 Powody podjęcia tematyki badawczej

Opisanie mechanizmu katalizy mTS i jej inhibicji może pozytywnie wpłynąć na rozwój terapii, leczenia chorób oraz projektowania leków, co z punktu widzenia społeczeństwa stanowi ogromną zaletę. W dalszej perspektywie, daje to możliwość bardziej efektywnej walki z rakiem i racjonalnej terapii przeciwnowotworowej. Jednocześnie, co powinno zostać podkreślone, dzięki konserwatywności enzymu, uzyskane wyniki znajdują szerokie zastosowanie jako model do interpretacji oddziaływań TS z różnych źródeł z ligandami.