

Wybrane enzymy zaangażowane w stany chorobowe i ich regulacja

Dr inż. Andrea Baier

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Instytut Biotechnologii
Katedra Biologii Molekularnej
ul. Konstantynów 1i
20-708 Lublin

1. Imię i Nazwisko

Andrea Baier
email: baier@kul.pl
tel: 81 4545 426

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2003 – mgr - inżynieria chemiczna, specjalizacja – biotechnologia
Uniwersytet Nauk Stosowanych Lausitz, Senftenberg, Niemcy
Wydział Technologii Biologicznej, Chemicznej i Procesowej
tytuł: Badanie benzoksazoli, benzimidazoli i benzotriazoli i ich halogenowych pochodnych jako selektywnych inhibitorów aktywności enzymatycznej NTPazy/helikazy *Flaviviridae* (praca w języku niemieckim)

2006 – doktor - biologia, specjalizacja - biochemia
Instytut Biochemii i Biofizyki (Pracownia Antymetabolitów), Polska Akademia Nauk, Warszawa
tytuł: Badanie efektu inhibitorowego wybranych zasad heterocyklicznych, nukleozydów i antracyklin w stosunku do NTPazy/helikazy niektórych wirusów *Flaviviridae* (praca w języku angielskim)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2003-2004 stypendium Marie-Curie – „Marie Curie Training Site-Education and Research in Molecular Biology” (Komisja Europejska)

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pracownia Antimetabolitów, Warszawa

2004-2005 asystent

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pracownia Antimetabolitów, Warszawa

2005-2006 stypendium doktoranckie

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pracownia Antimetabolitów, Warszawa

2007-2008 asystent

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biologii Molekularnej

od 01.09.2008 adiunkt

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biologii Molekularnej

4. Badanie naukowe w ramach pracy magisterskiej i pracy doktorskiej

Studia i praca magisterska

W czasie moich studiów na Uniwersytecie Nauk Stosowanych Lausitz w Senftenbergu miałam obowiązkowe semestralne (20 tygodni) praktyki w firmie biotechnologicznej Medigene AG w Martinsried (Niemcy). W tym czasie miałam okazję do opanowania wielu metod z zakresu biologii molekularnej i komórkowej. Tematem mojej pracy było generowanie plazmidów wirusa związanego z adenowirusem (AAV). Plazmidy te były używane do stworzenia czułego testu do ilościowego oznaczenia cząsteczek rekombinowanego AAV. AAV są używane do transferu genów terapeutycznych. Podczas drugiej 6-tygodniowej praktyki pracowałam w Instytucie Chorób Tropikalnych Bernhardt-Nocht w Hamburgu (Niemcy). Podczas tego krótkiego pobytu poznałam różne metody niezbędne dla nadekspresji i oczyszczania białek rekombinowanych oraz natywnych. Było to także częścią mojej pracy magisterskiej pod koniec moich studiów. Oczyszczałam NTPazy/helikazy z czterech wirusów *Flaviviridae* z kultur komórkowych zainfekowanych wirusem jak to było w przypadku wirusa Zachodniego Nilu lub jako enzymy rekombinowane w *E. coli*, jak w przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C, wirusa japońskiego zapalenia mózgu i wirusa dengi. Badanie szerokiego spektrum benzotriazoli i benzimidazoli wykazało, że cząsteczki o większej hydrofobowości osiągniętej dzięki halogenowaniu pierścienia benzolowego i przez rozbudowę pierścienia triazolowego lub imidazolu są bardzo silnymi inhibitorami aktywności helikazy HCV NTPazy/helikazy. Inhibitory te były syntetyzowane w Laboratorium Antymetabolitów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Poszukiwania pośród różnych analogów benzotriazoli i benzimidazoli wygenerowały kilka silnych i bardzo selektywnych inhibitorów

aktywności helikazy HCV. Najlepszy profil aktywności/selektywności w stosunku do aktywności helikazy HCV posiadały halogenowane benzotriazole N₂-metyltetrabromobenzotriazolu, N₁-etylotetrabromobenzotriazolu i N₂-propylotetrabromobenzotriazolu wykazujące hamowanie przy stężeniach rzędu 5,9 i 6,6 μM. Wyniki tych badań zostały opublikowane w:

1. Bretner M, Najda A, Podwińska R, **Baier A**, Paruch K, Lipniacki A, Piasek A, Borowski P, Kulikowski T. (2004) Inhibitors of the NTPase/helicases of hepatitis C and related *Flaviviridae* viruses. *Acta Pol. Pharm.* 61: 26-28.
2. Bretner M, **Baier A**, Kopańska K, Najda A, Schoof A, Reinholz M, Lipniacki A, Piasek A, Kulikowski T, Borowski P. (2005) Synthesis and biological activity of 1*H*-benzotriazole and 1*H*-benzimidazole analogues - inhibitors of the NTPase/helicase of HCV and of some related *Flaviviridae*. *Antivir. Chem. Chemother.* 16: 315-326.

Praca doktorska

Po ukończeniu studiów aplikowałam o stypendium Marie-Curie (Marie Curie Training Site-Education and Research in Molecular Biology) w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Tematem mojej rozprawy doktorskiej były badania inhibitorów aktywności NTPazy i helikaz *Flaviviridae* enzymu NTPazy/helikazy w testach *in vitro* ATPazy i helikazy. NTPazy/helikazy HCV, JEV i DENV użyte w badaniach uzyskano drogą nadekspresji w *E. coli* białka fuzyjnego znakowanego tagiem histydynowym i ich oczyszczeniu do stanu homogenności. Źródłem NTPazy/helikazy z WNV było medium zainfekowanych wirusem komórek Vero E6. W badaniach efektu inhibitorowego stosowano wiele klas niespokrewnionych cząsteczek. Pierwszą klasą cząsteczek stanowiły pochodne fluorosulfonylowe puryn, które wykazywały aktywność inhibitorową tylko po preinkubacji enzymu z badanym związkiem. Drugą klasą były pochodne benzotriazolowe i benzimidazolowe, które są znanymi inhibitorami kinazy białkowej CK2. Przypuszczalny mechanizm działania tych cząstek w przypadku NTPazy/helikazy

polega na wiązaniu z dużym i małym rowkiem substratowego DNA lub RNA. Badano różne pochodne 1*H*-benzotriazolu i 1*H*-benzimidazolu ze względu na ich potencjał inhibitorowy, ale stwierdzono jedynie niewielki efekt w porównaniu ze związkami macierzystymi. Wszystkie testowane związki okazały się bardzo selektywnymi inhibitorami helikazy HCV. Trzecią klasą inhibitorów były alkaloidy o niskiej toksyczności, mianowicie tropolony. Uzyskane wyniki sugerują jednoznacznie, że tropolony i ich pochodne nie wiążą się ani z miejscem wiązania ATP ani z miejscem wiążącym DNA. Obserwacja, że mechanizm działania tropolonów nie jest związany z blokowaniem miejsca wiązania ATP potwierdzona była testem ATP-azowym. Nie można wykluczyć, że pochodne policykliczne tropolonów interkalują w strukturę DNA i w ten sposób wzmacniają efekt hamujący względem helikaz. Ostatnią klasą substancji hamujących aktywność helikazy były leki o bazowym szkielecie antracykliny. Antracykliny działają poprzez interakcję ze strukturami DNA lub RNA. Wykazano, że cząsteczki te były silnymi inhibitorami aktywności helikazowych *Flaviviridae* NTPaz/helikaz nawet w warunkach standardowych. W przeciwieństwie do pierwszych trzech klas testowanych w tych badaniach inhibitorów helikazy, hamowanie przez antybiotyki obserwowano także, gdy jako substratu używano RNA. W świetle tych wyników można sugerować, że centra aktywne dwóch aktywności NTPazy/helikazy nie są wprost związane a inhibitory okupują miejsce allosteryczne regulujące wybiórczo aktywność helikazową. Wyniki tych prac były częściowo opublikowane w:

1. Bretner M, Schalinski S, Haag A, Lang M, Schmitz H, **Baier A**, Behrens SE, Kulikowski T, Borowski P. (2004) Synthesis and evaluation of ATP-binding site directed potential inhibitors of nucleoside triphosphatases/helicases and polymerases of hepatitis C and other selected *Flaviviridae* viruses. *Antivir. Chem. Chemother.* 15: 35-42.

2. Borowski P, Lang M, Haag A, **Baier A.** (2007) Tropolone and its derivatives as inhibitors of the helicase activity of hepatitis C virus nucleotide triphosphatase/helicase. *Antivir. Chem. Chemother.* 18: 103-109.

Tabela 1. Zestawienie osiągnięcia przed uzyskaniem doktoratu

	ilość	Impact Factor	Punkty MNiSW	cytowań
Publikacje w czasopismach posiadające IF	1	0,465	15	5
Publikacje w innych czasopismach recenzowanych	3	-	-	41
Rozdziały w książkach	-	-	-	-
Komunikaty konferencyjne	6	-	-	-
Łącznie		0,465	15	46

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.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Wybrane enzymy zaangażowane w stany chorobowe i ich regulacja

b) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego

1. Ujjinamatada RK, **Baier A**, Borowski P, Hosmane RS. (2007) An analogue of AICAR with dual inhibitory activity against WNV and HCV NTPase/helicase: synthesis and *in vitro* screening of 4-carbamoyl-5-(4,6-diamino-2,5-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)imidazole-1-beta-D-ribofuranoside. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17: 2285-2288.

IF₂₀₀₇: 2,604; MNiSW₂₀₀₇: 32; cytowań: 27

2. Kolaiti R-M, **Baier A**, Szyszka R, Kouyanou-Koutsoukou S. (2011) Isolation of a CK2 α subunit and the holoenzyme from *Mytilus galloprovincialis* and construction of the CK2 α and CK2 β cDNAs. *Mar. Biotechnol.*, 13: 505-516.

IF₂₀₁₁: 2,587; MNiSW₂₀₁₁: 35; cytowań: 2

3. Kouyanou-Koutsoukou S, **Baier A**, Kolaiti R-M, Maniatopoulou E, Thanopoulou K, Szyszka R. (2011) Cloning and purification of Protein Kinase CK2 recombinant alpha and beta subunits from the Mediterranean fly *Ceratitis capitata*. Mol. Cell. Biochem., 356: 261-267.

IF₂₀₁₁: 1,896; MNiSW₂₀₁₁: 15; cytowań: 1

4. Janeczko M, Orzeszko A, Kazimierczuk Z, Szyszka R, **Baier A**. (2012) CK2 α and CK2 α' subunits differ in their sensitivity to 4,5,6,7-tetrabromo- and 4,5,6,7-tetraiodo-1*H*-benzimidazole derivatives. Eur. J. Med. Chem., 47: 345-350.

IF₂₀₁₂: 3,499; MNiSW₂₀₁₂: 35; cytowań: 1

5. Kouyanou-Koutsoukou S, **Baier A**, Kolaitis R-M, Szyszka R. (2012) Protein kinase CK2 from two higher eukaryotes of economical importance, the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the medfly *Ceratitis capitata*. Cent. Eur. J. Biol., 7: 185-191.

IF₂₀₁₂: 0,818; MNiSW₂₀₁₂: 20; cytowań: 0

6. Zhang N, Zhang P, **Baier A**, Cova L, Hosmane RS. (2014) Dual inhibition of HCV and HIV by ring-expanded nucleosides containing the 5:7-fused imidazo[4,5-*e*][1,3]diazepine ring system. *In vitro* results and implications. Bioorg. Med. Chem. Lett., 24: 1154-1157.

IF₂₀₁₃: 2,331; MNiSW₂₀₁₃: 25; cytowań: 0

Artykuł przeglądowy i rozdział:

1. **Baier A**. (2009) Inhibition of *Flaviviridae* replication complex: Assays to Investigate the Modulating Effect of Potential Compounds. Curr. Enz. Inh., 5: 209-222.

2. **Baier A**. Flaviviral Infections and Potential Targets for Antiviral Therapy. W: Flavivirus Encephalitis. (edytor: D. Ruzek), InTech, 2011, 89-104.

Sumaryczny impact factor: 13,735; MNiSW₂₀₁₃: 162

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Głównym celem badań jest charakterystyka potencjalnych celów terapii różnych chorób, jak infekcje wirusowe i rak.

Poszukiwanie nowych celów białkowych oraz aktywności enzymatycznych do terapii infekcji wirusowych i przeciwnowotworowych jest obiektem badań wielu naukowców na całym świecie. Takimi enzymami mogą być kinaza białkowa CK2 w przypadku leczenia nowotworów i aktywności NTPazy/helikazy *Flaviviridae* w przypadku zakażeń wirusowych. Obydwa enzymy mają jedną wspólną cechę: są zależne od ATP. Możliwym mechanizmem działania potencjalnych inhibitorów jest blokada miejsca wiążącego ATP, które jest różne dla obu enzymów.

Wirusy z rodziny *Flaviviridae* powodują infekcję ludzi i zwierząt. Rodzina ta jest podzielona na trzy rodzaje: flawiwirusów, hepaciwirusów i pestiwirusów. Jednym z najważniejszych jej przedstawicieli jest wirus zapalenia wątroby typu C należący do rodzaju hepaciwirus. Wirus ten występuje na całym świecie będąc przyczyną ponad 300 milionów infekcji.

W Polsce wirusem HCV zainfekowanych jest 1,9 % populacji (ponad 700 000 osób). Przewiduje się, że opóźnienie w zapobieganiu tej infekcji w krajach UE doprowadzi do wzrostu w kosztach leczenia o więcej niż miliard Euro rocznie (Wiessing i in., 2003). Najnowsze dostępne badania szacunkowe WHO dotyczące ilości zgonów sugerują, że co najmniej 500 000 zgonów rocznie spowodowane jest przez HCV.

W związku z naturą wirusa, który jest około 10-krotnie bardziej infekcyjny od HIV, istnieje duża ilość niezdiagnozowanych osobników. Z powodu wielu przypadków bezobjawowego przebiegu infekcji w okresie początkowym, wirus jest przenoszony przez zakażone osoby. W końcu lat 90 XX w. około 59-65 % przypadków zakażeń spowodowane było przez szpitalne procedury diagnostyczne

lub lecznicze. Po wprowadzeniu badań krwi i preparatów krwiopochodnych największym źródłem nowych infekcji HCV są iniekcje narkotyków stosowanych przeważnie przez młode osoby (częstotliwość występowania w Polsce 80-90%). Wzrastająca liczba zarejestrowanych infekcji w Polsce jest wsparty przez fakt występowania chronicznych zakażeń HCV u osób w wieku 45 lat nieświadomych choroby do czasu detekcji. Wzrost liczby nowych prognozowanych infekcji wśród młodych (w wieku pomiędzy 15 a 29 lat) w sposób zastraszający uświadamia o fakcie braku efektywnej terapii przeciwko HCV (Czarkowski, 2006). Wgląd w opublikowane dane Eurasian Harm Reduction Network pokazuje, że w Polsce wciąż pozostaje nie wykryte do 97 % infekcji HCV. Do dzisiaj nie ma skutecznej szczepionki przeciwko temu wirusowi.

Wirusy należące do rodzaju flawiwirusów są patogenami ludzkimi mogącymi być przyczyną piorunującej choroby krwotocznej (wirus dengi – DENV) i wirusowego zapalenia mózgu (wirus japońskiego zapalenia mózgu – JEV, wirus zachodniego Nilu – WNV). Trzeci rodzaj *Flaviviridae* są zwierzęcymi wirusami patogennymi, np. klasyczny pomór świń, wirusowa biegunka bydła i wirus choroby granicznej. U zwierząt zainfekowanych tymi wirusami obserwuje się rozwój ciężkich chorób często zakończonych ich śmiercią. *Flaviviridae* są małymi wirusami otoczkowymi o genomie złożonym z dodatniego ssRNA. Pojedyncza ramka odczytu jest otoczona przez zlokalizowane na końcach 5'- i 3'- obszary nieulegające translacji. Kodowana przez genom poliproteina składająca się z 3000 do 3500 aminokwasów jest rozcinana proteolitycznie na białka strukturalne i niestrukturalne. Wiele zespołów badawczych przyjęło odmienne strategie do zahamowania replikacji wirusa. Jednym z potencjalnych celów są aktywności NTPazy i helikazy zasocjowane z niestrukturalnym białkiem NS3.

NTPaza/helikaza rozplata helisę RNA i DNA poprzez rozerwanie wiązań wodorowych łączących dwie nici. Enzym składa się z trzech domen o podobnej wielkości (1, 2 i 3) oddzielonych głębokimi szczelinami i połączonych elastycznymi odcinkami aminokwasowymi zwanymi regionami zawiasu. NTPazy/helikazy są enzymami wiążącymi i wykorzystującymi trifosfonukleotydy (NTP). Interakcja z nukleotydem może zachodzić dzięki dobrze scharakteryzowanej kieszeni wiążącej, wykrytej dzięki obecności bardzo konserwatywnych motywów Walker'a A i B. Motywy te składają się z krótkich sekwencji aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie i hydrolizę grup β - oraz γ -fosforanowych NTP. Innym ważnym elementem, zwanym motywem VI, jest segment bogaty w Arg zlokalizowany pomiędzy aminokwasami 1487 i 1500 poliproteiny HCV. Badania krystalograficzne pozwalają przypuszczać, że motyw ten odgrywa kluczową rolę w wiązaniu RNA i DNA. Inne badania krystalograficzne i modelowanie molekularne mocno sugerują jego udział w wiązaniu NTP do NTPazy/helikazy i/lub w stabilizacji tego wiązania.

W roku 2007 po ukończeniu doktoratu kontynuowałam badania naukowe nad inhibitorami wirusów z rodziny *Flaviviridae*. Badaniami inhibitorów objęto NTPazy/helikazy czterech *Flaviviridae*, w tym WNV, JEV, DENV i HCV.

Enzymy HCV, JEV i DENV użyte w badaniach uzyskano drogą ekspresji w *E. coli* BL21(DE3)trxB jako białka fuzyjne z tagiem His poprzez dodanie induktora 0,5 mM IPTG (izopropylu β -D-1-tiogalaktopyranozydu) oraz 4 godzinny wzrost hodowli w temp. 37 °C, po której komórki odwirowywano. Białka oczyszczano do stanu homogenności z zastosowaniem dwuetapowej procedury oczyszczania z zastosowaniem chromatografii powinowactwa na Ni- lub Co-NTA agarozie i chromatografii sitowej na Superdex G-200. Źródłem NTPazy/helikazy z WNV było medium komórek Vero E6 zainfekowane wirusem. Po oczyszczeniu na agarozie

Reactive Red 120 i żelu Superdex G-200 otrzymano homogeny enzym. Jako substratów używano dwóch zhybrydowanych oligonukleotydów RNA lub DNA tworzących częściowo nić podwójną. Krótszy oligonukleotyd (26-mer) był znakowany radioaktywnie z zastosowaniem kinazy polinukleotydowej T4 i mieszany z dłuższym oligonukleotydem w celu hybrydacji.

Z uzyskanych wcześniej wyników wiadomo było, że cząsteczki imitujące ATP lub adenozyne jak również pochodne analogów guanozyny hamują aktywność helikazy wirusa zapalenia wątroby typu C i wirusa zachodniego Nilu. Serię inhibitorów badałam we współpracy z Zakładem Chemii i Biochemii Uniwersytetu w Maryland Baltimore County. W pierwszych badaniach testowałam 15 analogów AICAR (5-amino-1- β -D-rybofuranosyl-imidazol-4-karboksyamid) na ich efekt inhibitorowy względem helikaz *Flaviviridae* (Ujjinamatada i in., 2007; załącznik 3, I.B.1). AICAR jest analogiem nukleozydów purynowych i wnika do komórek serca gdzie hamuje aktywność kinazy i deaminazy adenozyne. Jeden z tych związków (4-karbamoylo-5-(4,6-diamino-2,5-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)imidazol-1- β -D-ribofuranosydu) wykazywał wysoki potencjał inhibitorowy względem aktywności WNV i HCV rozplatających substratowy DNA. Badanie zdolności tego analogu nukleotydowego do hamowania aktywności NTPazy/helikazy w przypadku substratu RNA dało wynik negatywny. Aby zrozumieć to zjawisko analizowano potencjalną interakcję pomiędzy inhibitorem a substratem. W tym celu substrat i inhibitor inkubowano łącznie a następnie poddawano separacji na żelu poliakrylamidowym. Badane próbki jak i kontrole migrowały w żelu identycznie co wskazuje na brak silnych wiązań pomiędzy nimi.

W kolejnych badaniach nad inhibitorami replikacji HCV testowano nowe analogi nukleotydów o powiększonym pierścieniu (REN) (Zhang i in., 2014; załącznik 3, I.B.6). Użyte związki były wcześniej testowane jako inhibitory replikacji ludzkiego

wirusa niedoboru odporności (HIV) i helikazy WNV. Badano wpływ na aktywność helikazy HCV dla 11 z nich. Wcześniej odnotowano, że podobne związki posiadają aktywność antyhelikalną ale nie wykazują hamującego wpływu na mitochondrialną helikazę ludzką Suv3 (Zhang i in., 2003). Badania takie zostały włączone do doświadczeń w celu oszacowania selektywności i toksyczności tych związków. Można było zaobserwować, że dwa z badanych związków znacząco redukowało aktywność rozplatającą katalizowaną przez helikazę HCV. Wszystkie pozostałe związki nie wykazują aktywności nawet w wysokich stężeniach. Obydwa związki aktywne posiadają jedną bardzo charakterystyczną cechę, długi alkilowy łańcuch przyłączony w pozycji 6. W pierwszych badaniach przeprowadzonych z REN jako inhibitorami helikaz zaobserwowano podobnie, iż cząsteczki z dłuższymi łańcuchami bocznymi są silniejszymi inhibitorami.

Szacunkowo corocznie rejestruje się do 200 milionów nowych przypadków infekcji spowodowanych przez wirusy rodziny *Flaviviridae* takich jak wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus Zachodniego Nilu (WNV), wirus dengi (DENV) i wirus japońskiego zapalenia mózgu (JEV).

W artykule przeglądowym przedyskutowano i porównano stosowane w ostatnim czasie metody poszukiwań inhibitorów kompleksu replikacyjnego *Flaviviridae* (Baier, 2009; załącznik 3, I.B.2). Do dzisiaj nie ma efektywnej metody terapii antywirusowej skierowanej przeciwko wirusom *Flaviviridae*. Dla replikacji wszystkich wirusów niezbędna jest prawidłowa funkcja białek niestrukturalnych. Blokada ich aktywności prowadzi do zahamowania propagacji wirusów. Z tego powodu, aktywności trójfosfatazy nukleotydowej (NTPaza) jak i helikazy białka NS3 i zależna od RNA polimeraza RNA (RdRp) białka NS5 (lub NS5B) wydają się być niezwykle atrakcyjnymi celami dla związków antywirusowych. W związku z tym niezbędne jest systematyczne sprawdzenie bibliotek związków chemicznych i

analiza komputerowa która doprowadzi do opracowania efektywnych inhibitorów kompleksu replikacyjnego *Flaviviridae*.

W tej pracy przeglądowej podsumowano i przedyskutowano najskuteczniejsze metody bazujące na różnych technikach oznaczenia ilościowego aktywności enzymatycznych z zastosowaniem radioizotopów, fluorescencji, kolorymetrii jak również sprzęgnięte z inną reakcją enzymatyczną. Metody te mogą służyć jako punkt wyjścia do stworzenia systemów o wysokiej wydajności (HTS) pozwalających na wydajniejsze metody skriningu.

Chociaż wiele związków jest stosowane przeciwko infekcji *Flaviviridae*, prawie w każdym przypadku mechanizm ich działania pozostaje nieznany. W ostatnich latach włożono wiele wysiłku w poszukiwanie obiecujących inhibitorów przeciwko infekcji *Flaviviridae* czego rezultatem było skierowanie do prób klinicznych kilku z nich. Jak pokazano w pracy istnieje szereg testów do badania aktywności enzymatycznych kompleksu replikacyjnego. Każdy z nich ma zalety ale z drugiej strony i wady. W niektórych przypadkach różnią się one ekstremalnie wiarygodnością, czułością, kosztami i praktycznością zastosowania. Przyczyną problemów związanych z opracowywaniem związków antywirusowych jest złożona struktura systemu replikacyjnego jak również wzajemna zależność enzymów.

Celem jest opracowanie prostych w zastosowaniu testów enzymatycznych i nie wymagających kosztownego wyposażenia. Do uzyskania prostego i bezpiecznego do zastosowania testu przystosowano kilka metod. Pochodne fluoroscencyjne mogą mieć wpływ na aktywność helikazową i nie mogą być stosowane w każdym przypadku. W podstawowych testach helikazowych z użyciem radioizotopów, elektrochemiluminescencji i testu ELISA mierzony jest tylko jeden parameter. W wielu przypadkach wymagane jest posiadanie kosztownego wyposażenia i środków bezpieczeństwa. Było by ciekawe porównać efekt inhibitorowy uzyskany

dla kilku substancji przy użyciu różnych metod. Tylko kilka doniesień pokazuje testowanie tych samych substancji przy użyciu różnych metod. Niestety w tych przypadkach efekt hamujący był różny. Uzyskiwane wyniki wskazują na potrzebę opracowania bardziej miarodajnych metod.

W rozdziale książkowym opisano cykl replikacyjny flawiwirusów oraz potencjalne cele inhibitorów dla terapii antywirusowej (Baier, 2011; załącznik 3, I.B.3). Ten rodzaj składa się z ponad 70 gatunków, które na podstawie filogenetycznych analiz podzielone są na 14 klas zgrupowanych w trzy gromady: przenoszoną przez komary, kleszcze i nieznane. Wszystkie wirusy groźne dla ludzi należą do gromad przenoszonych przez komary i kleszcze, i mogą być przyczyną ciężkiego, szybko postępującej choroby krwotocznej i wirusowego zapalenia mózgu. Do dzisiaj nie ma efektywnej terapii antywirusowej skierowanej przeciwko wirusom *Flaviviridae*.

Pośród wirusów rodziny *Flaviviridae* replikacja genomowa zachodzi w podobny sposób. Po związaniu do komórki przez specyficzne receptory i wniknięciu wirusa w procesie endocytozy zależnej od receptora, wirusowy RNA jest rozpakowywany poprzez fuzję membran a w procesie zależnym od IRES- lub struktury kapu inicjowany jest proces translacji. Wirusowy RNA ulega translacji do pojedynczej wirusowej poliproteiny, która jest ko- i potranslacyjnie rozcinana przez proteazy wirusa i gospodarza. Synteza RNA zachodzi w zlokalizowanych w otocze jądrowej cytoplazmatycznych kompleksach replikacyjnych. Wszystkie białka niestrukturalne (NS) wydają się być zaangażowane w replikację RNA. Blokada ich aktywności prowadzi do zahamowania propagacji wirusa. Genomowy RNA jest zamknięty w białkowej powłoce zbudowanej z białek kapsydowych, otoczonej przez wirusowe białka powierzchniowe osadzone w membranach lipidowych pochodzenia komórkowego (złożenie wirusa). Cząsteczka wirusa pączkuje

poprzez membrany wewnątrzkomórkowe do pęcherzyków cytoplazmatycznych. Poprzez komórkowy szlak sekrecyjny cząsteczki wirusa transportowane są do membran komórkowych i ulegają procesowi dojrzewania. Uwolnienie wirusa do przestrzeni zewnątrzkomórkowej związane jest z fuzją pęcherzyka z membraną plazmatyczną. Każdy z tych etapów może być potencjalnym celem dla cząstek antywirusowych.

Podsumowane powyżej wyniki były opublikowane w:

Ujtinamatada RK, **Baier A**, Borowski P, Hosmane RS. (2007) An analogue of AICAR with dual inhibitory activity against WNV and HCV NTPase/helicase: synthesis and in vitro screening of 4-carbamoyl-5-(4,6-diamino-2,5-dihydro-1,3,5-triazin-2-yl)imidazole-1-beta-D-ribofuranoside. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17: 2285-2288.

Baier A. (2009) Inhibition of *Flaviviridae* replication complex: Assays to Investigate the Modulating Effect of Potential Compounds. *Curr. Enz. Inh.*, 5: 209-222.

Baier A. Flaviviral Infections and Potential Targets for Antiviral Therapy. W: *Flavivirus Encephalitis*. (Ed. D. Ruzek), InTech, 2011, 89-104.

Zhang N, Zhang P, **Baier A**, Cova L, Hosmane RS. (2014) Dual inhibition of HCV and HIV by ring-expanded nucleosides containing the 5:7-fused imidazo[4,5-e][1,3]diazepine ring system. *In vitro* results and implications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24: 1154-1157.

CK2 jest wszechobecną Ser/Thr kinazą białkową wykorzystującą jako donor fosforanu zarówno ATP jak i GTP. W niektórych przypadkach jest ona zdolna do fosforylacji reszt Tyr. Należy ona do najbardziej konserwatywnych ewolucyjnie kinaz białkowych. CK2 odgrywa kluczowe role w regulacji cyklu komórkowego, przetrwaniu komórki i apoptozie jak również w szeregu stanów patologicznych jak choroby nowotworowe i neurodegeneracyjne (choroby Alzheimerera i Parkinsona)

oraz infekcje wirusowe. CK2 jest jedną z najbardziej plejotropowych kinaz białkowych dla której znanych jest obecnie setki substratów białkowych. Skoro lista celów CK2 wciąż wzrasta staje się ewidentne, że posiada ona potencjał do udziału w regulacji fundamentalnych procesów komórkowych takich jak ekspresja genów, synteza białka, proliferacja i dyferencjacja/transformacja. W przeciwieństwie do większości kinaz białkowych, podjednostki katalityczne CK2 nigdy nie zostały stwierdzone w nieaktywnej konformacji z powodu swojej unikalnego ograniczenia intramolekularnego. Aktywność CK2 została stwierdzona w ekstraktach komórkowych i tkankowych nawet w nieobecności kofaktorów (np. wtórnych przekaźników) lub kiedy ulegnie ekspresji w bakterii. Fakty te prowadzą do ogólnego wniosku, iż CK2 jest nieregulowana i aktywna konstytutywnie. Jakkolwiek istnieją mechanizmy uczestniczące w regulacji CK2 w komórce. Obejmują one regulowaną ekspresję i składanie enzymu, regulację poprzez odwracalną fosforylację podjednostek regulatorowych β jak i podjednostki katalitycznej α , oraz interakcje regulatorowe. Taki brak ewidentnych regulacji inhibitorowych mogą odzwierciedlać plejotropię tego enzymu ale mogą także być odpowiedzialne za potencjał patogenny tej kinazy, której nienormalnie wysoka aktywność została powiązana z wieloma chorobami.

Typowa CK2 zbudowana jest z dimeru utworzonego przez podjednostki regulatorowe (β), do których są związane dwie podjednostki katalityczne (α). Z wielu badań wiadomo, że obydwie podjednostki występują w komórce także w formie monomerycznej. Ilość występujących podjednostek jest różny w różnych organizmach. Ludzka CK2 posiada trzy różne podjednostki katalityczne ale tylko jedną podjednostkę regulatorową. Z drugiej strony u roślin możemy znaleźć o wiele więcej izoform podjednostek α i β (Riera i in., 2001). W drożdżach występują

dwie podjednostki katalityczne i dwie regulatorowe. Ciekawe jest, że obydwie β i β' są niezbędne dla uformowania dimeru i finalnie holoenzymu (Kubiński i in., 2007). CK2 została zidentyfikowana u wielu organizmów, jak człowiek, ryby, owady i drożdże. Wcześniej nikt nie opisał kinazy białkowej CK2 u małży, jak omułek *Mytilus galloprovincialis*. Bardales i współpracownicy (Bardales i in., 2007) opisali aktywność fosforylującą nieoczyszczony ekstrakt z tkanki płaszczka *M. galloprovincialis* używającej GTP jako donora fosforanu i hamowanej przez selektywne inhibitory CK2 (emodynę i apigeninę). Z tego powodu we współpracy z Zakładem Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu w Atenach (the National and Kapodistrian University of Athens, Greece) prowadziliśmy badania podjednostki katalitycznej i regulatorowej CK2 z *M. galloprovincialis* (Kolaiti i in., 2011; załącznik 3, I.B.2). Do izolacji natywnej CK2 użyto tej samej strategii jaką wcześniej stosowano do oczyszczenia CK2 z *Saccharomyces cerevisiae* (Domańska i in., 2005). W pierwszym etapie, dezintegrowano i homogenizowano skrzela a uzyskany ekstrakt frakcji rozpuszczalnej nanoszono na kolumnę DEAE-celulozy. Białka eluowano buforem zawierającym rosnące stężenie NaCl. Punkt izoelektryczny (pI) drożdżowej podjednostki katalitycznej wynosi 8,8 i zawarta jest ona we frakcji niezwiązanej z nośnikiem (DE0). Holoenzym jest eluowany 0,5 M NaCl. W przypadku *M. galloprovincialis* aktywność enzymatyczna CK2 była wykryta zarówno we frakcji białek niezwiązanych jak i eluowanych przy stężeniu 350-400 mM NaCl (DE400). Obydwie frakcje były następnie oczyszczane na P-celulozie i białko eluowano gradientem aż do 1M NaCl. Frakcje analizowano ponownie na zawartość aktywności fosfotransferazowej. Dla uzyskania najwyższej czystości frakcje zawierające aktywność CK2 oczyszczano na heparyno-agarozie. Finalnie w oczyszczanych frakcjach białkowych identyfikowano obecność kinazy białkowej CK2 stosując specyficzne przeciwciała anti-CK2 α . Następnie obydwie

próbki kinazowe (DE0 i DE400) charakteryzowano enzymatycznie. Aby osiągnąć ten cel użyto znanych modulatorów aktywności CK2 jak: GTP, 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzimidazol (TBBz), 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazol (TBBt), heparynę i NaCl. CK2 należy do nielicznych kinaz białkowych zdolnych do wykorzystywania GTP jako kosubstrat. Podwyższanie stężenia GTP prowadzi do obniżenia transferu znakowanego radioaktywnie gamma fosforanu z cząsteczki ATP. Kompetytywny efekt działania GTP był wyższy w przypadku holoenzymu (DE400/PC700) niż w stosunku do wolnej podjednostki katalitycznej (DE0/PC500). W obecności 100 mM NaCl aktywność CK2 α była hamowana o 70 %, podczas kiedy aktywność holoenzymu ulegała stymulacji. Taki efekt znany jest dla innych CK2 jak ludzka czy enzym z kielków kukurydzy. Badano też wpływ hamujący selektywnych inhibitorów CK2 TBBz i TBBt. Uzyskane wyniki potwierdziły poprzednie badania z innymi kinazami gdzie obydwa inhibitory wykazują wysoką aktywność w stosunku do obydwu form molekularnych enzymu. Kolejnym testem potwierdzającym obecność CK2 u *M. galloprovincialis* była reakcja kinazowa w żelu. Żel poliakrylamidowy z SDS (SDS/PAGE) jest polimeryzowany z dodatkiem substratu białkowego (w tym przypadku użyto kwaśnego białka rybosomowego P2B drożdży). Stwierdzono, że tylko CK2 fosforyluje kwaśne białka rybosomowe. Po rozdziale elektroforetycznym, renaturacji kinazy i reakcji fosforylacji z wykorzystaniem znakowanego radioaktywnie ATP, za pomocą autoradiografii został zlokalizowany prążek białkowy o masie około 41 kDa odpowiadającej podjednostce katalitycznej kinazy. W następnym etapie na podstawie znanych konserwatywnych motywów obecnych w podjednostkach α i β CK2 określono ich geny oraz wklonowano w wektor ekspresyjny pRSET w celu przeprowadzenia dalszych badań.

W celu uzyskania najwyższego poziomu nadekspresji obydwu podjednostek badano różne szczepy *E. coli* stosując zmienne warunki wzrostu kultur: różną temperaturę i czas hodowli, zmienne stężenia induktora ekspresji – IPTG. Optymalnymi ustalonymi warunkami nadekspresji były: szczep *E. coli* BL21(DE3)trxB, temperatura 37°C, indukcja 0,3 mM IPTG a następnie 4 godzinna hodowla komórek.

Ceratitis capitata jest muszką owocową obszaru śródziemnomorskiego, która rozprzestrzeniła się inwazyjnie w wielu częściach świata. Z powodu jej zdolności do powodowania znacznych szkód w uprawach owoców uważana jest za jedną z najważniejszych ekonomicznie gatunków muszki owocowej na świecie. Podobnie jak w przypadku CK2 α małża *M. galloprovincialis* sekwencja genu dla podjednostki katalitycznej *C. capitata* nie była znana. Dla jej uzyskania przyjęto podobną strategię klonowania. Startery zostały zaprojektowane w oparciu o wysoce konserwatywne sekwencje podjednostek CK2 α z innych organizmów eukariotycznych (Kouyanou-Koutsoukou i in., 2011; załącznik 3, I.B.3). Sekwencja podjednostki CK2 β została opublikowana wcześniej. Zaprojektowane zgodnie z pierwszymi i ostatnimi nukleotydami startery użyte zostały w standardowej procedurze PCR. Uzyskane plazmidy użyto do transformacji różnych szczepów *E. coli*. Podobnie jak dla *M. galloprovincialis* podjednostek CK2 poziom nadekspresji ustalano z zastosowaniem różnych szczepów bakteryjnych i w różnych warunkach hodowli. Optymalnymi ustalonymi warunkami nadekspresji były: szczep *E. coli* BL21(DE3)trxB, temperatura 37 °C, indukcja 0,3 mM IPTG a następnie 4 godzinna hodowla komórek.

Uzyskane białka rekombinowane były używane w dalszych badaniach porównujących kinazę z *M. galloprovincialis* i *C. capitata* z białkami z innych organizmów. Obecność podjednostki CK2 β prowadzi zwykle do wzrostu

aktywności fosforylacyjnej holoenzymu. Tak jest także w przypadku nowo zidentyfikowanych aktywności CK2 z *C. capitata* i *M. galloprovincialis*. Niższa wrażliwość podjednostki katalitycznej na NaCl w porównaniu do odpowiedniego holoenzymu była już opisywana dla wielu enzymów CK2. Może być to wyjaśnione poprzez funkcję ochronną podjednostki regulatorowej. W przypadku holoenzymu ludzkiego, kukurydzy lub małża obserwuje się ich aktywację przy niższych stężeniach soli. Inaczej jest w przypadku holoenzymu z *C. capitata* gdzie nie obserwowano takiego efektu. Porównano różnicę w optymalnej temperaturze reakcji pomiędzy CK2 ludzkim, małża i muszki. Podczas gdy dla ludzkiej CK2 optimum obserwowano dla 37 °C optima dla dwóch pozostałych enzymów wynosiły 25 °C i 18 °C, odpowiednio dla *C. capitata* i *M. galloprovincialis*. Jaki jest powód tych rozbieżności ciągle nie wiadomo.

Przewidywane sekwencje aminokwasowe podjednostek katalitycznych regulatorowych *M. galloprovincialis* i *C. capitata* wykazują wysoką konserwatywność charakterystyczną dla CK2. Porównanie sekwencji aminokwasowych wskazuje na 88 % identyczność i 94 % podobieństwo pomiędzy CK2 α ludzkim i muszki oraz 86 % identyczność oraz 91 % podobieństwo pomiędzy CK2 α ludzkim i małża. Podczas kiedy ludzka CK2 α składa się z 391 aminokwasów o ciężarze molekularnym około 45 kDa uzyskane sekwencje aminokwasowe CK2 α z *M. galloprovincialis* i *C. capitata* składają się odpowiednio tylko z 356 i 338 aminokwasów (Kouyanou-Koutsoukou i in., 2012; załącznik 3, I.B.6). Podjednostki CK2 β mają podobną wielkość do ludzkiej (215 aa) i składają się z 221 (*M. galloprovincialis*) i 215 (*C. capitata*) aminokwasów. Wartości pI podjednostek regulatorowych są na podobnym poziomie od 4,35 w przypadku *S. cerevisiae* i 5,30 dla *M. galloprovincialis* i *C. capitata*. Dla podjednostek

katalitycznych różnice w wartościach pI są o wiele wyższe, sięgające od 6,68 w przypadku *C. elegans* do 8,83 w przypadku *S. cerevisiae*.

Jak wspomniano wcześniej TBBt i TBBz należą do selektywnych inhibitorów CK2. Już w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia pochodna TBBz, 5,6–dichloro-1- β -D-rybofuranozylobenzimidazol (DRB), została opisana jako inhibitor CK2. Od tego czasu szereg grup badawczych poszukiwało nowych, silniejszych jego analogów i innych klas związków o działaniu inhibitorowym. W badaniach z 2011 roku (Janeczko i in., 2011; załącznik 3, II.B.2) opisano, że typowe modulatory CK2 wpływają w różnym stopniu na pięć izoform drożdżowej CK2. Zaskakująco obserwowano różny efekt nie tylko pomiędzy podjednostkami katalitycznymi i 3 formami holoenzymu ale także między dwoma podjednostkami katalitycznymi CK2 α i CK2 α' . Ponadto by zbadać specyficzność modulatorów w badania włączono cztery substraty *in vivo* z *S. cerevisiae*. W kolejnych badaniach (Janeczko i in., 2012; załącznik 3, I.B.4) testowano aktywność inhibitorową kilka pochodnych 4,5,6,7-tetrabromo- i 4,5,6,7-tetrajodo-1*H*-benzimidazolu w stosunku do ludzkich podjednostek katalitycznych CK2 α i CK2 α' . Do dzisiaj większość publikacji dotyczących inhibitorów CK2 nie rozgranicza pomiędzy dwoma podjednostkami katalitycznymi chociaż wiadomo, że spełniają one różne funkcje w komórce. Pamiętając wyniki uzyskane w poprzednich badaniach użyto dwa różne substraty białkowe: drożdżowe kwaśne białko rybosomowe P2B i syntetyczny peptyd RRRADDSDDDDD. Zwykle to aktywność CK2 α' była bardziej wrażliwa od CK2 α na działanie testowanych związków bromopochodnych. Wprowadzenie łańcuchów bocznych (CH_2CO_2H , $(CH_2)_2CO_2H$, $(CH_2)_3CO_2H$) w pozycji 2 prowadzi do 11-krotnego lub 6-krotnego wzrostu efektu inhibitorowego odpowiednio dla CK2 α' i CK2 α . Obserwowany efekt zależał także od użytego białka substratowego. Dodatkowa grupa metylowa podstawiona w pozycji 1 skutkowałą zmiennym

efektem. Podczas kiedy cząsteczka 5f (R1 - CH₃, R2 - (CH₂)₃CO₂H) wykazuje dużo słabsze właściwości inhibitorowe dla syntetycznego peptydu niż dla substratowego białka P2B, cząsteczka 5b (R1 - CH₃, R2 - CH₂CO₂H) wykazuje lepsze właściwości inhibitorowe kiedy substratem jest syntetyczny peptyd substratowy. Badania prowadzone wcześniej przez inny zespół badawczy z Włoch (Gianoncelli i in., 2009) wykazały, iż jodowane pochodne inhibitorów wykazują wyższą aktywność inhibitorową w stosunku do holoenzymu. Było więc ciekawe by sprawdzić czy prawidłowość ta jest słuszna dla obu podjednostek katalitycznych CK2 α i CK2 α' . I tak w przypadku 4,5,6,7-tetraiodo-1*H*-benzimidazolu, jodowanego analogu TBBz, cząsteczka zawierająca podstawnik karboksymetylowy w pozycji 1 (2e) posiada wyższą aktywność inhibitorową w stosunku do obu podjednostek katalitycznych niż jego bromowany analog. Inaczej, substytucja podstawnikiem S-karboksymetylowym w pozycji 2 (5g) wykazuje inny efekt. Ponadto, testowano inną grupę analogów TBBz. Znany inhibitorem CK2 jest DMAT, analog podstawiony w pozycji 2 grupą dimetyloaminy. Oceniono aktywność inhibitorową nowo zsyntetyzowanych cząsteczek podstawionych w pozycji 1 resztą: metylową (1Me-DMAT), karboksymetylową (2c) lub karboksypropylową (2d) i porównano z wartościami uzyskanymi dla DMAT i TBBz. Analiza tych wyników wskazuje, że pochodna karboksylowa DMAT wykazuje najlepszą aktywność inhibitorową spośród wszystkich badanych w tej pracy analogów TBBz. Kolejne podstawienia w pozycji 1 prowadzi do obniżenia aktywności inhibitorowej cząsteczek i wyższych wartości K_i niż dla cząsteczek o krótszym łańcuchu bocznym w pozycji 1. Analog DMAT podstawiony grupą karboksypropylową posiada wyższą aktywność inhibitorową niż analogiczna pochodna TBBz w stosunku do CK2 α' ale jest mniej efektywny w przypadku CK2 α .

Podsumowane powyżej wyniki były opublikowane w:

Kolaiti R-M, **Baier A**, Szyszka R, Kouyanou-Koutsoukou S. (2011) Isolation of a CK2 α subunit and the holoenzyme from *Mytilus galloprovincialis* and construction of the CK2 α and CK2 β cDNAs. Mar. Biotechnol., 13: 505-516.

Kouyanou-Koutsoukou S, **Baier A**, Kolaiti R-M, Maniatopoulou E, Thanopoulou K, Szyszka R. (2011) Cloning and purification of Protein Kinase CK2 recombinant alpha and beta subunits from the Mediterranean fly *Ceratitis capitata*. Mol. Cell. Biochem., 356: 261-267.

Kouyanou-Koutsoukou S, **Baier A**, Kolaitis R-M, Szyszka R. (2012) Protein kinase CK2 from two higher eukaryotes of economical importance, the mussel *Mytilus galloprovincialis* and the medfly *Ceratitis capitata*. Cent. Eur. J. Biol., 7: 185-191.

Janeczko M, Orzeszko A, Kazimierczuk Z, Szyszka R, **Baier A**. (2012) CK2 α and CK2 α' subunits differ in their sensitivity to 4,5,6,7-tetrabromo- and 4,5,6,7-tetraiodo-1*H*-benzimidazole derivatives. Eur. J. Med. Chem., 47: 345-350.

Bibliografia

Bardales JR, Hellman U, Villamarin JA. (2007) CK2-mediated phosphorylation of a type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the mollusk *Mytilus galloprovincialis*. Arch. Biochem. Biophys., 461: 130-137.

Czarkowski, M.P. (2006) Wirusowe zapalenie wątroby typu C w 2004 roku. Przegl. Epidemiol., 60: 481-486.

Domańska K, Zieliński R, Kubiński K, Sajnaga E, Masłyk M, Bretner M, Szyszka R. (2005) Protein kinase CK2 from *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Biochim. Polon., 52: 947-951.

Gianoncelli A, Cozza G, Orzeszko A, Meggio F, Kazimierczuk Z, Pinna LA. (2009) Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2. Bioorg. Med. Chem., 17: 7281-7288.

Kubiński K, Domańska K, Sajnaga E, Mazur E, Zieliński R, Szyszka R. (2007) Yeast holoenzyme of protein kinase CK2 requires both beta and beta' regulatory subunits for its activity. Mol. Cell. Biochem., 295: 229-236.

Janeczko M, Masłyk M, Szyszka R, Baier A. (2011) Interactions between subunits of protein kinase CK2 and their protein substrates influences its sensitivity to specific inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.*, 356: 121-126

Riera M, Peracchia G, de Nadal E, Ariño J, Pagès M. (2001) Maize protein kinase CK2: regulation and functionality of three beta regulatory subunits. *Plant J.*, 25: 365-374.

Wiessing L, Hedrich D, Taylor C, Griffiths P. (2003) Hepatitis C: a hidden epidemic. *EMCDDA Drugs in Focus*, 11.

Zhang N, Chen HM, Koch V, Schmitz H, Minczuk M, Stępień P, Fattom AI, Naso RB, Kalicharran K, Borowski P, Hosmane RS. (2003) Potent inhibition of NTPase/helicase of the west Nile virus by ring-expanded ("fat") nucleoside analogues. *J. Med. Chem.*, 46: 4776-4789.

Najważniejsze wyniki:

1. Rozwój nowej klasy inhibitorów NTPazy/helikazy HCV.
2. Identyfikacja inhibitorów HCV o wyższym wpływie na replikon HCV od standardowej terapii z zastosowaniem rybawiryny.
3. Klonowanie i charakterystyka nowych aktywności CK2 z małża *Mytilus galloprovincialis* i muszki owocowej *Ceratitis capitata*.
4. Rozwój nowych silnych inhibitorów ludzkiej kinazy białkowej CK2.
5. Podstawowe informacje dotyczące mechanizmu regulacji aktywności kinazy białkowej CK2 z różnych organizmów (człowieka, małża i muszki).

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

a) Dalsze badania nad hamowaniem helikazy HCV

W następnych doświadczeniach badano modulujący wpływ analogów UK-1 na aktywność helikazy i replikację wirusa zapalenia wątroby typu C (Ward i in., 2014; załącznik 3, II.B.5). UK-1 jest metabolitem *Streptomyces* nie posiadającym żadnej aktywności hamującej wzrost bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, drożdży lub grzybów. Ponadto posiada on szerokie spektrum antynowotworowe oraz zdolność do chelatowania magnezu i cynku. Ostatnia właściwość jest szczególnie interesująca w przypadku udoskonalenia ważnych terapeutycznie inhibitorów enzymów zależnych od Mg^{2+} przekształcających kwasy nukleinowe. Pierwotnie te cząsteczki były testowane w kierunku efektu inhibitorowego na integrację HIV-1 odpowiedzialnej za inkorporację wirusowego DNA do genomu gospodarza. Żadna z tych cząsteczek nie wykazywała potencjalnej aktywności hamującej replikację HIV. Następnym celem była aktywność helikazowa niektórych wirusów *Flaviviridae*, która jest także zależna od jonów Mg^{2+} . UK-1 i większość analogów okazała się nieskuteczna w hamowaniu aktywności helikazy NS3 z HCV, WNV, JEV i DENV w niskich stężeniach mikromolarnych. Dwie z badanych cząsteczek hamowały aktywność helikazy HCV wykazując jednocześnie niższą toksyczność niż substancje nieaktywne. Wyniki te sprawiły, że cząsteczki te przetestowano w systemie replikonu na ich zdolność do zahamowania replikacji wirusa. Wszystkie testowane cząsteczki znacząco lepiej hamowały replikację niż aktywność helikazy. Wszystkie badane cząsteczki nie wpływały na inne enzymy docelowe takie jak aktywność NTPazy NS3 i zależnej od RNA polimerazy RNA NS5B.

Oprócz związków chemicznych także peptydy są potencjalnymi kandydatami na inhibitory replikacji wirusowej. W przypadku *Flaviviridae* peptydy są znanymi inhibitorami aktywności proteazy serynowej NS2 i proteazy podobnej do

chymotrypsyny NS3. W tym przypadku zastosowano trzy zestawy 5 peptydów odtwarzających motyw VI NTPazy/helikazy z HCV, WNV i JEV w dwóch wersjach skróconej i wydłużonej (Borowski i in., 2008; załącznik 3, II.B.2). Aktywność rozplatająca NTPazy/helikazy HCV była analizowana w obecności każdego z nich. Porównanie uzyskanych wyników wykazało, że 14 aminokwasowy peptyd o sekwencji zgodnej z motywem VI NTPazy/helikazy HCV (RRGRTGRGRRGIYR) jest najsilniejszym inhibitorem, który przy stężeniu 0,2 μ M hamuje 50 % enzymu (wartość IC_{50}). Peptydy zawierające dodatkowe aminokwasy lub peptydy krótsze od motywu VI wykazywały znacząco słabszy efekt hamujący. Peptyd o przypadkowej sekwencji hamował aktywność helikazy w stopniu marginalnym. Analogiczne peptydy pochodzące z motywu VI WNV i JEV były słabymi inhibitorami o prawie 1000-krotnie wyższych wartościach IC_{50} . Podkreśla to, że peptydy o sekwencji i długości dokładnie korespondującej z motywem VI cząsteczki NTPazy/helikazy są niezbędne do hamowania. Motyw VI NTPazy/helikazy HCV zawiera więcej reszt Arg niż peptydy pochodzące z WNV lub JEV co powoduje ich wyższą hydrofobowość. Wszystkie peptydy były następnie badane na aktywność inhibitorową skierowaną przeciwko helikazom JEV i WNV. Niespodziewanie obydwie enzymy były dużo słabiej hamowane przez badane peptydy niż aktywność helikazy HCV. Podobnie jak w przypadku enzymu z HCV 14 aminokwasowy peptyd wywierał najsilniejszy efekt na obydwie flawiwirusowe helikazy wykazując wartości IC_{50} równe 2,7 i 21,1 μ M odpowiednio dla aktywności helikaz z WNV i JEV. Ponieważ motyw VI zaangażowany jest w wiązanie ATP badano wpływ peptydów na aktywność NTPazy. Niezależnie od modyfikacji warunków reakcji takich jak różne stężenia ATP czy preinkubacja enzymu z peptydem nie obserwowano wpływu inhibitorowego. W kolejnych badaniach wykonanych przez Gozdek i in. (Gozdek A, Zhukov I, Polkowska A,

Poznański J, Stankiewicz-Drogon A, Pawłowicz JM, Zagórski-Ostoja W, Borowski P, Boguszevska-Chachulska AM. (2008) Antimicrob. Agents Chemother., 52: 393-401) pokazano, że peptyd oplatą domenę 1 i wypełnia szczelinę pomiędzy domenami 1 i 2 jak również pomiędzy domenami 1 i 3.

b) Hamowanie kinazy białkowej typu C (PKC) jako cel w terapii antynowotworowej

Innym tematem moich prac badawczych jest interakcja niestrukturalnego białka 3 wirusa zapalenia wątroby typu C i kinazy białkowej PKC. Ta kinaza białkowa zbudowana jest z dwóch strukturalnych subdomen różniących się pełnioną funkcją: domeną regulatorową zlokalizowaną na końcu N i karboksyterminalną subdomeną katalityczną. Subdomena katalityczna zawiera krótki motyw bogaty w reszty argininy zwany pseudosubstratową domeną autoinhibitorową, poza tym miejsca wiązania dla aktywatorów allosterycznych takich jak fosfatydyloseryna (PS), diacyloglicerol (DAG) lub 12-O-tetradekanoylforbol-13-octan (TPA) i Ca^{2+} . Jest wiadomo, że syntetyczne peptydy reprodukcujące sekwencję aminokwasową pseudosubstratowej domeny autoinhibitorowej, zwanej pseudosubstratami, jak np. peptyd PKC-(19-31), hamują kompetytywnie aktywność enzymatyczną PKC. Konstelacja zasadowych (arginina i lizyna) i hydrofobowych (leucyna, izoleucyna i walina) aminokwasów determinuje specyficzność rozpoznawania i wiązania substratów a także reguluje aktywność enzymatyczną poprzez pseudosubstratową domeną autoinhibitorową (autoregulacja). Dlatego obecność białek wirusowych posiadających sekwencje bogate w argininę – podobne do sekwencji istotnych – może prowadzić do zakłócenia równowagi pomiędzy receptorami komórkowymi i kinazami białkowymi.

We wcześniejszych eksperymentach wykazano, że HCV NS3 hamuje funkcje PKC takie jak aktywność katalityczna, translokacja enzymu pomiędzy kompartmentami komórkowymi i asocjacja ze specyficznymi receptorami PKC. Opisany wcześniej bogaty w Arg motyw VI NTPazy/helikazy HCV bardzo przypomina domenę autoinhibitorową PKC i hamuje kompetytywnie aktywność PKC. Orientacja bogatego w Arg motywu VI NTPazy/helikazy i jego dostępność dla PKC może zależeć od różnych czynników takich jak wiązanie substratu polinukleotydowego i orientacja elastycznej pętli utworzonej przez aminokwasy 1458-1476. Dla określenia funkcji tej pętli skonstruowano mutant delecyjny domeny 2. Delecja aminokwasów 1458-1476 prowadzi do znaczących różnic pomiędzy konstruktami względem interakcji z dsRNA, stopnia i sposobu inhibicji PKC a także kompetycji PKC i dsRNA w wiązaniu motywu bogatego w Arg. Interakcja pomiędzy HCV NS3 i PKC następowała jedynie z jedną trzecią fragmentu NTPazy/helikazy (domena 2) zawierającego motyw VI, który jest nieaktywny katalitycznie. Nie musi to znaleźć dokładnego odbicia w warunkach *in vivo*. Ponadto okazało się niezbędne by sprawdzić czy cała domena NTPazy/helikazy NS3 może hamować PKC niezależnie od swej aktywności NTPazy. Aby to osiągnąć badano dwa fragmenty NS3. Pierwszy z nich jest w pełni katalitycznie aktywnym białkiem HCV NS3 podczas kiedy drugi zawiera mutację punktową D1316A prowadzącą do utraty aktywności ATPazy. Wyniki potwierdziły wcześniejsze doświadczenia z mniejszymi nefizjologicznymi fragmentami NS3. Ponadto określono specyficzność względem izoenzymów PKC oraz sposób hamowania PKC modulowany przez NS3 NTPazę/helikazę. Wykazano, że wszystkie izoformy PKC są hamowane przy niskich mikromolarnych wartościach IC_{50} przez NS3 niezależnie od aktywności NTPazy NS3. Te wyniki mogą mieć znaczenie fizjologiczne ponieważ członkowie rodziny PKC odgrywają ważną rolę w proliferacji komórek, apoptozie i przetrwaniu

komórek. Zaburzenie aktywności PKC może prowadzić do nowotworzenia. Jest możliwe, że regulowana przez NS3 inhibicja PKC jest zaangażowana w patogenezę molekularną infekcji HCV, szczególnie w rozwój zasocjowanego z HCV raka wątrobowo komórkowego.

W innych badaniach znane inhibitory CK2 analizowano pod względem ich wpływu na aktywność 11 izoform PKC. Badania obejmowały około 50 pochodnych benzotriazolu i benzimidazolu. Obserwowano zależne od izoform różnice we wpływie tych substancji ale w tym samym czasie objawiły się podobieństwa w każdej z klas PKC (klasycznej, nowej i nietypowej). Fakt ten może być ważny dla przyszłego projektowania skutecznych inhibitorów. Chociaż wszystkie izoformy PKC posiadają podobną strukturę, to różnią się w swojej wrażliwości na aktywatory allosteryczne, powinowactwo substratowe jak też jako cel translokacji w kompartmentach komórkowych. W każdym rodzaju tkanek i komórek ekspresji ulega indywidualny zestaw izoform. Dlatego należy wziąć pod rozwagę, że izoformy różnią się pod względem kontroli w czasie wzrostu komórek i innych procesach biologicznych.

Uzyskane wyniki opublikowane zostały w recenzowanych czasopismach:

1. Ward DN, Talley DC, Tavag M, Menji S, Schaughency P, **Baier A**, Smith PJ. (2014) UK-1 and structural analogs are potent inhibitors of hepatitis C virus replication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24: 609-612.

IF₂₀₁₃: 2.331; MNiSW₂₀₁₃: 25

2. Borowski P, Heising M, Baretto Miranda I, Liao C-L, Choe J, **Baier A**. (2008) Viral NS3 helicase activity is inhibited by peptides reproducing the Arg-rich conserved motif of the enzyme (motif VI). *Biochem. Pharm.*, 76: 28-38.

IF₂₀₀₈: 4,838; MNiSW₂₀₀₈: 32

3. Hartjen P, Medom BK, Reinholz M, Borowski P, **Baier A.** (2009) Regulation of the biochemical function of motif VI of HCV NTPase/helicase by the conserved Phe-loop. *Biochimie*, 91: 252-260.

IF₂₀₀₉: 3,897; MNiSW₂₀₀₈: 27

4. Hartjen P, Höchst B, Heim D, von der Kammer H, Lucke J, Reinholz M, **Baier A**, Smeets R, Wege H, Borowski P, Schulze Zur Wiesch J. (2013) The NTPase/helicase domain of hepatitis C virus nonstructural protein 3 inhibits protein kinase C independently of its NTPase activity. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 18: 447-458.

IF₂₀₁₃: 1,953; MNiSW₂₀₀₈: 15

Ponadto jestem autorką 7 rozdziałów książkowych (3 w języku polskim, 3 w języku angielskim), 1 pracy przeglądowej i 1 publikacji recenzowanej. Wygłaszałam 4 referaty na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Ponadto przedstawiałam wyniki w postaci 17 doniesień posterowych (załącznik 3).

Tabela 2. Zestawienie pozostałych osiągnięć naukowych po uzyskaniu doktoratu

	Język		Impact Factor	Punkty MNiSW	Cytowań
	angielski	polski			
Publikacje w czasopismach posiadające IF	5	-	14,915	114	14
Publikacje w innych czasopismach recenzowanych	-	-	-	-	-
Rozdziały w książkach	3	3	-	-	-
Komunikaty konferencyjne	10				
Łącznie	18	3	14,915	114	14

7. Dalsze plany naukowe

We współpracy z prof. Paulem Smith'em z Uniwersytetu Maryland w Baltimore County będziemy badać nowe inhibitory NTPazy/helikazy HCV i aktywności proteazowych i określać ich mechanizm działania.

W najbliższej przyszłości planuję określić powód różnic w efekcie inhibitorowym niektórych benzimidazoli i naturalnych inhibitorów izolowanych z roślin skierowanych przeciwko aktywności enzymatycznym CK2 α i CK2 α' . Może to dopomóc w znalezieniu specyficznych i silnych inhibitorów.

Ponadto różnice w mechanizmie regulacji aktywności CK2 różnych organizmów, szczególnie efekt temperaturowy w stosunku do aktywności enzymu może być punktem startu w wynalezieniu nowych silnych inhibitorów CK2. Dla osiągnięcia tego celu porównanie sekwencji aminokwasowej CK2 α ludzkiej, małża i muszki oraz analizy mutacji punktowych są planowane do zidentyfikowania sekwencji odpowiedzialnych za różnice w profilach zależności temperaturowej enzymu.

Interakcja kinazy białkowej PKC i HCV wydaje się odgrywać ważną rolę w rozwoju raka wątrobowokomórkowego będącego skutkiem zakażenia HCV. Jego mechanizm wciąż pozostaje nieznanym.

