

STRESZCZENIE PRACY

Kinazy białkowe kodowane są przez 1,7% ludzkich genów tym samym stanowią jedną z największych nadrodzin homologicznych białek. W obrębie tej rodziny występuje ponad setka białek o poznanej strukturze, jednak wiele pozostałych kinaz nadal oczekuje na charakterystykę strukturalną. Do tej pory udało się scharakteryzować pod względem funkcjonalnym ponad 500 różnych kinaz białkowych, których wzajemne oddziaływania tworzą skomplikowane systemy przekazywania sygnałów zarówno wewnątrz jak i zewnątrzkomórkowych. Pomimo różnorodności struktur, typów regulacji oraz specyficzności substratowej, pomiędzy kinazami występują podobieństwa strukturalne. Domeny katalityczne kinaz zbudowane są z około 250-300 reszt aminokwasowych, z kolei łańcuch polipeptydowy posiada charakterystyczną dwupłatową strukturę z łączącym płaty regionem zawiasowym.

Mechanizm działania kinaz polega na ataku nukleofilowym tlenu pochodzącego z grupy hydroksylowej reszt seryny/treoniny (kinazy serynowo/treoninowych), tyrozyny (kinazy tyrozynowe), kwasu asparaginowego/kwasu glutaminowego (kinazy asparaginianowo/glutaminianowe) w centrum aktywnym kinazy na γ -fosforan ATP (lub GTP). W przypadku kinaz histydynowych dochodzi do ataku nukleofilowego azotu pochodzącego z grupy imidazolowej reszty histydyny na γ -fosforan ATP (lub GTP), chociaż dokładny mechanizm działania tych kinaz nie został jak dotąd dobrze poznany.

Ścisła kontrola działania kinaz zapewnia wysoką specyficzność katalizowanych reakcji. Białka te odgrywają kluczową rolę w fundamentalnych procesach komórkowych takich jak: metabolizm, transkrypcja, cykl komórkowy, przebudowa cytoszkieletu, migracja, proliferacja i apoptoza. Wykazano, że nieprawidłowa fosforylacja białek może prowadzić do wielu chorób i zaburzeń takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroby sercowo-naczyniowe, zaburzenia immunologiczne i endokrynologiczne, choroby neurodegeneracyjne i nowotworowe. Z tych powodów kinazy stanowią interesujący obszar badań.

Jako jedną z przyczyn powstawania nowotworów wskazuje się nadekspresję oraz nadaktywność kinaz w komórkach. Nieprawidłowe działanie tych enzymów przyczynia się do niekontrolowanego wzrostu nowotworu i jego metastazy. Z powodu podobieństwa strukturalnego kinaz początkowo sądzono, że kinazy białkowe nie są dobrym celem terapii lekowych o potencjale klinicznym, jednak pogląd ten został stosunkowo szybko zweryfikowany. Pierwszym przykładem sukcesu terapeutycznego inhibitora kinaz było przeciwciało

g-h

monoklonalne trastuzumab (Herceptin®; Hoffmann La Roche Ltd, Basel, Switzerland), hamujące aktywność receptora ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2 (HER2). Wysokie koszty terapii przeciwnowotworowych bazujących na przeciwciałach monoklonalnych są jednak dużym ograniczeniem w ich dostępności dla pacjentów. Dlatego istotnym celem badań jest otrzymanie małowcząsteczkowych inhibitorów kinaz. Pierwszym komercyjnie dostępnym inhibitorem niskocząsteczkowym był STI-571 (Imatinib /Gleevec®). Inhibitor ten hamując aktywność kinaz tyrozynowych (m.in. kinazę BCR-Abl), powoduje zatrzymanie proliferacji komórek i nasilenie ich apoptozy. Od tamtego czasu inhibitory kinaz zajmują poczesne miejsce wśród terapii przeciwnowotworowych.

Modyfikacje znanych inhibitorów oraz komercyjnie dostępnych analogów ATP stanowią podstawę do inicjatyw badawczych mających na celu stworzenie nowych terapii celowanych. Racjonalne modyfikacje są jednak możliwe jedynie, gdy znane są podstawy strukturalne wiązania inhibitora. Głównymi celami tej pracy były – charakterystyka aktywności enzymatycznej kinazy MELK opartej o znany model oddziaływania tej kinazy ze specyficznymi inhibitorami oraz stworzenie podstaw do przyszłego rozwoju inhibitorów kinazy PIM1 poprzez jej krystalizację w kompleksach z nowymi niskocząsteczkowymi inhibitorami. Wszystkie związki użyte do badań są kompetytorami ATP zajmującymi tą samą kieszeń wiążącą.

Pierwszym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy jest kinaza MELK. Kinaza ta uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego, proliferacji komórek, apoptozie, splicingu RNA oraz w kontroli rozwoju embrionalnego. Ponadto, kinaza MELK bierze udział w wielu interakcjach białkowych, które wpływają na szereg etapów nowotworzenia. Kinaza MELK może regulować progresję komórek mitotycznych we wczesnych etapach embriogenezy, zarówno w somatycznych komórkach macierzystych, jak i w niektórych liniach komórkowych układu krwiotwórczego. Jako wynik badań prowadzonych w Pracowni Krystalografii Rentgenowskiej MCB UJ, których jestem współautorem z sukcesem udało się z opisać model wiązania inhibitora dorsomorfiny do kinazy MELK. Badania te ujawniły istotną rolę Cysteiny 89 w tworzeniu wiązania wodorowego z dorsomorfiną. W celu potwierdzenia tego założenia przeprowadzono szereg testów aktywności mutein kinazy MELK, zawierających punktowe mutacje w postaci substytucji wyżej wspomianej reszty Cysteiny 89. Mutacje w obrębie Cysteiny 89 doprowadziły do całkowitej lub częściowej utraty aktywności kinazy MELK potwierdzając tym samym jej istotną rolę w zachowaniu prawidłowej funkcji tej kinazy.

Drugim celem badań opisanych w tej pracy jest zaangażowana w procesy onkogenne ludzkich nowotworów kinaza serynowo/treoninowa PIM1. Nadekspresję tej kinazy wykryto między innymi w nowotworach układu krwiotwórczego (chłoniaki B-komórkowe, ostra białaczka szpikowa), układu pokarmowego (rak żołądka, rak trzustki), nowotworze prostaty i guzach litych (rak głowy, szyi i jamy ustnej). Białko to reguluje kilka szlaków krytycznych dla przeżycia komórek nowotworowych. Swoje funkcje pełni ono głównie poprzez regulację translacji, cyklu komórkowego, wzrostu komórek oraz wzmocnienie aktywności przeciwapoptotycznej. Z tego powodu nowe inhibitory kinazy PIM1 stanowią ważne wyzwanie dla współczesnego rynku farmaceutycznego i biotechnologicznego. W niniejszej pracy opisana jest struktura krystalograficzna kinazy PIM1 w kompleksie z trzema nowymi inhibitorami, wykazującymi różnice w budowie chemicznej rdzenia cząsteczki: AZD1208 z rdzeniem tiazolidyno-2,4-dionowym (TZD), Związek 29 będący pochodną 3,4,5,6-tetrahydro-2H-[1,4]bipirydynoamidem oraz inhibitorem SLV-1420 będącym pochodną pirazolo[3,4-b]pirydyny.

Wyniki badań prezentowanych w tej pracy zapewniają solidną bazę do optymalizacji niskocząsteczkowych związków, a tym samym mogą w przyszłości pozwolić na zaprojektowanie oraz otrzymanie nowych leków o wysokiej selektywności opierających się na inhibicji kinaz białkowych.

