



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Wydział Chemii  
Zakład Chemii Organicznej  
Grupa Biologii Chemicznej i Projektowania Leków

**Biofizyczna charakterystyka molekularnego mechanizmu  
nukleacji aktyny przez białko Spire i jego partnera  
forminę oraz odkrycie małocząsteczkowych sond  
chemicznych zaburzających interakcję Spire-FMN2**

**mgr inż. Radosław Kitel**

Promotor: **prof. dr Tadeusz Holak**

Kraków 2019

Cytoszkielek aktynowy zbudowany jest z długich włókien, których podstawowym elementem budulcowym jest aktyna. Podstawową rolą cytoszkieletu aktynowego jest nadawanie komórkom kształtu oraz umożliwienie im poruszania się. Stanowi on bardzo dynamiczną strukturę, która podlega ścisłej regulacji ze strony białek wiążących aktynę (ang. actin binding proteins, ABP). Białka te kontrolują procesy polimeryzacji i depolimeryzacji filamentów aktynowych w odpowiedzi na bodźce zarówno zewnątrzkomórkowe, jak i te pochodzące z wnętrza komórki. W ostatnich latach zidentyfikowano licznych przedstawicieli należących do rodziny białek wiążących aktynę, jednak wiedza na temat procesów molekularnych, które te białka regulują jest nadal bardzo ograniczona. W dużej mierze jest to spowodowane dynamiczną naturą opisywanych układów białek, która utrudnia dokładny opis zjawisk z wykorzystaniem dotychczas stosowanych metod badawczych (np. krystalografii rentgenowskiej).

Proces polimeryzacji aktyny i tworzenia filamentów aktynowych w komórkach wymaga w pierwszym etapie utworzenia tzw. zarodka (ang. nucleus), czyli struktury zbudowanej z trzech monomerów aktyny. Spontaniczne powstawanie zarodków aktyny, czyli nukleacja jest procesem niekorzystnym energetycznie ze względu na niestabilność dimerów i trimerów tego białka. Przewyciężenie bariery energetycznej tworzenia zarodka umożliwia rodzina białek wiążących aktynę, nazwana od roli, którą pełnią w komórkach nukleatorami aktyny. Wyróżnić można trzy podstawowe grupy nukleatorów aktyny: kompleks Arp2/3, forminy i białka zawierające domeny WH2. Do ostatniej podgrupy należy białko Spire, które charakteryzuje się obecnością czterech domen WH2, z których każda wiąże jeden monomer aktyny. O ile mechanizm molekularny nukleacji aktyny z udziałem formin i kompleksu Arp2/3 został w ostatnich latach szczegółowo opisany, o tyle wciąż niejasny pozostaje proces powstawania zarodków aktyny z udziałem białka Spire. Wyniki badań kilku niezależnych grup wskazują, że białko Spire może nie być wystarczającym czynnikiem zdolnym do tworzenia stabilnego zarodka aktyny, a jego aktywność może wymagać asysty ze strony białek należących do innych grup nukleatorów, takich jak forminy.

Niezależnie od mechanizmu działania, białka należące do rodziny nukleatorów aktyny pełnią istotną rolę także w stanach patologicznych. Zwiększona dynamika cytoszkieletu aktynowego będąca wynikiem nadekspresji nukleatorów aktyny leży u podstaw pobudzania ruchliwości komórek nowotworowych, co umożliwia tworzenie przerzutów.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie roli domen WH2 białka Spire w kontekście procesu nukleacji i polimeryzacji aktyny oraz identyfikacja inhibitorów zaburzających oddziaływanie pomiędzy białkiem Spire i forminą FMN2.

Tworzenie zarodków polimeryzacji w obecności białek należących do rodziny nukleatorów aktyny jest procesem szybkim, wymagającym zastosowania specjalnych technik umożliwiających prawidłowe opisanie zachodzących zjawisk. W niniejszej pracy zastosowano technikę mikroskopii fluorescencyjnej na poziomie pojedynczych cząsteczek z wykorzystaniem macierzy typu ZMW (ang. Zero Mode Waveguide). Macierze ZMW są obecnie jedynymi urządzeniami, które pozwalają na śledzenie procesów biologicznych od początkowych etapów. Ich zastosowanie wiąże się z koniecznością immobilizacji badanych białek na dnie studzienek macierzy. W tym celu konieczne było wprowadzenie do struktury białek cząsteczki destiobiotyny, co osiągnięto na drodze selektywnego znakowania białek na N-końcu z udziałem enzymu Sortaza A. Badania prowadzono z wykorzystaniem fragmentu białka Spire zawierającego cztery domeny WH2 i należącego do grupy formin fragmentu białka Cappuccino zawierającego dwie domeny FH2. Badania przeprowadzone w obecności białka Spire wskazują, że cztery domeny WH2 pomimo ich zdolności do wiązania monomerów aktyny nie są wystarczającym czynnikiem zdolnym do utworzenia stabilnego zarodka nukleacji. Odwrotnie, w przypadku białka Cappuccino obserwowano powstawanie filamentów aktynowych i obecność stabilnego zarodka nukleacji przez cały czas trwania eksperymentu, co potwierdziło aktywność nukleacyjną tego białka.

W drugiej części pracy podjęto próbę identyfikacji małowiązujących inhibitorów wykazujących zdolność do zaburzania oddziaływania pomiędzy białkiem Spire1 i forminą FMN2. Ten aspekt jest szczególnie istotny w świetle informacji, że białko Spire jest znajdowane w inwadosomach, tj. bogatych w filamenty aktynowe strukturach, które umożliwiają komórkom nowotworowym rozpoczęcie procesu przerzutowania. Ponieważ dotychczas nie są znane związki będące inhibitorami oddziaływania Spire1-FMN2, w niniejszej pracy zastosowano dwie odrębne ścieżki poszukiwania związków wykazujących taką aktywność.

W ramach pierwszego podejścia związki wyselekcjonowano wykorzystując techniki *in silico*. Dysponując wysokorozdzielczą strukturą krystalograficzną kompleksu Spire1-FMN2, zaprojektowano model farmakofora, który został następnie użyty do przeprowadzenia wirtualnego skriningu. Związki wyselekcjonowane w tym procesie zostały następnie zbadane pod kątem ich oddziaływania z białkiem Spire1 z wykorzystaniem metod biofizycznych; testu przesunięcia temperatury topnienia białka (ang. thermal shift assay, TSA) oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Badania potwierdziły zdolność wiązania jednego związku zawierającego ugrupowanie *1H*-indolu do białka Spire1. W celu znalezienia bardziej aktywnych związków pozyskano piętnaście dodatkowych analogów strukturalnych

zawierających rdzeń *IH*-indolu, jednak żaden ze związków nie wykazywał pożądanej aktywności. Ciekawym bym fakt, że jeden z nowo pozyskanych związków wykazywał wiązanie do białka Spire2.

W drugim podejściu zastosowano metodę projektowania inhibitorów z wykorzystaniem biblioteki związków o strukturze tzw. fragmentów. W pierwszym etapie, wykorzystując test przesunięcia temperatury topnienia białka wytypowano pięć fragmentów. W kolejnym etapie, wykorzystując spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego potwierdzono zdolność wiązania się do białka Spire1 dla trzech związków.

W ramach pracy doktorskiej podjęto również próby uzyskania struktur krystalograficznych kompleksów białek Spire wraz z odkrytymi inhibitorami. Poznanie modelu wiązania nowych związków pozwoliłoby na zaprojektowanie bardziej aktywnych pochodnych. Dotychczasowe próby nasączania uzyskanych kryształów białka Spire1 zakończyły się jednak niepowodzeniem.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej zostały przedyskutowane w kontekście danych literaturowych dotyczących badanych białek. Na tej podstawie zaproponowano model współdziałania białka Spire z forminą FMN2 w procesie nukleacji aktyny i tworzenia filamentów aktynowych.

Kolejnym istotnym wynikiem niniejszej pracy doktorskiej jest odkrycie małowcząsteczkowych związków wykazujących zdolność wiązania się do białka Spire. Pomimo tego, że odkryte związki mają charakter słabych inhibitorów, stanowią pierwsze związki mogące zaburzać powstawanie kompleksu pomiędzy Spire i forminą FMN2. Odpowiednia optymalizacja struktury zidentyfikowanych związków mogłaby skutkować w przyszłości uzyskaniem bardziej aktywnych związków, które będą mogły być użyte jako swoiste sondy chemiczne do badania roli kompleksu Spire1-FMN2 na poziomie komórkowym.

Przedstawiona praca doktorska przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat molekularnego mechanizmu działania białka Spire oraz dostarczyła pionierskich informacji na temat uwarunkowań strukturalnych związków wykazujących zdolność do wiązania się z białkiem Spire.

### Dorobek naukowy:

1. Crevenna, A.H., Hoyer, M., **Kitel, R.**, Willems, K., Correia, J.R.C., Quezada, A.G., Czub, M., Dubin, G., Holak, T.A., Lamb, D.C., *Dimer arrangement and monomer flattening determine gelsolin-mediated actin filament formation*, Sci. Adv. (w rewizji), (**IF<sub>5</sub> = 11.51**)
2. Byczek-Wyrostek, A., **Kitel, R.**, Rumak, K., Skonieczna, M., Kasprzycka, A., Walczak, K., *Simple 2(5H)-furanone derivatives with selective cytotoxicity towards non-small cell lung cancer cell line A549 - Synthesis, structure-activity relationship and biological evaluation*. Eur. J. Med. Chem. 2018; 150, 687-697, (**IF<sub>5</sub> = 4.53**)
3. Stach, N., Kalińska, M., Zdżalik, M., **Kitel, R.**, Karim, A., Serwin, K., Rut, W., Larsen, K., Jabaiah, A., Firlej, M., Władyka, B., Daugherty, P., Stennicke, H., Drąg, M., Potempa, J., Dubin, G., *Unique Substrate Specificity of SplE Serine Protease from Staphylococcus aureus*. Structure 2018; 26, 572-579, (**IF<sub>5</sub> = 5.03**)
4. Żak, K.M., **Kitel, R.**, Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., Holak, T.A., *Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1*. Structure 2015; 23, 2341-2348, (**IF<sub>5</sub> = 5.03**)
5. Szeja, W., Gryniewicz, G., Bieg, T., Świerk, P., Byczek, A., Papaj, K., **Kitel, R.**, Rusin, A. *Synthesis and cytotoxicity of 2,3-enopyranosyl C-linked conjugates of genistein*. Molecules 2014; 19, 7072-93, (**IF<sub>5</sub> = 3.27**)
6. **Kitel, R.** Czarnecka, J., Rusin, A. *Trójwymiarowe hodowle komórek – zastosowania w badaniach podstawowych i inżynierii tkankowej*. Postępy Biochemii 2013; 59, 305–314,
7. Goj, K., Rusin, A., Szeja, W., Kitel, R., Komor, R., Gryniewicz, G. *Synthesis of genistein 2,3-anhydroglycoconjugates – potential antiproliferative agents*. Acta Pol. Pharm. 2012; 69, 1239-1247 (**IF<sub>5</sub> = 0.88**)