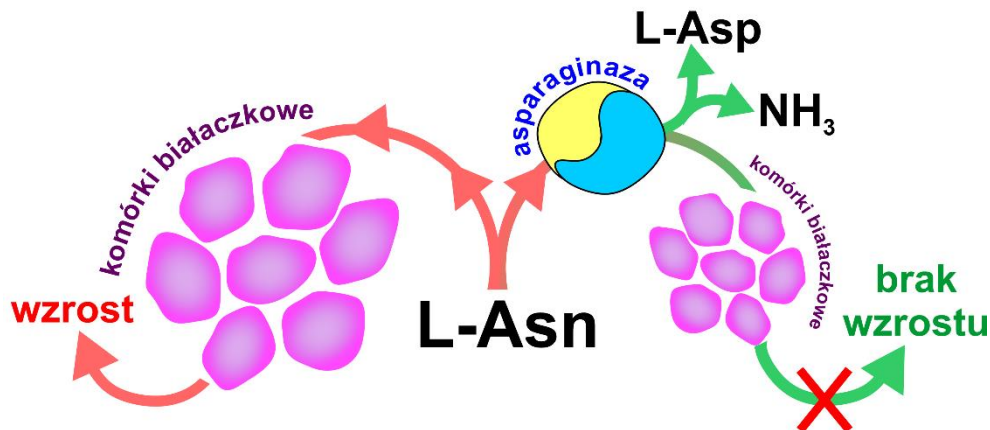


Badania strukturalne i funkcjonalne zmodyfikowanych oraz chimerycznych asparaginaz typu roślinnego jako nowych leków przeciwbiałaczkowych

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) jest najczęstszym nowotworem wieku dziecięcego i drugą co do częstości ostrą białaczką u dorosłych. L-asparaginaza jest stosowana w terapii ALL od 1967 roku, jednak obecnie klinicznie zastosowanie mają tylko enzymy bakteryjne. Niestety, wykazują one wysoką toksyczność i powodują reakcje alergiczne. Te niepożądane skutki uboczne wskazują na pilną potrzebę znalezienia lepszych enzymów. Kandydatów na nowe środki przeciwbiałaczkowe można szukać wśród asparaginaz typu roślinnego. Asparaginazy typu roślinnego występują nie tylko w roślinach, ale także w mikroorganizmach oraz u owadów i ssaków.

Celem moich badań jest zaprojektowanie, produkcja i charakterystyka nowych asparaginaz typu roślinnego. Dalekosiężnym celem jest otrzymanie enzymów z dobrą farmakokinetyką umożliwiającą wydajną, ale stopniową hydrolizę asparaginy oraz wykazujących minimalne skutki uboczne. Nowe enzymy powinny mieć optymalną stabilność dla wydajnej dystrybucji, przedłużonego krążenia we krwi oraz zmniejszoną immunogenność, aby uniknąć alergii i usuwania leku przez układ odpornościowy.

L-Asparagina (L-Asn) jest jednym z niezbędnych aminokwasów, natomiast asparaginazy to enzymy hydrolizujące L-Asn do kwasu L-asparaginowego (L-Asp) i amoniaku (NH_3). W ludzkim organizmie L-Asn jest wytwarzany przez syntetazę asparaginy, jednak większość komórek białaczkowych nie wytwarza L-Asn, stąd są one zależne wyłącznie od L-Asn dostarczanej z zewnątrz. Terapeutyczne asparaginazy działają poprzez zubożenie puli L-Asn krążącej we krwi, wywołując tym samym głód i śmierć komórek nowotworowych (Rys.1).



Rys.1. Zależność komórek białaczkowych od egzogennej L-Asn: asparaginaza działa poprzez usuwanie krążącej puli L-Asn, co powoduje głodzenie komórek nowotworowych, sprzyja hamowaniu ich wzrostu, a ostatecznie prowadzi do ich śmierci.

Wydawać by się mogło, że znalezienie terapeutycznych enzymów pochodzenia ludzkiego powinno być najlepszą strategią. W przeszłości podjęto kilka prób przystosowania ludzkich enzymów do zastosowań klinicznych, jednak bez powodzenia. Próby ulepszenia obecnie używanych enzymów bakteryjnych, również były nieudane. Moje wstępne badania wykazały, że enzymy typu roślinnego są bardzo podatne na modyfikacje, jednak prosta mutageneza jest niewystarczająca do stworzenia enzymów o lepszej aktywności. Z tego względu w tym projekcie wykorzystam bardziej zaawansowane metody do modulowania działania enzymu, takie jak ukierunkowana ewolucja i konstrukcja białek chimerycznych.

Molekularną architekturę asparaginazy typu roślinnego można przyrównać do białka fuzyjnego, złożonego z dwóch podjednostek (α oraz β) połączonych elastycznym łącznikiem. Taka architektura daje możliwość projektowania chimer, które zbudowane są z dwu lub więcej różnych sekwencji połączonych w jeden polipeptyd. Projektowanie białek chimerycznych otwiera możliwość budowania cząsteczek o zupełnie nowych funkcjach, wywodzących się z każdego komponentu. W przypadku asparaginaz typu roślinnego, łączenie podjednostek α i β pochodzących z różnych organizmów powinno wpływać na mechanizm katalityczny poprzez lokalne i globalne zmiany strukturalne.

Zaplanowane badania zostały podzielone na kilka etapów eksperymentalnych; na każdym z nich testowane będą różne właściwości nowych enzymów, takie jak stabilność, aktywność, (auto)proteoliza i struktura przestrzenna. W pełni scharakteryzowane enzymy posłużą jako prototypy do tworzenia w przyszłości nowych białek terapeutycznych. Wyniki będą ważne dla biochemii, enzymologii, biologii strukturalnej oraz będą promować postęp inżynierii białek i racjonalnego podejścia do projektowania leków.