

AUTOREFERAT

Przedstawiający osiągnięcie naukowe, zgłaszane jako przedmiot postępowania habilitacyjnego, życiorys naukowy wnioskodawcy oraz pozostałe osiągnięcia naukowe

Dr inż. Andrea Baier

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Instytut Biotechnologii
Katedra Biologii Molekularnej

Lublin, 2018

1. Imię i Nazwisko

Andrea Baier

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 nauk biologicznych, specjalizacja - biochemia

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN (Pracownia Antymetabolitów), 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

01.09.2008-28.02.2018 adiunkt

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biologii Molekularnej

Od 01.03.2018 asystent

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biologii Molekularnej

4. 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

Charakterystyka kinazy białkowej CK2 wybranych organizmów eukariotycznych i jej nowych inhibitorów o potencjale farmakologicznym

b) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego

1. 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

2. 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

3. 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-1H-benzimidazole derivatives. Eur. J. Med. Chem., 47: 345-350.

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

4. 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

5. **Baier A**, Alikowska E, Szyszka R. Asf1 protein as modulator of protein kinase CK2 activity. W: Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States. (Edytorzy: K. Ahmed, O-G. Issinger, R. Szyszka) Springer, 2015, 3-16.

MNiSW₂₀₁₅: 5

6. **Baier A**, Galicka A, Nazaruk J, Szyszka R. (2017) Selected flavonoid compounds as promising inhibitors of protein kinase CK2 α and CK2 α' , the catalytic subunits of CK2. *Phytochem.*, 136: 39-45.

IF₂₀₁₆: 3.205 ; MNiSW₂₀₁₆: 35; cytowań: 3

7. **Baier A**, Nazaruk J, Galicka A, Szyszka R. (2017) Inhibitory influence of natural flavonoids on human protein kinase CK2 isoforms - effect of the regulatory subunit. *Mol. Cell. Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3228-1>

IF₂₀₁₆: 2.669; MNiSW₂₀₁₆: 20; cytowań: 0

Sumaryczny impact factor: 14,674; MNiSW: 165; cytowań: 21

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

Głównym celem moich badań jest charakterystyka aktywności enzymatycznych będących potencjalnymi celami terapii różnych chorób takich jak zakażenia wirusowe, nowotwory oraz choroby neurodegeneracyjne. Poszukiwanie nowych celów białkowych oraz aktywności enzymatycznych do terapii stanów chorobowych jest obiektem badań wielu naukowców na całym świecie.

CK2 jest wszechobecną Ser/Thr kinazą białkową wykorzystującą jako donora 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 Alzheimera i Parkinsona) oraz zakażenia wirusowe. CK2 jest jedną z najbardziej plejotropowych kinaz białkowych dla której znanych jest obecnie setki substratów białkowych (Bian i in., 2013). 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 transformacja. W przeciwieństwie do większości kinaz białkowych, podjednostki katalityczne CK2 nigdy nie zostały stwierdzone w nieaktywnej konformacji z powodu swojej unikalnej struktury przestrzennej. 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 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.

CK2 w komórce zbudowana jest z dimeru utworzonego przez podjednostki regulatorowe β , do których są związane dwie podjednostki katalityczne α i/lub α' . Z wielu badań wiadomo, że obydwie podjednostki katalityczne występują w komórce także w formie monomerycznej. Ilość występujących podjednostek jest inny w różnych organizmach. Ludzki enzym CK2 posiada trzy 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 holoenzymu (Kubiński i in, 2007).

W trakcie moich badań dotyczących kinazy białkowej CK2 podjęłam współpracę z prof. Zygmuntem Kazimierzukiem i prof. Andrzejem Orzeszko z SGGW, z dr Sofią Kouyanou-Koutsoukou z Uniwersytetu Ateńskiego w Grecji oraz z dr hab. n. farm. Jolantą Nazaruk i dr hab. n. med. Anną Galicką z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku [szczegóły **Zał. 4**]. Wyniki tych prac są przedmiotem niniejszej rozprawy ale były one także prezentowane na w formie referatów oraz posterów na konferencjach międzynarodowych [szczegóły **Zał. 4**].

CK2 została zidentyfikowana u wielu organizmów, jak człowiek, ryby, owady i drożdże. Wcześniej nikt nie opisał kinazy białkowej CK2 u małży, jak omulek *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) prowadziłam badania dotyczące podjednostki katalitycznej i regulatorowej CK2 z *M. galloprovincialis* [Zal. 4, I.B1]. 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 małża 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. W oczyszczanych frakcjach białkowych identyfikowano obecność kinazy białkowej CK2 stosując specyficzne przeciwciała anty-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-1H-benzimidazol (TBBz), 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzotriazol (TBBt), heparynę i NaCl. CK2 należy do nielicznych kinaz białkowych zdolnych do wykorzystywania GTP jako kosubstratu. 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). 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 używając metody RACE (z ang. rapid amplification of cDNA ends).

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.

Ceratitidis 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 [Zal. 4, I.B2]. Sekwencja podjednostki CK2 β została już 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 kinazy 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 wolnej 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 [Zal. 4, I.B3]. 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 2005 poznałam prof. dr hab. Zygmunta Kazimierczuka z SGGW. Na początku nasza współpraca dotyczyła poszukiwania inhibitorów aktywności wirusowych helikaz z rodziny *Flaviviridae*. Po rozpoczęciu pracy w Katedrze Biologii Molekularnej KUL i poszerzeniu moich zainteresowań naukowych związku syntetyzowane przez niego i prof. dr hab. Andrzej Orzeszko testowałam kilka pochodnych 4,5,6,7-tetrabromo- i 4,5,6,7-tetrajodo-1H-benzimidazolu na aktywność inhibitorową w stosunku do ludzkich podjednostek katalitycznych CK2 α i CK2 α ' [Zal. 4, I.B4]. W pierwszym etapie uzyskałam enzymy na drodze nadekspresji jako białko fuzyjne z GST w bakteriach *E. coli* BL21(DE3)trxB oczyściłam je na glutationo-sepharozie. Do dzisiaj większość publikacji dotyczących inhibitorów CK2 w przedstawianych wynikach nie różnicuje pomiędzy dwoma podjednostkami katalitycznymi chociaż wiadomo, że spełniają one różne funkcje w komórce

a ich specyficzność jest podobna ale nie identyczna. Pamiętając wyniki uzyskane w poprzednich badaniach w przedstawianych doświadczeniach użyto dwa różne substraty białkowe: drożdżowe kwaśne białko rybosomowe P2B i syntetyczny peptyd RRRADDSDDDDDD. Zwykle to aktywność CK2 α' była bardziej wrażliwa od CK2 α na działanie testowanych związków bromopochodnych. Wprowadzenie łańcuchów bocznych ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$) w pozycji 2 4,5,6,7-tetrabromo- i 4,5,6,7-tetrajodo-*1H*-benzimidazoli 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 skutkowała zmiennym efektem. Podczas kiedy cząsteczka 5f (R1 – CH_3 , R2 – $(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$) wykazuje dużo słabsze właściwości inhibitorowe dla syntetycznego peptydu niż dla substratowego białka P2B, cząsteczka 5b (R1 – CH_3 , R2 – $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$) 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-tetrajodo-*1H*-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. Znanym 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 .

W roku 2015 rozpoczęłam współpracę z dr hab. n. farm. Jolantą Nazaruk i dr hab. n. med. Anną Galicką z Uniwersytetu Medycznego z Białegostoku. Celem tych badań jest

identyfikacja nowych związków pochodzenia naturalnego (izolowanych z różnych roślin przez dr hab. n. farm. J. Nazaruk) jako silnych inhibitorów aktywności ludzkiej kinazy białkowej CK2 [Zał. 4, I.B6 i B7]. Związki z grupy flawonoidów znane są od lat jako substancje o aktywności antynowotworowej i przeciwbakteryjnej. Oprócz czterech już opisanych flawonoidów z hamującym potencjałem przeciw holoenzymowi CK2 (apigenina, luteolina, kemferol i kwercetyna) badałam 24 nowe związki. Celem badań było porównywanie wszystkich substancji pod względem ich efektu na aktywność podjednostek katalitycznych (CK2 α i CK2 α') oraz ich holoenzymów (CK2 $\alpha_2\beta_2$ i CK2 $\alpha'_2\beta_2$). W pierwszym etapie podjednostki CK2 α i CK2 α' oczyszczono jak już opisano powyżej. Do tworzenie obu form holoenzymatycznych podjednostkę regulatorową CK2 β uzyskiwano jako białko fuzyjne z 6xHis ekspresowane w bakteriach *E. coli* BL21(DE3)pLys. Homogenne preparaty holoenzymów uzyskiwałam poprzez połączenie osadów bakteryjnych zawierających rekombinowane CK2 α oraz CK2 β lub CK2 α' oraz CK2 β , dezintegracji komórek i oczyszczanie na glutationo-sepharozie. Badanie enzymatyczne prowadziłam jak w przypadku benzimidazoli z dwoma substratami: kwaśnym białkiem rybosomowym P2B z *S. cerevisiae* oraz krótkim syntetycznym peptydem o sekwencji RRRADDSDDDDD.

Najlepszy efekt inhibitorowy wobec wolnych podjednostek katalitycznych wykazały chryzoeriol, kwercetyna i pedalityna z wartościami IC₅₀ pomiędzy 0,1 i 0,4 μ M dla CK2 α' oraz 0,5 i 7,0 μ M dla CK2 α co znaczy, że związki te wykazują wyższą aktywność hamującą od bardzo znanego inhibitora tego enzymu apigeniny (9,8 μ M dla CK2 α i 2,3 μ M dla CK2 α'). Innymi związkami obniżającymi aktywności CK2 są luteolina i kemferol. Podobnie jak w badaniach z halogenowanymi benzimidazolami CK2 α' jest mocniej hamowana niż CK2 α , a w niektórych przypadkach (pedalityna) nawet do 17 razy lepiej. Zidentyfikowałam też związki które mają wyłącznie efekt na podjednostkę CK2 α' i należą do nich trycyna i skutelaryna. Jedyną substancją o podobnym efekcie inhibitorowym na obie podjednostki katalityczne jest cernuozyd. W badaniach używane były również różne pochodne tych związków. Posiadają one dodatkowe grupy glikozydowe, hydroksydowe lub kwas glukuronowy. Takie pochodne wykazują różny efekt hamujący, niektóre lepiej obniżają aktywność CK2, np. 7-O-glukuronid izokemferyd, inne nie posiadają żadnego efektu.

Inne badane związki, takie jak linaryna, pektolinaryna, erigerozyd, 6'-kawoiloerigerozyd i kwas chlorogenowy nie obniżają aktywności enzymatycznych obu podjednostek niezależne od używanego substratu białkowego.

W porównywaniu wyników otrzymanych w eksperymentach z białkiem P2B i z krótkim peptydem jako substratami obserwowałam dużą różnicę efektu hamującego inhibitorów na aktywności CK2. W większości przypadków CK2 α' było lepiej hamowane dla substratu peptydowego i potwierdził się fakt, że podjednostka CK2 α' jest mocniej hamowana niż CK2 α .

W celu ustalenia mechanizmu działania flawonoidów badania enzymatyczne prowadzono przy zmiennych stężeniach inhibitora i donora fosforanu (ATP). Miało to na celu wykazać czy badane związki inhibitorowe są kompetytywne wobec ATP. Po analizie wyników i wykresów widoczne jest działanie inhibitorowe określone jako czysto współzawodniczące wobec donora fosforanu. Stała inhibicji K_i osiąga wartości pomiędzy 0,1 i 0,5 μM . Wartość dla najlepszego inhibitora, którym jest chryzoeriol wynosi 17 i 100 nM odpowiednio dla CK2 α' i CK2 α .

W dalszej analizie tych inhibitorów i ich mechanizmu działania używałam rekombinowane holoenzymy CK2 $\alpha_2\beta_2$ i CK2 $\alpha'_2\beta_2$. Celem było zbadanie czy różnica w elastyczności pomiędzy oboma holoenzymami będzie widoczna w eksperymentach z inhibitorami. W holoenzymie CK2 $\alpha'_2\beta_2$ podjednostka katalityczna jest mniej ruchoma niż w przypadku holoenzymu CK2 $\alpha_2\beta_2$. Czy to będzie miało wpływ na efekt hamujący flawonoidów?

W pierwszej kolejności testowałam najlepsze inhibitory z poprzednich doświadczeń z wolnymi podjednostkami CK2 α i CK2 α' : chryzoeriolem, pedalityną, apigeniną, luteoliną, kemferolem, kwercetyną i cernuozydem. Niespodziewanie, wszystkie związki lepiej hamowały aktywność holoenzymu CK2 $\alpha_2\beta_2$ niż CK2 $\alpha'_2\beta_2$. Uzyskane wartości IC_{50} dla CK2 α' są niższe od wartości dla holoenzymu CK2 $\alpha'_2\beta_2$, natomiast w przypadku CK2 α wartości są dużo wyższe od tych uzyskanych z holoenzymem CK2 $\alpha_2\beta_2$. Pochodne luteoliny są o 10 razy mniej efektywne wobec CK2 $\alpha'_2\beta_2$ niż dla wolnej podjednostki CK2 α' . Wszystkie cztery izoformy CK2 były najlepiej hamowane przez chryzoeriol (IC_{50} poniżej 0,42 μM) - związek dotąd nie znany jako inhibitor kinaz i mało opisany w literaturze. Pedalityna, trycyna, luteolina i kemferol są jedynymi związkami, które wykazują lepszy efekt hamujący wobec obu form holoenzymów niż w stosunku do odpowiednich wolnych podjednostek katalitycznych.

Poszukiwanie nowych inhibitorów dla kinazy białkowej CK2 jest utrudnione przez charakterystyczną topografię i rozmiar kieszeni wiążącej ATP, która w porównywaniu z innymi kinazami jest węższe. Z tego powodu potencjalne związki hamujące CK2 będące

kompetytywnymi wobec ATP muszą posiadać małą i płaską strukturę, tak jak np. apigenina i luteolina (Lolli i in., 2012). Najważniejszymi aminokwasami zaangażowanymi w związanie inhibitorów są: Leu85, Val95, Leu111, Phe113 i Ile174 (I region hydrofobowy), Val45 i Tyr115 (II region hydrofobowy), oraz Val53, Ile66, Val116 i Met163 (region adeninowy).

Z pomocą internetowego serwisu SWISS-DOC i programu UCSF Chimera 1.12rc analizowałam mechanizm wiązania pomiędzy wszystkimi trzema izoformami CK2 z inhibitorami apigeniną, kwercetyną i chryzoerolem. Do tego celu użyte zostały struktury krystaliczne CK2 α (PDB 1PJK), CK2 α' (PDB 3OFM), i holoenzymu CK2 $\alpha_2\beta_2$ (PDB 1JWH). Energie wiązania dla wszystkich modeli wynosiły pomiędzy -7,49 i -8,48 kcal/mol.

Różnicę w budowie tych inhibitorów stanowi ilość grup hydroksylowych oraz w przypadku chryzoerolu grupa metoksylova w pozycji 3'. Apigenina i kwercetyna wiążą się podobnie do wszystkich izoform. Znaczna różnica jest widoczna w przypadku chryzoerolu związanego do CK2 α . Porównując z apigeniną i kwercetyną chryzoeriol związany jest pod kątem 90°. W ten sposób kieszeń wiążąca ATP jest bardziej blokowana niż w przypadku apigeniny i kwercetyny, co może być tłumaczeniem lepszej aktywności inhibitorowej dla chryzoerolu. Niewielka różnica jest też obserwowana w wiązaniu chryzoerolu oraz pozostałych inhibitorów z holoenzymem CK2 $\alpha_2\beta_2$. Mimo różnych pozycji inhibitorów w kieszeni wiążącej ATP, odległości pomiędzy inhibitorami i łańcuchami aminokwasów są podobne i mieszczą się w granicach 2,2 i 2,4 Å.

Najniższa energia wiązania była szacowana dla kompleksu CK2 α' /chryzoeriol, co jest potwierdzeniem wyników badań enzymatycznych. Oddziaływania pomiędzy flawonoidami i izoformami CK2 są głównie skutkiem tworzenia wiązań wodorowych z Lys68 (Lys69 u CK2 α'), Val116 (Ile117 u CK2 α') i Asp175 (Asp176 u CK2 α').

W następnej części moich badań analizowałam oddziaływanie CK2 z potencjalnym substratem Asf1 [Zał. 4, I.B5]. Jest to drożdżowe białko zaangażowane w tworzeniu nukleosomu *in vitro* będące niezbędnym składnikiem dla stabilizacji genomu *in vivo* (Daganzo i in., 2003). W bazie SGD (z ang. *Saccharomyces* genome database) wyszukiwane były białka zawierające sekwencje konsensusowe S/TXXE/D charakterystyczne dla substratów CK2. Jednym z kandydatów na taki substrat wybrane zostało białko Asf1. Wykonane badania wykazały jednak, że potencjalne miejsce fosforylacji w sekwencji tego białka nie jest fosforylowane *in vitro*. Polipeptyd Asf1 zawiera bardzo charakterystyczny dla

tego typu białek konserwatywny fragment na N-końcu, a w drożdżach dodatkowy C-koniec o charakterze silnie kwaśnym.

Gen kodujący białko Asf1 został wklonowany do wektora pET28a w celu nadekspresji. Białko Asf1 było testowane jako inhibitor kinazy białkowej CK2. Podobnie jak w badaniach z inhibitorami ATP-kompetytywnymi podjednostka CK2 α' (IC_{50} 1,3 μ M) jest lepiej hamowana niż CK2 α (IC_{50} 2,5 μ M). Interesujący efekt obserwowałam w przypadku 30 minutowej preinkubacji Asf1 z różnymi izoformami CK2. Podczas gdy podjednostka CK2 α' i jej holoenzym CK2 $\alpha_2\beta_2$ były hamowane, podjednostka CK2 α i holoenzym CK2 $\alpha_2\beta_2$ ulegały aktywacji.

Jak już opisałam powyżej efekt inhibitorowy reakcji enzymatycznej może być zależny od używanego substratu białkowego. Do sprawdzenia czy to także dotyczy oddziaływania Asf1 z CK2 używałam różne, opisane wcześniej substraty dla drożdżowej CK2: Svf1, Fip1, Elf1, P2B oraz krótki peptyd syntetyczny. Asf1 powodował zahamowanie fosforylacji wszystkich białek, jednak w różnym stopniu. Fosforylacja białek P2B i Fip1 przez CK2 hamowana była przez Asf1 przy wartości IC_{50} odpowiednio 1,3 oraz 1,6 μ M, podczas gdy dla białek Svf1 i Elf1 wartości IC_{50} wynosiły tylko 9,8 i 6,0 μ M. Fosforylacja krótkiego peptydu była hamowana nieznacznie przy 10 μ M. Uzyskane wyniki były podobne dla obu podjednostek katalitycznych, jednak wartości IC_{50} dla CK2 α były wyższe.

Po pierwszych wynikach zainteresowało mnie, który fragment Asf1 jest niezbędny do hamowania aktywności CK2. W tym celu klonowałam dwa fragmenty białka: N-końcowy – sekwencja aminokwasów 1-169 i C-końcowy – aminokwasy 170-279. Pierwszy z nich jest fragmentem wysoce konserwatywnym charakterystycznym dla tego typu białek, a drugi zawiera dużo kwaśnych aminokwasów, i który prawdopodobnie jest odpowiedzialny za efekt hamujący. Analizy aktywności enzymatycznych prowadzono w obecności 5 μ M pełnego Asf1 lub jego fragmentów. Z otrzymanych wyników widać, że kwaśny C-koniec Asf1 posiada podobny wpływ hamującego na aktywności CK2 jak całe białko podczas gdy fragment N-końcowy nie posiada aktywności inhibitorowej.

Koniec karboksylowy Asf1 jest podobny do regionu pseudosubstratowego zawartego w podjednostce regulatorowej β oraz do sekwencji konsensusowej rozpoznawanej przez CK2. Z tego powodu możliwym mechanizmem działania może być kompetycja z miejscem wiązania substratu białkowego kinazy. W celu sprawdzenia tego przypuszczenia powtarzałam badanie aktywności enzymatycznej CK2 w obecności różnych stężeń Asf1 i P2B jako substratu

białkowego. Wyniki różniły się pomiędzy podjednostkami katalitycznymi. Podczas gdy CK2 α' jest hamowana w zależności od stężenia P2B, stopień inhibicji CK2 α pozostawał niezmienny. Podobny eksperyment powtarzałam zmieniając oprócz stężenia Asf1 także stężenie ATP, ażeby sprawdzić kompetencyjność Asf1 wobec ATP. Wyniki, które uzyskałam ponownie były różne dla obu podjednostek katalitycznych. Wartości zahamowania aktywności CK2 α' przez Asf1 były prawie identyczne niezależnie od stężenia ATP, ale w przypadku CK2 α stopień hamowania fosforylacji było większy przy niższych stężeniach ATP w mieszaninie reakcyjnej. Wyniki te sugerują, że hamowanie CK2 α przez białko Asf1 jest kompetencyjne wobec ATP, gdy hamowanie CK2 α' jest kompetencyjne wobec substratu białkowego.

Po analizie wszystkich badań ciekawa byłam, czy efekty obserwowane w warunkach *in vitro* też będą widoczne w badaniach w drożdżach *S. cerevisiae*. Pierwszym krokiem było klonowanie genu kodującego białko Asf1 do wektora umożliwiającego nadekspresję w drożdżach. Następnie różne drożdżowe szczepy delecyjne (Δ CK2 α i Δ CK2 α') były transformowane z wektorem zawierającym Asf1. Prowadzono hodowle w pożywce YPD z dodatkiem 2% galaktozy niezbędnej do nadekspresji białko Asf1 w drożdżach. Wyniki badań *in vivo* potwierdziły badania enzymatyczne. Interesowało mnie czy nadekspresja Asf1 będzie miała wpływ na podział komórek. Szczepy drożdżowe hodowane przez 8 godzin i mierzono w nich co 2 godziny gęstość optyczną. Porównując wzrost komórek szczepów delecyjnych z dzikim szczepem BMA64-1 okazało się, że podział komórek był hamowany w szczepie z delecją genu kodującego CK2 α , tzn. w tym gdzie tylko białko CK2 α' jest produkowane w drożdżach. Z drugiej strony drożdże produkujące tylko podjednostkę CK2 α urosły szybciej.

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.

Bian Y, Ye M, Wang C, Cheng K, Song C, Dong M, Pan Y, Qin H, Zou H. (2013) Global screening of CK2 kinase substrates by an integrated phosphoproteomics workflow. Sci Rep. 3: 3460.

Daganzo SM, Erzberger JP, Lam WM, Skordalakes E, Zhang R, Franco AA, Brill SJ, Adams PD, Berger JM, Kaufman PD. (2003) Structure and function of the conserved core of histone de-position protein ASF1. *Curr. Biol.*, 13: 2148-2158.

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.

Lolli G, Cozza G, Mazzorana M, Tibaldi E, Cesaro L, Donella-Deana A, Meggio F, Venerando A, Franchin C, Sarno S, Battistutta R, Pinna LA (2012) Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight. *Biochemistry* 51: 6097–6107

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.

Najważniejsze wyniki:

W pracach omówionych powyżej włączonych do osiągnięcia naukowego wykazałam:

1. Po raz pierwszy zidentyfikowałam kinazę białkową CK2 w morskim bezkręgowcu.
2. Przeprowadziłam klonowanie i scharakteryzowałam nową kinazę białkową CK2 z małża *Mytilus galloprovincialis*, wyizolowałam z małża oraz oczyściłam enzym rekombinowany.
3. Wykonałam klonowanie i scharakteryzowałam nową kinazę białkową CK2 z muszki owocowej *Ceratitis capitata*, oczyściłam enzym rekombinowany.
4. Porównałam aktywności enzymatyczne oraz mechanizmu regulacji kinazy białkowej CK2 u różnych organizmów eukariotycznych (człowieka, małża i muszki).
5. Zidentyfikowałam nowe, wysoko specyficzne i silne inhibitory (pochodne *1H*-benzimidazolu) ludzkiej kinazy białkowej CK2, o wysokiej selektywności wobec CK2 α' . Po raz pierwszy wykonane zostały analizy i odróżniony wpływ inhibitorów na podjednostki katalityczne ludzkiej CK2.
6. Wykonałam badanie i analizę oddziaływanie naturalnie występujących flawonoidów na aktywność katalityczną izoform ludzkiej kinazy białkowej CK2. Zidentyfikowałam nowe, silne inhibitory CK2: pedalitynę, chryzoeriol i trycynę.
7. Przebadałam oddziaływanie białka Asf1 drożdży na izoformy ludzkiej i drożdżowej kinazy białkowej CK2. Wykonałam analiza wpływu Asf1 *in vitro* w badaniach enzymatycznych oraz *in vivo* przez analizę wzrost *S. cerevisiae* po nadekspresji białka Asf1.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

a) Badania nad hamowaniem helikazy HCV

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 (HCV) 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 stwierdzenia zakażenia. 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). Szacunkowo corocznie rejestruje się do 200 milionów nowych przypadków infekcji spowodowanych przez wirusy rodziny *Flaviviridae*. 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.

Część praktyczną do mojej pracy magisterskiej wykonałam w Instytucie Chorób Tropikalnych im. Bernhardta-Nochta w Hamburgu (Niemcy). Podczas tego pobytu poznałam różne metody niezbędne dla nadekspresji i oczyszczania białek rekombinowanych oraz natywnych. Oczyszczałam NTPazy/helikazy z czterech wirusów z rodziny *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 pochodnych 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 WZW 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 WZW. Najlepszy profil aktywności/selektywności w stosunku do aktywności helikazy WZW posiadały halogenowane benzotriazole N₂-metyltetrabromobenzotriazolu, N₁-etylotetrabromobenzotriazolu i N₂-propylotetrabromobenzotriazolu wykazujące hamowanie przy stężeniach rzędu 5,9 i 6,6 μM [Zał. 4, II.D2 i D3].

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* w testach *in vitro*. 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. 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 hybrydyzacji.

W latach 2003-2005 pracowałam w projekcie „Design of novel inhibitors of HCV RNA helicase – potential antivirals for treatment and protection against hepatitis C virus-induced diseases” kierowane przez prof. dr hab. T. Kulikowski z IBB PAN w Warszawie [Zał. 4, III.A1 i III.E]. 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 [Zał. 4, II.D1]. 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 *1H*-benzotriazolu i *1H*-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 została testem ATP-azowym. Nie można wykluczyć, że pochodne policykliczne tropolonów interkalują w strukturę DNA i w ten sposób wzmacniają

efekt hamujący względem helikaz [Zał. 4, II.D4]. 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* NTPazy/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.

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.

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* [Zał. 4, II.A1]. 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 nukleotydogo do hamowania aktywności NTPazy/helikazy w przypadku substratu RNA dało wynik negatywny. Aby zrozumieć tego zjawisko analizowałam 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, po uzyskaniu finansowania projektu badawczego przez NIH [Zał. 4, II. I3; III.A2], sprawdzałam nowe analogi nukleotydogo o powiększonym pierścieniu (REN) [Zał. 4, II.A7]. 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 włączyłam do moich 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 wykazywały 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.

W dalszym etapie współpracy z Uniwersytetem Maryland w Baltimore County badałam modulujący wpływ analogów UK-1 na aktywność helikazy i replikację wirusa zapalenia wątroby typu C [Zał. 4, II.A6]. 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 białko NS3 z HCV, WNV, JEV i DENV w niskich stężeniach mikromolarnych. Dwa z badanych związków 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 substancje 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 [Zal. 4, II.A3]. Aktywność rozplatająca NTPazy/helikazy HCV była analizowana w obecności każdego z nich. Porównanie uzyskanych wyników wykazało, że 14 aminokwasowy peptyd o sekwencji aminokwasowej zgodnej z motywem VI NTPazy/helikazy HCV (RRGRTGRGRRGIYR) jest najsilniejszym inhibitorem, który przy stężeniu 0,2 μM hamuje enzym w 50 % (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 jej 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 μM 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. (2008) pokazano, że peptyd oplata domenę 1 i wypełnia szczelinę pomiędzy domenami 1 i 2 jak również pomiędzy domenami 1 i 3.

b) Wpływ oddziaływania ATPazy/helikazy HCV z kinazą białkową typu C (PKC) w nowotworzeniu

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 znajdują się tu 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 aminokwasów zasadowych (argininy i lizyny) oraz hydrofobowych (leucyny, izoleucyny i waliny) 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 [Zał. 4, II.A2]. Delecja aminokwasów 1458-1476 prowadzi do znaczących różnic pomiędzy konstrukcjami 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 badałam 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 [Zal. 4, II.A5]. Wyniki potwierdziły wcześniejsze doświadczenia z mniejszymi niefizjologicznymi fragmentami NS3. Ponadto określiłam 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.

Ponadto jestem autorką dodatkowych 6 rozdziałów książkowych (3 w języku polskim, 3 w języku angielskim) i 2 prac przeglądowych. Wygłaszałam 5 referatów na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Ponadto przedstawiałam wyniki swoich badań w postaci 22 doniesień posterowych [Zal. 4].

Bibliografia

Gozdek A, Zhukov I, Polkowska A, Poznański J, Stankiewicz-Drogon A, Pawłowicz JM, Zagórski-Ostoja W, Borowski P, Boguszewska-Chachulska AM. (2008) Antimicrob. Agents Chemother., 52: 393-401

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.

6. Dalsze plany naukowe

Obecnie jestem kierownikiem 1 projektu we współpracy z University of Massachusetts w Bostonie i wykonawcą w projekcie we współpracy z Instytutem Agrofizyki PAN w Lublinie. Byłam wykonawcą w 4 projektach naukowych [Zał. 4, II.I1 do I6].

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 pomóc w znalezieniu specyficznych i silnych inhibitorów. Do tego celu planuję uzyskać konstrukty podjednostek katalitycznych z mutacjami w miejsce wiązania ATP.

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

Wstępny wyniki wskazują, że fosforylacja seryny przez kinazę białkową PKC w regionie odpowiedzialnym za rozpoznanie substratu białkowego ma wpływu na stopień fosforylacji substratu [Zał. 4, III.B21]. Do dalszej analizy tego faktu planuję zmienić sekwencję aminokwasowe w tym regionie, a następnie analizować i porównywać aktywność enzymatyczną izoform CK2. Analizowała też będę kooperatywny wpływ fosforylacji podjednostek katalitycznych CK2 i podjednostki regulatorowej β na specyficzność substratową kinazy.

7. Aktywności organizacyjne

Byłam współorganizatorem 2 konferencji naukowych organizowanych na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim Jana Pawła II [Zał. 4].

Od 2011 r. prowadzę zajęcia (wykłady i ćwiczenia) dla studentów kierunku Biotechnologii (I i II stopnia) oraz od 2017 roku na kierunku Biotechnologii w języku angielskim (I stopnia) na Wydziale Biologii i Nauk o Środowisku KUL [Zał. 4].

Od 2009 r. jestem opiekunem naukowym dla 30 studentów w ramach pracowni dyplomowej w Katedrze Biologii Molekularnej oraz byłam promotorem 12 prac licencjackich w latach 2011/12 i 2012/13. Jestem opiekunem roku studentów Biotechnologii od 2013/14 [Zał. 4]. Pełniłam funkcję recenzenta w 25 pracach licencjackich oraz 45 magisterskich.

Byłam recenzentem wielu publikacji naukowych dla międzynarodowych czasopism, takich jak np. Virology Journal, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, American Journal of Research in Medical Sciences, PLOS ONE i Pharmaceuticals [Zał. 4].

Oprócz działalności naukowo–dydaktycznej angażowałam się również w prace na rzecz Uniwersytetu i Wydziału. W latach 2014–2016 uczestniczyłam w pracach Senackiej Podkomisji ds. Promocji i Współpracy z Zagranicą. Jestem członkiem zespołu ds. opisów przedmiotów/sylabusów Wydziałowej Komisji ds. Jakości Kształcenia [Zał. 4].

Jestem członkiem Komisji Przetargowej ds. zakupu aparatury naukowej i odczynników chemicznych na KUL.

Od 2009 jestem koordynatorem programu ERASMUS+ w Instytucie Biotechnologii KUL.

Od 2016 roku biorę czynny udział w popularyzacji nauki poprzez udział w Lubelskim Festiwalu Nauki oraz w Nocy Biologów. Prowadziłam zajęcia laboratoryjne dla uczniów klas licealnych w ramach projektu „Licea powiatu ryckiego – szkołami równych szans” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (czerwiec 2013). Prowadzę zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół licealnych i techników z Lublina i Chełma.

8. Dane bibliometryczne

8.1. Publikacje i komunikaty konferencyjne

Rodzaj publikacji	liczba	IF (wg rok publikacji)	Punkty MNiSW
Publikacje przed uzyskaniem doktoratu			
Publikacje w czasopismach poza bazy JCR	3	-	12
Komunikaty na konferencjach międzynarodowe	5	-	-
Komunikaty na konferencjach krajowe	3	-	-
Publikacje po uzyskaniem doktoratu			
Publikacje w czasopismach z bazy JCR	14	35,644	379
Publikacje w czasopismach poza bazy JCR	3		19
Rozdziały w książkach w języku polskim)	3		12
Rozdziały w książkach w języku angielskim)	4		20
Komunikaty na konferencjach międzynarodowe	12		
Komunikaty na konferencjach krajowe	4		
Łącznie		35,644	444

8.2. Cytowania i indeks Hirscha

	Web of Science	Scopus	Google Scholar	Research Gate
Ilość cytowań	90	149	228	164
Indeks Hirscha	4	6	8	7

Andrea Baier