

Mgr Adam Pomorski

# OTRZYMANIE I CHARAKTERYSTYKA BARWNIKÓW BIARSENOWYCH STOSOWANYCH DO SELEKTYWNEJ MODYFIKACJI BIAŁEK

## STRESZCZENIE

Fluorescencyjna modyfikacja białek jest jedną z najbardziej popularnych technik wykorzystywanych w badaniach biologii molekularnej. Przeprowadza się ją z użyciem reaktywnych, niskocząsteczkowych związków fluorescencyjnych lub poprzez łączenie z białkami fluorescencyjnymi, lub takimi, które można wyznakować fluorescencyjnie w wyniku reakcji enzymatycznych. Metody te posiadają jednakże kilka wad. Łączenie białek w duże fuzje z innymi makromolekułami często zmienia ich naturalną aktywność oraz lokalizację komórkową. Natomiast zastosowanie selektywnej modyfikacji niskocząsteczkowymi, reaktywnymi fluoroforami nie jest możliwe w żywych komórkach. Dlatego też zaczęto poszukiwać rozwiązań opierających się na niskocząsteczkowych związkach chemicznych, pozwalających na specyficzną modyfikację białek w żywych komórkach. Jedną z najpopularniejszych metod bazuje na wysokim powinowactwie fluoresceiny zmodyfikowanej w pozycjach 4' i 5' atomami arsenu (związek biarsenowy) do białek zawierających czterocysteinową etykietę powinowactwa, najczęściej sekwencję CCPGCC. Metoda ta jest z powodzeniem stosowana w biologii molekularnej, biochemii, bioanalizie oraz wielu innych dziedzinach. Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie i charakterystyka fizykochemiczna nowych barwników biarsenowych oraz ich praktyczne zastosowanie. W badaniach skupiono się m.in. na poszukiwaniach odpowiedniego barwnika biarsenowego, zdolnego do hamowania aktywności mutantów białkowych fosfataz tyrozynowych (ang. *Protein tyrosine phosphatase*, PTP), a także na opracowaniu wielofunkcyjnych sensorów jonów cynku(II) i pH mogących lokalizować się w konkretnych kompartmentach komórkowych. W celu uzyskania najwydajniejszych inhibitorów

białkowych fosfataz tyrozynowych zsyntetyzowano bibliotekę barwników biarsenowych wykorzystując liczne pochodne fluoresceiny (FlAsH-EDT<sub>2</sub>) i rezorufiny (ReAsH-EDT<sub>2</sub>). Wytworzono również szereg mutantów białkowych fosfataz tyrozynowych – TCPTP oraz HePTP. Testy aktywności enzymatycznej z użyciem jako substratu *para*-nitrofenolofosforanu (*p*NPP) oraz ufosforylowanego peptydu wykazały jednoznacznie, że barwniki podstawione w pozycjach 2' i 7' mają największą zdolność do hamowania aktywności mutantów białkowych fosfataz tyrozynowych. Ponadto, w pracy przedstawiono pełną charakterystykę fizykochemiczną kompleksów barwników biarsenowych z peptydami czterocysteinowymi oraz, po raz pierwszy, zbadano stabilność barwników biarsenowych w roztworze wodnym. Kolejnym etapem badań było opracowanie sensora pH zdolnego do lokalizacji w wybranych kompartmentach komórkowych. Biarsenowa modyfikacja najpopularniejszego sensora pH – BCECF pozwoliła na otrzymanie nowego związku biarsenowego BCECFIAsH-EDT<sub>2</sub>. Sensor ten charakteryzuje się zbliżonymi parametrami fizykochemicznymi do sensora macierzystego. Wartość  $pK_a$  grupy hydroksylowej w pozycji 3' odpowiedzialnej za właściwości sensorujące wynosi 6,68. Podobnie jak w przypadku innych barwników biarsenowych fluorescencja sensora pozostaje wygaszona w postaci niezwiązanej z motywem czterocysteinowym. Sensor zachowuje również możliwość różnicowego odczytu sygnału przy dwóch długościach fali świetlnej. Jednakże wyniki obliczone na podstawie różnicowego odczytu fluorescencji nie pokrywały się z wynikami uzyskanymi dla pojedynczych fal. Dokładna analiza wykazała, iż rozbieżność wyników spowodowana jest nieliniowością stosunku intensywności sygnałów, co w rezultacie prowadzi do niedoszacowania, lub przeszacowania wartości stałej dysocjacji. Biorąc pod uwagę ten efekt opracowano metodę wyznaczania prawidłowych wartości stałej dysocjacji, którą z sukcesem zastosowano do wyznaczenia stałej dysocjacji kompleksów sensorów różnicowych Zincon oraz FLIPE-1 $\mu$ . Ostatnim celem przeprowadzanych badań było otrzymanie sensora jonów cynku(II) mogącego lokalizować się w wybranych kompartmentach komórkowych. Na początku ustalono, że zoptymalizowana sekwencja czterocysteinowa FLNCCPGCCMEP posiada zdolność do wiązania jonów cynku(II) w stechiometrii 1:1 ze stałą dysocjacji  $\sim 10^{-11}$  M oraz, że w wiązanie tego metalu zaangażowane są trzy pierwsze reszty cysteiny motywu TC. Zaobserwowano również, że wiązanie cynku(II) do motywu czterocysteinowego spowalnia przyłączanie barwnika biarsenowego. Następnie, wykorzystując genetycznie kodowany sensor jonów cynku(II) eChZinc-2 udowodniono, że szereg czynników takich jak inkubacja komórek w buforze do obrazowania mikroskopowego, czy też przemywanie komórek roztworem 1,2-dimerkaptotenu po barwieniu barwnikami biarsenowymi nie ma wpływu na stężenie wolnego cynku(II) w cytozolu komórek linii HeLa.

W celu pomiaru stężenia wolnego cynku(II) w jądrze komórek HeLa wykonano syntezę sensorów jonów cynku(II) z rodziny ZnAF-F. Biarsenowa modyfikacja sensora ZnAF-1F pozwoliła na uzyskanie nowego sensora ZnAF1AsH-1F-EDT<sub>2</sub>, którego właściwości fizykochemiczne oraz koordynacyjne zostały dokładnie przebadane. Co istotne, sensor ze związanym jonem cynku(II) a nie dołączonym motywem TC wykazuje bardzo słabe właściwości fluorescencyjne. Dopiero skoniugowanie z motywem czterocysteinowym skutkuje silną fluorescencją w obecności jonów cynku(II). Stała dysocjacji kompleksu wynosi 1,4 nM co z powodzeniem pozwala na jego zastosowanie w komórkach ssaczy, charakteryzujących się stężeniem wolnego cynku na poziomie 5-900 pM. W celu skierowania sensora do jądra, komórki linii HeLa transfekowano przy użyciu przygotowanego wektora kodującego histon 2B z C-końcową zoptymalizowaną sekwencją czterocysteinową. Badania z użyciem mikroskopii konfokalnej nie tylko potwierdziły prawidłową lokalizację sensora w komórce, ale także pozwoliły na obliczenie stężenia wolnego cynku(II) w jądrze dwóch komórek. Uzyskane wartości – 324 i 494 pM w pełni wpisują się w obecnie funkcjonujący obraz homeostazy cynku(II) w komórkach eukariotycznych.