

“ Ekspresja, izolacja i hamowanie aktywności ureaz bakteryjnych”.

Ureaza (amidohydrolaza mocznika, EC 3.5.15) jest enzymem katalizującym hydrolizę mocznika do amoniaku i karbaminianu, który następnie ulega spontanicznej dekompozycji do kolejnej cząsteczki amoniaku oraz tlenku węgla(IV). W wyniku reakcji dochodzi do znaczącego podwyższenia pH środowiska reakcyjnego z powodu wydzielania dużej ilości mocznika. Efekt ten ma istotne konsekwencje podczas dwóch rodzajów ciężkich zakażeń bakteryjnych zachodzących w ludzkim organizmie: (i) enzymatyczna hydroliza mocznika umożliwia przeżycie bakterii *Helicobacter pylori* w żołądku i dwunastnicy, (ii) alkalizacja moczu podczas infekcji dróg moczowych przez *Proteus mirabilis* i gatunki pokrewne powoduje powstawanie kamieni nerkowych. Kluczowa rola aktywności katalitycznej enzymów w procesach biologicznych sprawia, że enzymy są dobrymi celami molekularnymi w projektowaniu nowych inhibitorów, mogących służyć jako punkt wyjścia do projektowania nowych leków mających praktyczne zastosowanie w rolnictwie, medycynie i przemyśle spożywczym.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadano aktywność inhibicyjną wysoce specyficznym inhibitorów ureaz bakteryjnych. Projektowanie specyficznym inhibitorów ureazy jest bardzo trudnym zadaniem ze względu (i) na małą dostępność przestrzeni w miejscu aktywnym enzymu oraz (ii) ruchomą pętlę stanowiącą znaczną część miejsca aktywnego. W ramach niniejszej pracy zastosowano kilka strategii projektowania nowych inhibitorów ureaz bakteryjnych. Pierwszą z nich było zbadanie wpływu jonów metali ciężkich na aktywność katalityczną ureazy. Druga strategia była oparta na obiecującej modyfikacji struktury kwasu bis(aminometylo)fosfinowego i jego pochodnych. W ostatnim podejściu zbadano związki zdolne do wiązania się z resztą cysteiny obecną na wejściu do miejsca aktywnego enzymu (ebselen i jego pochodne, akceptory Michaela, pochodne fosfonowe i fosfinowe z funkcją akceptorów Michaela, octany Mority-Baylisa Hillmana). Mimo, że reszta cysteiny nie jest bezpośrednio zaangażowana w katalizę reakcji enzymatycznej, jej wiązanie ze specyficznymi związkami umożliwia skuteczne hamowanie ureaz. Dodatkowym elementem badań było uzyskanie struktury krystalicznej ureazy w kompleksie z wybranymi inhibitorami.

Wyjściowym punktem badań było uzyskanie katalitycznie aktywnej ureazy z komórek *Sporosarcina pasteurii* i *Proteus mirabilis* wykazujących naturalną zdolność do wytwarzania enzymu oraz rekombinowanej ureazy z komórek *Helicobacter pylori*. Zoptymalizowano warunki ekspresji w celu poprawy wydajności produkcji rekombinowanej ureazy z *Helicobacter pylori*. Komórki *Escherichia coli* Rosetta były indukowane przy użyciu sześciu różnych stężeniach IPTG (0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 mM) w czterech różnych stężeniach jonów niklu (II) (0,3, 0,5, 0,75, 1,0 mM) i sześciu

różnych temperaturach indukcji (od 20 do 30°C). Supernatant pozbawiony komórek analizowano za pomocą elektroforezy pionowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz jakościowego testu wykazującego obecność ureazy. Celem przeprowadzonych badań było ustalenie wpływu temperatury, induktora oraz stężenia jonów Ni^{2+} na wydajność, aktywność i rozpuszczalność białka.

Oczyszczenie enzymu przeprowadzono stosując sekwencję czterech (lub pięciu) różnych kolumn chromatograficznych: chromatografii jonowymiennej (Q Sepharose, Mono Q), chromatografii oddziaływań hydrofobowych (Phenyl Sepharose), filtracji żelowej (Sephacryl S-300, Superdex S-200) oraz chromatografii powinowactwa (z wykorzystaniem złoża zawierającego siarczan celufiny). Zastosowanie wieloetapowej chromatografii doprowadziło do otrzymania prawie homogennych preparatów ureaz. W określonych warunkach doświadczalnych, uzyskano wysoce oczyszczone preparaty ureaz bakteryjnych z *Sporosarcina pasteurii*, *Proteus mirabilis* oraz *Helicobacter pylori*. Oczyszczone frakcje enzymu poddano następnie standardowej analizie biochemicznej w celu ustalenia pH, stabilność oraz powinowactwo ureaz do mocznika. Optimum pH dla analizowanych ureaz znajdowało się w zakresie 7 i 8, przy czym wartości K_m wyniosła 23.4 ± 1.9 mM dla SPU; 25.87 ± 3.08 mM dla PMU oraz 0.38 ± 0.02 mM dla HPU. Aktywność specyficzna HPU wyniosła 2451 U/mg dla SPU, 2051 U/mg dla PMU oraz 1654.46 U/mg dla HPU. Oczyszczone preparaty enzymatyczne zostały wykorzystane następnie do ustalenia właściwości hamujących ureaz przez wybrane inhibitory.

Pierwszą grupą inhibitorów ureaz były jony metali ciężkich. Kinetykę hamowania ureaz (*Sporosarcina pasteurii* i *Helicobacter pylori*) przez jony metali ciężkich badano za pomocą analizy krzywych postępów reakcji. Badania hamowania ureazy z *Sporosarcina pasteurii* przez jony Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} wykazały dwuetapowy i odwracalny mechanizm inhibicji podczas gdy inhibicja ureazy przez Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} została określona jako nieodwracalna. W przypadku ureazy z *Helicobacter pylori* wszystkie powyższe jony metali ciężkich (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) wykazały odwracalny mechanizm inhibicji. Obserwowane odwracalne hamowanie ureaz jest zależne od czasu inkubacji enzymu z inhibitorem i może być najlepiej opisane przez wolnowiążący mechanizm inhibicji. Wrażliwość ureazy na inhibicję przez jony metali ciężkich wynika z obecności wielu reszt cysteiny z których jedna, konserwatywnie zachowana we wszystkich znanych ureazy, buduje ruchomą pętlę znajdującą się na wejściu do miejsca aktywnego enzymu.

W przypadku niskocząsteczkowych inhibitorów ureaz zostały przeprowadzone bardziej złożone badania. Kwas bis(aminometylo)fosfinowy będący związkiem wiodącym w tej grupie inhibitorów, został poddany licznym modyfikacjom struktury chemicznej z wykorzystaniem komputerowo wspomaganego modelowania. Aktywność inhibicyjna tej klasy związków została

następnie oceniona wobec natywnej ureazy z *Sporosarcina pasteurii* i *Proteus mirabilis* oraz rekombinowanego enzymu z *Helicobacter pylori*. Pochodna zawierająca sześciowęglowy alifatyczny łańcuch okazała się najsilniejszym inhibitorem z $K_i = 108$ nM wobec ureazy z *S. pasteurii*, $K_i = 202$ nM wobec ureazy z *P. mirabilis* oraz $K_i = 290$ nM wobec ureazy z *H. pylori*. Badania mikrobiologiczne wykonane wobec żywych komórek szczepu *Proteus mirabilis* potwierdziły właściwości hamujące tej klasy związków wobec wewnątrzkomórkowego enzymu, co sugeruje, że ta klasa związków ma zdolność do penetracji przez błonę biologiczną bakterii. Biorąc pod uwagę wysoką stabilność hydrolityczną aminofosfinianów, nawet przy niskim pH, wydaje się oczywiste, że związki te mogą być pomocne w poprawie skuteczności standardowego leczenia antybiotykami zakażeń spowodowanych przez patogeny infekujące przewód pokarmowy oraz drogi moczowe.

Zbadanie serii akceptorów Michaela zawierających ketony, estry karboksylowe, amidy i kwasy doprowadziło do odkrycia bardzo silnych inhibitorów ureazy. Co ciekawe, kilka związków o wysokiej aktywności hamującej stwierdzono spośród kwasów karboksylowych. Ogólnie, kwasy karboksylowe są znacznie mniej reaktywne niż odpowiadające im estry, amidy i ketony. Badania reaktywności wybranych inhibitorów wobec związków tiolowych przy wykorzystaniu glutationu potwierdziły wyżej wymienione zasady. Warto zauważyć, że kwas acetylenodikarboksylowy wydaje się szczególnie interesujący ze względu na nanomolarną aktywność hamującą ($K_i = 42.5$ nM) w połączeniu z bardzo niską reaktywnością grup tiolowych ($\log k_{GSH} = -2,14$). Testy przesiewowe jego pochodnych mogą prowadzić do dalszej optymalizacji tych parametrów.

Kolejną grupą związków były inhibitory oparte na strukturze octanów Mority-Baylisa-Hillmana (MBH). Mimo, że ich struktura jest podobna do akceptorów Michaela, mechanizm reakcji z tiolami (z resztami cysteiny) jest inny. Badania prostych przykładów octanów MBH doprowadziły do odkrycia bardzo silnych inhibitorów ureaz. Reakcja grupy -SH z podwójnym wiązaniem MBH przyczynia się do delokalizacji podwójnego wiązania i eliminacji etylu. W związku z tym mechanizmem, reakcja jest nieodwracalna. Wartość k_{inact}/K_i znajduje się w zakresie od 75.3 do 94.8 $M^{-1}s^{-1}$. Co ciekawe, mechanizm działania kwasów i analogicznych estrów jest podobny, jednak reaktywność z grupami tiolowymi jest znacząco różna (estry są znacznie bardziej reaktywne niż odpowiednie kwasy).

Fosfonowe i fosfinowe inhibitory ureaz bakteryjnych są badane od kilku lat i wykazują wysoką aktywność hamującą. Badania modelowania molekularnego wskazujące na zdolności wiązania z jonami metali połączone ze strukturalnym podobieństwem do analogu stanu przejściowego są kluczowymi parametrami odpowiedzialnymi za wysoką aktywność hamującą tej grupy związków.

W tej części badań zaproponowano przedłużenie struktury kwasów fosfonowych i fosfinowych przez dodanie grupy odpowiedzialnej za funkcję akceptora Michaela. Struktury te powinny oddziaływać jednocześnie z jonami niklu (część fosfonowa i fosfinowa kwasów) oraz resztami cysteiny. Taki sposób działania nie został jak dotąd wykazany dla żadnego znanego inhibitora ureazy, jednak uzyskane wyniki wykazują na wysoką aktywność i selektywność tej klasy związków. Aktywność inhibicyjna znajduje się w niskim zakresie mikromolarnym (stałe inhibicji znajdują się w zakresie od 5.17 do 36 μM).

Ostatnią grupą inhibitorów ureaz był ebselen i jego pochodne. Ebselen jest związkiem selenoorganicznym, który jest zdolny do reakcji ze związkami tiolowymi. Aktywność biologiczna, w tym aktywność przeciwbakteryjna, przeciwwirusowa, przeciwgrzybicza i przeciwzapalna, została już w literaturze dokładnie scharakteryzowana i opisana dla tej grupy związków chemicznych. Co ciekawe, metabolizm i toksyczność ebselenu zostały szczegółowo zbadane, a badania wykazały, że związek ten może być bezpiecznie stosowany u ludzi. Badania w niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że ebselen, diselenek oraz analogiczne pochodne wykazują bardzo niską, nanomolarną aktywność inhibicyjną o odwracalnym mechanizmie inhibicji. Tak więc, związki te zaliczają się do jednych z najbardziej aktywnych inhibitorów ureaz bakteryjnych z wartościami stałych hamowania znajdujących się w zakresie od 2.11 nM do 222 μM).

Niestety nie udało się otrzymać struktury krystalicznej ureazy ze *Sporosarcina pasteurii* i *Helicobacter pylori* w kompleksie z wybranymi inhibitorami. Otrzymano natomiast kryształy ureazy z *Sporosarcina pasteurii* ze związaną cząsteczką cytrynianu w miejscu aktywnym.