Ukierunkowane hamowanie aktywności ludzkiej mitochondrialnej nukleazy EXOG jako sposób modulacji procesu naprawy mitochondrialnego DNA

Marta Wyszkowska

Integralność mitochondrialnego DNA (mtDNA) jest kształtowana przez kilka procesów, w tym replikację, transkrypcję, naprawę i degradację. Spośród szlaków naprawy działających w mitochondriach najlepiej scharakteryzowana jest naprawa przez wycinanie zasad (ang. base excision repair, BER). W niektórych nowotworach, w tym w gruczolakoraku płuca, podwyższona integralność mtDNA wiąże się ze zwiększoną przeżywalnością komórek nowotworowych. Proces BER w mitochondriach opiera się częściowo na enzymach wspólnych ze szlakiem jądrowym, jednak 5′-egzonukleaza EXOG jest specyficzna dla mitochondriów. EXOG uczestniczy w naprawie BER mtDNA, a jego udział wiązany jest z usuwaniem określonych produktów pośrednich naprawy zawierających koniec 5'. Doniesiono, że utrata aktywności białka EXOG prowadzi do gromadzenia się nienaprawionych pęknięć jednoniciowych i ostatecznie do apoptozy. Cechy te czynią EXOG kandydatem celowanej terapii przeciwnowotworowej: wybiórcze zahamowanie specyficznej dla mitochondriów aktywności naprawczej mogłoby uwrażliwiać komórki nowotworowe na chemioterapeutyki uszkadzające DNA. Do tej pory nie zidentyfikowano jednak żadnego selektywnego inhibitora EXOG.

Celem pracy było znalezienie niskocząsteczkowego związku modulującego aktywność EXOG, który mógłby stanowić punkt wyjścia do opracowania takiego inhibitora. Zastosowano dwie komplementarne strategie: wysokoprzepustowe badanie przesiewowe (ang. high-throughput screening, HTS) biblioteki LOPAC®1280 oraz przeszukiwanie wirtualne oparte na strukturze białka, z wykorzystaniem kolekcji związków z komercyjnej biblioteki BioAscent.

W wyniku HTS zidentyfikowano kwas aurintrikarboksylowy (ATA), jako inhibitor zarówno aktywności endonukleolitycznej, jak i 5′-egzonukleolitycznej EXOG. Scharakteryzowano jego wpływ na różne substraty DNA i RNA, wyznaczono stałą dysocjacji (K_d) oraz zaproponowano mechanizm hamowania. ATA wiązał się z wolnym białkiem EXOG z wysokim powinowactwem, wyraźnie zwiększał jego stabilność termiczną, a po preinkubacji obniżał powinowactwo EXOG do DNA, co jest zgodne z modelem, w którym ATA zaburza tworzenie kompleksu EXOG-DNA być może w obrębie miejsca aktywnego lub w jego pobliżu.

Kokrystalizacja i nasączanie kryształów związkiem (ang. soaking) nie dostarczyły interpretowalnej gęstości elektronowej odpowiadającej ligandowi, więc nie uzyskano bezpośredniego obrazu strukturalnego miejsca wiązania. Reszty aminokwasowe zaproponowane w dokowaniu *in silico* zbadano metodą mutagenezy ukierunkowanej, jednak, ponieważ żaden z wariantów nie wykazał obniżonej wrażliwości na ATA, ich dokładny udział w wiązaniu pozostaje do potwierdzenia.

Co istotne, ATA okazał się wysoce nieselektywny. Związek ten hamował również szereg innych enzymów uczestniczących w metabolizmie DNA i RNA i nie wykazywał selektywności względem EXOG. Mimo to, połączenie ATA z kamptotecyną (CPT) w linii komórkowej gruczolakoraka płuca (A549) obniżało integralność mtDNA, aktywność metaboliczną i przeżywalność komórek. Dane te są zgodne z upośledzeniem naprawy mtDNA, choć nie stanowią jego bezpośredniego dowodu.

Przeszukiwanie wirtualne wyłoniło trzy potencjalne inhibitory, jednak w dalszych testach hamowały one także niespokrewnione enzymy i zostały zidentyfikowane jako związki agregujące, przez co żaden z nich nie spełniał kryteriów selektywnego inhibitora.

Podsumowując, w pracy nie zidentyfikowano selektywnego inhibitora EXOG. Ustalono, że ATA jest silnym, lecz nieselektywnym inhibitorem EXOG, i scharakteryzowano jego prawdopodobny mechanizm działania.

Połączenie ATA z kamptotecyną obniżało aktywność metaboliczną i integralność mtDNA w komórkach A549, co wspiera szerszą strategię uwrażliwiania komórek nowotworowych poprzez obniżanie integralności mtDNA.