

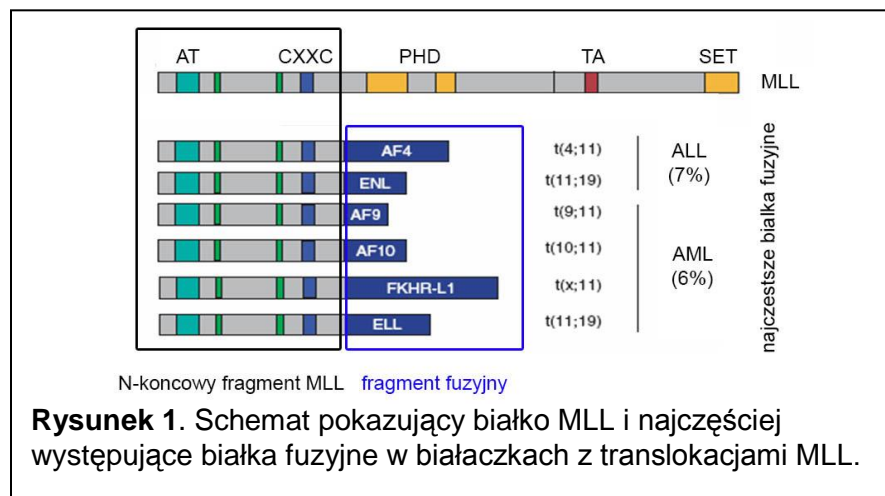
Dr Tomasz Cierpicki

Streszczenie wykładu:

STRUKTURA I FUNKCJA BIAŁEK UCZESTNICZĄCYCH W PATOGENEZIE BIAŁACZEK

Ostra białaczka szpikowa jest chorobą nowotworową układu krwiotwórczego. Rozwój białaczki następuje w wyniku mutacji genowych, wśród których najczęściej spotykane są translokacje, inwersje i duplikacje chromosomowe w komórkach krwi i szpiku kostnego. W wyniku takich mutacji następuje zaburzenie w dojrzewaniu leukocytów (białych krwinek) i gromadzenie się niedojrzałych morfologicznie komórek blastycznych we krwi, szpiku kostnym i narządach wewnętrznych (np. w śledzionie, węzłach chłonnych). W leczeniu ostrych białaczek najczęściej wykorzystuje się chemoterapię połączoną z przeszczepieniem szpiku kostnego. Pomimo częściowych sukcesów w leczeniu białaczek u wielu chorych leczenie nie jest skuteczne. Przykładem są białaczki wywoływane translokacjami genu *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*), które stanowią około 10% wszystkich ostrych białaczek szpikowych. Obecność translokacji *MLL* powoduje, że rokowania są złe i jedynie 35% pacjentów przeżywa więcej niż 5 lat od zdiagnozowania choroby. W przypadku białaczek *MLL* konwencjonalne metody leczenia wykorzystujące chemoterapię nie są skuteczne i duże nadzieje wiąże się z opracowaniem nowych leków do tzw. terapii celowanej.

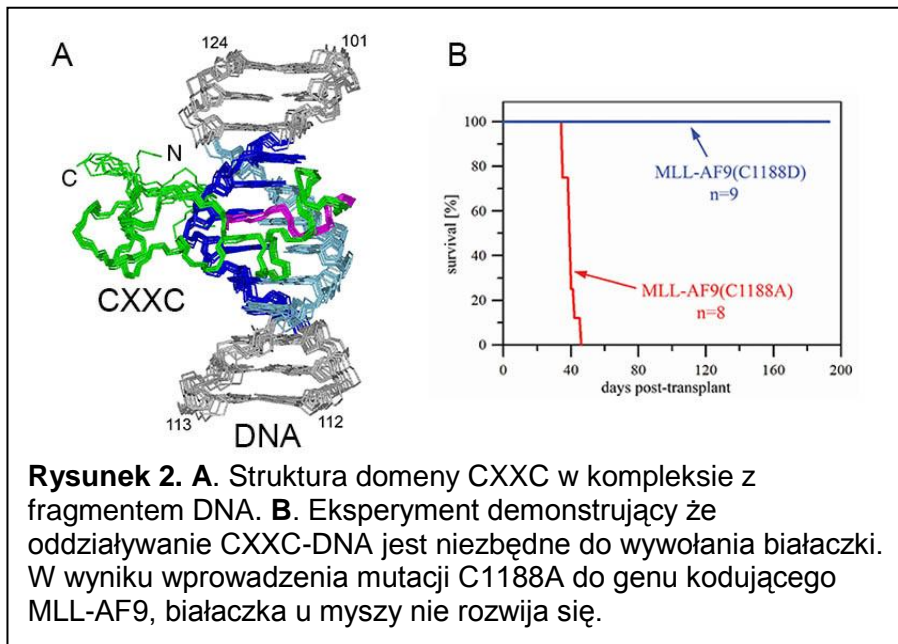
Molekularnym podłożem białaczek *MLL* jest translokacja w obrębie genu *MLL* zlokalizowanego na chromosomie 11q23 z różnymi partnerami genowymi. Translokacje te prowadzą do ekspresji tzw. białek fuzyjnych, które zaburzają ekspresję genów *Hox* kluczowych dla prawidłowego rozwoju komórek krwi. Dotychczas zidentyfikowano ponad 50 białek fuzyjnych *MLL*, w których N-końcowy fragment białka pochodzi od genu *MLL* i jest połączony z fragmentem fuzyjnym (**Rysunek 1**). Do najczęściej występujących białek fuzyjnych *MLL* należą *MLL-AF9*, *MLL-ENL* i *MLL-ELL*. Wiele prac naukowych wykazuje, że N-końcowy fragment *MLL* w białkach fuzyjnych jest kluczowy dla ich onkogennej aktywności w białaczce. N-koniec *MLL* oddziałuje z DNA oraz innymi białkami i ekspresja zmodyfikowanych wariantów *MLL* z usuniętymi fragmentami na N-końcu powoduje utratę właściwości onkogennych. Wyniki te sugerują, że N-końcowy fragment *MLL* pełni bardzo ważną rolę w rozwoju białaczki. Dlatego też, zablokowanie oddziaływań *MLL* z innymi białkami przy zastosowaniu niskocząsteczkowych związków chemicznych może stanowić skuteczny sposób na programowanie i otrzymanie



nowych leków do terapii celowanej. Prace w moim laboratorium na Uniwersytecie Michigan skoncentrowane są na badaniu struktury i oddziaływań białka *MLL* z wybranymi partnerami białkowymi. Celem tych badań jest znalezienie „pięty Achilleś” białek fuzyjnych *MLL*

i opracowanie nowych małowcząsteczkowych inhibitorów blokujących ich aktywność poprzez zahamowanie oddziaływań MLL. W tym celu prace w moim laboratorium koncentrują się na badaniach strukturalnych różnych fragmentów białka MLL jak również oddziaływań MLL z innymi białkami oraz kwasami nukleinowymi.

Badania czynnościowe wykazały, że tzw. domena CXXC w białku MLL jest niezbędna do onkogennej aktywności białek fuzyjnych MLL w białaczce. Domena CXXC oddziałuje z kwasami nukleoinowymi i specyficznie rozpoznaje DNA bogate w nie-metylowane fragmenty CpG. Usunięcie domeny CXXC z białek fuzyjnych MLL przy użyciu metod genetycznych powoduje, że białko takie traci właściwości onkogenne. Z tego powodu poznanie jak domena CXXC rozpoznaje DNA ma duże znaczenie dla zrozumienia funkcji tej domeny w aktywności



białek fuzyjnych MLL oraz dla zaprojektowania nowych leków, które mogą hamować aktywność domeny CXXC. W celu rozwiązania struktury białka CXXC zastosowaliśmy metodę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Zaletą metody NMR jest możliwość badania struktury białek w roztworze wodnym. Rozwiązaliśmy strukturę

domeny CXXC oraz kompleksu tej domeny z krótkim fragmentem DNA (**Rysunek 2A**).

Struktura ta dokładnie obrazuje sposób wiązania domeny CXXC do DNA oraz mechanizm rozpoznawania nie-metylowanego DNA. W oparciu o badania strukturalne zaprojektowaliśmy punktową mutację cysteiny 1188 do alaniny (C1188A), która uniemożliwia wiązanie CXXC do DNA. Wprowadzenie pojedynczej mutacji C1188A do MLL-AF9 powoduje utratę właściwości onkogennych w eksperymentach *in vivo* (**Rysunek 2B**). Badania te zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Nature Structural and Molecular Biology* (Cierpicki et al, NSMB 2010). Kolejnym etapem tych badań jest zidentyfikowanie związków chemicznych, które wiążą się do domeny CXXC i hamują oddziaływanie z DNA jako nowych potencjalnych leków przeciwbiałaczkowych.

Do aktywności onkogennej białek fuzyjnych MLL niezbędne jest ich oddziaływanie z innymi białkami: meniną i LEDGF. Prace prowadzone w kilku niezależnych zespołach naukowych pokazały, że oddziaływania te są kluczowe dla rozwoju białaczki MLL u myszy. Ponadto badania te wykazały, że wyeliminowanie oddziaływania MLL-AF9 z meniną i LEDGF przy użyciu metod inżynierii genetycznej blokuje rozwój ostrej białaczki *in vivo*. W celu zrozumienia jak białko MLL oddziałuje z meniną i białkiem LEDGF przeprowadziliśmy szereg badań strukturalnych przy użyciu metod krystalograficznych jak i spektroskopii NMR. Po wielu

próbach uzyskaliśmy kryształy meniny i kompleksu meniny z fragmentem MLL i poznaliśmy wysokorozdzielcze struktury używając metody rentgenografii strukturalnej. Menina jest białkiem o złożonej α -helikalnej strukturze, w którym w centralnym miejscu znajduje się miejsce wiążące dla MLL (**Rysunek 3**). Nasze dalsze badania pozwoliły również scharakteryzować oddziaływanie fragmentu MLL z domeną białka LEDGF. Te badania strukturalne posłużyły do zaprojektowania i otrzymania bardzo silnie działających, małowcząsteczkowych inhibitorów, które wiążą się do meniny i blokują oddziaływanie z białkami fuzyjnymi MLL (wyniki opublikowane w Grembecka et al. *Nature Chemical Biology* 2012 oraz Shi et al, *Blood* 2012). W układach modelowych *in vitro* oraz w modelach mysich białaczek, inhibitory te wykazują bardzo silne działanie - selektywnie zabijają komórki białaczkowe z translokacjami MLL. Celem naszych dalszych badań jest optymalizacja właściwości tych inhibitorów jako nowych, potencjalnych leków do badań klinicznych.

