

PH.D. DISSERTATION

Savčí Serinracemasa jako Cíl Terapeutického Zásahu

Jana Jirásková

Školitel: Jan Konvalinka



Department of Biochemistry
Faculty of Science
Charles University



Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
Gilead Sciences & IOCB Research Centre
Academy of Sciences of the Czech Republic

Praha 2010

Úvod

Serinracemasa (SR) je pyridoxal-5'-fosfát (PLP)-dependentní enzym odpovídající za produkci D-serinu. D-serin slouží jako neuropřenašeč, a spolu s L-glutamátem působí jako agonista ionotropních *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů. NMDA receptory jsou důležité pro nervovou signalizaci. Nedávné studie na myších s nefunkčním genem pro SR (knock-out myši) ukázaly, že SR katalyzuje vznik přibližně 90% veškerého D-serinu v mozku.

SR byla poprvé izolována ze souboru 60ti krysích mozků, a to v roce 1999. Orthology SR jsou přítomné jak u savců, tak i u rostlin nebo kvasinek. Savčí serinracemasy vykazují vysokou sekvenční identitu (okolo 90%). Myši a lidská SR si jsou navíc podobné svými enzymovými vlastnostmi, což podtrhuje fakt, že myší model je vhodný pro studium lidské SR.

SR se vyskytuje v buněčném cytosolu, a to ve formě dimeru. Monomerní jednotka má velikost přibližně 37kDa. Kromě PLP potřebuje pro plnou aktivitu divalentní ionty, například Ca^{2+} nebo Mg^{2+} , nukleotidy, jako je ATP, a redukční činidla. Savčí forma je neaktivnější ve 37 °C a při mírně zásaditém pH. Vedle racemizace SR katalyzuje také β -eliminaci (také dehydrataci, či deaminaci), při které přeměňuje L-serin, a v menší míře i D-serin, na pyruvát a amoniak.

Před několika měsíci byla poprvé publikována 3D struktura lidské a krysí SR. Celková forma i struktura aktivního místa připomínají strukturu kvasinkové SR nebo ostatních PLP-enzymů ze stejné rodiny (Typ II). PLP-enzymy jsou podle své struktury rozčleněny do několika rodin. SR patří do rodiny II (Fold type II) také pojmenované podle typického zástupce, serin/treonin dehydratasy. 3D struktura nabízí cenný vhled do katalytického mechanismu SR.

Další stadium SR je na místě především vzhledem k roli SR v chorobách spojených s nesprávnou aktivací NMDA receptorů. Ukázalo se, že DS působí excitotoxicky a přispívá tak k neurodegenerativním chorobám jako je Alzheimerova choroba nebo amyotrofni laterální skleróza. Naopak snížená hladina DS je spojována s některými symptomy schizofrenie. Studie na SR knock-out myších ukázala snížené toxické účinky amyloidového β -peptidu. Autoři studie tak poprvé nabídli pádný argument pro stadium SR jako cíle farmakologického zásahu. Jako potenciální léky jsou již mnoho let studovány přímé blokátory NMDA receptorů. Jak se ve většině případů ale ukázalo, tyto látky mají nežádoucí účinky, pro které nejsou pro léčbu přijatelné. Inhibice SR tak nabízí novou cestu jak regulovat excitotoxické působení NMDA-receptorů. Inhibitory SR jsou také důležité nástroje pro další studium působení DS a NMDA receptorů.

Cíle projektu

- Produkce a purifikace rekombinační myší serinracemasy (mSR).
- Enzymatická charakterizace SR.
- Zavedení metody na detekci reakčních produktů.
- Nalezení účinných a specifických inhibitorů SR.
- Vyřešení 3D struktury SR.

Výsledky

Připravili jsme aktivní rekombinantní mSR v *E. coli*. Purifikovaný enzym jsme kineticky charakterizovali pomocí metody stanovení na HPLC. Kinetické parametry SR ukázaly, že mSR katalyzuje přeměnu LS na DS (racemizaci) i na pyruvát (β -eliminaci), a přeměnu DS na LS, ale ne přeměnu DS na pyruvát. Zjistili jsme, že katalytická účinnost β -eliminace LS, která je považována za vedlejší reakci SR, je o něco vyšší než účinnost racemizace. SR také přeměňuje jiné substráty s vyšší účinností než serin, například L-serin-*O*-sulfát, L-threo-3-hydroxyaspartát, nebo L-Cl- β -alanin. Všechny tyto nové substráty podléhají β -eliminaci nikoliv racemizaci. Ukázalo se, že L-threonin je jediný další substrát, který je vedle β -eliminace také racemizován; L-*allo*-threonin je přeměňován na D-threonin a L-threonin na D-*allo*-threonin a *vice versa*. Threonin je β -eliminován s mnohem vyšší účinností. L-*erythro*-3-hydroxyaspartát, další isomer 3-hydroxyaspartátu, je dodnes neúčinnější známý kompetitivní inhibitor SR. Různé malé dikarboxylové kyseliny, jako malonová, dihydroxyfumarová, nebo maleinová, jsou také kompetitivní inhibitory SR. Nejmenší známý kompetitivní inhibitor SR je aminokyselina glycin. Přestože jeho afinita je poměrně nízká, může se vzhledem ke své velké koncentraci v buňce fyziologicky projevat jako inhibitor.

Vzhledem k tomu, že většina SR inhibitorů jsou v přírodě se vyskytující malé molekuly, provedli jsme měření s jejich analogy za účelem nalezení nových inhibitorů. Při prvním proměření jsme odhalili, že hydroxamové kyseliny účinně inhibují SR. Detailní studium ukázalo, že mechanismus účinku je poměrně komplexní. Některé z inhibitorů kovalentně interagovali s PLP a chovali se nespecificky. Popsali jsme tak reakci některých hydroxamových kyselin s PLP, a také jsme našli nový účinný kompetitivní inhibitor SR, β -hydroxamát kyseliny L-asparagové.

Během studia inhibice SR se nám podařilo vyvinout méně časově náročnou a méně pracnou metodu detekce DS založenou na kapilární elektroforéze. Postup zahrnoval derivatizaci přímo v kapiláře za použití *ortho*-phtaldialdehydu v kombinaci s 2-mercaptoethanolem jako donorem SH skupin. Výsledky postupu, založeném na CE, jsou srovnatelné s výsledky s jinak používanou metodou založenou na HPLC.

Provedli jsme mnoho pokusů o získání 3D struktury serinracemasy ale tento cíl se nám nepodařilo splnit. Protože nedávno vyšla struktura lidské a krysí SR s inhibitorem malonátem v aktivním místě, rozhodli jsme se pomocí dockovacích metod zmapovat vazbu různých inhibitorů, v čele s L-*erythro*-3-hydroxyaspartátem, a také vazbu komplexu ATP/Mg²⁺. Výsledky jsme shrnuli v souhrnném článku

zabývající se inhibicí SR, kde také uvádíme naše dosud nepublikované výsledky o inhibici SR citrátem a různými analogy malonátu.

Publikace uvedené v disertaci:

Stříšovský, K.; Jirásková, J.; Mikulová, A.; Rulíšek, L.; Konvalinka, J., Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity dicarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. *Biochemistry*. 2005. 44(39), 13091-100.

Koval, D.; Jirásková J.; Stříšovský, K.; Konvalinka, J.; Kašička, V., Capillary electrophoresis method for determination of D-serine and its application for monitoring of serine racemase activity. *Electrophoresis*. 2006. 27(13), 2558-66.

Hoffman, H.E.; Jirásková, J.; Cígler, P.; Šanda, M.; Schraml, J.; Konvalinka, J., Hydroxamic acids as a novel family of serine racemase inhibitors: mechanistic analysis reveals different modes of interaction with the pyridoxal-5'-phosphate cofactor. *J Med Chem*. 2009. 52(19), 6032-6041.

Jirásková, J.; Ettrich, R.; Vorlová, B.; Hoffman, H.E.; Lepšík, M.; Jansa, P.; Konvalinka, J., Inhibition of Human Serine Racemase, an Emerging Target for Medicinal Chemistry. *Curr. Drug Targets* (submitted, May 2010)