

Streszczenie:

Aleksandra Ferenc-Mrozek

„Zastosowanie wybranych metod fizyki i biologii molekularnej w badaniach struktury i oddziaływań białek z rodziny DcpS”

Obiektem badań opisanych w rozprawie doktorskiej jest białko DcpS (ang. Decapping Scavenger), które bierze udział w degradacji struktury (tzw. kapu) znajdującej się na 5' końcu informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA). Hydroliza końca 5' mRNA przez enzym DcpS w obrębie krótkich oligonukleotydów chroni komórkę przed akumulacją cząsteczek kapu, której konsekwencją może być inhibicja procesów takich jak: biosynteza białek na matrycy mRNA czy dojrzewanie pre-mRNA. Zaburzenia związane z dysfunkcją komponentów zaangażowanych w metabolizm mRNA (w tym enzymu DcpS) u człowieka mogą być przyczyną m.in. chorób układu nerwowego, sercowo-naczyniowego a nawet nowotworów.

Eksperymenty zaprezentowane w rozprawie zostały wykonane na białkach DcpS pochodzących z *H.sapiens* (człowiek), *Caenorhabditis elegans* (nicień wolnożyjący) oraz *Ascaris suum* (nicień pasożytniczy – glista świńska). Wiedza na temat mechanizmów zapewniających prawidłowy cykl życia mRNA w wybranych organizmach jest bardzo istotna ponieważ:

- *C.elegans* jest modelowym organizmem używanym w biologii molekularnej, wykorzystywanym w celu zrozumienia kluczowych procesów zachodzących w komórkach eukariotycznych,
- *A.suum* jest pasożytem kosmopolitycznym prawdopodobnie zdolnym do bytowania w człowieku,
- od niemalże dekady pojawiają się nowe doniesienia na temat powiązania dysfunkcji ludzkiego enzymu DcpS z upośledzeniem umysłowym oraz fizycznym, która została zarejestrowana jako nowa jednostka chorobowa w medycynie.

Wyniki eksperymentalne opisane w rozprawie zostały podzielone na dwie części. Pierwsza dotyczyła przygotowania odpowiedniego konstruktu bakteryjnego do „produkcji” białek DcpS w hodowlach bakteryjnych. W tej części analizowałam wpływ lokalizacji etykiety złożonej z sekwencji 6-10 histydyn (służącej do oczyszczania białka metodą chromatografii metalopowinowactwa) na N- lub C- końcu białka DcpS z *H.sapiens*, *C.elegans* oraz *A.suum* na strukturę, stabilność oraz właściwości hydrolityczne. Moje wyniki potwierdziły, że sekwencja polihistydynowa nie wpływa znacząco na aktywność, termostabilność oraz strukturę drugorzędową białek DcpS. Otrzymane różnice np.: dwukrotny wzrost aktywności enzymu lub przesunięcie o 1°C temperatury topnienia w porównaniu z białkiem natywnym (brak etykiety histydynowej), można raczej rozpatrywać pod kątem tendencji do zmian w pewnych kierunkach. Wyjaśniłam także wątpliwość dotyczącą specyficzności substratowej enzymu DcpS wobec cząsteczki m⁷GDP w kontekście lokalizacji etykiety w białku, która w literaturze nie została opisana w sposób jednoznaczny. Eksperymentem torującym drogę do dalszych badań, które zostały przedstawione w drugiej części wyników, była obserwacja zmian struktur drugorzędowych podczas denaturacji termicznej białek DcpS metodą spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). CD jest techniką często używaną w celu kontroli procesu rozwijania termicznego oraz chemicznego białek. Białka DcpS z *H.sapiens* oraz nicieni wraz z rosnącą temperaturą prezentowały przyrost populacji β-kartek. Typowe procesy denaturacji prowadzą

do utraty elementów struktury białka takich jak α -helisy czy β -kartki. Dlatego też sytuacje, w których obserwuje się wzrost poziomu β -struktur w trakcie denaturacji są interesującym zjawiskiem, wymagającym szczegółowej analizy i wyjaśnienia.

W literaturze brak jest informacji na temat stabilności temperaturowej białek DcpS oraz mechanizmów ich agregacji. Postanowiłam zatem wykorzystać tę lukę i podjąć próbę charakterystyki enzymów DcpS pod tym kątem. Naukowcy od dawna badają wpływ czynników stresowych jak: temperatura czy obecność denaturanta (w moich badaniach był to chlorowodorek guanidyny) na trwałość struktur białkowych. Paradoksalnie, śledzenie procesu denaturacji, a więc niszczenia struktury białka, pozwala lepiej poznać i zrozumieć nie tylko mechanizmy ewentualnej agregacji, ale także oddziaływania kluczowe w procesie fałdowania białka do specyficznej dla niego konformacji oraz istotne dla stabilizacji tej struktury.

Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty wykazały, że białka DcpS z człowieka oraz nicieni inkubowane w stałej temperaturze 37°C wraz z upływem czasu tworzą agregaty o morfologii i strukturze drugorzędowej charakterystycznej dla amyloidów. Istotnym krokiem dla mojej pracy okazało się włączenie do badań ludzkiego białka DcpS z mutacją, które wykazało silniejszą tendencję do agregacji w stosunku do ludzkiego białka w formie natywnej. W kontekście otrzymanych wyników dotyczących formowania włókien amyloidowych koniecznym było podjęcie kroków w celu wyjaśnienia tego procesu. Mechanizm agregacji białek DcpS okazał się tematem trudnym do ustalenia. Denaturacja termiczna oraz chemiczna wskazała jej przypuszczalne ścieżki, gdzie jednym z etapów jest prawdopodobnie separacja faz i formowanie białkowych kondensatów.

Otrzymane wyniki stanowią pierwsze doniesienia w tematyce agregacji białek DcpS. Trudno jest na chwilę obecną określić, czy formowane przez enzym DcpS włókna mają charakter funkcjonalny czy patologiczny oraz czy ich obecność w eksperymentach *in vitro* potwierdzi się *in vivo* w komórkach. Zaprezentowane wyniki mogą posłużyć jako punkt wyjścia do dalszych badań i rozważań na ten temat.

W pracy zastosowano szereg metod, m.in. spektroskopię fluorescencyjną, spektroskopię dichroizmu kołowego, dynamiczne rozpraszanie światła, różnicową kalorymetrię skaningową, różnicową fluorymetrię skaningową, mikroskopię konfokalną i elektronową. Niektóre wektory bakteryjne kodujące białka DcpS, służące do jego produkcji w hodowlach bakteryjnych i oczyszczania, zostały zaprojektowane i wykonane przeze mnie metodami biologii molekularnej. Podczas realizacji swojej pracy posiłkowałam się usługami laboratoriów komercyjnych oraz wchodzących w skład uniwersyteckiego Core Facility.

We wstępie mojej rozprawy przedstawiłam dotychczasowy stan wiedzy na temat białek DcpS z człowieka oraz wybranych nicieni. Aby rola białka DcpS była zrozumiana w kontekście biologicznym, w części literaturowej opisałam procesy oraz zagadnienia związane z metabolizmem mRNA w komórce. W świetle otrzymanych wyników istotnym podrozdziałem wstępu jest także: „Fizykochemia agregacji białek”, opisująca mechanizmy agregacji oraz jej aspekt medyczny. W kolejnych rozdziałach przedstawiłam cele badawcze oraz charakterystykę zastosowanych metod badawczych. Otrzymane wyniki wraz z analizą przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń w kontekście danych literaturowych zaprezentowałam w rozdziale: Wyniki, Wnioski i Dyskusja badań własnych, który został podzielony na dwie części. Ostatni rozdział: Podsumowanie zawiera najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań.