

Tytuł pracy

Badania białek zaangażowanych w wyciszanie ekspresji genów metodami biofizyki i biologii molekularnej

Streszczenie

Niniejsza praca doktorska dotyczy biofizycznych podstaw oddziaływania między białkami zaangażowanymi w wyciszanie ekspresji genów przez mikro-RNA (miRNA), a mianowicie pomiędzy białkiem CNOT1 a domeną wyciszającą białka GW182. W procesie wyciszania ekspresji genów przez miRNA, cząsteczki te wiążą się z białkiem Argonaute i naprowadzają je na cząsteczkę mRNA, która ma ulec wyciszeniu. Z białkiem Argonaute oddziałuje białko GW182, które z kolei wiąże się z kompleksem deadenylaz CCR4-NOT. Kompleks ten deadenyluje mRNA oraz może także blokować jego translację, co łącznie prowadzi do wyciszenia ekspresji danego genu. Z kolei w wyciszaniu mRNA zawierających sekwencje bogate w adeninę i urydynę, rolę miRNA wraz z Argonaute i GW182 pełni białko o nazwie tristetraprolina, które odgrywa kluczową rolę w procesach odpowiedzi na stany zapalne. Oddziaływania pomiędzy składnikami tego skomplikowanego układu białek o wielkich masach cząsteczkowych są jeszcze stosunkowo słabo poznane. W szczególności, nieznane były miejsca odpowiedzialne za tworzenie kompleksu pomiędzy GW182 a CCR4-NOT.

Doświadczenia z zakresu biologii molekularnej pozwoliły na identyfikację miejsc wiążących CCR4-NOT w sekwencji domeny wyciszającej białka GW182. Jedno z nich ma kluczowy wpływ na deadenylację, a drugie - kluczowy wpływ na oddziaływanie z kompleksem CCR4-NOT za pośrednictwem jego centralnej podjednostki CNOT1. Badania biofizyczne metodą wymiany wodór-deuter sprzężoną ze spektrometrią mas pozwoliły z kolei na identyfikację miejsca oddziaływania GW182 na białku CNOT1 (we fragmencie 800-999), które, niespodziewanie, okazało się bardzo dobrze pokrywać z miejscem oddziaływania CNOT1(800-999) z tristetraproliną. Eksperymenty biochemiczne wykazały, że białka te konkurują o miejsce oddziaływania na CNOT1(800-999). Białka GW182 i tristetraprolina oddziałują z CNOT1 wykorzystując ten sam motyw sekwencji, RLPX ϕ , w bardzo podobny, jednak nie identyczny sposób. Sekwencja ta prawdopodobnie działa jako tzw. krótki motyw liniowy (z *ang.* short linear motif, SLiM). Zatem te dwa szlaki kontroli nad ekspresją genów krzyżują się.

W pracy zbadano także dynamikę strukturalną białka CNOT1(800-999) oraz domeny wyciszającej białka GW182. Wykazano eksperymentalnie, że białko GW182 ma nieustrukturyzowany charakter, oprócz domeny wiążącej RNA (RRM), która ma strukturę bardzo dynamiczną. Natomiast białko CNOT1(800-999) charakteryzuje się stabilną, ściśle upakowaną strukturą.

Przeprowadzone badania doprowadziły do odkrycia miejsc oddziaływania pomiędzy natywnie nieustrukturyzowaną domeną wyciszającą GW182, a helikalnym fragmentem białka CNOT1(800 999), przyczyniając się do zrozumienia molekularnych mechanizmów rozpoznawania w kompleksach białkowych odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów w różnych procesach komórkowych.