

Streszczenie w języku polskim

Zarówno eksperymenty biochemiczne jak i symulacje białek prowadzone są zwykle w rozcieńczonych roztworach takich jak bufony lub woda z jonami soli. Tymczasem naturalne środowisko w którym funkcjonują białka stanowi zupełnie inne środowisko; na przykład cytoplazma żywych komórek w 30-40% zajęta jest przez makromolekuły takie jak RNA i białka. Taki poziom zatłoczenia może wpływać na dyfuzję i dynamikę konformacyjną białek, a więc również pośrednio na ich aktywność enzymatyczną.

W tej pracy opisuję badania wpływu zatłoczonego środowiska na proteazę NS3/4A z wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), która jest przykładem białka posiadającego wewnętrznie nieustrukturyzowane fragmenty. Takie białka stanowią prawie połowę wszystkich białek, i nawet większą część enzymów wirusów, które wykorzystują te fragmenty do wiązania i przejmowania kontroli nad strukturami komórkowymi i enzymami infektowanego organizmu. Nieustrukturyzowane fragmenty białek zyskują bardziej uporządkowane konformacje w kontakcie z makromolekułami z którymi oddziałują, lub pod wpływem zmian w otaczającym je środowisku. Z tego powodu mogą być one szczególnie podatne na wpływ zatłoczenia molekularnego.

Aby lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy wpływu zatłoczenia na NS3/4A, połączyłam analizę eksperymentów laboratoryjnych i symulacji prowadzonych w analogicznych warunkach. W obu przypadkach proteaza była obserwowana w wodzie, oraz w obecności glikolu polietylenowego (PEG) i polisacharozy. Oba polimery należą do cząsteczek najczęściej wykorzystywanych do modelowania zatłoczonego środowiska w doświadczeniach laboratoryjnych, ale prawie nigdy nie są włączane do symulacji dynamiki molekularnej (MD). Aby podzielić obserwowane efekty na te spowodowane wyłącznie przez ograniczenie przestrzeni, i te wynikające z oddziaływania z cząsteczkami modelującymi zatłoczone środowisko (crowderami), dodatkowo przeprowadziłam symulacje proteazy otoczonej gruboziarnistymi pseudo-cząsteczkami, które oddziałują z białkiem w minimalnym stopniu.

Dzięki połączeniu obserwacji układu w dwóch skalach – miliardów białek w eksperymentach biofizycznych i jednego białka w symulacjach, udało się zaproponować mechanizm molekularny odpowiedzialny za bardzo różny wpływ PEG i polisacharozy na aktywność NS3/4A. Symulacje MD w wodzie i w otoczeniu różnych crowderów wykazały również, że zatłoczone środowisko może wpływać na funkcje biologiczne proteazy. Dzięki stabilizacji prekursora helisy transbłonowej na N-końcowym fragmencie NS4A, zatłoczone środowisko wewnątrz komórki ludzkiej ułatwia proces zakotwiczenia kompleksu NS3/4A w błonie lipidowej.

Niniejsza praca opisuje jedną z pierwszych symulacji MD białka w otoczeniu pełnoatomowych crowderów PEG, oraz pierwszą symulację białka w otoczeniu polisacharozy reprezentującej wykorzystany w eksperymentach Ficoll. Ten polimer powszechnie uważany jest za nie wykazujący oddziaływań z białkami, jednakże w trajektoriach uzyskanych z modelem polisacharozy można zauważyć wiele kontaktów i wiązań wodorowych między crowderami a badanym białkiem.

Nowe techniczne metody opisane w pracy obejmują parametryzację pełnoatomowych modeli polimerów PEG i polisacharozy w taki sposób, aby zapobiec ich agregacji w symulacji wielu molekuł, a także opisanie modelu sferycznych gruboziarnistych crowderów, które mogą być wykorzystane w wieloskalowych symulacjach z wodą i białkiem w reprezentacji pełnoatomowej.