

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Interakcja ludzkich rybosomalnych białek P z katalityczną podjednostką rycyny

Eukariotyczny „kciuk” rybosomalny jest kompleksem białkowym wchodzącym w skład rybosomalnego centrum GTPazowego, które odpowiedzialne jest za stymulację hydrolizy GTP za pośrednictwem translacyjnych GTPaz, białek które wspomagają rybosom w procesie translacji. Kompleks „kciuka” zbudowany jest z rybosomalnego białka uL10 oraz unikalnych dla eukariotów białek P1/P2. Dwa heterodimery P1-P2 razem z białkiem uL10 tworzą pentameryczny kompleks o konfiguracji $uL10(P1-P2)_2$. Kompleks pentameryczny jest odpowiedzialny za interakcję z translacyjnymi GTPazami, odgrywając rolę w ich wiązaniu do rybosomu oraz bierze udział w stymulacji hydrolizy GTP za pośrednictwem translacyjnych GTPaz. W konsekwencji, kompleks ten jest odpowiedzialny za wysoką procesywność rybosomu w translacji. Rybosomalne białka wchodzące w skład pentamerycznego kompleksu zawierają wysoce konserwatywny fragment C-terminalny, który jest krytyczny dla interakcji z translacyjnymi GTPazami. Uważa się, że fragment C-terminalny są główną platformą wiążącą rodzinę translacyjnych GTPaz, zapewniających pełną funkcjonalność dla rybosomu. Co ciekawe, szereg badań wykazał, że białka te są również celem dla białek z rodziny RIP (ang. *Ribosomal Inactivating Protein*), które są uważane za jedne z najbardziej toksycznych białek w przyrodzie. Białka RIP prowadzą depurynację rRNA w obrębie centrum GTPazowego, co prowadzi do zahamowania translacji za pośrednictwem rybosomu, a konsekwencją tego jest śmierć komórki.

Celem badawczym w niniejszej pracy było zdefiniowanie roli poszczególnych białek P, a przede wszystkim roli indywidualnych fragmentów C-terminalnych w interakcji z białkiem RIP - rycyną. W tym celu zbadano interakcję ludzkich kompleksów białek P oraz ich form delecyjnych z katalityczną podjednostką rycyny (RTA). Należy podkreślić, że mimo wielu lat badań, interakcja białek RIP z rybosomalnymi białkami P nie była dokładnie zbadana. Opisano udział białek P i ich C-końców w wiązaniu białek RIP wykorzystując szereg badań biochemicznych, ale analizy przeprowadzono wyłącznie w tzw. izolowanych układach doświadczalnych z użyciem różnych form oligomerycznych białek P, takich jak homodimery P2 czy oligomery P1, bądź z wykorzystaniem krótkich peptydów. Z uwagi na fakt, iż białka P

preferencyjnie tworzą istotne biologicznie heterodimery P1-P2, które uznaje się za centralny element funkcjonalny „kciuka” rybosomalnego, w niniejszej pracy zbadano interakcję dimeru P1-P2 z białkami RIP, wykorzystując heterodimer jako tzw. najmniejszą funkcjonalną jednostkę strukturalną „kciuka”. W ramach prac badawczych opracowano *de novo* konstrukty genetyczne pozwalające na otrzymanie tzw. delecyjnych form ludzkich białek P, w których usunięto 16-cie konserwatywnych, C-końcowych aminokwasów (odpowiednio nazwane jako P1_{ΔC} dla białka P1 pozbawionego fragmentu CTD oraz P2_{ΔC} dla białka P2, także nieposiadającego fragmentu C-terminalnego). Zakres prac badawczych obejmował szereg działań w zakresie biologii molekularnej oraz analiz biofizycznych, m.in.: inżynierię genetyczną oraz inżynierię białka, a w tym chromatografię jonowymienną (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC), dichroizm kołowy (ang. *Circular Dichroism*, CD), nano-różnicową fluorymetrię skaningową (ang. *nano differential scanning fluorimetry*, nanoDSF), spektrometrię mas w warunkach niedenaturujących (ang. *Native Mass Spectrometry*, „native”-MS). Ponadto zastosowano techniki do analizy oddziaływań molekularnych białko-białko takie jak termoforeza mikroskalowa (ang. *Microscale Thermophoresis*, MST) oraz interferometria bio-warstwowa (ang. *Bio-layer Interferometry*, BLI).

Pierwszym zadaniem było otrzymanie rekombinowanych białek P1, P2 oraz ich form delecyjnych P1_{ΔC}, P2_{ΔC}. W tym celu przeprowadzono heterologiczną ekspresję białek P i w zależności od parametrów biofizycznych poszczególnych białek wykonano ich oczyszczanie. Otrzymane poszczególne białka rekombinowane zostały wykorzystane do uformowania kompleksów białkowych: heterodimeru P1-P2, heterodimerycznych form delecyjnych - P1-P2_{ΔC}, P1_{ΔC}-P2, P1_{ΔC}-P2_{ΔC} oraz homodimerów P2-P2 i P2_{ΔC}-P2_{ΔC}. W kolejnym etapie przeprowadzono charakterystykę strukturalną otrzymanych kompleksów białek P z wykorzystaniem metod biofizycznych takich jak SEC, CD, nanoDSF oraz „native”-MS. Równolegle, wykonano heterologiczną ekspresję katalitycznej podjednostki rycyny (RTA). Otrzymane białko rekombinowane oczyszczono na drodze chromatografii powinowactwa oraz wykonano, analogiczną do analiz dimerów, charakterystykę biofizyczną. Badanie interakcji białko:białko przeprowadzono za pomocą dwóch metod badawczych: MST oraz BLI. W ramach badań wyznaczono wartości stałych dysocjacji, a tym samym określono poziom powinowactwa poszczególnych kompleksów do RTA. Uzyskane wyniki wskazały, że C-terminalny region białek P jest odpowiedzialny za oddziaływanie z białkami RIP, jednakże badania te pozwoliły na precyzyjne zdefiniowanie roli poszczególnych C-terminalnych elementów, wskazując na nierównocenną rolę tychże fragmentów polipeptydowych w obrębie

białka P1 i P2; mianowicie zaobserwowano, że dominującą rolę w interakcjach z RTA wykazuje fragment C-terminalny pochodzący z białka P1. Wyniki analiz sugerują, że nie tylko fragment C-terminalny, ale także przestrzenna organizacja dimeru P1-P2 ma znaczenie dla interakcji z RTA. Na bazie uzyskanych wyników zaproponowano model interakcji heterodimeru P1-P2 z uwzględnieniem organizacji przestrzennej kompleksu, wskazując, że układ dwóch białek P1-P2 zapewnia właściwą orientację przestrzenną fragmentu C-terminalnego białka P1, co promuje interakcję z białkami RIP.

Деметрије Момчић