

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU

Michał Chojnacki

**Analiza właściwości nowych pochodnych ubikwityny oddziałujących
z proteasomem**

**Research into novel ubiquitin-based molecules interacting with
proteasome**

Rozprawa doktorska

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Medycznej
Katedry Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor pracy:
prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Łódź 2017

Streszczenie

System ubikwityna-proteasom (UPS) jest ATP-zależnym, proteolitycznym mechanizmem selektywnie degradującym białka wewnątrzkomórkowe. Stanowi on kluczowy element systemu kontroli jakości białek, eliminujący zdeformowane i uszkodzone białka, które negatywnie wpływają na homeostazę komórki. Ubikwityna (Ub) pełni rolę markera oznaczającego białka przeznaczone do degradacji. Polimeryzacja łańcuchów poliubikwityny (polyUb) polega na utworzeniu wiązania izopeptydowego pomiędzy C-końcem (G76) jednostki Ub, a grupą ε-aminową łańcucha bocznego lizyny (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) lub N-terminalną metioniną (M1) kolejnej jednostki Ub. Rodzaj wzajemnych połączeń jednostek Ub definiuje ich konformacje oraz nadaje charakterystyczne właściwości biochemiczne. Modułarny sygnał Ub jest rozpoznawany przez wiele receptorów i kontroluje wiele procesów komórkowych: proteosomalną degradację białek, cykl komórkowy, transkrypcję, naprawę DNA czy mitofagię. Udział ubikwityny w tak szerokim spektrum procesów komórkowych powoduje, że jakiegokolwiek zaburzenia w tym systemie wywołują wiele stanów patologicznych. Nadal jednak pozostaje niejasny mechanizm, w jaki sposób ubikwitynowane białka są rozpoznawane przez receptory proteasomalne.

Wdrożenie nowych, zmodyfikowanych cząsteczek ubikwityny jako skutecznych bionarzędzi w badaniu zjawisk zachodzących w szlaku UPS pozwoli na uzyskanie wiarygodniejszych wyników badań. Ocena właściwości naturalnie występujących w komórce pochodnych ubikwityny umożliwi zrozumienie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za proteinostazę, a także wyjaśni przyczynę ich zaburzeń.

Celem tej pracy było scharakteryzowanie pochodnych ubikwityny otrzymanych na drodze syntezy chemicznej (Ub^{PT}) oraz mutacji (Ub^{F45W}) i zaproponowanie ich jako narzędzi biochemicznych pomocnych w badaniu UPS, jednocześnie wskazując na ich zalety i ograniczenia.

Fotoreaktywne białkowe kroslinkery to użyteczne molekuly służące do identyfikacji partnerów oddziaływań międzybiałkowych, szczególnie tych, które charakteryzują się krótkotrwałą, przejściową interakcją. W celu wygenerowania fotoreaktywnej Ub^{PT} i zminimalizowania interferencji wpływających na oddziaływania hydrofobowe, Leu8 lub Leu73 zastąpiono kwasem L-2-amino-4,4-azydo-walerianowym (fotoleucyna). Enzymatyczna polimeryzacja Ub^{PT} w homogenne łańcuchy o określonym typie i zdefiniowanej długości pozwoliła na analizę oddziaływań z wieloma receptorami polyUb (Rap80, Rpn10, Dsk2, Rad23)

oraz kompleksem proteasomu 26S. Zastosowanie polyUb^{PT} do całego kompleksu proteasomu 26S pozwoliło przechwycić podjednostkę Rpn1, co umożliwiło jej izolację. Inkorporacja fotoleucyny w łańcuch poliubikwityny umożliwiła detekcję partnerów przejściowych interakcji międzybiałkowych o charakterze hydrofobowym. Metoda fotoaktywacji Ub^{PT} pozwala na identyfikację pełnego interaktomu ubikwityny.

Właściwości fluorescencyjne mutanta Ub^{F45W} były obszernie wykorzystywane do monitorowania procesów fałdowania, jednak sporadycznie do oceny interakcji Ub-receptor. Mutacja F45W w cząsteczce Ub nie wpłynęła na integralność strukturalną K48-Ub₂, co zostało potwierdzone odkryciem struktury krystalicznej dimeru K48-Ub^{F45W}. Jednocześnie Ub^{F45W} został z sukcesem zastosowany jako donator w technice FRET.

UBB⁺¹ to zmutowana forma UBB występująca w komórkach eukariotycznych. Jej akumulacja w neurocytach jest symptomem wielu chorób neurodegeneracyjnych. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że UBB⁺¹ jest zdolne do inkorporacji w polyUb z zastosowaniem uniwersalnych enzymów E1 oraz E2. Otrzymane koniugaty zostały poddane testom biochemicznym oraz analizie NMR. Wykazują one bardzo podobne właściwości do swoich natywnych odpowiedników. Jedyne różnice przejawiają się w podatności na działanie nieproteasomalnych enzymów deubikwitynujących (DUB).

Celem dodatkowym pracy było zbadanie unikalnych właściwości wiązania polyUb przez domenę UBL białka współdziałającego Ddi1. Uzyskane wyniki wskazują na unikalną zdolność do wiązania koniugatów K48- i K63-polyUb. Zaimplementowana mutacja UBL^{SK} w nowym, nieznanym wcześniej miejscu wiązania dimerów potwierdziła tworzenie „kanapkowego” kompleksu z K48-Ub₂ oraz z białkiem Dsk2.