

„Struktura i dynamika peptydów i białek amyloidogennych na przykładzie serum amyloidu A i ludzkiej cystatyny C”

Celem mojej rozprawy doktorskiej było uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy na temat struktury przestrzennej oraz oddziaływań pomiędzy białkami amyloidowymi. W swoich badaniach skupiłam się na dwóch białkach odpowiedzialnych za występowanie chorób cywilizacyjnych XXI, do których zaliczyć można serum amyloid A (SAA) oraz ludzką cystatynę C (hCC).

W pierwszym etapie badań ustaliłam strukturę przestrzenną białka SAA korzystając z metody opartej tylko na sekwencji aminokwasowej białka *de novo*, w polu sił UNRES. Uzyskałam strukturę, na którą składa się siedem antyrównoległych helis połączonych fragmentami o strukturze nieuporządkowanej, z nieuporządkowanym N- oraz C-końcem. Uzyskaną strukturę porównałam z danymi literaturowymi, między innymi ze strukturą teoretyczną uzyskaną za pomocą modelowania homologicznego oraz ze strukturami krystalicznymi oligomeru białka SAA. Wyznaczona przeze mnie struktura monomeru SAA wykazuje wiele podobieństw do struktury eksperymentalnej. Podobieństwo to odzwierciedla przede wszystkim antyrównoległe ułożenie helis względem siebie oraz nieuporządkowany C-terminalny koniec białka. Zaobserwowane różnice wynikają z faktu, że struktura otrzymana w wyniku zwijania białka *de novo* jest strukturą dynamiczną, zaś struktury krystalograficzne są strukturami statycznymi. Otrzymany na podstawie sekwencji aminokwasowej teoretyczny model monomeru białka serum amyloid A może odpowiadać faktycznej jego strukturze w roztworze.

Kolejnym etapem badań realizowanych w ramach mojej pracy doktorskiej było ustalenie struktury w roztworze białka hCC oraz jego mutanta V57G z wykorzystaniem wielowymiarowej techniki NMR. W wyniku analizy dwu- (2D NMR ^1H - ^{15}N HSQC) oraz trójwymiarowych (3D HNCO, 3D HN(CO)CA, 3D HNCA, 3D CACB(CO)NH, oraz 15N- ^{13}C -edited NOESY-HSQC) widm magnetycznego rezonansu jądrowego dla podwójnie (hCC V57G ^{13}C , ^{15}N) oraz potrójnie (hCC ^2D , ^{13}C , ^{15}N) znakowanych białek uzyskałam przesunięcia chemiczne dla atomów łańcucha głównego, a następnie na podstawie przesunięć chemicznych wygenerowałam strukturę trójwymiarową monomeru hCC. Otrzymana struktura posiada wszystkie elementy struktury drugorzędowej występujące w znanych strukturach krystalicznych monomerów ludzkiej cystatyny C. Długości poszczególnych elementów struktur drugorzędowych są zgodne z długościami występującymi w znanych strukturach krystalicznych monomerów białka hCC. Niewielkie różnice można zaobserwować w rejonach nieuporządkowanych – głównie pętli L1 oraz AS. Należy przy tym zauważyć, że otrzymana przeze mnie struktura została wygenerowana na podstawie przesunięć chemicznych atomów łańcucha głównego oraz na podstawie homologii do znanych struktur białek, stąd istnieje bardzo duże podobieństwo pomiędzy strukturą NMR oraz strukturami krystalicznymi.

Dla podwójnie znakowanego białka V57G struktura została uzyskana na podstawie analizy widm NOESY. Sygnały NOE dla poszczególnych par atomów zostały przeliczone na odległości międzyatomowe tzw. więzy odległościowe. Na podstawie więzów NOE wygenerowałam startową strukturę białka V57G, która, w dalszym etapie poddana została minimalizacji w programie AMBER. Topologia uzyskanej struktury białka V57G hCC białka jest analogiczna jak topologia białek należących do rodziny cystatyn. W porównaniu do nich poszczególne elementy struktury drugorzędowej są nieco krótsze i nie tak regularne jak w strukturze krystalograficznej. Większa jest też zawartość fragmentów o strukturze nieuporządkowanej. Wynika to z faktu, iż otrzymana struktura jest strukturą dynamiczną, wyznaczoną na podstawie pomiarów NMR w roztworze, gdzie białko ma większą swobodę ruchu. Zauważalna jest różnica w ułożeniu płaszczyzny beta-kartek – są one bardziej płaskie

niż w znanych strukturach krystalicznych. W strukturze NMR udało się wyznaczyć położenie długiego, N-końcowego fragmentu oraz strukturę całej pętli AS. Tych elementów struktury drugorzędowej brakuje w znanych dotychczas strukturach krystalicznych hCC.

Powyższe wyniki uzupełniłam o studia nad strukturą fragmentu białka SAA odpowiedzialnego za tworzenie kompleksu z hCC. Ustaliłam jego konformację przestrzenną z wykorzystaniem danych NMR. Otrzymane wyniki dla peptydu SAA(86-104) zestawiałam ze znanymi strukturami białka SAA. Następnie przeprowadziłam badania strukturalne analogów SAA(86-104) posiadających mutację Pro-Ala i sprawdziłam, czy wyłączenie proliny z sekwencji aminokwasowej C-końcowego fragmentu SAA znacząco wpływa na strukturę tego peptydu i w jaki sposób te zmiany wpływają na możliwość formowania kompleksu analogów z hCC. Okazało się, że niemożliwe jest znalezienie korelacji między danymi strukturalnymi, a rezultatami badań powinowactwa peptydów do ludzkiej cystatyny C.

W ostatnim etapie badań wykonałam symulacje dokowania molekularnego dla kompleksów hCC/SAA wykorzystując, między innymi, uzyskane wcześniej struktury białka SAA oraz peptydu SAA(86-104). Dla uzyskanych modeli strukturalnych przeprowadziłam analizę oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy resztami aminokwasowymi hCC i SAA odpowiedzialnymi za formowanie się kompleksu. W przypadku kompleksu hCC z SAA(86-104) potwierdziły się wnioski uzyskane w badaniach analogów Pro-Ala, to jest struktura kompleksu hCC z peptydem jest stabilizowana przez oddziaływanie pomiędzy resztami SAA: Lys90 oraz Arg96 i odpowiednio hCC Ser98 i Tyr102. Natomiast w przypadku modelowania kompleksów białko-białko okazało się, że dominującym oddziaływaniem jest kontakt pomiędzy Tyr102 hCC - Lys90 SAA, uzupełniony o oddziaływanie Ser98 hCC, a Arg96 SAA.

Przeprowadzone przeze mnie badania poszerzyły istniejący stan wiedzy na temat struktury i oddziaływań pomiędzy białkami amyloidowymi. Uzyskane wyniki umożliwią przeprowadzenie kolejnych badań mających na celu projektowanie peptydomimetyków hamujących proces oligomeryzacji/fibrylizacji białek serum amyloid A oraz ludzkiej cystatyny C.