

Anna Kowalska

Praca doktorska wykonywana pod opieką:

Prof. dr hab. Grzegorza Bujacza, Politechnika Łódzka

Prof. dr hab. Zygmunta Derewendy, University of Virginia

Badania strukturalne białek p25 i p27 kompleksu ludzkiej dynaktyny

Dynaktyna to wieloskładnikowy kompleks białkowy, niezbędny dla aktywności dyneiny, białka motorycznego u *Eukariota*. Kompleks ten jest kluczowy dla przeżycia komórki, gdyż bierze udział w mitozie, a także jest ważny dla transportu wewnątrzkomórkowego.

Przedmiotami moich badań były dwa białka wchodzące w skład dynaktyny: p27 i p25, które są najmniejszymi podjednostkami tego wieloskładnikowego kompleksu. Badane białka p25 i p27 znajdują się nie tylko w dynaktynie ale również występują w rozpuszczalnej puli białek w cytozolu, co sugeruje, że oddziałują także z innymi białkami i mogą przyłączać dynaktynę do różnych wewnątrzkomórkowych struktur. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji można było przewidzieć, że białka te przyjmują strukturę lewoskrętnej β -helisy, rzadko spotykanego motywu strukturalnego, charakteryzującego głównie enzymy prokariotyczne.

Dla umożliwienia efektywnej ekspresji i oczyszczania badanych białek zaprojektowane zostały różne konstrukty. Najlepsze rezultaty otrzymano przez utworzenie białka fuzyjnego p27 z metką heksahistydyno-MBP (maltose binding protein). Białka były otrzymywane w wysokoekspresyjnym szczepie *E.coli* BL21(DE3)RIPL i oczyszczane do postaci homogenicznej przez kombinację chromatografii powinowactwa na kolumnie agarozowej z dołączonymi jonami niklu i filtracji żelowej na kolumnie Superdex 75 w systemie AKTA FPLC.

Otrzymano kryształy białka natywnego p27 oraz w kompleksie p25/p27 przy użyciu dyfuzji par metodą siedzącej kropli. Białko p27 krystalizowało w obecności 20% PEG3350, 0.2 M KH_2PO_4 . Dodatkowo ulepszono jakość kryształów poprzez zastosowanie proteolizy *in situ* z α -chymotrypsyną. Zebrano dane dyfrakcyjne do rozdzielczości 2.15 Å, określono grupę przestrzenną jako jednoskośną o centrowanej podstawie (C2). Problem fazowy rozwiązano metodą podstawienia molekularnego, używając w tym celu serwera BALBES.

Określenie struktury p27 potwierdziło oparte na porównawczej analizie sekwencyjnej przewidywanie, że białko to przyjmuje motyw strukturalny lewoskrętnej β -helisy. Prezentuje ono typ I, czyli zawierający 6 aminokwasów w każdym łańcuchu β , a zatem 18 aminokwasów w każdym skręcie β -helisy. Interesującym jest również, że inaczej niż inne białka prezentujące ten typ, białko p27 nie tworzy trimeru, a dimer.

Chromatografia powinowactwa pokazała, że p27 asocjuje z p25 czym potwierdziliśmy teorię o formowaniu przez te białka heterodimeru. Homodimer białka p27 może być modelem do budowy heterodimeru kompleksu p27/p25. Opierając się na rozwiązanej przez mnie strukturze p27 oraz na stworzonym modelu p25 przewidziano, które aminokwasy są odpowiedzialne za tworzenie interfejsu oraz zaplanowano mutacje i eksperymenty biochemiczne, by potwierdzić postawioną tezę.

Kryształy heterodimeru p25/p27 były mierzone na synchrotronie APS w Argonne i rozpraszały do 3.4 Å. Niedoskonała rozdzielczość danych dyfrakcyjnych spowodowana uszkodzeniami radiacyjnymi białka podczas pomiaru nie pozwoliła na zebranie pełnego zbioru danych.

Określona struktura krystaliczna białka p27 do bardzo dobrej rozdzielczości wzbogaciła naszą wiedzę na temat białek uczestniczących w transporcie wewnątrzkomórkowym i mitozie. Natomiast rozwiązanie struktury kompleksu p25/p27 pozwoli na precyzyjną analizę interakcji pomiędzy podjednostkami tego heterodimeru.