

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

## Wyznaczenie struktury i dynamiki białka CsPin oraz jego oddziaływania z modelowymi peptydami metodami spektroskopii NMR

*Promotorzy:*

prof. dr hab. Andrzej Ejchart

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, Środowiskowe Laboratorium NMR

e-mail: aejchart@ibb.waw.pl, tel. (22) 659 20 37

prof. dr hab. Karol Jackowski

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

e-mail: kjack@chem.uw.edu.pl, tel. (22) 822 02 11 w 315

Izomerazy peptydylowo-prolylowe (PPI) są obecne we wszystkich organizmach żywych. Katalizują one proces rotacji wokół wiązania peptydowego (izomeryzację *cis* - *trans*) w białkach w układzie X<sub>aa</sub>-Pro. W skład tej grupy białek wchodzi cyklodofiliny, białka wiążące FK506 oraz parwuliny. Parwuliny są przeważnie małymi białkami bardzo konserwatywnymi ewolucyjnie. Występują one zarówno u przedstawicieli królestwa *Procaryota* jak i *Eucaryota*. Jak wykazały przeprowadzone dla przedstawicieli królestwa *Eucaryota* badania, białka z grupy parwulin zaangażowane są między innymi w regulację cyklu komórkowego i kontrolę jakości powstałych w wyniku biosyntezy białek. Proces ten ma szczególne znaczenie, gdyż istnieją uzasadnione podejrzenia, że niektóre niewielkie parwuliny jak białka Pin (Protein Interacting with NINA-kinase) mogą uczestniczyć w pierwszych etapach zwijania białek, odpowiadając za kontrolę ich jakości. Nieprawidłowo zwinięte białka znajdują się obecnie w centrum zainteresowania nauki, gdyż powodują one szereg groźnych chorób zwierząt i ludzi. Przykładem mogą być choroby neurodegeneracyjne: choroby prionowe, Alzheimerera czy Parkinsona. W literaturze w ostatniej dekadzie niejednokrotnie wskazywano na powiązania pomiędzy występowaniem ludzkiej parwuliny hPin1 a różnymi chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym tauopatiami. Parwulina

CsPinA pochodzi z zimnolubnych organizmów morskich należących do archeonów *Cenarchaeum symbiosum* będących symbiontami morskich gąbek z gatunku *Axinella mexicana*. Białko CsPinA z powodu swojego uderzającego podobieństwa do ludzkich białek Pin1 oraz Pin14 jest interesującym obiektem do badań funkcjonalnych oraz strukturalnych. Odpowiada ono za izomeryzację wiązania peptydowego w niskich temperaturach, co jest wyjątkowe w świecie przyrody, gdyż wszystkie dotychczas poznane białka z rodziny parwulin aktywne są w znacznie wyższych temperaturach.

Parwulina CsPinA katalizuje proces izomeryzacji wiązania peptydowego w temperaturze 10°C, podczas gdy optymalne temperatury pracy pozostałych, obecnie poznanych parwulin wynoszą 30°C lub więcej. Ponadto niewielkie rozmiary parwuliny CsPinA (92 aa) oraz dobrze zbadane homologiczne białka z innych organizmów ciepłolubnych sprawiają, iż jest ona doskonałym układem modelowym do badania adaptacji niskotemperaturowych oraz wpływu temperatury na strukturę oraz dynamikę funkcjonalną enzymu.

Tematyka rozprawy ma przede wszystkim znaczenie poznawcze i pozwoli opisać molekularne różnice między parwulinami wysoko (>30°C) a niskotemperaturowymi (~10°C). Wykorzystanie otrzymane wyniki nie ogranicza się do jednej klasy enzymów. Mogą one zainteresować wielu badaczy zajmujących się reakcjami enzymatycznymi niejednokrotnie wrażliwymi na niewielkie zmiany temperatury i stanowiącymi podstawę procesów życiowych. Przedstawione badania dają wgląd w zależność między wydajnością pracy enzymu a temperaturą zarówno od strony strukturalnej jak i dokładnej dynamiki procesów katalitycznych.

Podsumowując, podstawowym znaczeniem rozprawy jest wyjaśnienie często subtelnych różnic w strukturze i dynamice enzymu w warunkach optymalnych dla jego działania oraz odległych od tych warunków. Porównanie wyników uzyskanych dla parwuliny CsPinA aktywnej w niskiej temperaturze z jej bakteryjnymi i ludzkimi odpowiednikami aktywnymi w wyższych temperaturach umożliwia lepsze poznanie sposobów w jaki różne organizmy przystosowały się do życia w skrajnych warunkach termicznych. Wiedza ta może posłużyć do projektowania enzymów pracujących w pożądanym warunkach termicznych, co jest niezmiernie interesujące zarówno dla czystej nauki jak i zastosowań przemysłowych.

Cele pracy zostały przedstawione poniżej:

- I. badania strukturalne pierwszej parwuliny z *Archea* z wykorzystaniem wielowymiarowych technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR):
  - przypisania sygnałów <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C oraz <sup>15</sup>N łańcucha głównego oraz łańcuchów bocznych CsPinA;
  - określenie motywów drugorzędowych oraz zwinięcia białka CsPinA;
  - określenie wysokorozdzielczej struktury CsPinA w roztworze;

- II. opis dynamiki łańcucha głównego białka CsPinA w temperaturze fizjologicznej z wykorzystaniem pomiarów magnetycznej relaksacji jąder  $^{15}\text{N}$ ;
- III. identyfikacja reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie modelowego peptydu;
- IV. wpływ temperatury na dynamikę globalną oraz lokalną białka CsPinA;
- V. przyspieszenie badań dynamiki łańcucha głównego białka formalizmem MFA/EMFA z wykorzystaniem wyłącznie stałych prędkości relaksacji  $R_1$  oraz  $R_2$  przy wyeliminowaniu czasochłonnych pomiarów  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE;
- VI. wyznaczenie parametrów strukturalnych  $r_{N-H}$  oraz  $\Delta\sigma(^{15}\text{N})$  z danych magnetycznej relaksacji jąder  $^{15}\text{N}$  białka CsPinA w temperaturze fizjologicznej.

Wymienione cele zostały zrealizowane. Poniżej zamieszczony jest skrócony opis realizacji poszczególnych celów pracy.

Przeprowadzone badania metodami cieczowego magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) pozwoliły rozwiązać i udokładować wysoko rozdzielczą strukturę pierwszej parwuliny z archeonów. Widma  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC oraz  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC charakteryzują się doskonałą dyspersją sygnałów, co w połączeniu z wielkością białka sprawia, że jest ono idealnym obiektem do badań technikami cieczowego NMR. Wysoko rozdzielcza struktura NMR parwuliny CsPinA wykazała, że białko posiada zwinięcie typu  $\beta$ - $\alpha$ 3- $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ 2 charakterystyczne dla wszystkich znanych dotychczas parwulin. Jedyna różnica dotyczy helisy 3, będącej w tym przypadku krótką helisą typu  $3_{10}$ .

Porównanie pierwszej parwuliny CsPinA z archeonów z jej bakteryjnymi oraz eukariotycznymi odpowiednikami wykazało znacząco większy rozmiar miejsca aktywnego wiązania substratu. Można to tłumaczyć jako adaptację do pełnienia funkcji izomerazy w niskich temperaturach.

Pomiary magnetycznej relaksacji  $^{15}\text{N}$  ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE) wolnego białka CsPinA zostały wykonane dla próbki pojedynczo  $^{15}\text{N}$  znakowanego białka CsPinA o stężeniu  $\sim 0.9$  mM w polach magnetycznych 9,4 T, 11,7 T, 14,1 T i 16,4 T. Komplet otrzymanych danych relaksacyjnych pozwolił na zastosowanie opisu dynamiki łańcucha głównego z wykorzystaniem modelu Extended Model-Free Approach (EMFA) w  $10^\circ\text{C}$ .

Badania dynamiki łańcucha głównego białka CsPinA wykazały, że reszty krótkiej helisy  $3_{10}$  oraz sąsiedniej pętli wykazują w temperaturze  $10^\circ\text{C}$  wyraźną dynamikę w skali mikro- do milisekund oraz heterogenność w rodzinie struktur wyznaczonej z danych NMR. Są to reszty aminokwasowe: H14, Q25, F36, G37, D46, S55, V65, K66, E87 oraz F88. Są to te same reszty, które wykazują zmiany przesunięć chemicznych po związaniu modelowego peptydu HQSPWNN z białkiem.

Miareczkowanie białka CsPinA modelowym peptydem wybranym za pomocą fagowej ekspresji

peptydów (phage display) potwierdziło znaczenie reszt helisy 3 oraz sąsiedniej pętli w procesie wiązania ligandu, który moduluje ruchliwość helixy 3 oraz reszt centrum katalitycznego po związaniu w 10°C. Glicyna oraz dwa dodatkowo naładowane aminokwasy obszaru helisy 3 i pętli są konserwowane we wszystkich parwulinach, co dodatkowo potwierdza ich znaczenie funkcjonalne dla tej rodziny białek.

Wybrane za pomocą fagowej ekspresji peptydów dwa modelowe peptydy HQSPWNN oraz HKRPRNN wykorzystano do miareczkowania podwójnie znakowanego  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  białka CsPinA w proporcjach 1:0, 1:1, 1:4 oraz 1:8 (stosunek molowy białka do peptydu) w temperaturze fizjologicznej 10°C. Do monitorowania zmian wykorzystano widma  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, a dla dwóch skrajnych punktów dodatkowo widma  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC dla obszaru aromatycznego. Analiza uzyskanych profili zaburzeń przesunięć chemicznych grup H/N (chemical shifts perturbation plots) wykazała, że peptyd HQSPWNN oddziałuje specyficznie z białkiem CsPinA.

Reszty wykazujące największe zmiany przesunięć chemicznych w wyniku związania peptydu to: V65, G60, K63, G37, G89, F36, G47, F88, G89, S49, G58, G62 znajdujące się wokół miejsca wiązania substratu oraz w centrum katalitycznym (H14, H91).

Zbadano różnice w dynamice funkcjonalnej i strukturze przestrzennej izomerazy CsPinA w szeregu temperatur. Dynamika łańcucha głównego białka CsPinA w polu 9.4 T w 1°C, 10°C, 19°C oraz 28°C zmienia się znacząco z temperaturą przy zachowaniu ogólnego upakowania oraz zwinięcia białka. Zmiany przesunięć chemicznych protonów amidowych łańcucha głównego w funkcji temperatury pozwoliły obserwację zmian na poziomie lokalnym. Pomiar widm 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC w funkcji temperatury w przedziale od -1°C do 36°C, wykazały, że powyżej 15°C kilka reszt z centralnej części białka (C12, I15, V26), a powyżej 25°C wiele dodatkowych reszt aminokwasowych, kluczowych dla procesu izomeryzacji w temperaturze 10°C, charakteryzuje się nieliniowym przebiegiem amidowych przesunięć chemicznych w funkcji temperatury. Wskazuje to na zmiany struktury oraz zachodzący proces wymiany chemicznej. Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone przez wartości lokalnych parametrów MFA w 28°C, a w szczególności wartości charakteryzujące wymianę chemiczną,  $R_{\text{ex}}$ .

Ponieważ pomiary magnetycznej relaksacji jądrowej w białkach są czasochłonne, szczególnie z powodu mało czułego pomiaru  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE, który jak pokazały wcześniejsze i nasze badania wymaga stosowania długich przerw relaksacyjnych, ważne stają się nowe metody skrócenia całkowitego czasu pomiarowego. Wykonanie pomiarów relaksacyjnych dla białka CsPinA w temperaturze 10°C w czterech polach magnetycznych umożliwiło całkowite wyeliminowanie pomiarów  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE z analizy EMFA. Zarówno globalne jak i lokalne parametry relaksacyjne

otrzymane wyłącznie z zestawu czterech par  $R_1$  oraz  $R_2$  jak i dodatkowo z pomiarami  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE okazały się być w granicach błędów identyczne. Potwierdza to zasadność rezygnacji z danych  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE i zastąpienia tego eksperymentu pomiarem  $R_1$  i/albo  $R_2$  w dodatkowym polu.

Od dawna znany jest fakt, iż parametry strukturalne białek, takie jak długości wiązań N-H oraz anizotropia przesunięcia chemicznego jąder  $^{15}\text{N}$ , wykazują zmienność. Często w analizie danych relaksacyjnych stosuje się uproszczenie polegające na przyjęciu stałych wartości  $r_{N-H}$  oraz  $\Delta\sigma(^{15}\text{N})$  dla wszystkich reszt aminokwasowych. Dane relaksacyjne dla CsPinA z czterech pól okazały się wystarczające do wyznaczenia wartości  $r_{N-H}$  oraz  $\Delta\sigma(^{15}\text{N})$  dla poszczególnych reszt. Wyniki te zgadzają się z wynikami otrzymanymi przez innych badaczy odmiennymi metodami. Obserwowana jest ciekawa zależność między wydłużeniem się wiązania N-H a zmniejszeniem wartości  $\Delta\sigma(^{15}\text{N})$ .

Część wyników została zaprezentowana na konferencjach krajowych oraz zagranicznych oraz opublikowana w czasopiśmie Journal of Biological Chemistry.