

Białka pełnią kluczową rolę we wszystkich procesach biologicznych zachodzących w komórkach i tkankach żywych organizmów, a ich wadliwe działanie jest przyczyną wielu chorób człowieka. Funkcje białek są głównie regulowane na drodze tzw. modyfikacji potranslacyjnych, polegających najczęściej na trwałej chemicznej modyfikacji określonych aminokwasów budujących białko. Zmiany te wprowadzane są przez enzymy - białka zdolne do katalizy reakcji chemicznych.

Chociaż natura większości modyfikacji potranslacyjnych, mechanizmy ich wprowadzania oraz rola biologiczna zostało dość dobrze poznane, nadal istnieją w komórkach kręgowców modyfikacje białek, o których wiemy bardzo niewiele. Białko SETD3 jest przykładem enzymu, który wydaje się katalizować *N*-metylację licznych białek w komórkach człowieka, lecz jego właściwości oraz rola biologiczna pozostają bardzo słabo poznane.

Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie wiedzy o modyfikacjach potranslacyjnych dla pełnego zrozumienia funkcjonowania komórek, zarówno prawidłowych jak i zmienionych chorobowo, celem niniejszego projektu jest:

- 1) wytworzenie metodami inżynierii genetycznej dużych ilości „syntetycznej” rekombinowanej formy białka SETD3 człowieka
- 2) wytworzenie ludzkich komórek pozbawionych aktywności badanego enzymu, co umożliwi identyfikację jego wewnątrzkomórkowych substratów,
- 3) uzyskanie metodami inżynierii genetycznej rekombinowanych form zidentyfikowanych substratów i potwierdzenie ich modyfikacji przez badany enzym *in vitro*.
- 4) identyfikacja mechanizmu warunkującego specyficzne rozpoznawanie substratu (swoistość substratową) przez białko SETD3.

Rekombinowany enzym SETD3 będzie wytwarzany w komórkach ssaczyh (COS-7). Wykorzystując najnowsze metody biologii molekularnej (technika CRISPR/cas9) zostaną przygotowane komórki ludzkie pozbawione aktywnego genu kodującego białko SETD3, które posłużą identyfikacji jego wewnątrzkomórkowych substratów. W komórkach bakterii (*E. coli*) lub drożdży piekarniczych (*S. cerevisiae*) będą wytwarzane rekombinowane ludzkie substraty białka SETD3. Natomiast zastosowanie odpowiednich narzędzi bioinformatycznych umożliwi identyfikację mechanizmu rozpoznawania białek-substratów przez badany enzym.

Oczekujemy, że realizacja projektu doprowadzi do pełnej identyfikacji reakcji biochemicznych katalizowanych przez enzym SETD3, co będzie pomocne w ustaleniu roli fizjologicznej tego białka. Natomiast identyfikacja substratów badanego enzymu dostarczy kluczowych informacji o procesach wewnątrzkomórkowych, w które jest on zaangażowany. Liczymy także, że uzyskane wyniki: 1) pomogą w zrozumieniu mechanizmu powstawania poważnych zaburzeń rozwojowych (anatomicznych i fizjologicznych) obserwowanych u myszy pozbawionych genu *SETD3* oraz 2) przyczynią się do identyfikacji zaburzeń zdrowotnych człowieka, w których patogenezie może być zaangażowany badany enzym.