

Regulacja procesu deoksyhypuzynacji przez kinazy białkowe

mgr Paweł Kochanowski

Modyfikacje potranslacyjne (PTM) to zmiany wprowadzane w białkach w trakcie lub po zakończeniu ich syntezy. Często polegają one na kowalencyjnym przyłączeniu grupy funkcyjnej przez enzym. Modyfikacje te mogą wpływać na różnorodne właściwości białek, często na przykład regulują aktywność biologiczną, a niektóre z nich są niezbędne do powstania w pełni funkcjonalnego białka. Jeden typ modyfikacji jest zwykle wprowadzany do wielu różnorodnych białek i może być zwykle generowany przez kilka białek enzymatycznych, jednak niektóre PTM są unikalne.

Hypuzynacja to modyfikacja potranslacyjna którą zaobserwowano tylko w jednym białku – eukariotycznym czynnikiem translacyjnym 5A (eIF5A). Jest to dwuetapowy proces katalizowany przez syntazę deoksyhypuzyny (DHS) oraz hydroksylazę deoksyhypuzyny (DOHH). Hypuzyny w eIF5A przyspiesza etap elongacji pomagając w formowaniu wiązania peptydowego w trakcie translacji sekwencji powodujących spowolnienie elongacji jak np. obszary kodujące liczne reszty prolinowe. Ta wyjątkowa PTM jest niezbędna do prawidłowego przebiegu procesu translacji i jej brak jest letalny dla rozwijających się zarodków ssaków. Nie jest więc zaskakujące, że zaburzenia tego procesu powodują poważne następstwa np. mutacje w genie kodującym DHS wywołują zaburzenia rozwoju związane z neurodegeneracją. Co więcej zwiększoną ekspresję eIF5A zaobserwowano w wielu guzach, a poziom ekspresji DHS skorelowano ze złym rokowaniem pacjentów onkologicznych.

Pomimo tego regulacja hypuzynacji pozostaje poznana jedynie w bardzo ograniczonym zakresie. Jak dotąd postulowano możliwość fosforylacji DHS przez kinazę kazeinową CK2, różnorodne izoformy kinazy białkowej C oraz kinazy aktywowane mitogenami ERK1/2. Jednak funkcja tej fosforylacji jest wciąż nieznaną. Ponieważ DHS jest pierwszym i jednocześnie limitującym szybkość enzymem w tym procesie, mechanizmy wpływające na jego aktywność regulują cały proces. Właśnie dlatego głównym celem przedstawionego projektu jest badanie regulacji pierwszego etapu hypuzynacji poprzez kinazy białkowe fosforylujące DHS lub oddziałujące z nią bezpośrednio.

W ramach proponowanych badań zamierzamy strukturalnie i funkcjonalnie scharakteryzować oddziaływanie kinazy białkowej - DHS, które mogą być zaangażowane w regulację hypuzynacji. Poznanie całokształtu takich procesów regulatorowych wymaga zastosowania zarówno metod biochemicznych i biofizycznych jak i wykonania badań z zakresu biologii strukturalnej i komórkowej. W pierwszym etapie naszych badań przeanalizujemy pod względem biochemicznym oddziaływanie DHS z kinazami, dla których były wcześniejsze przesłanki, że mogą one fosforylować DHS. Następnie zweryfikujemy istnienie takiej fosforylacji. Zostanie również zbadany wpływ bezpośrednich oddziaływań z kinazami oraz samej fosforylacji na aktywność katalityczną DHS. Wreszcie w celu sprawdzenia czy obserwowane oddziaływanie mają znaczenie biologiczne, zostaną one przetestowane w modelu komórkowym. Dla kinaz, których oddziaływanie z DHS zweryfikujemy, wyznaczymy struktury molekularne ich kompleksów z DHS z wykorzystaniem mikroskopii krio-elektronowej.

Przedstawiony projekt dostarczy kluczowych danych dotyczących molekularnych mechanizmów biorących udział w kontroli aktywności DHS, a zatem regulujących cały proces hypuzynacji. Co więcej, biorąc pod uwagę, że szlak hypuzynacji, a szczególnie DHS były wcześniej wskazane jako molekularne cele terapeutyczne (ang. „druggable target”), uzyskane wyniki mogą stać się podstawą do dalszych badań translacyjnych.