

Substytucje aminokwasowe jako molekularna przyczyna pierwotnej dyskinezy rzęsek (primary ciliary dyskinesia, PCD)

Pierwotna dyskineza rzęsek (PCD), której głównymi objawami są nawracające infekcje dróg oddechowych, niepłodność męska i zaburzenia symetrii ciała, należy do klasy dziedzicznych chorób określonych jako ciliopatie. W przypadku PCD choroba ma związek z zaburzeniem funkcji rzęsek ruchomych – wypustek występujących na powierzchni komórek nabłonka oddechowego, w plemnikach i w zarodku. PCD jest chorobą wysoce heterogenną pod względem genetycznym (dotychczas opublikowano 50 genów). Jej przyczyną są recesywne mutacje w genach kodujących białka, które albo tworzą strukturalne/funkcjonalne elementy ruchomych rzęsek, albo są niezbędne podczas ich biogenezy.

PCD jest najczęściej spowodowana defektami zewnętrznych ramion dyneinowych (ODA), elementów struktury ruchomej rzęski odpowiedzialnych za generowanie ich ruchu. Aby stać się funkcjonalnymi elementami rzęski, liczne białka ODA są wstępnie składane w cytoplazmie przy pomocy innych białek. Większość patogennych mutacji u pacjentów z PCD skutkuje brakiem białek pełnej długości. Mutacje zmiany sensu, skutkujące substytucjami aminokwasów (aa), są rzadsze. Mechanizmy, poprzez które takie mutacje zaburzają składanie, strukturę i funkcję ODA w rzęskach komórkach nabłonkowych, są słabo poznane. DNAI1, białko pośredniego łańcucha dyneiny, jest częścią ODA i jednym z dwóch białek, które inicjują proces wstępnego składania ODA w cytoplazmie. DNAI1 jest jednym z ośmiu genów PCD, w których mutacje są najczęściej wykrywane u polskich pacjentów z PCD. Wśród patogennych wariantów DNAI1 obserwuje się częstszy niż u większości innych genów PCD udział substytucji aa. Większość patogennych substytucji aa w DNAI1, skutkujących brakiem ODA, występuje w eksonach, które kodują ważną domenę WDR40, znaną ze swojej funkcji w wiązaniu białek.

W proponowanym projekcie będziemy badać, w jaki sposób substytucje aa w białku DNAI1 upośledzają jego strukturę, stabilność i/lub interakcje białko-białko, ważne dla prawidłowego wstępnego składania i funkcjonowania ODA, ostatecznie prowadząc do zmiany struktury i defektów ruchliwości rzęsek. Etapy projektu: 1. Przewidywanie in silico wpływu wykrywanych u pacjentów z PCD substytucji aa DNAI1 na strukturę i stabilność domeny WDR. 2. Analizy biofizyczne wyizolowanych wariantów białek DNAI1 w celu weryfikacji modeli in silico. 3. Wpływ substytucji aa w DNAI1 na jego wiązanie ze znanym interaktorem DNAI2. 4. Wpływ substytucji aminokwasów w DNAI1 na funkcjonowanie komórek nabłonka dróg oddechowych. 5. Wpływ substytucji aminokwasów DNAI1 na jego interakcje z innymi białkami w komórkach nabłonka.

Modelowanie in silico patogennych substytucji aa w DNAI1 zapewni kompleksowy obraz przewidywanego wpływu takich zmian na stabilność białka; analizy biofizyczne zweryfikują modele in silico i umożliwią bezprecedensowe porównanie wiązania DNAI1-DNAI2 w wariantach DNAI1 typu dzikiego (wt) lub zmutowanych (aa). Globalna analiza z użyciem tandemowej spektrometrii mas pozwoli zidentyfikować spektrum białek, których interakcja z DNAI1 jest zmieniona na skutek obecności substytucji aa. DNAI1, który jest zarówno częścią struktury ODA, jak i niezbędnym partnerem w cytoplazmatycznym wstępnym składaniu ODA, zapewnia dobry model do badania takich interakcji. Badanie dostarczy także informacji istotnych dla badań dotyczących wpływu substytucji aa na domenę WDR w różnych białkach. Kompleksowa analiza wpływu substytucji aa na stabilność i interakcje DNAI1, pozwalająca na eksperymentalne potwierdzenie ich szkodliwego wpływu, zwiększy pewność diagnozy PCD u pacjentów z tego typu mutacjami.