

Struktura kompleksu ludzkiej rybonukleazy N4BP1 wraz z białkami usuwającymi czapeczkę RNA

Matrycami do produkcji białek w komórce są transkrypty genów – czyli cząsteczki RNA niosące informację o sekwencji aminokwasowej białek. Jednym z procesów wpływających negatywnie na poziom transkryptów w komórkach jest ich degradacja z udziałem enzymów hydrolizujących cząsteczki RNA, które należą do rodzaju RNaz. Mechanizmy degradacji RNA stanowią istotny element zachowania równowagi w komórce, ale także pełnią znaczącą rolę w przeciwstawieniu się niekorzystnym czynnikom np. podczas regulacji stanu zapalnego. Część z procesów degradacji RNA jest związana z występowaniem ziarnistych struktur w komórkach takich jak granule stresowe oraz granule procesujące RNA. W przypadku granul stresowych stanowią one również magazyn transkryptów, które mogą zostać uwolnione w momencie ustąpienia czynników stresowych, tym samym mogą wpłynąć między innymi na syntezę nowych białek. Jedną z głównych własności granul procesujących RNA jest zależność od kompleksu usuwającego czapeczkę RNA z końca 5' transkryptu. Wielobiałkowy kompleks dekapingu jest związany z obecnością białka EDC4 stanowiącego swoiste rusztowanie dla kolejnych składowych kompleksu w tym białka DCP2 będącego hydrolazą czapeczki RNA. Obecność czapeczki RNA u organizmów wielokomórkowych, chroni transkrypty przed ich przedwczesną degradacją. Następnym etapem hydrolizy czapeczki RNA jest trawienie transkryptu, które jest realizowane przez RNazę - egzorybonukleazę 1 (XRN1). Na skutek aktywności XRN1 transkrypt jest sukcesywnie skracany po jednym nukleotydzie, tym samym zostaje zdegradowany.

Wcześniejsze badania pokazały, że RNaza N4BP1 uczestniczy w procesach regulacji odpowiedzi zapalnej organizmu poprzez degradację transkryptów cytokin prozapalnych. Nasze wyniki wstępne pokazują, że ludzkie białko N4BP1 jest nukleazą związaną z dekapinieniem RNA stanowiąc alternatywne dla degradacji transkryptów zależnej od XRN1. Stosując metodę immunoprecypitacji wykonano izolację kompleksów N4BP1 z komórki, następnie przeprowadzoną identyfikację składowych kompleksów metodą spektrometrii masowej. Co interesujące wyniki analiz wstępnych ujawniły udział N4BP1 w kompleksie z EDC4 oraz innymi białkami dekapingu. Celem naszych badań jest pokazanie strukturalnych podstaw interakcji N4BP1 z EDC4 oraz RNA stosując metody biologii strukturalnej. Przypuszczamy, że poprzez oddziaływanie z EDC4 nukleaza N4BP1 jest nakierowana na określone pętle RNA w regionach sąsiadujących z końcem 5' transkryptów. Planujemy rozwiązać struktur przestrzenną N4BP1 metodą krystalografii rentgenowskiej oraz mikroskopii krioelektronowej. W trakcie projektu wykorzystamy hodowlę komórek w celu produkcji białek rekombinowanych o określonych własnościach i sekwencjach. Białka rekombinowane zostaną wyizolowane z komórek oraz oczyszczone technikami chromatograficznymi. Kolejno wykonana zostanie charakterystyka strukturalna N4BP1 poprzez krystalizację białka wraz z determinacją struktury badanego białka na podstawie obrazów dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego przez kryształ białka. Oprócz analizy samego N4BP1 wykonamy badania strukturalne jego kompleksów z EDC4 oraz innymi białkami dekapingu. Oczekujemy, że uzyskamy informację o architekturze miejsca aktywnego N4BP1 oraz poznamy szczegóły selektywnego wiązania określonych sekwencji lub struktur RNA obecnych w substratach rozpoznawanych przez N4BP1. Dodatkowo stosując techniki biochemiczne sprawdzimy selektywność substratową nukleazy N4BP1 oraz zbadamy jaki wpływ mają składowe kompleksu dekapingu na aktywność N4BP1. Jako substraty do degradacji przez N4BP1 wykorzystamy RNA o określonej sekwencji oraz strukturze modelującej regiony niepodlegające translacji w transkryptach. Wyniki planowanych eksperymentów ujawnią mechanizm działania N4BP1 w granulach procesujących RNA. Poznana struktura N4BP1 oraz detale katalizy transkryptów przez N4BP1 mogą zostać w przyszłości wykorzystane do inteligentnego projektowania inhibitorów tego białka, a tym samym do terapii opierającej się na modulacji procesów zapalnych. Ponadto udowodniono, że N4BP1 degraduje RNA niektórych retrowirusów w tym HIV 1, zatem określenie mechanizmu działania N4BP1 może okazać się istotne w opracowaniu nowych metod wzmocnienia pierwotnej odpowiedzi immunologicznej organizmu i przeciwdziałaniu infekcjom wirusowym.