

„Otrzymywanie i charakterystyka znakowanych fluorescencyjnie białek natywnie nieuporządkowanych biorących udział w wyciszaniu genów”

Opiekunka: dr hab. Anna Niedźwiecka, prof IF PAN

Środowiskowe Laboratorium Fizyki Biologicznej, Instytut Fizyki PAN

annan@ifpan.edu.pl

tel. 22 116 3516

Współopieką: prof. dr hab. Edward Darzynkiewicz

Edward.Darzynkiewicz@fuw.edu.pl

tel. 22 55 32 319

Zasadniczym mechanizmem potranskrypcyjnego wyciszania genów jest degradacja mRNA. Kluczowym etapem degradacji jest hydroliza ogona poliA mRNA, znajdującego się na końcu 3'. Odpowiada za to wieloskładnikowy kompleks enzymatyczny CCR4-NOT. mRNA są zazwyczaj kierowane do deadenyacji przez odpowiednie miRNA, wiązane przez białko Argonaute. Pośrednikiem pomiędzy Argonaute i CCR4-NOT jest natywnie nieuporządkowane białko bogate w glicynę i tryprofan o masie 182 kDa (GW182) [1]. Miejsce oddziaływania CCR4-NOT z GW182 jest nieznane.

Wyjątkową klasę mRNA stanowią te kodujące protoonkogeny, jądrowe czynniki transkrypcyjne i cytokiny (białka inicjacji stanu zapalnego). Ich mRNA zawierają sekwencje bogate w reszty adenylowe i urydylowe (*AU-rich elements*; AREs) w rejonie 3' nieulegającym translacji. Sekwencje te są rozpoznawane przez inne natywnie nieuporządkowane białko, tristetraprolinę (TTP), która wiąże się do centralnej podjednostki CCR4-NOT (CNOT1), kierując te mRNA do degradacji. Struktura krystalograficzna kompleksu końca C TTP z fragmentem CNOT1 jest znana [2].

Nasze wstępne wyniki uzyskane metodami spektrometrii mas wskazują, że GW182 wiąże się do CNOT1 w tym samym miejscu, co TTP. Aby to udowodnić metodami spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS), przygotowujemy szereg fragmentów GW182 i TTP w fuzji z białkami fluorescencyjnymi (mCherry lub α EGFP): <https://www.fpbases.org/protein/avgfp/>. Stopień poprawnego zwinięcia białek fluorescencyjnych zależy m. in. od ich umiejscowienia na końcu N lub C, sekwencji linkera i temperatury hodowli: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/index.html>. Jakkolwiek wydajność poprawnego zwijania znaczników nie wpływa na oddziaływanie z CNOT1, to ilościowa analiza tych oddziaływań wymaga znajomości proporcji znacznika do części aktywnej konstruktów. Dodatkowe wyzwanie stanowi fakt, iż warunki sprzyjające tworzeniu fluorochromów są odmienne niż warunki sprzyjające ekspresji białek niestrukturyzowanych. Rozwiązujemy częściowo ten problem stosując drugie białko fuzyjne, SUMO, poprawiające wydajność ekspresji.

Celem pracy jest otrzymywanie (*E. coli*), oczyszczanie (His-tag) i charakterystyka spektralna (widma absorpcyjne UV/VIS oraz IR) fragmentów GW182 i TTP w fuzji z białkami fluorescencyjnymi, które są konieczne do badań oddziaływań z CNOT1.

[1] Cieplak-Rotowska MK, Tarnowski K, Rubin M, Fabian MR, Sonenberg N, Dadlez M, Niedzwiecka A. *Structural Dynamics of the GW182 Silencing Domain Including its RNA Recognition motif (RRM) Revealed by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry*. **J Am Soc Mass Spectrom**. 2018; 29(1): 158-173.

[2] Fabian MR, Frank F, Rouya C, Siddiqui N, Lai WS, Karetnikov A, Blackshear PJ, Nagar B, Sonenberg N. *Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin*. **Nat Struct Mol Biol**. 2013; 20(6): 735-9.