

„Badania struktury, dynamiki oraz oddziaływań białko-ligand ludzkiej cystatyny C metodami magnetycznego rezonansu jądrowego”

Kierownik projektu: mgr Martyna Ewa Maszota

Streszczenie:

Głównym celem projektu jest ustalenie struktury przestrzennej oraz oznaczenie dynamiki w roztworze dla dimeru ludzkiej cystatyny C (hCC) oraz jej występującego w formie monomerycznej mutanta V57G. W tym celu zamierzamy wykorzystać techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Do tej pory znane są jedynie struktury krystaliczne tych białek, natomiast podjęte między innymi przez Ekiel i współpracowników próby wyznaczenia struktur NMR dla hCC nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Mimo, iż nie udało się określić struktur przestrzennych na poziomie atomowym, to informacje NMR, które uzyskano wyraźnie wskazują na istnienie pewnych różnic pomiędzy strukturami krystalicznymi a strukturami NMR. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój zaawansowanych technik NMR dla biomolekuł, rozpowszechnione zostały również metody wyznaczania struktury podwójnie znakowanych białek z wykorzystaniem dwu- oraz trójwymiarowych eksperymentów NMR. Sprawia to, iż wyznaczenie struktury NMR dla planowanych białek będzie znacznie ułatwione. Przewidujemy, że oprócz struktur hCC oraz mutanta V57G, uda nam się określić również fleksybilne regiony białek (między innymi N-koniec, którego struktura, ze względu na zbyt dużą fleksybilność nie jest możliwa do zaobserwowania w formie krystalicznej). Planujemy również porównać struktury NMR, uzyskane w roztworze, ze znanymi strukturami krystalograficznymi oraz określić znaczące różnice (jeśli będą występowały) między nimi. Dokonamy również analizy porównawczej struktur NMR otrzymanych dla dimeru hCC i dla jego monomerycznej formy V57G. Pozwoli to nam na głębsze poznanie procesu dimeryzacji i oligomeryzacji cystatyny C a tym samym zrozumienie procesów powstawania fibryli amyloidowych. Przewidujemy, że wyniki uzyskane w tej części projektu w postaci danych NMR (przesunięcia chemiczne, efekty NOE) będą wykorzystane w drugiej części projektu, która dotyczy badania oddziaływań hCC z peptydowymi ligandami. W kolejnym etapie badań planujemy wykonanie serii miareczkowań ludzkiej cystatyny C ligandami peptydowymi z wykorzystaniem techniki NMR. Kolejnym celem naszego projektu jest określenie natury oddziaływania ludzkiej cystatyny C z ligandami peptydowymi. Wykonane dotychczas w Katedrze Chemii Medycznej badania wykazały, iż cystatyna C oddziałuje z fragmentami peptydu A β oraz z fragmentami białka SAA (serum amyloid A). Badania, prowadzone techniką spektrometrii mas połączoną z enzymatycznym trawieniem, wskazały miejsca wiążące w kompleksach hCC/Ab oraz hCC/SAA. Są to fragmenty (101- 117) hCC i (17-28) A β dla kompleksu hCC/A β oraz fragmenty (96-102) hCC i (86-104) SAA dla kompleksu hCC/SAA. Przeprowadziliśmy również testy immunoenzymatyczne ELISA dla kompleksu A β /hCC oraz SAA/hCC w połączeniu z jednoczesnym skanem alaninowym dla peptydu A β i SAA. Testy ELISA jednoznacznie wskazały krytyczne dla formowania kompleksu reszty aminokwasowe peptydów/ligandów. W ramach niniejszego projektu planujemy poszerzenie zakresu badań oddziaływań hCC z ligandami peptydowymi wykorzystując technikę NMR. Zamierzamy zbadać rodzaj oddziaływań pomiędzy białkiem a ligandem oraz sprawdzić, które reszty aminokwasowe białka hCC są zaangażowane w tworzenie kompleksów. Uważamy, że w przyszłości nasze wyniki umożliwią zaprojektowanie skutecznych inhibitorów agregacji hCC, a co za tym idzie odnalezienie skutecznych terapii w przebiegu innych chorób amyloidowych.