

Temat:

Analiza struktury i stabilności wariantów białka TRAIL o podwyższonej aktywności cytotoksycznej

Streszczenie

Ludzka cytokina TRAIL, należąca do nadrodziny czynników martwicy nowotworu, odgrywa rolę w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego i regulacji odpowiedzi przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych i autoimmunologicznych. W swojej biologicznie aktywnej formie białko TRAIL jest homotrimerem wiążącym jon cynku, którego obecność warunkuje aktywność i specyficzność działania białka. Poprzez oddziaływanie z receptorami śmierci DR4 i DR5, TRAIL indukuje apoptozę na drodze niezależnej od p53, a jego działanie jest specyficzne względem komórek nowotworowych. Z tego powodu białko to jest obiecującym kandydatem na nowy lek przeciwnowotworowy, jednak niektóre linie komórek nowotworowych rozwijają oporność na indukcję apoptozy przez TRAIL. Zaproponowano dwa nowe warianty białka TRAIL cechujące się wyższą cytotoksycznością *in vitro*.

Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy jest struktura i stabilność tych dwóch nowych wariantów białka TRAIL uzyskanych jako białka rekombinowane w prokariotycznym systemie ekspresyjnym. Sprawdzono, że parametry struktury drugo- i trzeciorzędowej są podobne do białka typu dzikiego i zgodne z oczekiwanymi na podstawie znanych struktur krystalicznych białka TRAIL. Do analizy zawartości struktur drugorzędowych wykorzystano pomiary dichroizmu kołowego. Parametry struktury trzeciorzędowej badano z wykorzystaniem metod spektroskopii fluorescencji i spektroskopii dichroizmu kołowego. Dzięki temu, że TRAIL zawiera dwie reszty tryptofanowe na monomer - a jedna z tych reszt jest zlokalizowana w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca wiązania jonu cynku - przeprowadzone pomiary pozwalają także wnioskować, że ligand ten jest obecny w cząsteczkach badanych białek. Dla jednego z analizowanych konstruktów stwierdzono tworzenie mostków disiarczkowych spinających dwie podjednostki białka.

Po potwierdzeniu prawidłowej struktury badanych pochodnych białka TRAIL sprawdzono także, w jakich warunkach wykazują one najwyższą stabilność. Wyznaczono wartości entalpii swobodnej natywnej konformacji oraz temperatury topnienia w różnych warunkach, wykorzystując pomiary fluorescencji oraz skaningową fluorymetrię różnicową. Wykazano, że stabilność badanych białek zwiększa się ze wzrostem siły jonowej oraz w obecności glicerolu i sacharozy. Obecność chelatora jonów metali EDTA obniża natomiast stabilność białek, prawdopodobnie wskutek chelatowania kofaktora Zn^{2+} . W niskim pH zaobserwowano globalną zmianę struktury w kierunku stopionej globuli.

Dwie analizowane pochodne białka TRAIL różnią się sekwencją łącznika między dwiema częściami białka fuzyjnego. Wpłynęła ona na stabilność konstruktów, ich strukturę czwartorzędową oraz wydajność proteolizy. Obserwowane różnice w strukturach białek zostały przedyskutowane w kontekście badań ich aktywności *in vitro*.

Krolusw 03.03.2015
Małgorzata Figiel