

Bożena Szelażek

Streszczenie rozprawy doktorskiej pod tytułem „Analiza struktury i funkcji białek wirusowych: transglikozylazy P5 z bakteriofaga ϕ 6 oraz białka nukleokapsydu ludzkiego koronawirusa NL63”

Streszczenie

Praca koncentruje się wokół charakterystyki strukturalnej i funkcjonalnej wybranych białek wirusowych. Opisane wyniki badań dotyczą transglikozylazy P5 z bakteriofaga ϕ 6 oraz białka nukleokapsydu (N) ludzkiego α koronawirusa NL63 (HCo NL63).

Gospodarzem faga ϕ 6 jest *Pseudomonas syringae*, Gram – ujemna bakteria, patogen wielu gatunków roślin uprawnych. Enzym P5 wykazuje aktywność lityczną wobec ściany komórkowej bakterii Gram – ujemnych. Białko P5 zostało wstępnie zaklasyfikowane jako proteaza o potencjalnie nowym mechanizmie katalizy. Później jednak pojawiły się sugestie wskazujące na możliwy mechanizm działania jako litycznej transglikozylazy. Celem badań opisanych w rozprawie było scharakteryzowanie aktywności katalitycznej i mechanizmu działania poprzez połączenie analizy biochemicznej i strukturalnej. Uzyskana struktura krystaliczna jest analogiczna do lizozymu i litycznych transglikozylaz sugerując, że P5 wykazuje jeden z powyższych rodzajów aktywności, a tym samym nie jest zapewne proteazą. Analiza specyficzności substratowej na substratach syntetycznych oraz wyizolowanej ścianie bakteryjnej pozwoliły na identyfikację produktów typowych dla litycznych transglikozylaz. Tym samym wykazano, że P5 nie posiada aktywności proteolitycznej ani lizozymu, a wykazuje aktywność litycznej transglikozylazy. Ukierunkowana mutageneza kluczowych reszt aminokwasowych potwierdziła powyższą konkluzję.

Białko P5 poza domeną katalityczną posiada nietypowe wydłużenia N- i C- końców. W pracy wykazano, że część N-końcowa, jak i helisa C-końcowa uczestniczą w regulacji aktywności P5. w przypadku helisy C-końcowej wyjaśniono szczegółowo mechanizm działania poprzez analizę aktywności szeregu mutantów punktowych.

Zainteresowanie fizjologią wirusów skłoniło mnie także do podjęcia badań nad białkami strukturalnymi koronawirusów. Koronawirusy odpowiadają za infekcję górnych i dolnych dróg oddechowych u ludzi. Szacunkowo, około 1 – 10% populacji cierpi rocznie na przeziębienia (infekcje górnych dróg oddechowych) wywołane przez ludzkiego koronawirusa

NL63 (HCoV NL63). Białko N jest głównym białkiem strukturalnym formującym nukleokapsyd HCoV NL63. Ponadto, białko N jest zaangażowane w inne procesy, w tym replikację wirusa oraz unikanie odpowiedzi układu immunologicznego. Podczas, gdy rola białka N w replikacji wirusa jest względnie dobrze poznana, dane na temat struktury białka N α -koronawirusów nie były znane na dzień rozpoczęcia badań. W pracy opisano struktury krystaliczne domen N- i C- (odpowiednio NTD, reszty 10-140 i CTD, reszty 221-340) białka N pochodzącego z α -koronawirusa HCoV NL63, obydwie z rozdzielczością 1.5 Å. W oparciu o strukturę NTD zaproponowano model wiązania RNA, a następnie zweryfikowano go eksperymentalnie. Struktura domeny C-terminalnej ukazała, że białko N w naturze występuje w formie dimeru. Badania te pozwoliły na lepszy wgląd w początkowe etapy interakcji białko N / kwas nukleinowy. Badania opublikowano w 2017 r. w czasopiśmie *Journal of Virology*, 91(11), e02503-16.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej pracy poszerzają podstawową wiedzę na temat fizjologii wirusów, w szczególności roli transglikozylazy P5 z bakteriofaga ϕ 6 oraz białka nukleokapsydu HCoV NL63. W szerokiej perspektywie badania te mogą przyczynić się do opracowania metod kontroli patogenów roślinnych i koronawirusowych zakażeń ludzi.