

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Charakterystyka specyfiki degradacji transkryptów przez MCPIP1**

mgr Mateusz Wilamowski

Promotor: Prof. dr hab. Jolanta Jura

Promotor pomocniczy: dr Andrzej Górecki

Nukleazowa degradacja mRNA jest niezbędnym mechanizmem kontrolującym poziom transkryptów w komórkach. Regulacja stabilności mRNA jest odpowiedzialna za 40 do 50 % zmian w ekspresji genów. MCPIP1 (białko indukowane przez MCP-1), znane również jako Regnaza1, jest rybonukleazą kluczową dla modulacji poziomu transkryptów związanych z procesami zapalnymi. Charakterystyczną cechą MCPIP1 jest obecność pojedynczej domeny palca cynkowego CCCH, który jest zlokalizowany na końcu C domeny RNazowej PIN (N-koniec PiIT). Regulacja odpowiedzi immunologicznej przez MCPIP1 zachodzi poprzez bezpośrednią degradację transkryptów wielu cytokin, takich jak IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12b i IL-17. MCPIP1 jest modulatorem wczesnej fazy procesu zapalnego, w późniejszym etapie rozwoju stanu zapalnego jego rolę przejmuje białko Roquin1, rozpoznające zbliżone matryce. MCPIP1 reguluje również poziom transkryptów kluczowych dla procesów różnicowania, progresji nowotworów oraz angiogenezy.

Celem niniejszej pracy jest biochemiczna oraz strukturalna analiza specyfiki degradacji transkryptów przez białko MCPIP1.

Wykazaliśmy, że rekombinowane ludzkie białko MCPIP1 działa jako endonukleaza, która przecina różne struktury pętli RNA a także jednoniciowe RNA. Stosując test aktywności nukleazowej połączony z wysoce rozdzielczą elektroforezą w warunkach denaturujących ujawniliśmy miejsca cięcia występujące w pętlach RNA pochodzących z sekwencji regionu 3' nieulegającego translacji (3'UTR) transkryptu mysiej i ludzkiej interleukiny 6. Wykonaliśmy analizę specyfiki substratowej MCPIP1 względem jednoniciowych oraz dwuniciowych substratów RNA i DNA oraz sekwencji tworzących zróżnicowane strukturalnie pętle RNA. Pokazaliśmy, że MCPIP1 wywołuje endonukleazową hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w obrębie jednoniciowego fragmentu pętli w strukturze RNA typu spinki do włosów. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że MCPIP1 wykazuje obniżoną aktywność katalityczną względem jednoniciowych fragmentów RNA. Nasze badania wykazały, że jednoniciowe substraty RNA krótsze niż 6 nukleotydów nie ulegają degradacji na skutek aktywności nukleolitycznej MCPIP1. Analizy *in vitro* nie wykazały silnej specyfiki strukturalnej lub sekwencyjnej względem rozpoznawanych substratów RNA, dlatego sądzimy, że białka tworzące kompleks z MCPIP1 w komórce są kluczowe dla determinacji jego selektywności.

W teście opóźnienia migracji kompleksów w żelu (EMSA) pokazaliśmy, że białko MCPIP1 posiadające mutację D141N w obrębie domeny RNazowej PIN tworzy stabilny kompleks z fragmentami 3'UTR transkryptów C/EBP $\beta$ , IL-6 oraz IL-8. Stosując pełnej długości MCPIP1<sub>D141N</sub>, domenę rybonukleazową PIN<sub>D141N</sub> oraz domenę rybonukleazową z palcem cynkowym PIN-ZF<sub>D141N</sub> wyznaczyliśmy stałe dysocjacji kompleksów analizowanych białek z 12 oligonukleotydami. Zaobserwowaliśmy wysokie powinowactwo białka MCPIP1<sub>D141N</sub> do struktur spinek RNA. Równowagowa stała wiązania (K<sub>d</sub>) dla kompleksu wynosiła około 10 nM. W przypadku zastosowania domeny PIN<sub>D141N</sub> lub PIN-ZF<sub>D141N</sub> powinowactwo do oligonukleotydów było niższe niż w przypadku pełnej długości białka. Stała dysocjacji kompleksów PIN-ZF<sub>D141N</sub> w zależności od stosowanej sekwencji oligonukleotydowej wynosiła 15-56 nM. Obecność palca cynkowego CCCH na końcu C domeny PIN zwiększa powinowactwo tego białka do substratu RNA o długości 25 nukleotydów, ale nie do krótszych sekwencji. Wyniki te wskazują, że palec cynkowy CCCH stabilizuje oddziaływanie z oligonukleotydami, ale nie jest niezbędny dla wiązania i katalizy RNA przez MCPIP1.

Uzyskane wyniki chromatografii sączenia molekularnego białek MCPIP1 i PIN oraz analizy kooperatywności oddziaływania z kwasami nukleinowymi sugerują, że MCPIP1 ulega homooligomeryzacji podczas interakcji z substratami RNA. Wykazaliśmy, że białko MCPIP1 jest w równowadze pomiędzy formą dimeryczną i tetrameryczną. Rezultaty te zostały potwierdzone analizą krystalografii rentgenowskiej. Rozwiązaliśmy strukturę krystalograficzną domeny PIN o tetramerycznej strukturze czwartorzędowej, która zawiera dodatnio naładowany tunel o szerokości wystarczającej do zmieszczenia jednoniciowego oligonukleotydu. W eksperymencie transmisyjnej mikroskopii elektronowej, w którym obserwowano barwiony negatywnie octanem uranylu kompleks białka MCPIP1<sub>D141N</sub>, zaobserwowaliśmy stabilizację czwartorzędowej struktury MCPIP1<sub>D141N</sub> w obecności oligonukleotydu DNA tworzącego 25 nt pętlę. Obserwowany kompleks ma średnicę 10 nm, co świadczy o homooligomeryzacji MCPIP1. Obecność palca cynkowego CCCH w sąsiedztwie domeny PIN jest charakterystyczny jedynie dla białek rodziny MCPIP, dlatego wykonaliśmy eksperymenty krystalograficzne mające na celu rozwiązanie struktury PIN-ZF. Opracowano warunki krystalizacji PIN-ZF oraz pełnej długości MCPIP1, które są w trakcie dalszej optymalizacji w celu uzyskania wysokiej rozdzielczości danych dyfrakcyjnych.

Reasumując, opisana w pracy doktorskiej charakterystyka biochemiczna i strukturalna rekombinowanego białka MCPIP1 daje wgląd w mechanizm rozpoznawania substratów przez MCPIP1. Liczne miejsca nukleazowej degradacji oligonukleotydów RNA na skutek aktywności MCPIP1 sugerują, że rekombinowane MCPIP1 nie zachowuje wysokiej selektywności sekwencyjnej. Zaobserwowaliśmy wysokie powinowactwo MCPIP1<sub>D141N</sub> względem zróżnicowanych substratów tworzących ssRNA, ssDNA oraz pętle RNA. Opracowany test analizy powinowactwa MCPIP1<sub>D141N</sub> do substratów może zostać wykorzystany w przesiewowej analizie inhibitorów białka MCPIP1.

Słowa kluczowe: stan zapalny, degradacja mRNA, domena PIN, palec cynkowy CCCH