Ewa Niedziałkowska
Streszczenie pracy doktorskiej pod tytułem:

„Wpływ modyfikacji potranslacyjnych na oddziaływanie między histonem H3 a surwiwiną"

Poprawna segregacja chromosomów w trakcie podziału komórkowego wymaga prawidłowego połączenia mikrotubul wrzeciona kinetycznego, powstającego na obu biegunach dzielącej się komórki, z kinetochorami formowanymi w regionie centromerycznym siostrzanych chromatyd. Nieprawidłowości w trakcie tego procesu prowadzą do zaburzeń liczby chromosomów a w konsekwencji do nowotworów i wrodzonych wad rozwojowych. W niniejszej pracy skoncentrowano się na mechanizmach, które są odpowiedzialne za prawidłowy przebieg podziału komórki zwracając szczególną uwagę na potranslacyjne modyfikacje chromatyny. Jedną z kluczowych roli w kontrolowaniu podziału komórki odgrywa kompleks CPC (ang. chromosomal passenger complex). W skład tego kompleksu wchodzi kinaza Aurora B oraz białka regulatorowe: surwiwina, borealina i INCENP (ang, inner centromere protein). Rola Aurory B polega między innymi na kontrolowaniu nieprawidłowo uformowanych połączeń między kinetochorem a mikrotubulami wrzeciona kinetycznego, stąd prawidłowa lokalizacja tego kompleksu jest kluczowa dla funkcji Aurory B.

Celem pracy było wyznacznie molekularnych podstaw oddziaływania pomiędzy histonem H3 a surwiwiną oraz roli tego oddziaływania w kierowaniu kompleksu CPC do centromerycznego regionu chromosomu. W badaniach sprawdzono znaczenie fosforylacji treoniny-3 (T3) oraz metylacji i acetylacji lizyny-4 (K4) histonu H3 w oddziaływaniu z surwiwiną. Doświadczenia prowadzono na ludzkiej surwiwinie oraz jej odpowiedniku z *Xenopus laevis*.

W pierwszym etapie pracy scharakteryzowano oddziaływania między histonem H3 a fragmentem kompleksu CPC z *Xenopus laevis*, na który składały się surwiwina, borealina oraz INCENP (reszty aminokwasowe od 1 do 58). Wyznaczono w warunkach *in vitro* stałą dysocjacji między N-końcowym fragmentem histonu H3 a kompleksem surwiwina:borealina:fragment $INCENP^{1-58}$ oraz wykazano, że fosforylacja T3 histonu H3 wzmacnia siłę tego oddziaływania.

Następnie określono molekularne podstawy tego oddziaływania wykorzystując krystalografię rentgenowską. Na tym etapie badań skoncentrowano się na ludzkiej surwiwinie

i zbadano strukturalne podstawy oddziaływania tego białka z fragmentem histonu H3. Na podstawie uzyskanych struktur krystalicznych kompleksu surwiwiny i histonu H3 oraz analizy porównawczej tych struktur z innymi białkami posiadającymi domenę BIR wykazano, że N-końcowy fragment histonu H3 wiąże się w rowku tworzonym przez aminokwasy ludzkiej surwiwiny W67, D71, E76, L64, które są charakterystyczne dla białek posiadających domenę BIR i wiążących N-końcowe fragmenty białek. Ponadto porównanie struktur surwiwiny z innymi białkami posiadającymi domenę BIR wykazało, że aminokwasy H80, E65 i K62 w ludzkiej surwiwinie są charakterystyczne tylko dla tej surwiwiny pozwalając jej na specyficzne wiązanie N-końcowego fragmentu histonu H3. Znaczenie tych reszt aminokwasowych dla wiązania histonu H3 potwierdzono metodami ukierunkowanej mutagenezy, izotermalnego miareczkowania kalorymetrycznego oraz krystalografii rentgenowskiej.

Ze względu na obserwowane różnice w wyznaczonych stałych wiązania ufosforylowanego na T3 histonu H3 przez surwiwiny z *Homo sapiens* i *Xenopus leavis* porównano sekwencje aminokwasowe surwiwin z wybranych organizmów modelowych z królestwa zwierząt i grzybów. Pokazano, że w obrębie analizowanych kręgowców, wyłączając ssaki, istnieją dwa warianty surwiwiny. Istotną różnicę między nimi stanowi obecność histydyny lub argininy w pozycji wiążącej ufosforylowaną T3 histonu H3. Za pomocą izotermalnego miareczkowania kalorymetrycznego wykazano *in vitro*, że ludzka surwiwina z histydyną (H80) w miejscu wiążącym histon H3 wykazuje większą fosfospecyficzność względem zmodyfikowanego histonu H3 w miarę spadku pH otoczenia. Z kolei surwiwina z *Xenopus laevis* z argininą w miejscu odpowiadającym H80 w ludzkiej surwiwinie cechuje się wzrostem fosfospecyficzności w miarę wzrostu pH otoczenia, przy czym siła wiązania ufosforylowanego fragmentu histonu pozostaje stała w analizowanym zakresie pH. Zademonstrowana odmienna zależność fosfospecyficzności różnych typów surwiwin od pH wyjaśnia początkowo obserwowaną rozbieżność charakterystyk wiązania histonu H3 przez ludzką surwiwnę pomiędzy badaniami *in vitro* i w hodowlach komórkowych. Ponadto, wykazano też, że temperatura nie ma znaczącego wpływu na fosfospecyficzne wiązanie N-końcowego fragmentu histonu H3 przez ludzką surwiwinę.

W ostatnim etapie badań sprawdzono wpływ metylacji i acetylacji K4 histonu H3 w obecności lub braku fosforylacji T3 na oddziaływanie z ludzką surwiwiną. Wykazano, że pojedynczo i podwójnie metylowana K4 nie wpływa istotnie na siłę oddziaływania z surwiwiną oraz nie zmienia jej fosfospecyficzności. Natomiast acetylacja K4, podobnie jak jej

potrójna metylacja, zmniejsza siłę wiązania między surwiwiną a potranslacyjnie zmodyfikowanym końcem histonu H3.

Opisane w niniejszej pracy badania wyjaśniają rolę potranslacyjnej modyfikacji histonu H3 (fosforylacji T3) oraz surwiwiny w kierowaniu kompleksu CPC do centromerycznego regionu chromosomu. Dzięki przeprowadzonym doświadczeniom poznano molekularne podstawy oddziaływania histonu H3 z surwiwiną oraz wykryto wrażliwość fosfospecyficznego oddziaływania surwiwiny na zmiany lokalnego pH. Badania pokazują też, że potranslacyjne modyfikacje K4 histonu H3 mogą mieć znaczenie w regulacji oddziaływania CPC z chromatyną. Otrzymane wyniki doświadczalne pozwalają na postawienie hipotezy, że lokalne pH chromatyny ma znaczenie w kontroli przebiegu podziału komórkowego. Uzyskane dane pozwalają też na zadanie pytania o sens biologiczny istnienia dwóch wariantów surwiwin o różnej wrażliwości na pH u niższych kręgowców.