

Kamil Synoradzki

**Badanie oddziaływań ludzkich białek Hsp90  
z białkami substratowymi i pomocniczymi**

Promotor:

Dr hab. Paweł Bieganowski



Zakład Farmakologii Doświadczalnej  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

**Warszawa, 2016**

## Streszczenie

Białka szoku cieplnego 90 (Hsp90) należą do klasy białek opiekuńczych. Białka te odgrywają istotną rolę w komórce w warunkach fizjologicznych i związanych ze stresem. Hsp90 jest zaangażowane w wiele różnych procesów komórkowych, w trakcie których oddziałuje z ponad 200 białkami nazywanymi klientami. Hsp90 zapewnia prawidłową aktywność i stabilizację tym białkom.

Aktywność opiekuńcza Hsp90 zależy od hydrolizy ATP – zachodzącej w jego domenie N i podlega regulacji przez białka zwane koczaperonami (pomocniczymi). Większość zwierząt (z wyjątkiem kręgowców) posiada jedną cytoplazmatyczną formę Hsp90. W cytozolu ludzkich komórek współwystępują dwie izoformy Hsp90 nazywane  $\alpha$  i  $\beta$ , które pomimo że są kodowane przez różne geny, posiadają bardzo podobną sekwencję aminokwasową. Wiele prac naukowych nie rozróżnia istnienia izoform Hsp90, traktując je jako jedno białko, bądź badając tylko jedną z izoform. Niewiele wiadomo o roli poszczególnych izoform oraz różnicach strukturalnych między nimi. Zidentyfikowano zaledwie kilka białek-klientów oraz białek pomocniczych oddziałujących preferencyjnie z jedną z izoform Hsp90.

Celem podjętej pracy było poszukiwanie różnic między ludzkimi cytoplazmatycznymi izoformami Hsp90. Starano się określić, które fragmenty ludzkiego Hsp90 mogą być odpowiedzialne za preferencyjną interakcję Hsp90 $\alpha$  lub Hsp90 $\beta$  z białkami pomocniczymi i białkami-klientami.

Stabilność i wysoki poziom ekspresji Hsp90 w komórce utrudnia badania nad specyficznymi funkcjami izoform Hsp90  $\alpha$  i  $\beta$  *in vivo*. Wykorzystanie technik siRNA lub antysensownych oligonukleotydów i związane z tym zaprojektowanie sekwencji wyciszających tylko jedną izoformę jest utrudnione, z uwagi na wysoką homologię sekwencji między izoformami Hsp90.

W niniejszej pracy posłużono się genami *HSP90* z mutacją nadającą oporność na inhibitor ATPazy w Hsp90. Zastosowanie tego inhibitora pozwoliło zahamować aktywność endogennego Hsp90 przy zachowaniu ekspresji genów *HSP90* z wprowadzonych plazmidów, jako jedyne źródła tego białka w komórce.

Hsp90 składa się z 3 domen: N-końcowej, środkowej oraz C-końcowej. Aby określić, które obszary sekwencji Hsp90 odpowiadają za różnice między izoformami, skonstruowano geny hybrydowe, w których fragmenty izoformy  $\alpha$  zostały wymienione na odpowiadające im

fragmenty izoformy  $\beta$ . Białka hybrydowe oraz izoformy badano w ludzkiej linii komórkowej i w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*.

Skonstruowano szczep drożdży, w którym ludzkie izoformy lub formy hybrydowe zastępowały endogenne Hsp90. Drożdże z ekspresją Hsp90 $\alpha$  lub hybryd posiadających w swej strukturze fragmenty pochodzące ze środkowej domeny tej izoformy rosły wolniej, niż drożdże z ekspresją Hsp90 $\beta$  lub hybryd zawierających fragmenty środkowej domeny z Hsp90 $\beta$ . W przeciwieństwie do drożdży, ludzkie komórki linii HEK-293 z ekspresją izoform Hsp90 i białek hybrydowych, dzieliły się w jednakowym tempie.

Immunoprecypitacja kompleksów białek oddziałujących z Hsp90 wykazała preferencyjne wiązanie p23 oraz Aha1 z izoformą Hsp90 $\alpha$  i hybrydami posiadającymi w swej strukturze środkową domenę tej izoformy. Te same fragmenty środkowej domeny Hsp90 $\alpha$  warunkujące wysokie powinowactwo wiązania z Aha1 były odpowiedzialne za wolny wzrost drożdży.

Oddziaływanie między izoformami Hsp90 a Aha1 sprawdzano w drożdżach pozbawionych genów *AHA1* oraz *HCH1* (oba geny są homologiczne do ludzkiego *AHA1*). Drożdże z ekspresją Hsp90 $\beta$  były niewrażliwe na brak *AHA1* i *HCH1*, podczas gdy spowolnienie tempa wzrostu dotyczyło drożdży z ekspresją Hsp90 $\alpha$  pozbawionych genu *AHA1*.

Powszechnie przyjmuje się, że środkowa domena Hsp90 odpowiada za oddziaływanie z białkami-klientami. Wyniki niniejszej pracy pokazują, że w oddziaływaniu tym może mieć znaczenie również N-końcowa domena Hsp90. Analiza Western blot wykazała, że aktywność opiekuńcza Hsp90 wobec białek cIAP uwarunkowana jest obecnością N-końcowej domeny pochodzącej z Hsp90 $\beta$ .

Preferencyjne interakcje białek pomocniczych i klientów z daną izoformą Hsp90 zależą od różnych obszarów tego białka. Oddziaływanie charakterystyczne dla Hsp90 $\alpha$  z p23 oraz Aha1 jest związane z jej środkową domeną, podczas gdy N-końcowa domena z Hsp90 $\beta$  jest decydująca w oddziaływaniu z białkami cIAP.