

**„Specyficzność rozpoznawania i transportu substratów systemu degradacji białek
związanego z retikulum endoplazmatycznym ERAD”
mgr Hanna Sominka-Pierchlewicz**

Środowisko retikulum endoplazmatycznego (ER) jest optymalne dla biosyntezy m.in. białek sekrecyjnych oraz lizosomalnych. Białka o prawidłowej konformacji są transportowane do miejsc docelowych, natomiast nieprawidłowo zwinięte polipeptydy są specyficznym rozpoznawane w ER i transportowane do cytozolu w celu proteolitycznej degradacji. Ten proces nosi nazwę ERAD (ang. *ER-associated degradation*) i jest częścią systemu kontroli jakości fałdowania białek, zapewniającego prawidłowe funkcjonowanie komórek eukariotycznych. W procesie rozpoznawania substratów ERAD uczestniczą m.in. lektyny z rodziny EDEM (EDEM1, EDEM2 i EDEM3), a także białka z rodziny Derlin (Derlin-1, Derlin-2 i Derlin-3), które są zaangażowane w rozpoznawanie i translokację substratów białkowych przez błonę ER. Rozpoznawanie substratów białkowych przez regulatory procesu ERAD jest prawdopodobnie zależne m.in. od struktury i stopnia hydrofobowości tych substratów.

Celem niniejszej pracy było zatem zbadanie w jaki sposób struktura i hydrofobowość wybranych substratów białkowych wpływają na ich rozpoznawanie i transport z ER do cytozolu, ze szczególnym uwzględnieniem roli białka EDEM3 i białek z rodziny Derlin w tym procesie.

W pracy wykorzystano różne substraty białkowe: toksynę pochodzenia roślinnego rycynę, β -sekretazę (BACE457) oraz białko prekursorowe amyloidu (APP). Badania były prowadzone na ludzkich embrionalnych komórkach nerkowych (HEK293). Rycyna jest nietypowym substratem procesu ERAD. Zamiast proteolitycznej degradacji w cytozolu, jej aktywna enzymatycznie podjednostka A (RTA) wpływa na zahamowanie syntezy białek. Wykorzystane w pracy warianty rycyny: RTA P250A, RTA DHF i RTA IHF charakteryzują się odpowiednio: zmienioną strukturą drugorzędową oraz obniżoną i podwyższoną hydrofobowością. Modelowe białka o nieprawidłowej konformacji są kluczowym narzędziem w badaniu mechanizmów kierowania substratów na szlak degradacji związanej z ER. Przykładem takich białek są warianty ludzkiej β -sekretazy: BACE457, BACE457 DHF (wariant z obniżoną hydrofobowością) oraz BACE457 Δ , pozbawiony hydrofobowej domeny transmembranowej, co czyni go białkiem światła ER. Istotnym modelem badawczym jest również białko APP, którego cięcie proteolityczne może generować powstawanie toksycznych form β -amyloidu, przyczyniając

się do rozwoju choroby Alzheimera. W tej pracy wykorzystano dwie, różniące się budową izoformy APP: APP₇₅₁ oraz APP₆₉₅.

Przeprowadzone badania wykazały, że nadprodukcja białka EDEM3 wpływa na dwukrotnie podwyższenie zarówno cytotoksyczności rycyny P250A, jak i transportu podjednostki RTA_{P250A} z ER do cytozolu, jednocześnie nie wpływając na redukcję holotoksyny P250A w ER. Rola EDEM3 w transporcie RTA_{P250A} została również potwierdzona w warunkach wyciszenia ekspresji genu kodującego to białko. Obniżenie ilości EDEM3 spowodowało zmniejszenie wydajności transportu tej podjednostki z ER do cytozolu. W eksperymentach z wykorzystaniem różnych wariantów toksyny: RTA_{P250A}, RTA_{DHF} oraz RTA_{IHF} wykazano, że EDEM3 najsilniej oddziałuje z podjednostkami RTA o zmienionej hydrofobowości. Zmiana struktury drugorzędowej podjednostki A rycyny również podwyższa jej interakcje z EDEM3, w porównaniu do oddziaływań tej lektyny z RTA dzikiego typu. Dodatkowo, eksperymenty z zastosowaniem różnych form β -sekreazy wykazały, że EDEM3 skutecznie promuje degradację formy BACE457 Δ , pozbawionej domeny hydrofobowej oraz BACE457 DHF. Można wnioskować, że w wiązaniu substratów ERAD przez białko EDEM3 ma istotne znaczenia ich zmieniona struktura oraz hydrofobowość, co wpływa bezpośrednio na transport tych substratów z ER do cytozolu. Nadprodukcja białka Derlin-1, podobnie jak podwyższona ilość EDEM3, wpływa na uwrażliwienie komórek HEK293 na działanie rycyny P250A i podwyższenie transportu RTA_{P250A} do cytozolu. Co ciekawe, nadprodukcja białka Derlin-2 nie ma wpływu na te procesy. Sugeruje to odmienny mechanizm działania białek Derlin-1 i Derlin-2 w procesie transportu RTA o zmienionej strukturze drugorzędowej. W pracy pokazano również, że nadekspresja genów białek rodziny Derlin w różny sposób wpływa na ilość nadprodukowanych form APP₆₉₅ i APP₇₅₁, z czego podwyższona ilość białka Derlin-3 przyczynia się do istotnego obniżenia ilości niedojrzałych form zarówno APP₆₉₅, jak i APP₇₅₁. Dodatkowo, badania nad wpływem białek z rodziny EDEM na ilość nadprodukowanej izoformy APP₇₅₁, a zwłaszcza eksperymenty z zastosowaniem inhibitora proteasomu epoksymycyny, wykazały, że EDEM1 jest bardzo ważnym regulatorem wewnątrzkomórkowego metabolizmu białka APP₇₅₁.

Podsumowując, prowadzone badania wykazały, że zarówno struktura, jak i stopień hydrofobowości białek odgrywają kluczową rolę w ich rozpoznawaniu i kierowaniu na szlak degradacji ERAD. Wyniki te mogą mieć istotne znaczenie dla rozwoju strategii terapeutycznych, zwłaszcza w kontekście chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba

Alzheimera oraz w badaniach nad toksynami, co może przyczynić się do opracowania nowych zastosowań medycznych.