

W swojej rozprawie doktorskiej przedstawiłam wyniki badań dotyczących wpływu jonów miedzi na strukturę i oligomeryzację cystatyny C oraz jej wybranych wariantów. Wykonane przeze mnie prace badawcze i ich wyniki pozwoliły mi na zrealizowanie większości z postawionych sobie wcześniej celów.

W ramach badań doktorskich przygotowałam wektory ekspresyjne i nadprodukowałam w systemie bakteryjnym *E. coli* trzy nowe mutanty cystatyny C – H86A, H90A oraz H86_90A. Otrzymane białka oczyściłam i scharakteryzowałam porównując ich budowę i właściwości do hCC typu dzikiego. Badania aktywności inhibicyjnej względem papainy oraz badania struktury z wykorzystaniem dichroizmu kołowego nie wykazały istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami, a białkiem dzikim. Badania CD w gradiencie temperatury wskazały natomiast na obniżoną stabilność konformacyjną mutantu H90A, co w trakcie kolejnych analiz skutkowało jego znacznie podwyższoną tendencją do dimeryzacji. Mutacja wprowadzona została we fragmencie łańcucha, który według dotychczasowych badań, nie powinien wpływać na proces trójwymiarowej wymiany domen (w pętli AS). Jednak usunięcie reszty His⁹⁰ spowodowało destabilizację łańcucha na tyle dużą, że pod wpływem czynników nawet słabo indukujących dimeryzację wariant ten dimeryzował w stopniu dużo wyższym niż białko typu dzikiego. Wskazuje to na możliwą, choć nieopisaną jeszcze, rolę pętli AS w procesie dimeryzacji cystatyny C.

Wpływ jonów miedzi (II) na strukturę i stabilność konformacyjną wariantów hCC badałam za pomocą takich technik jak dichroizm kołowy oraz chromatografia sączenia molekularnego. Obecność jonów Cu²⁺ nie wpływa na strukturę drugo- i trzeciorzędową białka, ale podczas dłuższej interakcji prowadzi do zainicjowania procesu trójwymiarowej wymiany domen i dimeryzacji (zwłaszcza w przypadku białek WT oraz H90A), która jest początkiem dalszej oligomeryzacji białka. Dodatkowo, oddziaływanie z jonami miedzi (II) istotnie obniża stabilność termiczną białka typu dzikiego oraz wariantu H90A. Do rozpoczęcia zmian konformacyjnych w ich strukturach wystarczy temperatura o około 10-15 °C niższa niż w przypadku próbek kontrolnych niezawierających Cu²⁺. Podobne zachowanie białek hCC WT oraz H90A podczas wykonywanych eksperymentów sugeruje, że to obecność reszty His⁸⁶ jest kluczowa w oddziaływaniu cystatyna C – jony miedzi(II). Usunięcie wspomnianej reszty (co miało miejsce w białkach H86A oraz H86_90A) obniżyło wrażliwość obu mutantów na obecność miedzi w roztworze.

Badania EPR wskazały na istnienie czterech rodzajów kompleksów tworzonych przez jony miedzi (II) w roztworze wodnym zawierającym monomeryczną formę cystatyny C (stabilizowaną przeciw dimeryzacji). Jednak tylko dwa z nich uwzględniają udział badanych reszt histydyny: His⁸⁶ oraz His⁹⁰. Analizy NMR potwierdziły oddziaływanie jonu miedzi (II) z obiema resztami histydyny w pętli AS, jednak wykazały także występowanie szeregu dodatkowych, niespecyficznych oddziaływań w innych regionach cząsteczki. Powinowactwo reszty His⁹⁰ do ww. jonów potwierdziły również badania rentgenograficzne na białku typu dzikiego. Po namoczeniu kryształów hCC WT w roztworze miedzi (II) na otrzymanych z badań dyfrakcyjnych mapach gęstości elektronowej, w obrębie reszty His⁹⁰ zaobserwowałam pojawienie się dodatkowej mapy różnicowej, która prawdopodobnie stanowi hydratowany jon miedzi (II). Przy reszcie His⁸⁶ nie zauważyłam podobnych zmian ze względu na jej położenie. Dostęp do reszty His⁸⁶ jest utrudniony w wyniku obecności w jej bliskiej sąsiedztwie reszt Tyr⁴² i Arg⁵¹ cząsteczki symetrycznej.

Podjęte przeze mnie próby fibrylizacji cystatyny C w obecności badanych jonów udowodniły, że ich obecność nie wpływa na morfologię otrzymanych włókien białkowych, co potwierdziłam za pomocą zdjęć z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Wyjątkiem był mutant H90A, który w warunkach słabszego wytrząsania (300 rpm – wytrząsanie słabsze od literaturowego 600 rpm) i w obecności chlorku miedzi utworzył głównie duże, zbite agregaty białkowe, wśród których zaobserwowałam niewielkie i pozlepiane struktury fibrylarne oddziałujące z tioflawiną T. Eksperyment wykonany na białku dzikim w stężeniu 12x niższym od literaturowego udowodnił natomiast, że miedź wpływa na początkowe etapy oligomeryzacji. Struktury protofibrylarne w próbce z miedzią pojawiły się kilkadziesiąt godzin później niż w próbce kontrolnej. Cu²⁺ prawdopodobnie ma zdolność do stabilizowania dimerycznych i/lub niskooligomerycznych, rozpuszczalnych form białka, co prowadzi do opóźnienia agregacji, jednak nie wpływa na strukturę i morfologię tworzących się fibryli.

Ostatnim etapem moich badań doktorskich była krystalizacja nadprodukowanych białek w obecności jonów miedzi w celu ustalenia miejsca wiążącego. Niestety indukowana Cu²⁺ dimeryzacja, a dalej oligomeryzacja białek prowadziła do szybkiego strącania osadów białkowych w kroplach krystalizacyjnych i uniemożliwiała tworzenie kryształów. Udało mi się jednak otrzymać trzy struktury krystaliczne wariantów H90A oraz H86_90A bez udziału jonów miedzi. Odpowiednio dobrane składy roztworów krystalizacyjnych pozwoliła mi na wykrycie i wykryształowanie mutantu H90A w dwóch formach – monomerycznej i dimerycznej, co nie

udało się wcześniej dla żadnego innego wariantu hCC. Obie struktury zdeponowane zostały w Białkowej Bazie Danych i znaleźć je można pod kodami 7PU2 (monomer) oraz 7PU3 (dimer). Struktura białka H86_90A nie została zdeponowana ze względu na słabą jakość modelu. Wszystkie trzy otrzymane struktury krystaliczne nie różniły się znacząco od modeli dostępnych w PDB. Główne różnice zaobserwowałam we fragmentach labilnych i słabo ustrukturyzowanych takich jak pętle oraz N- i C-końce.