

oraz

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pracownia Dojrzewania i Degradacji RNA

Analiza biochemiczna i funkcjonalna ludzkiego białka CCDC97

Miłosz Ludwinek

Kierownik: **dr hab. Marzena Jankowska–Anyszka, prof. ucz.**

Opiekun: **dr hab. Agnieszka Tudek (IBB PAN)**

Poznanie funkcji białek obecnych w komórkach zwierzęcych (zwłaszcza ludzkich) dostarcza cennych informacji i stanowi podstawę do badania wielu zjawisk i chorób. Część białek występuje jedynie w pewnych grupach zwierząt i nie są one identyczne, jednak zawierają ewolucyjnie konserwowane fragmenty, co sugeruje, że mogą pełnić istotne funkcje w organizmach żywych.

Jednym z ludzkich białek, o którym wiemy niewiele, jest CCDC97 (Rys. 1.). To małe białko o masie około 39 kDa zawiera motyw coiled coil i oddziałuje z białkami zaangażowanymi w tworzenie innych kompleksów o ważnych, już poznanych funkcjach.

Na podstawie analiz biochemicznych i spektrometrii mas wykazano już, że białko CCDC97 oddziałuje z białkami: PHF5A, TTC33, WDR61, o których wiadomo, że tworzą również kompleks potrójny PHF5A:TTC33:WDR61. Celem pracy było ustalenie, czy w komórkach tworzony jest tetramer PHF5A:TTC33:WDR61:CCDC97 oraz w jaki sposób CCDC97 oddziałuje ze składnikami tego kompleksu.

W ramach pracy uzyskano pięć plazmidów kodujących różne fragmenty białka CCDC97 ze znacznikiem EGFP na N-końcu każdego fragmentu – schematyczny podział białka zaprezentowano na Rys.2. Dysponowano także plazmidem kodującym białko CCDC97 pełnej długości wraz ze znacznikiem EGFP na jego N-końcu.

N-końiec 1–144aa; Środek 145–218aa; C-końiec 219–343aa; coiled–coil 224–262

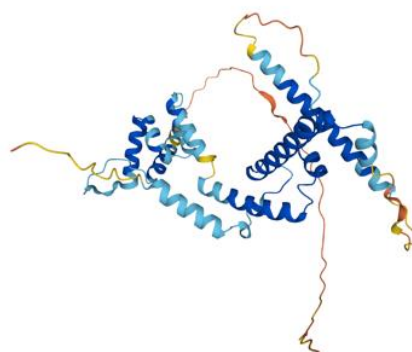


N-końciec 1–219aa; C-końciec 220–343aa; coiled–coil 224–262



Rysunek 2. Schemat podziału białka CCDC97 na 5 fragmentów. Zaznaczono także miejsce występowania motywu *coiled–coil*.

Przeprowadzono transfekcje w komórkach zawiesinowych HEK293, a po immunoprecypitacji białek z uzyskanego materiału biologicznego metodą hybrydyzacji typu WesternBlot



Rysunek 1. Proponowana struktura ludzkiego białka CCDC97 przewidziana przez algorytm AlphaFold [1].

potwierdzono, że białko CCDC97 pełnej długości oddziałuje z PHF5A, z WDR61 oraz TTC33. Ponadto białko to oddziałuje z SF3B4 – jest to podjednostka dużego kompleksu splicingowego SF3B, który obejmuje również PHF5A [2,3]. Analiza tego, którym fragmentem CCDC97 oddziałuje z każdym z wymienionych białek, nie doprowadziła do jednoznacznych wniosków. Niektóre z eksperymentów wskazywały na oddziaływanie TTC33 z C–końcem CCDC97, a PHF5A z N–końcem CCDC97, inne natomiast ukazywały oddziaływanie tych białek jedynie z CCDC97 pełnej długości. Być może badane białko jest „ruchomym” interaktorem opisanego trimery pełniąc pewną niepoznaną funkcję, a oddziaływania są niejednoznaczne i fragmentacja białka uniemożliwia tworzenie tetrameru.

Przeprowadzono także eksperymenty polegające na wyciszeniu CCDC97 oraz TTC33 w komórkach HEK293 – wyprowadzono stabilne linie komórkowe. Analiza biochemiczna wykazała, że w komórkach z linii z wyciszeniem TTC33 pojawia się więcej fosforylowanej formy białka p53, co sugeruje na związek jednego z interaktorów CCDC97 z powstawaniem pęknięć podwójnej helisy DNA, bowiem mechanizm uczestniczący w naprawie double strand breaks polega pośrednio na fosforylacji Ser15 białka p53.

Literatura:

- [1] Jumper J., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. Aug 2021, Tom 596(7873), strony 583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [2] Cretu C, Schmitzová J, Ponce-Salvatierra A et al., Molecular Architecture of SF3b and Structural Consequences of Its Cancer-Related Mutations. *Mol Cell* 64 307-319 (2016)
- [3] Will CL, Urlaub H, Achsel T, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4978-88. doi: 10.1093/emboj/cdf480. PMID: 12234937; PMCID: PMC126279.