

Streszczenie

Klatki białkowe są szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie, nano-strukturami, które odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu żywych organizmów. Mogą pełnić funkcje naczyń reakcyjnych lub przechowywać w swoim wnętrzu różne molekuly. Ich wnętrze wykorzystywane jest głównie w celach ochronnych, strona zewnętrzna do interakcji ze środowiskiem, natomiast połączenia między białkami budulcowymi odpowiadają za procesy montażu i demontażu klatek, które prowadzą do uwolnienia załadunku i mają kluczowe znaczenie dla morfologii i stabilności konstrukcji. Przykłady naturalnych klatek białkowych obejmują między innymi kapsydy wirusowe, ferrytyny i syntazę lumazyny. Ze względu na łatwość modyfikacji, wysoką stabilność i dobrze znaną strukturę, te supramolekularne nano-pojemniki są często wykorzystywane jako materiał do produkcji nowatorskich materiałów dla bio-nanotechnologii. Na ich podstawie opracowano również sztuczne klatki białkowe o ulepszonych właściwościach.

Istnieje duże zainteresowanie inżynierią klatek białkowych w projektowaniu połączeń białko-białko, tak aby mogły one ulegać demontażowi pod wpływem określonych bodźców. Taka właściwość byłaby szczególnie pożądana w przypadku dostarczania i uwalniania załadunku w danym czasie i miejscu. Aby utworzyć klatkę białkową o tak ulepszonych właściwościach, nasza grupa wykorzystwała jako element budulcowy 11-merowe białko TRAP z wprowadzoną mutacją cysteinową, aby wywołać jego składanie w struktury wyższego rzędu poprzez reakcję z jednowartościowymi jonami złota. Rekonstrukcja cryo-EM ujawniła tworzenie się pustych, monodispersyjnych klatek białkowych, składających się z 24 pierścieni połączonych ze sobą wiązaniami koordynacyjnymi tiol-Au(I)-tiol między cysteinami na sąsiednich pierścieniach. Klatka TRAP ma unikalne właściwości: jest wyjątkowo stabilna, ale jednocześnie łatwo ją rozmontować w łagodnym środowisku redukującym. Takie cechy są obiecujące dla rozwoju klatki jako nośnika dostarczania leków. Niemniej jednak ukierunkowane dostarczanie leków nadal stanowi wyzwanie. Głównym celem tego projektu badawczego było zaprojektowanie, wyprodukowanie i scharakteryzowanie nowych sztucznych klatek białkowych o różnych, wyzwalalnych na żądanie właściwościach demontażu i zdolności do zamykania przykładowych cząsteczek w ich wnętrzu. Prosta chemia koordynacyjna między atomami Au(I) i tiolami w klatce TRAP była inspiracją do zastosowania innego typu cząsteczek, które mogą potencjalnie łączyć cysteiny na sąsiadujących pierścieniach. Pierwszym wyborem były homo-bifunkcjonalne łączniki (linkery), które reagują specyficznym z grupami

sulfhydrylowymi: DTME i BMH. Zmieszanie ich z pierścieniami TRAP (K35C/R64S) zaowocowało pomyslnym utworzeniem klatki TRAP. Wykazano również, że proces ten nie jest uniwersalny i silnie zależy od zastosowanego maleimidowego łącznika. Pochodne dibromowe są innym rodzajem linkerów, które mogą reagować z grupami sulfhydrylowymi w fizjologicznym pH, które wybrano do testowania ich zdolności do tworzenia klatek TRAP. Do wstępnych prób wybrano m-DBX i DBB, które nie doprowadziły do powstania klatki po zmieszaniu ich z pierścieniami TRAP (K35C/R64S). Przetestowano inne podejście, w którym do już utworzonej klatki TRAP indukowanej złotem (TRAP-cage^{Au(I)}) dodano dibromo-linkery, w tak zwanej „reakcji szablonowej”. Otrzymane w ten sposób struktury klatek TRAP poddano analizie metodami, które wykazały ich wysoką stabilność.

Klatki TRAP złożone z linkerami maleimidowymi zenkapsulowano dwoma białkami fluorescencyjnymi, mOrange2 i mCherry, służącymi odpowiednio jako donator i akceptor FRET. Obecność tych białek w bliskim sąsiedztwie wewnątrz klatek TRAP umożliwiła obserwację FRET między cząsteczkami, co umożliwiło śledzenie rozpadu klatki po dodaniu różnych związków redukujących.

Opracowanie „reakcji szablonowej” umożliwiło wprowadzenie foto-degradowalnego w promieniowaniu UV linkera 1,2-BBN co doprowadziło do uzyskania pierwszej (według naszej wiedzy) klatki białkowej, której rozpad można kontrolować za pomocą światła. W przypadku potencjalnych przyszłych zastosowań klatki TRAP w żywych organizmach zbadano również reakcję foto-rozpadu dla innych linkerów, w których długość fali została przesunięta w kierunku zakresu światła widzialnego.

Metody pakowania zostały ulepszone poprzez włączenie białka SpyCatcher do struktury pierścieni TRAP, które po złożeniu klatki mogą enkapsulować ładunek zawierający metkę SpyTag. Klatki SpyCatcher-TRAP indukowane 1,2-BBN (SpyC-TRAP-cage^{1,2-BBN}) zenkapsulowano komputerowo zaprojektowanym białkiem podobnym do IL-2-NL-2/15 z metką SpyTag. Zmieszanie SpyTag-NL-2/15 ze SpyC-TRAP-cage^{1,2-BBN} poskutkowało enkapsulacją około 20 cząsteczek ładunku na klatkę. Aby przetestować odpowiedź komórkową enkapsulowanego NL-2/15, przeprowadzono test na komórkach HEK-Blue, który wykazał pozytywną odpowiedź i stymulację szlaku IL-2R po potraktowaniu komórek naświetlonymi SpyC-TRAP-cage^{1,2-BBN}-NL-2/15.

Podsumowując, badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej zaowocowały uzyskaniem nowatorskich metod tworzenia i funkcjonalizacji klatek TRAP w oparciu o różnorodne czynniki linkujące. Dzięki temu uzyskano pierwszą według naszej wiedzy foto-degradowalną pod wpływem UV klatkę białkową. Opracowano również skuteczne i wydajne metody enkapsulacji, co doprowadziło do stworzenia nowego narzędzia do śledzenia kinetyki demontażu klatki TRAP i pakowania aktywnych cząsteczek NL-2/15, które wykazały wyraźny potencjał dla zastosowania medycznego klatek TRAP.