

SENSYBILIZOWANE USZKODZENIA FOTOCHEMICZNE I RADIACYJNE W OLIGONUKLEOTYDACH ORAZ KOMPLEKSACH BIAŁKO-DNA

mgr inż. Paweł Wityk

Promotor: prof. dr hab. Janusz Rak

Promotor Pomocniczy: dr hab. inż. Jacek Czub

Podstawowym celem rozprawy doktorskiej jest ustalenie wpływu obecności specyficznego oddziałującego białka na wydajność i rodzaj uszkodzeń generowanych fotochemicznie i radiacyjnie w sensybilizowanym DNA.

W środowisku komórki natywne DNA nieustannie oddziałuje, specyficznie oraz niespecyficznie, z białkami (czynniki transkrypcyjne, histony, polimerazy, enzymy naprawcze, etc.). Oddziaływania specyficzne realizowane są głównie przez wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów tworzących białko, a zasadami nukleinowymi wchodzącymi w skład DNA. Oddziaływania te wpływają na powinowactwo zasad do elektronu oraz na sam mechanizm powstawania uszkodzeń w sensybilizowanym DNA. Dlatego konieczne wydaje się rozszerzenie dotychczas przeprowadzonych badań nad foto- i radiodegradacją izolowanych modeli sensybilizowanego DNA na kompleksy w których modyfikowany oligonukleotyd oddziałuje specyficznie z peptydem. Zbadanie wydajności procesu uszkodzania w kompleksach i porównanie jej z wydajnością degradacji izolowanego, punktowo znakowanego oligonukleotydu, powinno umożliwić scharakteryzowanie wpływu kompleksujących reszt aminokwasowych. Mechanizm foto- i radiodegradacji został również opisany przy pomocy obliczeniowych metod hybrydowych umożliwiających oszacowanie barier termodynamiczno-kinetycznych reakcji elementarnych składających się na badane procesy uszkodzania oligonukleotydu. Ostatecznym celem projektu jest więc pełne zrozumienie i ilościowe scharakteryzowanie sensybilizacji DNA w układach zbliżonych do występujących w żywych komórkach. [1]

W pracy skupiono się na specyficznych oddziaływaniach układu zasadowego fragmentu białka GCN4 (bZIP) z rozpoznawanym przez to białkiem fragmentem dsDNA. W celu uproszczenia tak skomplikowanego układu wykonano układ modelowy, w którym jedynie fragment bZIP (25 aa) jest kowalencyjnie połączony z dsDNA o długości 17 pz za pomocą reakcji CLICK [2]. Tak otrzymany kompleks został scharakteryzowany przez techniki takie jak nano-DSC, CD, HPLC, PAGE, czy LC-MS, które pozwoliły stwierdzić, iż odwzorowuje on w pełni specyficznie oddziałujący układ występujący w naturalnym kompleksie białko-DNA. Następnie tak scharakteryzowany kompleks został wyznakowany punktowo bromopochodnymi zasad azotowych i poddany napromienianiu (promieniowaniem X) oraz naświetlaniu (fotonami o długości fali 280 oraz 320 nm), a otrzymane radio- i fotolity zostały zaanalizowane za pomocą techniki LC-MS.

Literatura:

[1] Rak, J.; Chomicz, L.; Wiczak, J.; Westphal, K.; Zdrowowicz, M.; Wityk, P.; Makurat, S.; Golon, Ł. *J. Phys. Chem. B* 2015, 119, 8227-8238.

[2] Ahmad, F. A. A.; Azmi, F.; Skwarczynski, M.; Toth, I. *Molecules* 2013, 18, 13148-13174.