

STRESZCZENIE

Ubikwitynacja jest jednym z procesów komórkowych powodujących potranslacyjne modyfikacje białek. Głównym celem tej kaskady enzymatycznej jest przyłączenie małego białka– ubikwityny do modyfikowanych białek (tzw. substratów). Jest to niezwykle ważna kaskada ze względu na to, że ubikwityna może oznaczać białka, m.in. uszkodzone, nieprawidłowo sfałdowane lub niesprawne, co może prowadzić do ich degradacji. Co ważne, zaburzenia przynajmniej jednego z etapów tego procesu są przyczyną wielu chorób, w tym nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych czy immunologicznych.

Oprócz ubikwityny w proces ubikwitynacji zaangażowanych jest szereg innych strukturalnie pokrewnych enzymów. Najważniejsze z nich to: enzymy aktywujące ubikwitynę (E1), enzymy sprzęgające ubikwitynę (E2) oraz ligazy ubikwityny (E3). U ludzi opisano ponad 30 enzymów koniugujących ubikwitynę i ponad 600 ligaz ubikwityny, które mogą ubikwitynować różne substraty. Różnorodność ligaz E3 skutkuje zatem specyficznością procesów ubikwitynacji. Warto zauważyć, że w różnych typach nowotworów obserwuje się zwiększoną ilość ligaz ubikwitynowych, co czyni ligazy ubikwitynowe szczególnie interesującymi z punktu widzenia opracowywania nowych terapii. Główną przeszkodą postępu w rozwoju leków, w tym leków hamujących aktywność wybranych ligaz ubikwitynowych, jest złożoność mechanizmu procesów ubikwitynacji. Do tej pory dokładna rola biologiczna wielu ligaz ubikwityny nie została poznana, a ich substraty nie zostały jeszcze zidentyfikowane.

W przedstawionym manuskrypcie scharakteryzowaliśmy sieć interakcji wybranych ligaz ubikwitynowych przy użyciu nowoczesnych testów *in vivo* oraz standardowych narzędzi biochemicznych i genetycznych. Wiele interakcji i substratów białkowych odkryto głównie za pomocą technik biochemicznych *in vitro*, które mogą nie odzwierciedlać dokładnie rzeczywistego środowiska komórkowego. Zatem badanie interakcji w żywych komórkach w czasie rzeczywistym umożliwia nam scharakteryzowanie rzeczywistych procesów biologicznych zachodzących w komórkach. Przetestowaliśmy ligazy Nam7 (Upf1) i Irc20 E3 przy użyciu drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* jako organizmu modelowego. Białka te nie zostały jeszcze szczegółowo scharakteryzowane pod kątem ich roli w procesie

ubikwitynacji. U ludzi upośledzona funkcja białka Nam7 jest związana z występowaniem niektórych chorób genetycznych i niektórych typów nowotworów. Irc20 jest niescharakteryzowanym białkiem, o którym wiadomo, że bierze udział w rekombinacji homologicznej, ale jego bezpośredni mechanizm działania nie został jeszcze wyjaśniony. Manuskrypt koncentruje się na dogłębnym zrozumieniu mechanizmów działania Nam7 i Irc20 jako ligaz E3 oraz ich potencjalnych implikacjach zarówno dla ubikwitynacji, jak i innych procesów biologicznych. Prezentujemy również nowoczesne techniki z zakresu biochemii oparte na komplementacji fragmentów białek NanoBiT® i NUBiCA oraz standardowe techniki biologii molekularnej i genetyki. Zoptymalizowany system NanoBiT® zaproponowany w naszych badaniach umożliwi badanie oddziaływań białek w procesie ubikwitynacji w żywych komórkach na dużą skalę. Projekt przyczyni się zatem do lepszego zrozumienia sieci interakcji białek i konsekwencji tych interakcji w komórce.

Sarawenić