

Transferowy RNA jako substrat deaminazy APOBEC3A

Karolina Hoffa-Sobiech

Streszczenie

APOBEC3A to deaminaza cytydyny zależna od cynku, której główna aktywność enzymatyczna polega na katalizowaniu reakcji deaminacji cytydyny do urydyny w jednoniciowym DNA (ssDNA). Dodatkowo APOBEC3A ma zdolność do przekształcania 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny, odpowiednio, do tymidyny i 5-hydroksymetylourydyny w ssDNA. W warunkach fizjologicznych aktywność APOBEC3A odgrywa kluczową rolę w mechanizmach odporności wrodzonej. Zaburzenia w regulacji aktywności tego białka mogą prowadzić także do nowotworzenia. Między innymi z tego względu w ostatnim czasie APOBEC3A budzi szczególne zainteresowanie badaczy. Aktywność APOBEC3A wobec cytydyny w RNA została odkryta zaledwie kilka lat przed rozpoczęciem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy. Dotyczyła ona deaminacji cytydyn ulokowanych w strukturach typu spinki do włosów w mRNA. Odkrycie to stworzyło podstawy do badania udziału APOBEC3A w edycji RNA. Biorąc pod uwagę, że motyw spinki do włosów stanowi kluczowy element struktury drugorzędowej cząsteczek tRNA, oraz że deaminazy APOBEC pochodzą od deaminaz tRNA, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że tRNA jest substratem dla APOBEC3A. W celu weryfikacji tej hipotezy opracowano metodę produkcji APOBEC3A w systemie bakteryjnym i przetestowano jej aktywność wobec cząsteczek tRNA *in vitro*. Zarówno na podstawie wyników analiz ilościowych, wykorzystujących ultrawydajną chromatografię cieczową, jak i jakościowych, obejmujących sekwencjonowanie nowej generacji, stwierdzono, że w warunkach *in vitro* APOBEC3A deaminowała cytydynę w cząsteczkach tRNA pochodzących z ludzkiej linii komórkowej. Ponadto, edycję cytydyny do urydyny wykryto w puli fragmentów tRNA pochodzących od pacjentów z nowotworami. W kolejnym etapie badań wykazano, że *in vitro* APOBEC3A deaminowała 5-metylocytydynę w modelowej cząsteczce mRNA i w antykodonie syntetycznego tRNA-Leu-CAA. Uzyskane wyniki znacząco poszerzają dotychczasową wiedzę dotyczącą aktywności APOBEC3A wobec RNA i stanowią podstawę do dalszych badań nad funkcją tego enzymu zarówno w kontekście procesów fizjologicznych, jak i patologicznych.