

Streszczenie

Charakterystyka oddziaływania międzybiałkowego kompleksu koreceptora CD4 z kinazą tyrozynową Lck zależnego od jonów Zn^{2+}

Oddziaływania białko-białko są kluczowe do zachodzenia szeregu niezbędnych procesów komórkowych prowadzących do zachowania homeostazy. Ich identyfikacja, przewidywanie oraz badanie jednoznacznie przyczyniają się do zrozumienia obecnie zidentyfikowanych szlaków komórkowych oraz do poznania nowych ścieżek funkcjonalnych biomakromolekuł. Pośród szeregu biocząsteczek rezydujących w komórce krążą najmniejsze dostępne molekuly – jony metali – które pomimo swojego małego rozmiaru mają kluczowy wpływ zarówno na strukturę biomakromolekuł, jak i ich funkcjonowanie. Jonem metalu będącym przedmiotem opisywanej tezy jest jon Zn^{2+} , którego oddziaływanie na organizm ludzki badane jest od dekad. Jednak dopiero ostatnimi czasy jego zaangażowanie w tworzenie interfejsów białko-białko zaczęło nabierać większego znaczenia. Podstawą użyteczności Zn do tworzenia kompleksów białkowych o różnych funkcjach: katalitycznych, strukturalnych, regulatorowych i transportowych, jest w z pewnością jego zdolność do tworzenia oddziaływań z odmiennymi grupami funkcjonalnymi białek tj. grupą cysteinylową, histydylową, czy karboksylową. Dodatkowo, odmienność ta jest zobrazowana możliwościami tworzenia odmiennych sfer koordynacji Zn^{2+} oraz szeregiem osiągniętych powinowactw jonów Zn do białek, które leżą w granicach od mikro- do pikomolowych. Skutkiem tak zróżnicowanych pod względem stabilnościowym białkowych kompleksów cynkowych jest ściśle jego buforowanie w warunkach komórkowych, które zależy głównie od specyficznych transporterów cynkowych oraz metalotionein. Metalotioneinowa rodzina białek stanowi jak dotąd główny składnik komórkowego buforu cynkowego i jest zdolna do asocjacji/dysocjacji aż do 7 jonów Zn^{2+} na cząsteczkę białka, z różnym powinowactwem. W rezultacie komórka dysponuje pulą Zn^{2+}_{wolny} , który wiąże się ze stężeniem Zn^{2+} dostępnym do związania dla białek.

Głównym przedmiotem opisywanej pracy jest heterodimerski kompleks składający się z Zn^{2+} , 38-aminokwasowego cytoplazmatycznego fragmentu koreceptora CD4 oraz 29-aminokwasowego fragmentu N-końca kinazy tyrozynowej Lck. Jest on pierwszym zidentyfikowanym heterodimerem zależnym od Zn^{2+} o kluczowej roli w układzie immunologicznym. Pomimo ważnej roli jaką kompleks CD4-Lck odgrywa w aktywacji oraz dojrzewaniu komórek limfocytów T, udział Zn^{2+} w jego tworzeniu oraz badaniu jest często pomijany. Zn^{2+} w heterodimerskim kompleksie Zn(CD4)(Lck), zwanym także kompleksem uścisku cynkowego, koordynowany jest przez cztery reszty cysteinowe, dwie z każdej podjednostki białkowej. W sekwencji CD4 jednak znaleźć można dodatkowe reszty cysteinowe i histydynowe, których wpływ na tworzenie kompleksów opartych na CD4 i/lub Lck nie został jak dotąd zbadany. Mając na uwadze sekwencję CD4 oraz związane z nią elementy strukturalne, otrzymano został szereg wariantów CD4 mając na celu sprawdzenie ich wpływu na zależną od Zn^{2+} kompleksację Lck. Wykorzystując metody spektrofotometryczne, dichroizm kołowy oraz eksperymenty kompetycyjne uzyskano parametry stabilnościowe oraz stechiometrię tworzonych przez CD4 i Lck kompleksów z Zn^{2+} . W rezultacie wykazano, że najdłuższy fragment CD4 charakteryzuje się największą stabilnością oraz że obecność C^{397} i H^{399}

znacząco wpływa na stechiometrię tworzonych kompleksów Zn-CD4. Mając na uwadze, iż dodatkowe reszty cysteinowe w sekwencji CD4 (m.in. C³⁹⁷) mogą ulegać odwracalnej reakcji palmitylacji w warunkach komórkowych, jednym z celów pracy było sprawdzenie wpływu tej modyfikacji na tworzone kompleksy. Otrzymane drogą syntezy chemicznej fluorescencyjne palmitylowane pochodne CD4 oraz ich niepalmitylowane warianty zostały przebadane pod względem kompleksowania Zn²⁺ w obecności lub bez Lck. Przeprowadzone badania wykazały, że w obecności palmitylacji kompleks uścisku cynkowego charakteryzuje się mniejszą stabilnością oraz że palmitylowane CD4 ma tendencję do dimeryzacji w obecności Zn²⁺. Formowanie się kompleksów CD4 i Lck z Zn²⁺ przeprowadzane było w warunkach kontrolowanej dostępności Zn²⁺, to znaczy z zastosowaniem nieorganicznych buforów cynkowych. Podejście takie pozwala na dokładne i rzetelne wyznaczenie stałych stabilnościowych, na przykład logK¹² dla kompleksu uścisku cynkowego wyniósł 18.6. Ponadto w badaniach wykazano, że parametrami wpływającymi na formowanie się dimerycznych kompleksów z udziałem Zn²⁺, są zarówno stężenia Zn²⁺, jak i podjednostek białkowych, co odróżnia kompleksy te od często badanych układów Zn-białko.

W celu osiągnięcia warunków bliższych warunkom komórkowym dla tworzenia zależnego od Zn²⁺ oddziaływania CD4-Lck został zaprojektowany model membrany lipidowej. Wprowadzone zostały do niego znakowane fluorescencyjnie motywy CD4 i Lck pokazując, że asocjacja zachodzi jedynie w obecności Zn²⁺. Do badań wykorzystano technikę FLIM-FRET, pozwalającą na obrazowanie pojedynczych liposomów zawierających jednocześnie oba badane białka. Ponadto, badania nad kompleksowaniem CD4 i Lck z udziałem Zn²⁺ zostały poszerzone o wykorzystanie modelowej linii komórkowej limfocytów T (Jurkat). Początkowo określone zostały zakresy stężenia wewnątrzkomórkowego Zn²⁺_{wolny}, osiągnięte za pomocą różnego traktowania medium hodowlanego. Po wyprowadzeniu linii komórkowej ze stabilną ekspresją znakowanego CD4 (CD4⁺) pokazano, że poziom białka CD4 na błonie komórkowej wzrasta wraz ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Zn²⁺_{wolny}. Następnie linia komórkowa CD4⁺ poddana została przejściowej transfekcji plazmidami kodującymi znakowane fluorescencyjnie Lck w celu obserwacji międzybiałkowego oddziaływania wykorzystując metodę FACS-FRET. Dla określenia wpływu Zn²⁺ na interakcję CD4-Lck linię komórkową transfekowano plazmidami kodującymi wersje mutacyjne Lck, pozbawione reszt cyteinowych wiążących Zn²⁺. Otrzymane wartości FRET dla mutantów Lck były znacząco niższe w porównaniu z typem dzikim Lck oraz, dodatkowo, komórki poddane stymulacji w celu ich aktywacji charakteryzowały się wyższym poziomem wartości FRET w odniesieniu do komórek nie stymulowanych.

W trakcie pracy motyw uścisku cynkowego został poddany optymalizacji w kierunku uzyskania użytecznego biotechnologicznie narzędzia do zależnej od Zn²⁺, odwracalnej i specyficznej, heterodimeryzacji białek. W celu maksymalizacji specyficzności tworzenia kompleksu uścisku cynkowego wybrany został mutant CD4, który charakteryzował się największą stabilnością tworzonego kompleksu z Zn²⁺ i Lck, podczas gdy z udziałem Zn²⁺ tworzył kompleksy o najniższej stabilności. Efektywność kompleksowania monitorowana była technikami sączenia molekularnego oraz z wykorzystaniem spektrofotometrii i fluorymetrii. Użyteczność fragmentu CD4 jako metki do znakowania białek została pokazana na przykładzie natywnej chemicznej ligacji z małym bakteryjnym białkiem. Otrzymane koniugaty CD4 z białkami modelowymi zostały następnie poddane analizie z wykorzystaniem zaprojektowanych i scharakteryzowanych wędek

molekularnych opartych o zimmobilizowane Lck. Wszystkie badane koniugaty wykazywały zależne od Zn^{2+} wiązanie do wędek molekularnych. Ponadto wysoka specyficzność została wykazana przez wyłapywanie znakowanego naprodukowanego białka z lizatu komórkowego *E.coli*. Specyficzność została także określona w kierunku wiązania innych jonów metali (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) przez zoptymalizowany motyw uścisku cynkowego oraz określone zostały stałe kinetyczne reakcji kompleksowania z użyciem techniki interferometrii biowarstwowej. W badaniach wiązania Zn^{2+} do białek oraz przy określaniu stabilności tworzonych kompleksów często stosowanym podejściem jest wykorzystanie metalochromoforów. Dwa z najczęściej stosowanych, tj. PAR i Zincon, zostały dogłębnie scharakteryzowane pod względem współczynników absorpcji molowej i stałych stabilnościowych ich kompleksów z różnymi jonami metali (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , and Mn^{2+}) uwzględniając znaczące braki literaturowe. Uzyskane wyniki pomogły nie tylko rzetelniej scharakteryzować wiązanie się Zn^{2+} do CD4 i Lck, ale także dostarczyły kompleksowy zestaw danych gotowych do wykorzystania przez naukowców z dziedziny chemii analitycznej, analityki środowiskowej oraz biochemii.

Skróty: FLIM, mikroskopia obrazowania czasu życia fluorescencji; FRET, fluorescencyjny rezonansowy transfer energii; FACS, metoda aktywnego sortowania komórek fluorescencją; PAR, 4-(2-pirydylazo)rezorcynol.