

Streszczenie

Cynk (Zn^{2+}) to jeden z najbardziej rozpowszechnionych jonów metali przejściowych w żywych organizmach. Głównym jego zadaniem jest modulowanie funkcji białek komórkowych. Jednak wciąż nie jest pewne czy wysycenie białek jonami Zn^{2+} w komórce jest powiązane z ich biologiczną funkcją. Wiele dowodów wskazuje, że zależny od jonów Zn^{2+} proces fałdowania białek jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na ich stabilność i reaktywność. Najpopularniejszą grupą białek cynkowych są palce cynkowe, małe, kompaktowe domeny cynkowe wyspecjalizowane w oddziaływaniach z innymi makromolekułami. Część z nich oddziałuje z kwasami nukleinowymi (DNA, RNA), inne z białkami a nawet lipidami. Funkcje palców cynkowych są rozmaite, do najważniejszych z nich należy selektywne rozpoznawanie sekwencji DNA, aktywność transkrypcyjna, regulacja apoptozy czy udział w fałdowaniu białek. Najczęściej opisywanym i badanym motywem palca cynkowego jest tzw. motyw klasyczny CCHH występujący najliczniej w ludzkim proteomie cynkowym. Motyw ten posiada ściśle określoną i wysoce konserwowaną sekwencję, w której występują reszty odpowiedzialne za wiązanie jonu Zn^{2+} , tworzenie rdzenia hydrofobowego a także zmienne reszty aminokwasowe, odpowiedzialne za interakcję z DNA oraz reszty o nieznanym dotąd funkcji. W trakcie wiązania jonu Zn^{2+} do motywów palców cynkowych typu CCHH powstaje charakterystyczna trójwymiarowa struktura składająca się z dwóch anty-równoległych β kartek oraz α -helisy zwana jako $\beta\beta\alpha$. Liczne badania wykazały, że obecność jonu Zn^{2+} jest kluczowa dla stabilności struktury $\beta\beta\alpha$ a sztuczne mutacje lub delecje konserwowalnych reszt histydynowych bądź cysteinowych wpływają na wiązanie jonu Zn^{2+} zaburzając tym samym funkcjonowanie wielu białek posiadających domenę palców cynkowych.

Zarówno czynniki strukturalne jak i termodynamiczne wpływają na różnice w powinowactwie tych palców do jonów Zn^{2+} i tym samym powodują ich dywersyfikację przez co w warunkach fluktuacji stężenia wolnego Zn^{2+} w komórce mogą one być częściowo lub całkowicie wysyczone. Wolny cynk komórkowy pełni istotną rolę w sygnalingu komórkowym, a jego właściwy poziom zapewnia prawidłowe funkcjonowanie białek cynkowych. Dlatego też jeżeli pula dostępnego w komórce cynku skorelowana jest ze stałymi powinowactwa motywów palców cynkowych wówczas motywy te są aktywowane i mogą selektywnie oddziaływać z DNA. Dostępne dane literaturowe na temat chemicznej i biofizycznej charakterystyki palców cynkowych i białek ze strukturalnymi miejscami wiązania cynku wyraźnie pokazują, że obecna wiedza na temat energetyki domen palca cynkowego jest wciąż niewystarczająca, aby zrozumieć mechanizm stabilizacji/destabilizacji tych domen i tym samym funkcję danego białka lub jego reaktywność. Celami niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie relacji pomiędzy sekwencją-strukturą a stabilnością w palcach cynkowych, poznanie wpływu jonów srebra na strukturę, geometrię oraz stabilność zmiennych sekwencyjnie palców cynkowych, a także charakterystyka biofizyczna bogatej w reszty cysteinowe domeny pochodzącej z ludzkiego białka MTF1, będącego czynnikiem transkrypcyjnym posiadającym motyw palca cynkowego typu CCHH.

W pierwszej części badań skupiono się na charakterystyce czynników strukturalnych i efektów termodynamicznych przyczyniających się do utraty stabilności w motywach klasycznych palców cynkowych. W tym celu otrzymano dwa modele peptydowe oparte na sekwencji konsensusowej palców cynkowych pierwotnie zdefiniowanej w 1991 (Cp1-1991) roku a później ponownie sprecyzowanej w 2015 (Cp1-2015) roku. Uzyskane wyniki wykazały, że peptydy te, pomimo wysokiej konserwatywności sekwencji, różnią się istotnie pod względem stabilności kompleksów cynkowych. W dalszym toku badań zaobserwowano, że za utratę stabilności odpowiedzialne są aminokwasy z fragmentu tworzącego strukturę α -helisy. Przeprowadzona analiza termodynamiczna wiązania jonów Zn^{2+} do motywów zmiennych sekwencyjnie palców cynkowych wykazała, że tworzenie silnych kompleksów z Zn^{2+} wynika z korzystnej zmiany czynnika entalpowego. Niemniej jednak, w peptydach o obniżonej stabilności zaobserwowano, że konkretne niekonserwowane aminokwasy są odpowiedzialne za utratę stabilności. W tym przypadku proces wiązania Zn^{2+} jest napędzany entropowo i jest związany z czynnikiem entropowym pochodzącym z reorganizacji strukturalnej, zmian w solwatacji i/lub interakcji wewnątrzcząsteczkowych, które różnią się w zależności od typu i położenia aminokwasów.

W kolejnej części pracy przeprowadzono analizę bioinformatyczną z użyciem bazy danych UniProt z wykorzystaniem narzędzia ScanProsite i pokazano, że około 10% sekwencji motywów klasycznych palców cynkowych zdeponowanych w bazie UniProt zawiera naturalne substytucje w obrębie aminokwasów wiążących jony cynku. Analiza otrzymanych sekwencji umożliwiła wybranie 9 sekwencji motywów palców cynkowych z zaburzoną strefą koordynacyjną (XCHH, CXHH, CCXH, CCHX) obecnych w ludzkich oraz mysich czynnikach transkrypcyjnych zidentyfikowanych na poziomie białka, które zostały poddane dalszej charakterystyce stabilnościowej oraz funkcjonalnej. Przeprowadzone badania pokazały, że w przypadku motywów palców cynkowych z zaburzoną strefą koordynacyjną, 4 lub 5 miejsce koordynacyjne mogą zajmować cząsteczki wody. Przeprowadzone pomiary stabilnościowe wyraźnie wskazują, że powinowactwo dla motywów palców cynkowych u których brak jednej reszty cysteinowej, XCHH i CXHH, zostało zmniejszone o około 4–5 rzędów wielkości w porównaniu do motywów klasycznych palców cynkowych dzikiego typu. Warto zwrócić uwagę, że wyliczone stałe dysocjacji dla grupy palców cynkowych zawierających substytucję w obrębie reszt histydynowych pokrywają zakres fluktuacji stężenia wolnego cynku w komórce a przeprowadzona analiza transferu cynku w powszechnie znanym komórkowym układzie buforującym jaki jest tioneina/metalotioneina pokazuje, że w zależności od sekwencji i powinowactwa motywy tych palców cynkowych były całkowicie lub częściowo nasycone Zn^{2+} w obecności metalotioneiny. Wyniki te sugerują potencjalnie regulatorową rolę dla motywów palców cynkowych z zaburzoną strefą koordynacyjną, których stałe powinowactwa pokrywają zakres stężenia wolnego cynku. Otrzymane wyniki są pierwszymi doniesieniami na temat naturalnie występujących motywów palców cynkowych z zaburzoną strefą koordynacyjną, które mogą być funkcjonalne.

Pomimo, że natywnie palce cynkowe wysycone są cynkiem, posiadają również zdolność do wiązania innych metali które mogą akumulować się i konkurować z Zn^{2+} prowadząc do nieodwracalnie toksycznych zmian. Z najnowszych badań środowiskowych wynika, że wzrost zawartości jonów srebra w pyłach wzrasta ze względu na wszechobecne wykorzystanie nanocząstek srebra w wielu produktach codziennego użytku. Ponieważ, jony srebra cechują się wysokim powinowactwem do grup tiolowych a ich wpływ wiązania do motywów białkowych nie został jak dotąd opisany. W dalszym etapie projektu badawczego zbadano czy obecność jonów srebra może mieć wpływ na strukturę, geometrię oraz stabilność motywów palców cynkowych. W tym celu syntezie poddano szereg motywów klasycznych palców cynkowych opierających się na najlepiej jak dotąd poznanej i przebadanej sekwencji konsensusowej palca cynkowego Cp1-2015. Uzyskane wyniki sugerują, że srebro może bezpośrednio zastępować cynk w motywach palców cynkowych (CCHH, CCCH i CCCC), tworząc wysoce stabilne kompleksy Ag_nS_n . Kooperatywne wiązanie srebra do motywów palców cynkowych prowadzi do termodynamicznie nieodwracalnego tworzenia się klastrów srebrowych zaburzając tym samym natywną i wysoce uporządkowaną strukturę palców cynkowych. Aby zbadać właściwości strukturalne klastrów srebrowych, zastosowano rentgenowską spektroskopię absorpcyjną (*ang.* X-ray Absorption Spectroscopy – XAS), która wykazała, że każdy jon srebra związany jest do dwóch donorów siarkowych, ze średnią odległością Ag–S wynoszącą około 2.41 Å. Wyniki tych badań są pierwszymi doniesieniami strukturalnymi na temat kompleksów palców cynkowych z jonami srebra i stanowią solidną podstawę dla zrozumienia molekularnych podstaw toksyczności srebra.

Ostatni etap rozprawy doktorskiej poświęcono charakterystyce biofizycznej bogatego w reszty cysteinowe fragmentu wywodzącego się z ludzkiego czynnika transkrypcyjnego 1 zależnego od jonów cynku (MTF1). Białko MTF1 pośrednio uczestniczy w regulacji jonów cynku w komórce poprzez metalo-zależną regulację biosyntezy wielu białek cynkowych biorących udział w homeostazie Zn^{2+} w komórce. Białko MTF1 posiada na C-końcu unikalny motyw bogaty w reszty cysteinowe, zwany klastrem cysteinowym. Motyw ten jest wysoce konserwowany u wyższych eukariontów, co może sugerować o jego wyspecjalizowanej roli w trakcie aktywacji białka MTF1. Uzyskane wyniki bazujące na krótszym i dłuższym fragmencie klastra cysteinowego pokazują, że motyw ten jest zdolny do wiązania jonów Zn^{2+} z powinowactwem zbliżonym do motywów palców cynkowych, pokrywającym zakres fluktuacji stężenia wolnego Zn^{2+} w komórce. W trakcie dalszej charakterystyki pokazano, że klaster cysteinowy podczas wiązania Zn^{2+} tworzy dimer, którego obecność jest ściśle związana z dostępnością wolnego Zn^{2+} w układzie. Tym samym, przy pikomolowym stężeniu wolnego Zn^{2+} jedynie niezwiązana z Zn^{2+} forma monomeryczna jest obecna, natomiast przy zwiększaniu stężenia wolnego Zn^{2+} do nanomolowego, a następnie mikromolowego stężenia, powstaje dimeryczny kompleks cynkowy (prawdopodobnie z centrum dwujądrowym). Przeprowadzone badania sugerują, że klaster cysteinowy może brać udział w aktywacji ludzkiego białka MTF1 i jego translokacji do jądra komórkowego.