

Tomasz Kochańczyk

## **Charakterystyka biofizyczna i funkcjonalna domeny haczyka cynkowego białka Rad50 i jego homologów**

### **Streszczenie**

Ogromna różnorodność strukturalna i funkcjonalna białek warunkowana jest obecnością licznych kofaktorów. Spośród kofaktorów nieorganicznych, jony metali przejściowych odgrywają szczególną rolę w białkach. Cynk (formalnie w postaci jonu Zn(II)), stanowi jeden z najbardziej rozpowszechnionych jonów metali przejściowych w biologii i jest wykorzystywany przez białka do pełnienia zróżnicowanych funkcji biologicznych. W większości poznanych białkowych domen wiążących jony Zn(II), takich jak palce cynkowe czy domeny o aktywności katalitycznej, jon Zn(II) koordynowany jest przez ligandy pochodzące od pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Odmienna architektura cechuje dimer białka Rad50, gdzie Zn(II) jest wiązany międzycząsteczkowo, przez ligandy pochodzące od dwóch podjednostek białkowych. W dimerze Rad50, dwie pary cystein konserwowanego motywu CXXC obu podjednostek koordynują pojedynczy jon Zn(II) tworząc charakterystyczny międzycząsteczkowy kompleks nazwany haczykiem cynkowym. Białko Rad50 tworzy długie wrzecionowate struktury zawierające domeny haczyka cynkowego i globularną, które połączone są długą antyrównoległą superhelisą na dystansie ~500 Å. Homologi białka Rad50 odznaczające się wysokim stopniem ewolucyjnej konserwacji domeny haczyka cynkowego zostały zidentyfikowane u przedstawicieli wszystkich królestw świata organizmów żywych – od bakterii po ssaki, także wśród wirusów. Tworzenie kompleksu haczyka cynkowego jest niezbędne do asocjacji kompleksu Mre11–Rad50–Nbs1, który odgrywa kluczową rolę w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA, poprzez wykrywanie i naprawę dwuniciowych pęknięć DNA. Celami niniejszej pracy doktorskiej było poznanie czynników wpływających na powstawanie i stabilność kompleksów haczyka cynkowego, zastosowanie zoptymalizowanej domeny haczyka cynkowego w roli narzędzia pozwalającego na odwracalną, zależną od jonów Zn(II) dimeryzację białek oraz zrozumienie funkcjonalnej roli domeny haczyka cynkowego.

W pierwszej części przedstawionych badań skupiono się na charakterystyce czynników strukturalnych i efektów termodynamicznych wpływających na powstawanie i stabilność kompleksów cynkowych tworzonych przez domenę haczyka cynkowego

z *P. furiosus*. W celu przeprowadzenia analizy wpływu elementów strukturalnych na stabilność kompleksów haczyka, otrzymano szereg peptydów o długościach od 4 do 45 reszt aminokwasowych, poczynając od motywu CPVC wiążącego Zn(II), po do domenę o pełnej długości. Ponadto otrzymano szereg wariantów zawierających mutacje wybranych reszt na reszty alaninowe oraz substytucję wiązania peptydowego wiązaniem estrowym. Następnie, przeprowadzono badania z wykorzystaniem technik spektroskopowych, potencjometrycznych i kalorymetrycznych w celu określenia stałych trwałości kompleksów peptydów z Zn(II) oraz ich struktury, zbadania właściwości kwasowo-zasadowych peptydów i ich kompleksów, oraz zbadania parametrów termodynamicznych reakcji tworzenia kompleksów z Zn(II). Przeprowadzona analiza wykazała, że domena haczyka cynkowego charakteryzuje się bardzo wysoką stabilnością tworzonego kompleksu haczykowego ( $\log K_{12} = 20,74$ ) oraz charakteryzuje się zachodzeniem głębokich zmian konformacyjnych w wyniku tworzenia kompleksu. Ponad 650 000 krotnie wyższa stabilność oddziaływania tworzonego przez domenę o pełnej długości, w stosunku do minimalnego fragmentu domeny zdolnego utworzyć kompleks haczyka, wynika z korzystnej zmiany czynnika entalpowego reakcji tworzenia kompleksu. Korzystna zmiana entalpii wynika z efektu obniżenia entalpowego kosztu deprotonacji cysteiny, który obserwowany jest w obrębie fragmentu tworzącego spinkę  $\beta$  oraz z korzystnej entalpii wynikającej z tworzenia oddziaływań w obrębie struktury spinki  $\beta$  i fragmentu superhelikalnego, które są tworzone podczas tworzenia kompleksu. Efekt zwiększenia korzystnej zmiany entalpii obserwowany wraz ze wzrostem długości peptydu jest częściowo kompensowany przez niekorzystną energetycznie zmianę entropii, wynikającej ze strukturyzowania domeny. Przedstawione dane pokazują, że tworzenie oddziaływań hydrofobowych i spinki  $\beta$  są kluczowe dla procesu strukturyzacji domeny pod wpływem Zn(II) i tworzenia kompleksu o wysokiej stabilności. W kolejnej części pracy wykorzystano wysoką stabilność kompleksów domeny haczyka cynkowego do zastosowania jej w roli niewielkiej etykiety powinowactwa pozwalającej na stabilną i odwracalną homodimeryzację białek. Analiza zależności sekwencji i stabilności w domenie haczyka z *P. furiosus* posłużyła do zaprojektowania na jej bazie białkowej etykiety powinowactwa, bazującej na miniaturowym centralnym fragmencie domeny o długości 14 reszt aminokwasowych, który dodatkowo zawierał mutację R449A podnoszącą stabilność tworzonych kompleksów. Sekwencja ta została dołączona do końców C białek cyjanowej i żółtej fluorescencji a uzyskane białka fuzyjne zostały oczyszczone i przebadane przy wykorzystaniu pomiarów zjawiska FRET i dynamicznego rozpraszania światła. Przeprowadzone badania dimeryzacji pokazały, że uzyskane białka fuzyjne tworzą stabilne

dimery ( $\log K_{12} = 19,2$ ) w sposób zależny od jonów Zn(II), co potwierdza przydatność zastosowanego motywu w roli systemu umożliwiającego efektywną i odwracalną indukowaną jonami Zn(II) dimeryzację białek.

Ostatnim celem przeprowadzonych badań było poznanie funkcjonalnej roli tworzenia kompleksu haczyka cynkowego poprzez scharakteryzowanie efektów mutacji w domenie haczyka cynkowego białka Rad50 z *S. cerevisiae*. Badane mutanty, oznaczone jako *rad50-46*, *rad50-47* i *rad50-48* zostały zidentyfikowane w badaniach *in vivo* przeprowadzonych przez współpracowników i cechowały się upośledzeniem w różnym stopniu funkcji wykrywania i naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Poprzez scharakteryzowanie modelowych peptydów przy zastosowaniu dichroizmu kołowego, pomiaru denaturacji termicznej i metod spektroskopowych, udało się ustalić, że badane mutanty cechują się upośledzeniem tworzenia międzycząsteczkowego kompleksu haczyka cynkowego z Zn(II) i znacznym zmniejszeniem zakresu zmian strukturalnych w domenie pod wpływem wiązania jonów Zn(II). Wyniki tej analizy, wraz z wynikami badań *in vivo* sugerują translację efektów strukturalnych w domenie haczyka na domenę superhelikalną i oddaloną o 500 Å domenę globularną białka Rad50. Aby dokładniej zbadać ten aspekt, przeprowadzono badania wewnątrzgenowych mutacji supresorowych w obrębie domeny haczyka, znalezionych przez współpracowników dla mutantu *rad50-46* (L703F, K700Q, I680V). Aby poznać mechanizm obserwowanej supresji opracowano metodę otrzymywania wyznakowanych fluorescencyjnie fragmentów białka Rad50 o długości 130 reszt aminokwasowych, obejmujących zarówno domenę haczyka jak i fragmenty rejonu superhelikalnego. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem tych modeli ukazują, że mutacje supresorowe nie powodują odtworzenia tendencji do wiązania Zn(II), jednak powodują zmianę konformacji domeny superhelikalnej. Dodatkowo, zbadano wpływ mutacji supresorowych znalezionych dla mutantu *rad50-46*, który charakteryzuje się upośledzeniem funkcji wykrywania i naprawy dwuniciowych pęknięć DNA na mutantu *rad50-48*, który charakteryzuje się jedynie upośledzeniem funkcji wykrywania dwuniciowych pęknięć DNA. Przeprowadzone badania pokazują, że mutacje supresorowe L703F, K700Q, I680V powodowały również supresję allelu *rad50-48*. Uzyskane dane uwidaczniają kluczowy wpływ stabilności kompleksu haczyka cynkowego i konformacji domeny superhelikalnej na funkcje Rad50 w roli sensora dwuniciowych pęknięć DNA.