

mgr Agnieszka Drozd

## Streszczenie

Tytuł pracy: Charakterystyka stabilności i reaktywności ludzkich metalotionein w kontekście komórkowej homeostazy jonów Zn(II)

Ludzkie metalotioneiny są niskocząsteczkowymi białkami występującymi głównie w cytoplazmie. Dzięki wysokiej zawartości reszt cysteinowych w swojej sekwencji aminokwasowej, posiadają one zdolność do wiązania jonów metali o charakterze miękkim i pośrednim według teorii HSAB. Pierwsza część badań przeprowadzona w niniejszej pracy doktorskiej dotyczyła zbadania biofizycznych różnic pomiędzy dziesięcioma homologami metalotionein: MT1a, MT1b, MT1e, MT1f, MT1g, MT1h, MT1x, MT2a, MT3 i MT4. Szczególną uwagę poświęcono badaniom siedmiu białek MT1, które do tej pory nie zostały scharakteryzowane w kontekście komórkowej homeostazy jonów Zn(II). W tym celu metalotioneiny nadprodukowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i oczyszczono. Następnie białka scharakteryzowano pod względem stechiometrii wiązania jonów Zn(II), stabilności oraz reaktywności. Dalsze badania prowadzono nad reaktywnością i stabilnością tych białek monitorując wymianę jonów Zn(II) między metalotioneinami i innymi białkami i peptydami wiążącymi Zn(II). Potwierdzono występowanie słabo związanego jonu Zn(II) we wszystkich izoformach metalotionein. Ponadto stwierdzono, że pomiędzy poszczególnymi izoformami metalotionein występują stabilnościowe różnice w wiązaniu i donorowaniu jonów Zn(II). Stabilność izoform maleje wraz ze wzrostem ich reaktywności do donorowania jonów Zn(II). Szczególną rolę w buforowaniu jonów Zn(II) i utrzymywaniu homeostazy jonów Zn(II) odgrywają częściowo nasycone formy metalotionein, takie jak Zn<sub>6</sub>MT, Zn<sub>5</sub>MT i Zn<sub>4</sub>MT. W drugiej części tej pracy doktorskiej przeprowadzono mapowanie reszt cysteinowych wiążących każdy z siedmiu molowych równoważników jonów Zn(II). W tym celu zastosowano chemiczną modyfikację reszt cysteinowych za pomocą jodoacetamidu, a następnie trawiono zmodyfikowane białko trypsyną. Powstałe hydrolytyczne fragmenty (peptydy tryptyczne) rozdzielono i zidentyfikowano metodą LCMS. Na podstawie zebranych danych prześledzono ścieżkę asocjacji jonów Zn(II) do białka MT2a i zaproponowano model asocjacji pokazując tym samym potencjalne struktury metalotionein o różnym stopniu nasycenia jonami Zn(II). Wykazano również, że cysteina 21, jako jedyna ulega modyfikacji podczas wiązania sześciu molowych równoważników

jonów Zn(II) przez białko MT2a. Ten sam wniosek wyciągnięto w wyniku dysocjacji jednego jonu Zn(II) z MT2a z użyciem apo-formy cynkowego enzymu - dehydrogenazy sorbitolowej. Tym samym, dwukrotnie potwierdzono, w procesie asocjacji i dysocjacji białka MT2a, że cysteina 21 stanowi kotwiczący donor w wiązaniu najsłabszego jonu Zn(II) w białku MT2a i tworzy słabe miejsce wiązania Zn(II). Miejsce to nazywane jest regulatorowym, ponieważ jest najbardziej reaktywne. Siódmy jon Zn(II), określany również, jako luźno związany, jako pierwszy podlega wymianie pomiędzy metalotioneinami a białkami efektorowymi. Słabe miejsce wiązania białka MT2a i jego rola w akceptorowo-donorowych właściwościach metalotionein jest szeroko dyskutowana w niniejszej pracy. Osobne badania prowadzono na syntetycznych fragmentach odpowiadających  $\beta$ - i  $\alpha$ -domenie białka MT2a. Pokazano, że jony Zn(II) w izolowanych domenach wiążą się z mniej rozróżnialnym powinowactwem i brak jest w nich słabego miejsca wiązania. Stwierdzono, że wbrew panującej opinii, pojedyncze  $\beta$ - i  $\alpha$ - domeny nie są dobrym modelem do badań całego białka MT2a.

Słowa kluczowe:

metalotioneina, izoformy, białka cynkowe, jony cynku, jony kadmu, buforowanie jonów cynku, homeostaza cynku, transfer jonów metali