

Streszczenie

Życie to kontinuum samopodtrzymującej się informacji – informacji w postaci kodu genetycznego zapisanego w cząsteczkach DNA. Utrzymanie informacji w stanie nienaruszonym i pozwalającym na jej bezpieczne przekazanie kolejnym pokoleniom to podstawowy cel istnienia wszystkich indywiduów materii ożywionej. Aby sprostać temu wyzwaniu organizmy rozwinęły skomplikowane mechanizmy obrony przed uszkodzeniami DNA oraz sposoby naprawy kwasów nukleinowych, które każdego dnia narażone są na destrukcyjne siły egzogenne, takie jak promieniowanie słoneczne, oraz zaprogramowane procesy przerywające nić DNA, np. procesy rekombinacji podczas podziałów mejotycznych. Najgroźniejsze uszkodzenia to podwójne pęknięcia nici DNA (z j. ang. *double-stranded DNA breaks* – DSB), które mogą doprowadzić do poważnych uszkodzeń genomu i w efekcie do śmierci komórki. Za rozpoznawanie i naprawę tych pęknięć odpowiada kompleks MRN/X, który, w postaci heterotetrameru (Mre11₂Rad50₂) bądź heteroheksameru (Mre11₂Rad50₂Nbs1₂Xrs2₂ (Xrs2 – homolog Nbs1 w *S. cerevisiae*)) znajduje się we wszystkich organizmach żywych, niezależnie od domeny życia, do której przynależą. Białko Rad50, należące do rodziny białek organizacji strukturalnej chromosomów (z j. ang. *structural maintenance of chromosomes* – SMC), stanowi rdzeń strukturalny kompleksu MRN/X. Jego unikatowa, dwubiegunowa budowa, w postaci globularnego biegunu ATP-azowego, odpowiedzialnego za wiązanie DNA, oraz rozdzielonego długim segmentem superhelikalnym biegunu haczykowego, odpowiedzialnego za dimeryzację kompleksu, umożliwia łączenie dwóch pękniętych cząsteczek DNA ze sobą na przestrzeni nawet 1200 Å. Aby naprawić pęknięcia DSB, cząsteczki muszą znaleźć się w odpowiednio bliskiej odległości, która umożliwi rozpoczęcie odbudowy podwójnej helisy z wykorzystaniem jednej z dwóch głównych ścieżek naprawy DSB – precyzyjnej naprawy w postaci homologicznej rekombinacji, bazującej na matrycy w postaci chromatydy siostrzanej, oraz mniej dokładnej, lecz szybkiej naprawy w postaci niehomologicznego łączenia końców. Dwie zróżnicowane ścieżki naprawy DNA wymuszają na kompleksie MRN/X wysoki stopień strukturalnej i funkcjonalnej elastyczności, gwarantującej odpowiednie dopasowanie i gotowość do optymalnego procesowania i łączenia przerwanych nici DNA. Dwubiegunowość białka Rad50 przejawia się również w procesach regulacji relacji struktury i funkcji kompleksu MRN/X – zarówno biegun globularny jak i haczykowy odpowiada za funkcjonowanie kompleksu, a zmiany allosteryczne na jednym z nich mogą oddziaływać na drugi.

Domena haczyka cynkowego (Hk) jest przykładem międzybiałkowego miejsca wiązania Zn(II). Dwa protomery Rad50 dostarczają dwa, silnie konserwowane ewolucyjnie, motywy dwucysteinowe CXXC, które współwiążą jon Zn(II) w geometrii tetraedrycznej. Utworzenie kompleksu Zn(Hk)₂, wespół z oddziaływaniem części globularnych, utrzymuje całość kompleksu

MRN/X w konformacji dimerycznej. Chociaż stabilność kompleksu z Zn(II) jest ekstremalnie wysoka (jest to kompleks biomolekuły z Zn(II) o najwyższej zarejestrowanej do tej pory stałej trwałości), sąsiadujący z domeną haczyka cynkowego długi segment superhelikalny białka utrudnia dokładną analizę biofizyczną opisywanego biegunu Rad50. Pierwsza, i przez kilkanaście lat jedyna, struktura krystaliczna domeny haczyka cynkowego ukazywała centralny fragment białka Rad50 z organizmu hipertermofilnego archeowca *P. furiosus*. Symetryczna, otwarta struktura dimeru nie wyjaśniała jednakże wszystkich aranżacji kompleksu obserwowanych w badaniach mikroskopii sił atomowych i mikroskopii elektronowej. Dodatkowo, różnice w sekwencji aminokwasowej bezpośrednio sąsiadującej z resztami wiążącymi Zn(II), jak również w dalszych obszarach segmentu superhelikalnego, pomiędzy białkami Rad50 z różnych organizmów sugerują, że struktury domeny haczykowej mogą prezentować się zgoła odmiennie w organizmach przedstawicieli różnych domen życia. Na szczególną uwagę zasługuje dodatkowa reszta Cys, zlokalizowana po aminowej stronie pierwszej reszty Cys motywu wiążącego (CCXXC) w sekwencjach Rad50 większości organizmów eukariotycznych, która, potencjalnie, może brać udział w koordynacji Zn(II) i wpływać na strukturę sfery koordynacyjnej.

Niniejsza dysertacja opisuje badania domen haczyka cynkowego białek Rad50 pochodzących z trzech organizmów - *H. sapiens*, *S. cerevisiae* oraz *P. furiosus* – których celem było dostarczenie nowych danych biofizycznych, rzucających światło na następujące zagadnienia: **i)** jak wygląda struktura domeny haczyka cynkowego w białkach organizmów eukariotycznych, **ii)** jaka jest rola trzeciej reszty Cys w obrębie motywu wiążącego Zn(II), **iii)** w jaki sposób domena haczyka cynkowego może przekazywać sygnały allosteryczne do części globularnej kompleksu MRN/X (i w drugim kierunku) oraz **iv)** czy jon Zn(II) w kompleksie haczyka może być podstawiony przez toksyczny jon Cd(II) - co tłumaczyłoby potencjał genotoksyczny tego jonu.

Pierwsza część tezy opisuje badania strukturalne domeny haczyka cynkowego ludzkiego białka Rad50. Współpraca z grupą prof. Yunje Cho, która zaowocowała rozwiązaniem struktury krystalicznej domeny, pozwoliła ukazać nową aranżację protomerów Rad50 w dimerze haczyka cynkowego – konformację zamkniętą, w układzie walca. Układ zamknięty utrzymywany jest poprzez dodatkowe miejsca oddziaływania pomiędzy protomerami – interfejs hydrofobowy i elektrostatyczny. Badania *in vitro* z wykorzystaniem spektrofлуorymetrycznej analizy hetero-FRET potwierdziły analizy *in vivo* wykonane na komórkach *S. cerevisiae* i wspólnie wykazały, że nowe miejsca oddziaływania odkryte w ludzkiej domenie haczykowej odpowiadają za utrzymanie konformacji zamkniętego dimeru. Co więcej, przeprowadzone badania z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych wariantów mutacyjnych domeny haczyka cynkowego dowiodły, że nowy interfejs elektrostatyczny i interfejs koordynacyjny – motyw wiążący Zn(II) – są od siebie zależne i współpracują przy regulacji funkcjonalnej kompleksu MRN/X.

W drugiej części tezy zaprezentowano wyniki badań domeny haczyka cynkowego Rad50 z organizmu *S. cerevisiae*. Obszerna analiza biofizyczna domeny, przeprowadzona na fragmentach domeny o długości od 5 do 196 reszt aminokwasowych, wykazała, że struktura drożdżowego haczyka cynkowego prezentuje konformację rozwartego dimeru, w przeciwieństwie do struktury ludzkiego homologu, i jest bardziej zbliżona do klasycznej struktury białka z organizmu *P. furiosus*. Dodatkowo, zarejestrowano znaczne zmiany strukturalne domeny pod wpływem wzrastającego stężenia jonów Zn(II). Szczegółowa analiza tego procesu z wykorzystaniem precyzyjnego buforowania jonów Zn(II) wykazała, że drożdżowy haczyk cynkowy wiąże dwa jony Zn(II) z istotnie odmiennym powinowactwem, a wiązanie każdego z nich niesie za sobą globalne zmiany w strukturze łańcucha peptydowego. Dzięki badaniom zmutowanego wariantu domeny haczykowej w postaci mutantu pozbawionego dodatkowej reszty Cys, którą zastąpiono resztą Gly (C686G), dowiedziono, że dodatkowa reszta odpowiada za opisaną dynamikę strukturalną domeny haczyka, która poprzez dostarczenie dodatkowego donora S⁻ umożliwia dokoordynowanie drugiego jonu Zn(II) w mononuklearnym kompleksie haczyka Zn(Hk)₂ i uformowanie binuklearnego centrum Zn₂S₆, tym samym generując kompleks Zn₂(Hk)₂. Transformacja formy mononuklearnej do formy binuklearnej domeny haczyka cynkowego wiąże się z nożycowym ruchem regionów superhelikalnych protomerów Rad50 – z formy otwartej do formy zamkniętej – i sugeruje możliwość zależnej od Zn(II) regulacji struktury i funkcji całego kompleksu MRX w komórkach drożdży.

Trzecia, i ostatnia, część tezy dotyczy oddziaływania toksycznego jonu Cd(II) na domenę haczyka cynkowego białka Rad50. Cd(II), poza szeregiem silnie toksycznych efektów jakie wywołuje w narażonych nań komórkach, jest karcynogenem i jonem o potencjale genotoksycznym, którego mechanizm nie został poznany. Z uwagi na wysokie powinowactwo ligandów z donorami siarkowymi względem Cd(II), wydajnie wypiera Zn(II) z białek cynkowych angażujących reszty Cys w miejscach wiązania jonu metalu, w efekcie generując toksyczny nadmiar wolnych jonów Zn(II) w komórce i zaburzając homeostazę proteomu cynkowego. Z uwagi na czterocysteinowe miejsce wiązania Zn(II) oraz fundamentalne znaczenie dla procesów naprawy DNA, białko Rad50 jest potencjalnym celem dla toksycznego jonu Cd(II), a wymiana Zn(II)/Cd(II) w domenie haczyka cynkowego może być odpowiedzialna za efekty genotoksyczne wywołane tym jonem. Przeprowadzona analiza wymiany Zn(II)/Cd(II) w domenie haczyka cynkowego białka Rad50 z *P. furiosus* wykazała, że wymiana jonów zachodzi szybko i wydajnie, nawet w obecności metalotionein - białek magazynujących Zn(II) w komórkach o wysokim powinowactwie do Cd(II), a kompleks zachowuje swoją stechiometrię ($\text{Zn(Hk)}_2 + \text{Cd(II)} \rightleftharpoons \text{Cd(Hk)}_2 + \text{Zn(II)}$). Badania termodynamiki procesu wymiany udowodniły, że główną siłą napędową procesu wymiany jest korzystna zmiana entalpii tworzenia wiązania Cd—S, która jest aż o 2,6 kcal/mol niższa (bardziej korzystna termodynamicznie) od entalpii tworzenia wiązania Zn—S. Powstający kompleks Cd(Hk)₂ jest

najbardziej stabilnym kompleksem jonu Cd(II) z cząsteczką biologiczną opisanym w literaturze ($-\log K_d = 22,7$), a jego struktura jest istotnie odmienna w porównaniu z kompleksem z jonem Zn(II), co udokumentowano analizą strukturalną jądrowego rezonansu magnetycznego. Wyniki uzyskane w toku pracy badawczej sugerują, że wymiana Zn(II)/Cd(II) w domenie haczyka cynkowego może zachodzić w warunkach komórkowych, co może skutkować upośledzeniem funkcji Rad50, a w efekcie osłabieniem mechanizmów naprawy DSB wywołując efekt genotoksyczny.