

Wpływ zmienności sekwencyjnej w motywach palców cynkowych na ich właściwości koordynacyjne, strukturę oraz stabilność

Streszczenie

Cynk (Zn^{2+}) to jeden z najbardziej rozpowszechnionych pierwiastków śladowych będący drugim najliczniej występującym metalem w organizmach żywych. Jest wykorzystywany przez białka do pełnienia zróżnicowanych funkcji biologicznych. Jako pierwiastek śladowy wchodzi w skład wielu białek, będąc kofaktorem ponad 300 enzymów, w tym dehydrogenazy mleczanowej, fosfatazy zasadowej anhidrazy węglanowej, dysmutazy ponadtlenkowej i dehydrogenazy alkoholowej. Bierze on udział w tworzeniu motywu palca cynkowego (ZF, ang. *zinc finger motif*), który występuje w czynnikach transkrypcyjnych.

Głównymi wewnątrzkomórkowymi białkami wiążącymi Zn^{2+} są metalotioneiny, które pełnią istotną funkcję w magazynowaniu, dystrybucji i uwalnianiu Zn^{2+} w przestrzeniach komórkowych. Rodzina tych białek stanowi główny składnik komórkowego buforu cynkowego i jest zdolna do asocjacji/dysocjacji aż do siedmiu Zn^{2+} na cząsteczkę białka z różnym powinowactwem. W rezultacie komórka dysponuje pulą „wolnego” Zn^{2+} , która oznacza stężenie Zn^{2+} dostępne do związania dla innych białek. Liczne badania *in vitro* wykazały, że buforowanie Zn^{2+} w układach biologicznych wpływa na aktywność wielu białek zależnych od cynku i tym samym może nadawać i modulować funkcję tychże białek.

Jon cynku, jako pośredni kwas, tworzy liczne kompleksy zarówno z ligandami nieorganicznymi, np.: woda czy jony cyjankowe, jak i ligandami organicznymi pochodzącymi z reszt bocznych aminokwasów tj.: atom siarki reszt cysteinyłowych, atom azotu reszt histydynyłowych oraz aniony karboksylowe pochodzące z reszt aspartyłowych i glutaminyłowych. Najczęściej w białkowych motywach wiążących Zn^{2+} spotyka się kompleksy wykazujące symetrię tetraedryczną o liczbie koordynacyjnej 4 lub kompleksy o liczbie koordynacyjnej 5 i 6. W białkach nie znaleziono sfery koordynacji Zn^{2+} o liczbie koordynacyjnej większej niż 6. W zależności od funkcji miejsc wiążących cynk w białku można je podzielić na miejsca katalityczne, strukturalne, klastrowe, translokujące oraz międzycząsteczkowe.

Miejsca charakteryzujące się wysoką stałą powinowactwa to miejsca strukturalne, które najczęściej stabilizują strukturę domen białkowych, zapewniając stabilność kinetyczną układu. Jak dotąd, najlepiej poznanymi miejscami strukturalnymi w białkach są palce cynkowe, małe, kompaktowe domeny cynkowe wyspecjalizowane w oddziaływaniach z innymi makromolekułami. W zależności od rodzaju ligandów koordynujących jon cynku oraz struktury przyjętej po związaniu Zn^{2+} wyróżnia się wiele klas i rodzajów palców cynkowych. Większość z nich oddziałuje z kwasami nukleinowymi (DNA, RNA), innymi białkami, a niektóre nawet z lipidami. Ich funkcje są zróżnicowane, jednak najważniejsze to swoiste rozpoznanie DNA,

aktywność transkrypcyjna, regulacja apoptozy i udział w fałdowaniu białek. W ludzkim proteomie cynkowym najczęściej występującym, a zatem często opisywanym i badanym motywem palca cynkowego jest tzw. motyw klasyczny inaczej zwany jako Cys₂His₂ (CCHH). Motyw ten posiada dobrze zdefiniowaną i wysoce zachowaną sekwencję, zawierającą konserwowane reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie jonów Zn²⁺ i tworzenie rdzenia hydrofobowego, a także zmienne reszty aminokwasowe odpowiedzialne za interakcję z DNA oraz reszty o nieznannej dotąd funkcji. W trakcie wiązania jonu Zn²⁺ do motywów palców cynkowych typu CCHH powstaje charakterystyczna trójwymiarowa struktura składająca się z dwóch anty-równoległych β kartek oraz α-helisy zwana jako ββα. Liczne badania wykazały, że obecność jonu Zn²⁺ jest kluczowa dla stabilności struktury ββα, a sztuczne substytucje lub delecje konserwowanych reszt histydynylowych, bądź cysteinyłowych wpływają na wiązanie Zn²⁺. Zmiany w geometrii wiązania Zn²⁺ do motywów palców cynkowych typu CCHH wpływają na zmiany w ich drugorzędowej strukturze, tym samym prowadzą do zaburzenia funkcji biologicznych wielu białek posiadających domeny palców cynkowych.

Zarówno czynniki strukturalne jak i termodynamiczne wpływają na różnice w powinowactwie palców cynkowych do jonów Zn²⁺ i tym samym powodują ich dywersyfikację, przez co w warunkach zmiennego stężenia wolnego Zn²⁺ w komórce mogą one być częściowo lub całkowicie wysyczone metalem. Odpowiedni poziom wolnego Zn²⁺ komórkowego zapewnia prawidłowe funkcjonowanie białek cynkowych. Jeżeli stężenie dostępnego w komórce cynku skorelowane jest ze stałymi dysocjacji kompleksów motywów palców cynkowych z Zn²⁺, wówczas motywy te są aktywowane i mogą selektywnie oddziaływać z DNA. Dostępne dane literaturowe na temat fizykochemicznej charakterystyki palców cynkowych i białek ze strukturalnymi miejscami wiązania cynku są wciąż niewystarczające, aby zrozumieć mechanizm stabilizacji/destabilizacji tych domen i tym samym funkcję danego białka.

Założone cele niniejszej pracy doktorskiej obejmowały: zbadanie relacji pomiędzy sekwencją, strukturą a stabilnością w palcach cynkowych, poznanie wpływu jonów Ag⁺ na strukturę, geometrię oraz stabilność zmiennych sekwencyjnie palców cynkowych, a także charakterystykę fizykochemiczną i strukturalną bogatej w reszty cysteinyłowe 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 ββα. W tym celu zastosowano dwa modele peptydowe oparte na sekwencji konsensowej palców cynkowych pierwotnie zdefiniowanej w roku 1991 (Cp1-1991), a później doprecyzowanej w 2015 (Cp1-2015). Uzyskane wyniki wykazały, że peptydy te, pomimo wysoce zachowanej sekwencji, różnią się istotnie pod względem stabilności kompleksów cynkowych. W dalszym toku badań zaobserwowano, że utrata wiązań

wodorowych powstałych pomiędzy zmiennymi resztami aminokwasowymi pochodzącymi z fragmentu α -helisy a konserwowanymi resztami hydrofobowymi prowadzi do spadku stabilności kompleksów cynkowych. 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 zmienne aminokwasy zaangażowane są w wiązania wodorowe, a utrata tych wiązań obniża stabilność termodynamiczną tworzonych kompleksów. W tym przypadku proces wiązania Zn^{2+} jest napędzany entropowo i 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 dowiedziono, że około 10% sekwencji motywów klasycznych palców cynkowych zdeponowanych w bazie UniProt zawiera naturalne substytucje w obrębie reszt aminokwasów wiążących Zn^{2+} . W trakcie analizy otrzymanych sekwencji wybrano 9 sekwencji motywów palców cynkowych z zaburzoną sferą koordynacyjną – XCHH, CXHH, CCXH, CCHX (X oznacza inne niż Cys i His reszty aminokwasowe) – 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 sferą koordynacyjną, czwarte lub piąte miejsce koordynacyjne mogą zajmować cząsteczki wody. Uzyskane pomiary stabilnościowe wyraźnie wskazują, że powinowactwo dla motywów palców cynkowych, u których brak jednej reszty cysteinyłowej, XCHH i CXHH, zostało zmniejszone o około 4–5 rzędów wielkości w porównaniu do motywów klasycznych palców cynkowych dzikiego typu. Ponadto badania spektroskopowe tychże palców pokazują, że tworzą one kompleksy ZnL (gdzie L oznacza cząsteczkę palca cynkowego) poprzez wiązanie metalu do mieszanych donorów {SNNOO}, potwierdzając tym samym obecność dwóch cząsteczek wody w sferze koordynacyjnej metalu. Z drugiej strony, dane spektroskopowe uzyskane dla grupy palców cynkowych zawierających substytucję w obrębie reszt histydynyłowych (CCXH i CCHX) pokazują, że palce te mogą tworzyć kompleksy ZnL_2 (CCXH) i ZnL (CCHX). W przypadku palców cynkowych tworzących kompleksy ZnL_2 jon metalu wiązany jest do donorów siarkowych {SSSS}. Natomiast dla palców cynkowych tworzących kompleksy ZnL metal wiąże się do mieszanych donorów {SNNO} sugerując obecność cząsteczki wody w sferze koordynacyjnej. Warto zwrócić uwagę, że wyliczone stałe dysocjacji dla grupy palców cynkowych zawierających substytucję w obrębie reszt histydynyłowych pokrywają się z zakresem fluktuacji stężenia wolnego Zn^{2+} w komórce. Przeprowadzona analiza transferu Zn^{2+} w powszechnie znanym komórkowym układzie buforującym, jakim jest tioneina/metalotioneina, pokazuje, że w zależności od sekwencji i powinowactwa motywy tych palców cynkowych były nasycone lub nienasycone Zn^{2+} w obecności metalotioneiny. Wyniki te sugerują regulatorową rolę dla motywów palców cynkowych z zaburzoną sferą koordynacyjną, których stałe dysocjacji

pokrywają zakres stężenia wolnego Zn^{2+} . Otrzymane wyniki są pierwszymi opisanymi w literaturze informacjami na temat naturalnie występujących motywów palców cynkowych z zaburzoną sferą koordynacyjną, które mogą być funkcjonalne.

Pomimo że natywnie palce cynkowe wysyczone są jonami Zn^{2+} , posiadają również zdolność do wiązania innych metali, które po dostaniu się do komórki, mogą konkurować z Zn^{2+} , prowadząc do reorganizacji strukturalnej motywów palców cynkowych, wynikającej ze zmiany geometrii metalu w miejscu wiążącym. W konsekwencji reorganizacja strukturalna w motywach palców cynkowych prowadzi do zahamowania ich funkcji i tym samym do ich toksyczności. Z najnowszych badań środowiskowych wynika, że wzrost zawartości jonów Ag^+ w środowisku wzrasta ze względu na wszechobecne wykorzystanie nanocząstek srebra w wielu produktach codziennego użytku. Badania strukturalne dotyczące wiązania jonów Ag^+ do metalotioneiny pokazują, że Ag^+ wypiera Zn^{2+} i wiąże się do centrum koordynacji w sposób liniowy. Wypieranie Zn^{2+} przez Ag^+ w metalotioneinie sugeruje, że w Ag^+ może wypierać Zn^{2+} z innych białek, w tym również z palców cynkowych.

Z toksykologicznego punktu widzenia badania strukturalne dotyczące wiązania jonów Ag^+ do motywów palców cynkowych są istotnym obszarem zainteresowania, dlatego w dalszym etapie projektu badawczego zbadano, czy obecność Ag^+ może mieć wpływ na strukturę, geometrię oraz stabilność motywów palców cynkowych. W tym celu syntezie poddano szereg zmiennych sekwencyjnie peptydów, opierając się, jak dotąd, na najlepiej poznanej i przebadanej sekwencji konsensowej palca cynkowego Cp1-2015. Uzyskane wyniki sugerują, że Ag^+ wypiera Zn^{2+} z motywów palców cynkowych zawierających dwie (Cys₂His₂, CCHH), trzy (Cys₃His₂, CCCH), lub cztery (Cys₄, CCCC) reszty cysteinyłowe w sferze koordynacyjnej. W trakcie wiązania Ag^+ do przebadanych motywów palców cynkowych tworzą się wysoce stabilne kompleksy Ag_nS_n . Zmiany w geometrii wiązania metalu w sferze koordynacyjnej prowadzą do zniszczenia natywnej i wysoce uporządkowanej struktury palców cynkowych. Aby określić geometrię wiązania Ag^+ do palców cynkowych, zastosowano rentgenowską spektroskopię absorpcyjną (*ang.* X-ray Absorption Spectroscopy – XAS). Badania XAS wykazały, że każdy jon srebra związany jest do dwóch donorów siarkowych, ze średnią odległością Ag–S wynoszącą 2.41 Å. Zaprezentowane wyniki badań strukturalnych na temat kompleksów palców cynkowych z Ag^+ stanowią solidny fundament dla zrozumienia molekularnych podstaw toksyczności srebra.

Ostatni etap projektu poświęcono charakterystyce fizykochemicznej i strukturalnej bogatego w reszty cysteinyłowe fragmentu wywodzącego się z ludzkiego czynnika transkrypcyjnego 1 zależnego od jonów cynku (MTF1). Białko MTF1 pośrednio uczestniczy w regulacji Zn^{2+} 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 cysteinyłowe. Motyw ten jest wysoce zachowany u wyższych eukariontów, co może sugerować o jego wyspecjalizowanej roli w mechanizmie aktywacji białka MTF1. Uzyskane wyniki bazujące na krótszym i dłuższym fragmencie motywu bogatego w reszty

cysteinyłowe dowodzą, że motyw ten jest zdolny do wiązania jonów Zn^{2+} z wartością stałej dysocjacji zbliżoną do wartości otrzymanej dla motywów palców cynkowych, pokrywającym zakres fluktuacji stężenia wolnego Zn^{2+} w komórce.

W trakcie dalszej charakterystyki zaprezentowano, że motyw bogaty w reszty cysteinyłowe podczas wiązania Zn^{2+} tworzy dimer, którego obecność jest ściśle związana z dostępnością wolnego Zn^{2+} w układzie. Tym samym, przy niskim stężeniu wolnego Zn^{2+} jedynie niezwiązana z Zn^{2+} forma monomeryczna jest obecna, natomiast przy zwiększaniu stężenia wolnego Zn^{2+} , powstaje dimeryczny kompleks cynkowy, prawdopodobnie z dwujądrowym centrum Zn_2L_2 (gdzie L oznacza cząsteczkę peptydu zawierającego motyw bogaty w reszty cysteinyłowe).