

Manuel Peris Diaz

„Biofizyczna charakterystyka częściowo wysyconych form metalotioneiny cynkowej oraz ich rola w komórkowym buforowaniu cynku”

Charakterystyka strukturalna białek i ich potranslacyjnych modyfikacji, oddziaływania białko-białko, a także charakterystyka powstałych kompleksów ma ogromne znaczenie dla zrozumienia procesów biologicznych. Techniki badawcze, takie jak techniki rentgenowskie, jądrowy rezonans magnetyczny (NMR) czy mikroskopia elektronowa (cryoEM) to metody strukturalne, które dostarczają szczegółowych informacji na poziomie atomowym. Mimo ogromnych walorów, ich zastosowanie w badaniu znaczącej ilości białek jest nadal niemożliwe z przyczyn technologicznych. Z pomocą przychodzi jednak spektrometria mas (MS), która poza możliwością jej użycia w badaniach strukturalnych, jest także podstawowym narzędziem w badaniach proteomicznych czy funkcjonalnych. Z tego powodu w biologii strukturalnej uznawana jest za wartościową metodę uzupełniającą. Metoda ta stała się też jedną z podstawowych technik badawczych w niniejszej pracy doktorskiej. Użyte w niej metody proteomiki natywnej MS oraz kombinacja analizy MS z symulacjami komputerowymi stanowiły podstawę wyjaśnienia oddziaływań między strukturą a funkcją, zachodzących w ludzkiej metalotioneinie (MT). Metalotioneiny to rodzina niskocząsteczkowych białek bogatych w reszty cysteiny (~ 6 kDa), które zaangażowane są w utrzymanie homeostazy jonów Zn(II) i Cu(I). Wiążąc do siedmiu jonów Zn(II), metalotioneina stanowi jeden z głównych układów buforujących, utrzymujących stężenie Zn(II) w komórce na odpowiednim poziomie. Ze względu na zróżnicowane powinowactwo siedmiu jonów Zn(II), wahające się w przedziale stałej dysocjacji od  $10^{-12}$  do  $10^{-8}$  M, MT obecna jest w warunkach komórkowych w postaci form częściowo wysyconych jonami Zn(II) ( $Zn_{4-6}MT$ ). Z tego tytułu białko to nazywane jest „gąbką molekularną”. Wychwytuje nadmiar Zn(II) lub przekazuje go apoproteinom w sytuacji jego deficytu. Jednakże molekularne podstawy tego mechanizmu pozostawały dotąd mało poznane. Nie znane było między innymi w jaki sposób fałdowane są częściowo-wysycone formy MT oraz czy te same struktury powstają, gdy jony metalu dysocjują z form o wyższym stopniu zmetalizowania. Odpowiedź na te pytania była niemożliwa ze względu na bariery technologiczne czy metodyczne. Celem pracy doktorskiej było zatem opracowanie nowej metodologii, opartej na połączeniu chemicznego znakowania MT ze spektrometrią masową. Pozwoliło to zlokalizować miejsca wiązania Zn(II) z atomową dokładnością w tychże strukturach. W trakcie realizacji badań, opracowano również kompleksowe oprogramowanie do analizy danych MS, działające w oparciu o język R, dostępne dla każdego zainteresowanego. Łącząc metody MS i chemometrii z zaawansowanymi symulacjami dynamiki molekularnej, możliwe było opisanie molekularnych podstaw, odpowiadających za zróżnicowanie powinowactwa Zn(II) w MT. Wyniki uzyskane w trakcie

realizacji projektu doktorskiego przyczyniły się do wyjaśnienia sposobu funkcjonowania tych małych, reaktywnych, aczkolwiek bardzo ważnych białek komórkowych.