

UNIwersytet Wrocławski
Wydział Biotechnologii

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA, STRUKTURALNA
I FUNKCJONALNA MIĘDZYBIAŁKOWYCH MIEJSC WIĄZANIA
JONÓW ZN(II)

JÓZEF TRAN

PRACA DOKTORSKA

Zakład Chemii Biologicznej
pod opieką
prof. dr hab. Artura Krężła
Maj 2023

STRESZCZENIE

Prawie każda makrocząsteczka w komórce lub żywym organizmie musi przejściowo lub trwale oddziaływać z innymi cząsteczkami, aby spełnić swoją rolę. Przewiduje się, że około 30–40% tych makrocząsteczek oddziałuje z jonami metali, przy czym często oddziaływanie to jest niezbędne, aby makrocząsteczka była biologicznie aktywna. Biorąc pod uwagę te liczby, dziwi fakt, że jak dotąd badania poświęcone charakterystyce sieci oddziaływań białko–białko nie pokrywają się z badaniami poświęconymi interakcjom metal–białko, pozostawiając obszar przecięcia jako *terra incognita*. Mój interdyscyplinarny projekt doktorski miał dwie fazy. W pierwszej fazie podjąłem próbę poznania tego nieznanego obszaru badając programowo zasoby [Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank \(PDB\)](#) (RCSB PDB), pod kątem [interakcji białko–białko z udziałem metalu \(MPPI, ang. metal-involved protein–protein interaction\)](#)—a dokładniej interfejsów białko–białko z udziałem jonów metali. Drugi etap poświęcony był dokładnej charakterystyce, metodami biofizycznymi, jednego ze szczególnych przypadków [interakcji białko–białko z udziałem jonu cynku \(ZPPI, ang. zinc-involved protein–protein interaction\)](#)—domeny haczyka cynkowego [białka naprawy DNA \(Rad50\)](#), koronnej domeny dla fizjologicznej dimeryzacji białka [Rad50](#), a w konsekwencji niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania kluczowego gracza w odpowiedzi na uszkodzenia [kwasu deoksyrybonukleinowego \(DNA\)](#)—kompleksu [Mre11–Rad50–Nbs1\(Xrs2\)](#) (MRN(X)).

Logika badania została wdrożona przy użyciu języka programowania [Python](#). Jeden z dwóch wygenerowanych w tym procesie przeglądów przedstawia fizjologiczne interakcje białko–białko z udziałem jonu cynku (ewaluowane ręcznie). Drugi przegląd jest stale i regularnie aktualizowany, ponieważ jest wdrożony jako narzędzie online z wykorzystaniem platformy programistycznej [Django](#)—[InterMetalDB](#).

Drugi etap mojego projektu doktorskiego—biofizyczna charakterystyka haczyka cynkowego z białka [Rad50](#) składał się z dwóch części. Pierwszą częścią było opisanie relacji sekwencja–struktura–stabilność ludzkiego białka [Rad50](#). Powstała publikacja jest pierwszym artykułem, opisującym stabilność eukariotycznego [Rad50](#), ponadto, według mojej wiedzy, badany kompleks tworzy najbardziej stabilny kompleks cynkowy opisany w ludzkim [proteomie](#). Ludzkie białko [Rad50](#) jest fosforylowane w bliskim sąsiedztwie (strukturalnie i sekwencyjnie) motywu wiążącego jon [cynku\(II\) \(Zn\(II\)\)](#), na reszcie treoniny 690. Pokazałem również, że ze względu na ekstremalną stabilność kompleksu fosforylacja haczyka cynkowego nie może być przełącznikiem kontrolującym stan dimeryzacji białka [Rad50](#) w warunkach fizjologicznych. Pomimo

ekstremalnej stabilności $Zn(\text{Rad50})_2$, kompleks nie jest selektywny wobec $Zn(II)$, który może być zastąpiony jonami metali o wyższym powinowactwie do haczyka cynkowego.

Druga część charakterystyki domeny haczyka cynkowego została przeprowadzona z wykorzystaniem modelowej domeny haczyka cynkowego z Rad50 pochodzącego z *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) i była poświęcona badaniu właściwości strukturalnych, a także stabilności domeny wysyczonej przez toksyczne jony metali ciężkich—**rtęci(II)** (**Hg(II)**) i **srebra(I)** (**Ag(I)**). Metale te w warunkach eksperymentalnych łatwo i chętnie wypierały $Zn(II)$, co sugeruje, że stabilność powstałych kompleksów była nawet wyższa niż kompleksu cynkowego. Te ekstremalnie wysokie powinowactwa udało mi się oszacować przy użyciu najmniej prawdopodobnej metody—**izotermicznej kalorymetrii miareczkowej** (**ITC, ang., isothermal titration calorimetry**). Uzyskane wyniki przyczyniają się do zrozumienia oddziaływań typu **MPPI**, w tym oddziaływań typu **ZPPI**, jak również zależności pomiędzy strukturą i stabilnością ludzkiego białka **Rad50**, a także wpływu jonów metali ciężkich na stabilność i architekturę białka **Rad50** z *P. furiosus*.