

Głównym celem niniejszego projektu jest identyfikacja architektury dimeru (funkcjonalnego kompleksu zbudowanego z dwóch białek) drożdżowego białka Rad50, określenie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za jej powstanie oraz analiza wpływu dynamiki superhelikalnego regionu na funkcjonowanie białka. Kompleks białkowy MRN(X) (Mre11:Rad50:Nbs1(Xrs2 w komórkach drożdży)) jest odpowiedzialny za rozpoznanie i naprawę podwójnych pęknięć nici DNA powstających na skutek narażenia komórki na czynniki genotoksyczne (zagrożające materiałowi genetycznemu), takie jak promieniowanie jonizujące, czy promieniowanie UV, ale również generowane podczas procesów fizjologicznych – podczas podziałów komórkowych, mejozy i rekombinacji w limfocytach B. Rad50 cechuje wyjątkowo skomplikowana struktura, na którą składają się: domena globularna (sferyczna), która stanowi jeden biegun białka, tak zwany motyw haczyka cynkowego, czyli centralnie ulokowana domena wiążąca Zn^{2+} , która odpowiada za połączenie dwóch białek w jeden kompleks, oraz niezwykle długi, 50 nm odcinek superhelikalny (*coiled-coil* z j. ang) łączący oba bieguny, dzięki wymuszonemu skrętowi łańcucha w jego centrum. Z uwagi na znaczącą dynamikę regionu superhelikalnego, kompleks MRN(X) może przyjmować różne formy strukturalne. Najnowsze badania sugerują, że tylko dwie architektury dimeru Rad50 są funkcjonalne – forma otwarta, scharakteryzowana dla białka pochodzącego z hipertermofilnego archeona, oraz forma zamknięta, świeżo zidentyfikowana dla białka ludzkiego. Podejrzewamy, że architektura prezentowana przez białko drożdżowe będzie podobna do ludzkiej formy zamkniętej, jednak struktura białka Rad50 w dalszym ciągu pozostaje osnuta tajemnicą, a znacząca rozbieżność w sekwencji aminokwasowej obu białek może sugerować inną formę rozmieszczenia przestrzennego. Wyniki badań na dzień dzisiejszy wskazują istotną rolę regionu superhelikalnego zarówno w procesie strukturyzowania dimeru i wyboru jednej z dwóch form funkcjonalnych, jak również w procesach przekazywania sygnału z jednego bieguna kompleksu na drugi. Uważamy, że podstawy mechaniczne przekazywania sygnału leżą w dynamice regionu. W celu sprawdzenia przedstawionych hipotez planujemy przeprowadzić szereg badań strukturalnych na różnych wariantach drożdżowego Rad50, między innymi eksperymenty spektrofluorymetryczne oraz pomiary na spektrometrze mas z możliwością separacji mobilności jonów. Zróżnicowanie wariantów pod względem sekwencji regionu superhelikalnego oraz regionu haczyka pozwoli na precyzyjną analizę podstaw molekularnych zachodzących procesów podczas dimeryzacji, a wykorzystanie innowacyjnie wyprodukowanych peptydów o ograniczonej ruchomości w odcinku superhelisy umożliwi zrozumienie roli jaką pełni dynamizm tego segmentu w funkcjonowaniu białka Rad50.