

Podwójne pęknięcia nici DNA należą do jednych z najbardziej destruktywnych form uszkodzeń helisy, prowadzących do groźnych aberracji chromosomowych. Uszkodzenia te powstają w wyniku działania czynników zewnętrznych lub – częściej - podczas procesów metabolicznych związanych z DNA, takich jak replikacja, transkrypcja lub rekombinacja, w których powstają w zaprogramowany sposób lub są wynikiem błędów. W celu kontrolowania powstałych uszkodzeń i utrzymania prawidłowego funkcjonowania genomu, komórki rozwinęły wysoce wyspecjalizowaną sieć białek, zarządzającą odpowiedzią na uszkodzenia DNA. Kompleks MRN, będący kluczowym elementem tej sieci, odgrywa główną rolę w komórkowej odpowiedzi na podwójne pęknięcia nici DNA: rozpoznaje uszkodzenie, uruchamia kaskadę sygnału oraz doбира odpowiedni szlak naprawy, w której aktywnie uczestniczy poprzez łączenie uszkodzonych nici. W skład kompleksu MRN wchodzi trzy białka pełniące uzupełniające się wzajemnie role: nukleaza Mre11, Smc-podobne białko Rad50 oraz Nbs1 – podjednostka regulatorowa charakterystyczna dla eukariontów.

Białko Rad50 pełni zasadniczo odmienne role od pozostałych białek kompleksu MRN. Działa potrójnie, tworząc rusztowanie dla całego kompleksu, wiążąc DNA w pobliżu uszkodzeń oraz umożliwiając dimeryzację konieczną do utworzenia w pełni funkcjonalnego wielobiałkowego kompleksu. Rad50 dimeryzuje poprzez globularną domenę ATPazową oraz poprzez silne wiązanie jonu cynku na drugim biegunie kompleksu. Fundamentalne znaczenie tego małego białkowego motywu, zwanego haczykiem cynkowym, wykazały analizy genetyczne, które ujawniły jego wpływ na procesowanie nici DNA przez globularną domenę kompleksu MRN. To odkrycie przyczyniło się do powstania hipotezy o wzajemnej strukturalnej zależności pomiędzy dwoma biegunami kompleksu, prawdopodobnie koordynowanej przez długie superhelikalne ramiona Rad50. Jednakże, mechanizm tej strukturalnej komunikacji pozostaje niewyjaśniony.

Bazując na badaniach strukturalnych wysunięto założenie, że struktura dimeru haczykowego jest dynamiczna, dzięki czemu działa on jak zawias umożliwiający superhelikalnym ramionom przechodzenie z otwartej do zamkniętej konformacji i *vice versa*, podczas aktywności kompleksu MRN. Dlatego też bardzo istotnym jest dokładne zbadanie molekularnych podstaw determinujących właściwości strukturalne haczyka aby w pełni zrozumieć jego wpływ na działanie MRN. Fakt, iż tworzenie się dimeru haczyka jest bezsprzecznie związane z wiązaniem jonu cynku, stał się dla nas podstawą do zbadania wpływu Zn(II) na stabilność i dynamikę konformacyjną domeny haczyka wraz z fragmentem superhelikalnym poniżej wiązania jonu metalu – co istotne – w ściśle kontrolowanych warunkach buforujących Zn(II) aby ocenić potencjalne znaczenie fizjologiczne obserwowanych zjawisk. W proponowanym projekcie zamierzamy zbadać czynniki molekularne definiujące stabilność i dynamikę konformacji eukariotycznych domen haczyka w kontekście kontrolowanego stężenia Zn(II). Projekt obejmuje dwa główne zadania: 1) badania biofizyczne sfery koordynującej Zn(II) przeprowadzane na krótkich wariantach haczyka; 2) analizę fluorescencyjną konformacji i jej dynamiki przeprowadzane na dłuższych modelach domeny, z uwzględnieniem wpływu samego haczyka oraz fragmentu superhelikalnego na przestrzenną organizację dimeru. Ze względu na fakt, że aktywność białka jest determinowana zarówno przez jego strukturę jak i dynamikę tej struktury, badania skupiające się na molekularnych mechanizmach ich tworzenia znacząco wzbogacają prace badawcze przeprowadzane na układach biologicznych. Dlatego też wierzymy, że proponowane przez nas niskobudżetowe badania biofizyczne domeny haczyka Rad50 przyniosą owocne korzyści dla badań nad mechanizmem działania całego białka.

Kompleks MRN odgrywa kluczową rolę w naprawie podwójnych pęknięć nici DNA, prowadzących często do mutacji i progresji nowotworu. Nie jest zatem zaskakującym fakt, że nieprawidłowe funkcjonowanie któregośkolwiek z białek wchodzących w skład kompleksu, przyczynia się do rozwoju poważnych chorób i kancerogenezy. Dysfunkcje kompleksu MRN są powiązane z wieloma typami ludzkich nowotworów. Ponadto, w badaniach na mysich modelach wykazano, że mutacje w obrębie haczyka Rad50 zaburzały odpowiedź komórkową na uszkodzenia DNA, homeostazę tkankową oraz promowały rozwój guza. Proponowane przez nas wyczerpujące badania nad strukturą, stabilnością i dynamiką domeny haczyka Rad50 przybliżą nas do zrozumienia, w jaki sposób kompleks MRN funkcjonuje w warunkach fizjologicznych, sprawując kontrolę nad integralnością genomu i ochraniając komórki przed nowotworzeniem.