

## Raport z doświadczeń wykonanych na synchrotronie ESRF

Eksperyment: MX1222

Wykonany: 28-02-2011/01-03-2011

### Tytuł: „Structural studies of RuvC - Holliday junction complex” (“Badania strukturalne kompleksu RuvC ze strukturą Holliday’a”)

Struktura Holliday’a (HJ) to czteroramienna forma DNA, która jest stanem pośrednim w procesie homologicznej rekombinacji oraz w niektórych ścieżkach naprawy DNA. Dupleks DNA musi być następnie rozdzielony przez specyficzne enzymy – rezolwazy. U bakterii Gram-negatywnych rolę tę pełni białko RuvC – dimeryczna endonukleaza należąca razem z RNazami H do nadrodziny integraz retrowirusowych. Celem naszych badań było rozwiązanie struktury RuvC w kompleksie ze strukturą Holliday’a, aby na tej podstawie poznać szczegóły sposobu rozpoznawania substratu przez enzym i jego katalizy. Uzyskaliśmy kryształy w kompleksie z krótkimi syntetycznymi strukturami Holliday’a i zarejestrowaliśmy dane dyfrakcyjne do rozdzielczości 3,8 Å na stacji pomiarowej 23-2 na ESRF, która dzięki wysokiemu skupieniu promieniowania pozwala na zebranie danych z wybranego fragmentu kryształu. Za pomocą metody podstawienia cząsteczkowego rozwiązaliśmy strukturę kompleksu, co pozwoliło nam stwierdzić, iż struktura Holliday’a podczas wiązania do RuvC przyjmuje konformację o symetrii z osią dwukrotną. Jednakże aby móc opublikować wyniki naszego eksperymentu musimy uzyskać strukturę o wyższej rozdzielczości lub fazy eksperymentalne aby potwierdzić prawidłowość naszego modelu uzyskanego na podstawie struktury o niskiej rozdzielczości.

W celu poprawienia jakości kryształów zastosowaliśmy kilka podejść. Po pierwsze użyliśmy nowych syntetycznych struktur Holliday’a zaprojektowanych na podstawie naszej struktury. Modyfikacje obejmowały wydłużanie lub skracanie ramion, zmianę położenia sekwencji rozpoznawanej przez enzym, wprowadzenie lepkich końców oraz wprowadzenie takich parowań w ramionach, aby zapobiec przesuwaniu się miejsca cięcia. Uzyskaliśmy liczne kryształy białka w kompleksie z nowymi strukturami Holliday’a w tym kilka nowych form krystalicznych. Sześć typów kryształów (w sumie 120 kryształów) przetestowaliśmy na wiązce 23-2, niestety dla żadnego z ich nie uzyskaliśmy rozdzielczości lepszej niż 5 Å.

Drugą próbą potwierdzenia prawidłowości naszego rozwiązania struktury było uzyskanie faz eksperymentalnych, aby wykluczyć możliwość nadinterpretacji naszego modelu uzyskanego metodą podstawienia molekularnego, co mogłoby mieć miejsce z uwagi na niską rozdzielczość naszej struktury. W tym celu uzyskaliśmy kryształy kompleksu z pochodną selenometioninową białka oraz zastosowaliśmy nasączenie kryształów zawierających natywne białko za pomocą związków metali ciężkich. W ramach eksperymentu MX-1222 przetestowaliśmy 26 kryształów selenometioninowych oraz 16 kryształów nasączanych, ale ponownie nie udało się nam uzyskać satysfakcjonującej rozdzielczości.

Kolejnym podejściem było skrzystalizowanie RuvC ze strukturami Hollidaya zawierającymi bromowane pochodne zasad. Dane dyfrakcyjne z takich kryształów pozwoliłyby nie tylko na uzyskanie faz eksperymentalnych ale również silnego sygnału pochodzącego od atomów bromu co umożliwiłoby określenie ich dokładnego położenia w strukturze a tym samym potwierdzenie poprawności modelu. Z zastosowaniem bromowanych pochodnych oligonukleotydów udało nam się uzyskać liczne regularne i duże kryształy, dwa ich typy (w sumie 22 kryształy) zostały

przetestowane w ramach eksperymentu MX-1222, niestety te kryształy nie rozpraszały promieni Rentgena.

Mimo iż w trakcie eksperymentu MX-1222 nie uzyskaliśmy nowych danych dyfrakcyjnych, uzyskane wyniki pozwoliły nam sprawdzić różne sposoby poprawienia jakości kryształów. W tej chwili najbardziej obiecującym sposobem wydaje się dehydratacja kryształów. Ponadto sprawdzamy, czy uda nam się uzyskać kryształy kompleksu RuvC-struktura Holliday'a z białkami z innych organizmów. Naszym głównym celem jest uzyskanie struktury kompleksu w rozdzielczości co najmniej 3 Å. Model w tej rozdzielczości pozwoli na dokładne określenie miejsc wiązania jonów metalu w miejscu aktywnym białka oraz mechanizmu rozpoznawania miejsca cięcia.