

Opis projektu MX-998 realizowanego na ESRF

Tytuł: Badania strukturalne RNazy H2

Daty wykonania doświadczeń: 22-23 września i 7-8 grudnia 2009

Linie pomiarowe: 23-2 i 14-4

Głównym celem doświadczeń przeprowadzonych na synchrotronie ESRF była rejestracja danych dyfrakcyjnych promieniowania Roentgena z kryształów bakteryjnej i ludzkiej RNazy H2. RNazy H2 hydrolizują nić RNA w hybrydowych kwasach nukleinowych zawierających RNA i DNA (1). Dzieli się je na dwa typy: RNazy H1 i RNazy H2. Charakterystyczną cechą RNazy H2 jest ich zdolność do hydrolizowania pojedynczych rybonukleotydów obecnych w dłuższych fragmentach DNA. Pojedyncze rybonukleotydy są często mylnie włączane do DNA przez polimerazy replikujące genom i muszą być usunięte (2). Rolę tę najprawdopodobniej wypełnia RNaza H2.

Eukariotyczne RNazy H2 są złożone z trzech podjednostek. Zostały one najpierw zidentyfikowane w drożdżach *S. cerevisiae* i nazwane RNaza H2A (podjednostka katalityczna) (3), RNaza H2B and RNaza H2C (podjednostki pomocnicze). Dokładna rola podjednostek pomocniczych nie jest znana, ale są one niezbędne do aktywności enzymu. Mutacje w ludzkiej RNazie H2 prowadzą do zespołu Aicardi-Goutières (AGS). Jest to autosomalna recesywna choroba genetyczna, o objawach występujących już u noworodków, polegających na bardzo silnej odpowiedzi autoimmunologicznej, która prowadzi do uszkodzenia tkanek, w tym w szczególności mózgu (4).

Podczas realizacji projektu na synchrotronie ESRF, zarejestrowaliśmy dane dyfrakcyjne dla kryształów kompleksu bakteryjnej RNazy H2 w kompleksie z substratem – fragmentem dwuniciowego DNA zawierającym pojedynczy rybonukleotyd. Struktura rozwiązana na podstawie tych danych oraz struktury określone na podstawie danych zarejestrowanych na innych źródłach promieniowania Roentgena pokazały, że kluczowe dla działania enzymu jest specyficzne wiązanie przez białko połączenia RNA-DNA tworzonego przez pojedynczy rybonukleotyd (5). Reszta RNA jest rozpoznawana przez sieć kontaktów między resztami białka, a charakterystyczną grupą chemiczną RNA – 2'-OH. Reszta DNA połączenia tworzy silne oddziaływania resztą tyrozyny białka, które są efektywne jedynie, jeśli nie jest obecna grupa 2'-OH, co prowadzi do specyficznego wiązania DNA. W centrum aktywnym obecne są dwa jony metalu dwuwartościowego, które są niezbędne do katalizy. W wiązaniu jednego z nich bierze udział grupa fosforanowa połączenia RNA-DNA. Jest to możliwe, dzięki temu, że kwas nukleinowy jest zdeformowany w sposób, który prawdopodobnie jest możliwy jedynie dla połączenia RNA-DNA. Udział substratu w mechanizmie katalizy zapewnia wysoką specyficzność reakcji.

Podczas prac na ESRF zarejestrowaliśmy również dane dyfrakcyjne dla kryształów ludzkiej RNazy H2 złożonej z trzech podjednostek. Aby móc zarejestrować dane użyteczne do rozwiązania struktury niezbędne było wykorzystanie specjalnej wiązki promieniowania Roentgena o bardzo małym przekroju i bardzo wysokiej intensywności (tzw. microfocus beam). ESRF jest jednym z niewielu miejsc na świecie, gdzie wiązki takie są dostępne. Struktura ludzkiego kompleksu RNazy H2 została rozwiązana i na jej podstawie mogliśmy zlokalizować miejsca wszystkich mutacji obserwowanych w pacjentów z AGS oraz wyjaśnić defekty, które powodują one w aktywności i stabilności białka (6). Na podstawie struktury kompleksu substratowego bakteryjnej RNazy H2 przygotowaliśmy model białka ludzkiego ze związanym kwasem nukleinowym. Został on zweryfikowany w badaniach biochemicznych i pozwolił nam wyjaśnić specyficzność substratową enzymu.

Czas eksperymentalny na wiązkach ESRF został przez nas również wykorzystany do rejestracji danych dla innych projektów realizowanych w naszej pracowni. Uzyskaliśmy na przykład pierwsze dane dyfrakcyjne dla kryształów kompleksu białka naprawczego UvrA z DNA. Zarejestrowaliśmy również dane dla kompleksu substratowego bakteryjnej rezolwazy RuvC. Te badania są kontynuowane, przy użyciu innych źródeł synchrotronowych.

LITERATURA:

1. Tadokoro, T., and Kanaya, S. (2009) *FEBS J* **276**, 1482-1493
2. Nick McElhinny, S. A., Watts, B. E., Kumar, D., Watt, D. L., Lundstrom, E. B., Burgers, P. M., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T. A. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4949-4954
3. Jeong, H. S., Backlund, P. S., Chen, H. C., Karavanov, A. A., and Crouch, R. J. (2004) *Nucleic Acids Res* **32**, 407-414
4. Crow, Y. J., Leitch, A., Hayward, B. E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., Baumann, C., Baxter, P., Bertini, E., Chandler, K. E., Chitayat, D., Cau, D., Dery, C., Fazzi, E., Goizet, C., King, M. D., Klepper, J., Lacombe, D., Lanzi, G., Lyall, H., Martinez-Frias, M. L., Mathieu, M., McKeown, C., Monier, A., Oade, Y., Quarrell, O. W., Rittey, C. D., Rogers, R. C., Sanchis, A., Stephenson, J. B., Tacke, U., Till, M., Tolmie, J. L., Tomlin, P., Voit, T., Weschke, B., Woods, C. G., Lebon, P., Bonthron, D. T., Ponting, C. P., and Jackson, A. P. (2006) *Nat Genet* **38**, 910-916
5. Rychlik, M. P., Chon, H., Cerritelli, S. M., Klimek, P., Crouch, R. J., and Nowotny, M. (2010) *Mol Cell* **40**, 658-670
6. Figiel, M., H., C., Cerritelli, S. M., Cybulska, M., Crouch, R. J., and Nowotny, M. (2010) *J. Biol. Chem.* ,
złożone do druku