

Strukturalne podstawy funkcjonalnej współpracy białek zaangażowanych w procesowanie starterów RNA podczas replikacji mitochondrialnego DNA

Piotr Purzycki

Ludzkie mitochondrialne DNA (mtDNA) to kolista, dwuniciowa cząsteczka DNA o długości 16,6 kilopar zasad, której replikacja i utrzymanie są niezbędne dla funkcjonowania komórki; mutacje w mtDNA prowadzą do ciężkich chorób. System replikacji mtDNA różni się od replikacji jądrowej, poprzez wykorzystanie białek dedykowanych mitochondriom. W powszechnie cytowanym modelu wypierania nici, synteza nici wiodącej rozpoczyna się na początku replikacji nici ciężkiej. Gdy dwie trzecie genomu zostanie zreplikowane, odsłaniany jest początek replikacji nici lekkiej, tworząc strukturę pętli typu stem-loop. Po zakończeniu replikacji startery RNA na końcach 5' nowo zsyntetyzowanych nici muszą zostać usunięte. Defekty w tym procesie mogą prowadzić do powstawania patogennych cząsteczek mtDNA, skutkując różnorodnymi chorobami mitochondrialnymi. Ostatnie badania dotyczące terminacji replikacji mtDNA zidentyfikowały funkcjonalne interakcje między rybonukleazą H1 (RNaza H1), mitochondrialną egzonukleazą 5' G (EXOG) i polimerazą DNA Pol γ , jednak dokładny mechanizm usuwania starterów RNA w ludzkich mitochondriach pozostaje jedynie częściowo zdefiniowany. W celu zbadania molekularnych podstaw dwóch odrębnych interakcji z RNazą H1, niniejsza rozprawa ma na celu wyjaśnienie funkcjonalnego oddziaływania RNazy H1 z EXOG w procesowaniu końcowym primerów RNA oraz współdziałania RNazy H1 z Pol γ podczas replikacji. W badaniach wykorzystano testy biochemiczne i kinetyczne, w tym powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) i interferometrię biowarstwową (BLI), analizę mutacyjną, modelowanie strukturalne za pomocą AlphaFold, krystalografię rentgenowską oraz mikroskopię krioelektronową (cryo-EM).

W pierwszej części projektu, zbadalem funkcjonalne oddziaływanie między RNazą H1 a EXOG. Za pomocą SPR zmapowałem główną powierzchnię interakcji w domenie katalitycznej RNazy H1. W biochemicznej rekonstytucji potwierdziłem, że ta interakcja jest istotna funkcjonalnie, gdyż do całkowitego wycięcia starterów RNA *in vitro* wymagane były oba, wspólnie działające enzymy, czego nie udało się osiągnąć przez żadne z białek osobno. Ponadto EXOG była w stanie częściowo przywrócić upośledzoną aktywność chorobotwórczego wariantu RNazy H1 co może sugerować znaczenie kliniczne. W celu

zbadania strukturalnych podstaw tego oddziaływania zastosowałem zintegrowane podejście, łączące próby krystalizacji z predykcjami AlphaFold2 Multimer. Chociaż krystalografia nie pozwoliła na rozwiązanie struktury kompleksu, modelowanie komputerowe zidentyfikowało kluczowe reszty na powierzchni interakcji, które następnie zweryfikowałem za pomocą mutagenезy ukierunkowanej i testów aktywności biochemicznej.

W drugiej części rozprawy badałem współdziałanie RNazy H1 z Pol γ . W eksperymentach SPR pokazałem bezpośrednią interakcję pomiędzy obydwojma białkami, w której pośredniczy domena katalityczna RNazy H1. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że synteza DNA poprzez Pol γ stymuluje RNazę H1 do całkowitego usunięcia starterów. Ponadto, katalitycznie nieaktywny wariant RNazy H1 zatrzymywał Pol γ w trakcie syntezy DNA, działając jako fizyczna przeszkoda. Podczas gdy dowody biochemiczne wspierają istnienie trójskładnikowego kompleksu, mikroskopia cryo-EM wykazała heterogenność konformacyjną, która uniemożliwiła wysokorozdzielczą wizualizację RNazy H1. Aby rozwiązać ten problem, wykonałem predykcję za pomocą AlphaFold3, co umożliwiło mi uzyskanie wiarygodnego modelu kompleksu zgodnego z danymi biochemicznymi. Dane strukturalne i biochemiczne zasugerowały określoną organizację przestrzenną, która umożliwia koordynację podczas terminacji replikacji mtDNA. Łącznie, wyniki te dostarczyły dowodów na istnienie komplementarnych mechanizmów, za pomocą których RNaza H1 koordynuje działanie z różnymi partnerami enzymatycznymi, aby zapewnić całkowite usunięcie starterów RNA i terminację replikacji w ludzkich mitochondriach.

Niniejsza praca określa specyficzne warunki biochemiczne, w których RNaza H1 jest zdolna do całkowitego cięcia startera RNA *in vitro*, dając podstawy do głębszego zrozumienia dotychczas niewyjaśnionych procesów. Integrując dowody strukturalne, biochemiczne i kinetyczne, niniejsza rozprawa poszerza dostępną wiedzę w zakresie dojrzewania mitochondrialnych starterów RNA i podkreśla, w jaki sposób aktywność RNazy H1 przyczynia się do terminacji replikacji i stabilności genomu mitochondrialnego.