

## Charakterystyka kompleksu MLH1-MBD4, tworzonego przez białka biorące udział w naprawie DNA

Katarzyna Poleszak

System naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. *mismatch repair*, MMR) usuwa z DNA błędy, które powstały podczas replikacji. Główną rolę w systemie MMR w komórkach ludzkich odgrywa kompleks MutL $\alpha$ , będący heterodimerem MLH1 i PMS2. MLH1 poprzez oddziaływanie z innymi białkami, bierze udział w przekazywaniu sygnału pomiędzy różnymi ścieżkami naprawy DNA oraz punktami kontrolnymi cyklu komórkowego i apoptozy. Jednym z partnerów MLH1 jest białko MBD4. Kompleks MLH1-MBD4 bierze udział w indukcji apoptozy. MBD4 to glikozylaza DNA, która uczestniczy w naprawie przez wycinanie zasad usuwając błędne sparowania guaniny z tyminą powstałe na skutek działania uszkodzających czynników endo- i egzogennych.

W niniejszej rozprawie, przeprowadzono szczegółową analizę oddziaływania białek w kompleksie MLH1-MBD4 przy użyciu metod teoretycznych i doświadczalnych. Analiza bioinformatyczna pozwoliła przewidzieć miejsca oddziaływania w obu białkach. Opierając się na tych przewidywaniach, zaprojektowane zostały doświadczenia umożliwiające ustalenie regionów oraz reszt aminokwasowych biorących udział w oddziaływaniu pomiędzy MLH1, a MBD4.

W wyniku analizy sekwencji aminokwasowej białka MBD4 zidentyfikowano region odpowiadający resztom aminokwasowym 414-TSLYF-418, którego sekwencja przypomina motyw MIP (ang. *Mlh1 interacting protein box*). Potwierdzono, że motyw oraz otaczające go reszty aminokwasowe (390-422) są kluczowe dla oddziaływania z MLH1. Istotną rolę w wiązaniu MLH1 przez MBD4 odgrywają również regiony: obejmujące reszty aminokwasowe 433 – 453, 469-483 i 544-558.

Wykazano, że zgodnie z przewidywaniami konserwowany region w poddomenie Ex oraz motyw QXLLXP wraz z otaczającym go regionem i miejsce S2 białka MLH1 są zaangażowane w wiązanie białka MBD4. Ponadto, zidentyfikowano dwa dodatkowe miejsca wiązania MBD4 odpowiadające resztom aminokwasowym: 486-500 i 676-690. Stwierdzono, że mutacje w genie *MLH1* związane z dziedzicznym rakiem jelita grubego niezwiązanym z polipowatością, które objawiają się, jako substytucje reszt aminokwasowych znajdujących się w miejscu wiązania tych białek, znacznie osłabiają oddziaływanie pomiędzy MLH1 i MBD4.

Uzyskane dane posłużyły jako więzy do modelowania struktury kompleksu strukturalnego MLH1-MBD4, a otrzymane modele pozwoliły na zaproponowanie sposobu oddziaływania obu białek i wyjaśnienie molekularnych podstaw dysfunkcji wariantów MLH1 związanych z rakiem jelita grubego.

Katarzyna Poleszak

## Characteristics of the MLH1-MBD4 complex formed by proteins involved in DNA repair

**Katarzyna Poleszak**

DNA mismatch repair (MMR) removes errors that arise during replication and is thus essential for maintaining genome integrity. The MutL $\alpha$  complex, consisting of MLH1 and PMS2 heterodimer, plays a major role in the MMR system in human cells. MLH1, through interactions with other proteins, is involved in signal transduction between different DNA repair pathways, cell cycle checkpoints and apoptosis. One of MLH1 partners is MBD4. The MLH1-MBD4 complex is involved in the induction of apoptosis. MBD4 is a DNA glycosylase that participates in base excision repair (BER) which removes errors resulting from the action of damaging endo- and exogenous factors.

In this dissertation, a detailed analysis of protein interaction in MLH1-MBD4 complex was performed using theoretical and experimental methods. Bioinformatics analysis allowed to predict the interaction sites in both proteins. Based on these predictions, experiments were designed to identify regions and amino acid residues involved in the interaction between MLH1 and MBD4.

Sequence analysis of MBD4 protein family led to identification of a conserved region corresponding to amino acid residues 414-TSLYF-418 that resembles the MIP motif (Mlh1 interacting protein box). Experimental analysis confirmed that this motif and the surrounding amino acid residues (390-422) play a key role in the interaction with MLH1. Additionally, other interacting regions in MBD4 have been identified, comprising amino acid residues: 433-453, 469-483 and 544-558.

I confirmed predictions of MLH1 regions (conserved region in the Ex subdomain, QXLLXP motif along with the surrounding region and S2 site) implicated in interactions with MBD4. Additionally, other MBD4 binding sites were identified comprising to amino acid residues: 486-500 and 676-690. Substitutions in MLH1 at the MBD4 binding site associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) have been found to significantly reduce the interaction between MLH1 and MBD4.

The obtained data were used as restraints to build a structural model of MLH1-MBD4 complex and on its basis propose the mechanism of interaction of both proteins and the molecular mechanisms of pathogenicity of MLH1 cancer-related alterations.

*Katarzyna Poleszak*