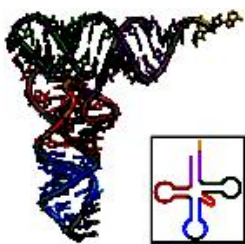


Badania nad wpływem cytochromu c na procesy oksydacyjnych uszkodzeń 2-tiourydyno-RNA

Kwasy nukleinowe są biopolimerami, których zawartość w organizmie, choć niewielka, jest bardzo istotna, ponieważ decydują one o naszej dziedziczności. W kwasach nukleinowych zapisana jest informacja genetyczna dotycząca cech i właściwości organizmu. Jednym z graczy jest transferowy kwas rybonukleinowy (tRNA, ang. transfer RNA), którego zadaniem jest dostarczenie reszty aminokwasu do odpowiedniego miejsca na rybosomie, gdzie aminokwas zostaje włączony do rosnącego łańcucha polipeptydowego. Tym samym odgrywa on zasadniczą rolę w procesie biosyntezy odpowiedniego białka. Częsteczką tRNA zbudowaną jest z kilkudziesięciu nukleotydów i bardzo często posiada w swojej strukturze modyfikowane nukleozydy, takie jak pseudourydyna czy 2-tiourydyna. Transferowy RNA przypomina swoim kształtem „czterolistną koniczynę” (**Rys.1.**), w której można wyróżnić cztery ramiona, z czego najważniejszą rolę pełni ramię i pętla antykodonu. To właśnie trójnukleotydowy antykodon znajdujący się w wystającej pętli antykodonu, rozpoznaje i wiąże się z komplementarnym trypletem nukleotydów, tzw. kodonem w częsteczce mRNA, niosącej informację genetyczną. Modyfikowane nukleozydy usytuowane w obrębie kodonu uczestniczą w ten sposób w procesie odczytywania informacji genetycznej. Ważną podgrupę modyfikowanych nukleozydów zlokalizowanych w pozycji 34 tRNA (pierwsza pozycja antykodonu, tzw. pozycja wahadłowa, ang. *wobble*) stanowią nukleozydy zawierające atom siarki w pozycji C2, tj. 2-tiourydyny (S2U) oraz ich pochodne modyfikowane w pozycji 5 heterozasady (R5S2U).



Rysunek 1. Trójwymiarowy model tRNA^{Phe} z drożdży oraz struktura drugorzędowa tRNA (w ramce) z zaznaczonym obszarem antykodonu (kolor niebieski).

Ostatnio wykazano, że w warunkach stresu oksydacyjnego (zaburzenia w równowadze pomiędzy wytwarzaniem a usuwaniem reaktywnych form tlenu (RFT, ang. ROS, *reactive oxygen species*)) dochodzi do uszkodzeń różnych biomolekuł, a w tym np. RNA. Częsteczki tRNA zawierające S2U w obrębie antykodonu mogą być pierwotnym miejscem ataku ROS. Nasze badania prowadzone na oligonukleotydach RNA zawierających S2U wykazały, że są one szczególnie podatne na utlenienie w obecności nadtlenu wodoru, a w wyniku tej reakcji powstaje RNA zawierający zamiast S2U nukleozyd 4-pirymidynonu (H2U). Konsekwencją biologiczną transformacji S2U w łańcuchu tRNA do częsteczki H2U, który traci możliwość tworzenia wiązania wodorowego z komplementarną resztą adenozy (z uwagi na inny układ akceptorów oraz donorów wiązania wodorowego), może być upośledzenie funkcji tRNA, skutkiem czego może dojść do zaburzenia oddziaływań kodon-antykonon, a w efekcie do zakłócenia procesu translacji.

Niedawno odkryto, że zarówno cała częsteczka tRNA, jak i jej połówki zaangażowane są w proces indukowanej śmierci komórki (apoptozy), z którym bezpośrednio związany jest cytochrom c. Jest to białko, które np. pod wpływem wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu zostaje uwolnione z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytoplazmy, gdzie tworzy apoptosom, który na drodze aktywacji różnych czynników doprowadza do śmierci komórki. Ostatnio zaobserwowano również, że cytozolowe tRNA tworzy z uwolnionym z mitochondriów cytochromem c kompleks, który blokuje powstawanie apoptosomu, przez co uniemożliwia śmierć komórki. Ostatnio udowodniono, że cytochrom c w obecności H₂O₂ katalizuje reakcję utleniania guanozyny w łańcuchu RNA, co prowadzi do uszkodzenia całej częsteczki. Zachęteni tym odkryciem i własnymi doświadczeniami w zakresie desulfuracji S2U, znajdujących się w transferowych RNA, zadaliśmy sobie pytanie, czy cytochrom c ma wpływ na proces desulfuracji w warunkach stresu oksydacyjnego. Przeprowadziliśmy badania wstępne, w których zaobserwowaliśmy, że cytochrom c w obecności H₂O₂ katalizuje reakcję desulfuracji S2U-RNA. Reakcja przebiega przy niskich stężeniach H₂O₂ i jest znacznie szybsza niż kontrolna, bez udziału cytochromu c, a głównym produktem reakcji jest H2U-RNA. Odkrycie to stało się podstawą do zaprojektowania badań prezentowanych w niniejszym projekcie. Uważamy, że istotne jest podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmu zaobserwowanej katalizy, zwłaszcza, że proces taki może mieć miejsce także w komórce.

Celem badań jest analiza procesu desulfuracji 2-tiourydyny w obecności cytochromu c w oparciu o szerokie spektrum częsteczek modelowych (na poziomie nukleozydu, oligonukleotydu oraz całego tRNA) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego za pomocą H₂O₂. Dodatkowym celem projektu jest również zbadanie oddziaływań modyfikowanych oligonukleotydów RNA (odpowiednio z S2U oraz H2U) z cytochromem c w kontekście tworzenia kompleksu blokującego apoptozę. Cel zamierzam osiągnąć poprzez przeprowadzenie kompleksowych badań nad procesem desulfuracji na poziomie odpowiednio modyfikowanych częsteczek modelowych z wykorzystaniem różnych czynników utleniających oraz zbadanie charakteru oddziaływań cytochromu c z modyfikowanym RNA. W badaniach wykorzystam metodykę z zakresu syntetycznej chemii organicznej oraz biochemii, a także wybranych metod biologii molekularnej.

Przeprowadzone przez nas badania pozwolą na poszerzenie wiedzy w zakresie oksydacyjnych uszkodzeń modyfikowanych nukleozydów. Będą miały pierwszorzędne znaczenie w zrozumieniu mechanizmu działania cytochromu c w aspekcie uszkodzania RNA. Spodziewamy się, że uzyskanie wiedzy o chemii desulfuracji w obecności cytochromu c stanowić będzie istotne podwaliny w zrozumieniu zjawiska tworzenia się kompleksów cyt c/ RNA blokujących tworzenie się apoptosomu, odgrywającego zasadniczą rolę w procesie apoptozy.