

## **Badania uszkodzeń 2-tiourydyno-tRNA zachodzących w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu**

Transportujący RNA (tRNA), jeden z kilku niskocząsteczkowych kwasów rybonukleinowych (RNA) w komórce, pełni bardzo istotną funkcję polegającą na przyłączaniu wolnych aminokwasów i dostarczaniu ich do rybosomów, czyli miejsc w komórce, w których odbywa się biosynteza białka. W obrębie rybosomów, w procesie translacji, dochodzi do przyłączania aminokwasów do wydłużającego się łańcucha polipeptydowego w ściśle określonej kolejności wyznaczanej przez sekwencję nukleotydową w informacyjnym RNA (mRNA). Częsteczki tRNA przyjmują charakterystyczną strukturę drugorzędową przypominającą liść koniczyny, przy czym poszczególne odcinki tej struktury określane są jako ramiona i pętle, m in. ramię akceptorowe, do którego wiąże się charakterystyczny dla danego tRNA aminokwas, czy pętla antykodonowa, zawierająca sekwencję antykodonu, rozpoznająca określone kodony w mRNA.

Po syntezie nici pre-tRNA w jądrze komórkowym, po etapie dojrzewania, część nukleotydów w tRNA ulega modyfikacjom chemicznym. Modyfikacje polegają głównie na metylacji, wysyceniu podwójnych wiązań, przyłączeniu siarki lub przyłączeniu określonych podstawników do rybonukleozydów. Obecność modyfikowanych nukleozydów w cząsteczce tRNA jest bardzo istotna, ponieważ nadaje mu wewnętrzną zdolność do przyjmowania skomplikowanej struktury przestrzennej, wspomaga oddziaływanie z innymi biomolekułami, ułatwia tworzenie niekanonicznych par zasad, a więc poszerza wachlarz możliwości i funkcji biologicznych.

Od wielu lat obiektem naszych zainteresowań są modyfikacje chemiczne nukleozydów znajdujących się w pierwszej pozycji antykodonu, tzw. „pozycji wahadłowej”, istotnej dla prawidłowego odczytu informacji genetycznej w procesie biosyntezy białka. 5-Podstawione 2-tiourydyny (X5S2U), zawierające atom siarki w pozycji C2 pierścienia uracylu oraz podstawnik X w pozycji C5, występują tylko w niektórych transferowych RNA (tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> i tRNA<sup>Gln</sup>). We wcześniejszych badaniach odkryliśmy, że w warunkach utleniających, *in vitro* 2-tiourydyna ulega desulfuracji, tj. usunięciu atomu siarki z cząsteczki, a produktami tej reakcji są urydyna i rybozyd 4-pirymidynonu (H2U), w którym nie ma już atomu siarki, a układ donorów i akceptorów jest odmienny od urydyny i 2-tiourydyny. Produkt reakcji desulfuracji 2-tiourydyny można potraktować jako uszkodzenie tRNA, ponieważ tRNA zawierające jednostkę H2U może nie spełniać już prawidłowo swojej funkcji (np. tworzą się nieprawidłowe białka lub hamowany jest proces syntezy białka), są też nietrwałe, łatwo ulegają pęknięciu w miejscu modyfikacji. Powstające połówki tRNA mogą być zagrożeniem w naturalnym systemie biologicznym, gdyż stanowią cząsteczki regulatorowe, które wprowadzają komórkę na nieprawidłowe ścieżki metaboliczne. Potwierdziliśmy również, że uszkodzenia 2-tiourydyno-tRNA zachodzą nie tylko w próbówce (*in vitro*), ale także w żywych komórkach. Doświadczenia przeprowadzone na komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* potwierdziły tworzenie się w nich mcm5H2U-tRNA oraz mcm5U-tRNA podczas ich hodowli w warunkach stresu oksydacyjnego.

Prezentowany projekt ma na celu dalszą weryfikację w systemach biologicznych wyników badań uzyskanych w warunkach syntezy chemicznej. Weryfikacja ta powinna dać odpowiedź na następujące pytania:

- Czy w warunkach naturalnych, w komórkach, które są poddane stresowi oksydacyjnemu, dochodzi, podobnie jak w warunkach *in vitro*, do desulfuracji 2-tiourydyny obecnej w pozycji *wobble* antykodonu wewnątrzkomórkowego tRNA,
- Jaka jest proporcja produktów reakcji desulfuracji S2U (H2U vs U),
- Jaki jest mechanizm desulfuracji 2-tiourydyno-tRNA w warunkach komórkowych,
- Czy obniżony poziom nukleozydów typu X5S2U w tRNA<sup>Glu</sup> w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu wynika z sugerowanego w literaturze uszkodzenia specyficznej metylotransferazy, czy raczej z desulfuracji obecnej w komórce S2U-tRNA,
- Jakie są dalsze konsekwencje dla komórki desulfuracji 2-tiourydyno-tRNA.

Dla uzyskania odpowiedzi na wymienione powyżej pytania i udowodnienia hipotezy badawczej planujemy przeprowadzenie kompleksowych badań nad procesem desulfuracji 2-tiourydyno-tRNA zachodzącym w wybranych komórkach drożdżowych i ssaczych, poddanych stresowi oksydacyjnemu. Podstawowymi badaniami podjętymi w celu identyfikacji zdesulfurowanych nukleozydów będzie spektroskopia mas LC-MS/MS - te badania zostaną wykonane przez naszego Partnera w zawartym w projekcie Konsorcjum (Wydział BiOŚ, UŁ). Wykonane zostaną również badania proteomiczne.

Wyniki analiz pomogą nam odnieść się do zagadnienia, w jaki sposób desulfuracja specyficznych tRNA przekłada się na konkretną odpowiedź komórkową, jaką jest regulacja ekspresji genów na poziomie transkryptów RNA i syntezy białka.