

## ***Dlaczego Natura wprowadziła selen do nukleozydów w pozycji wahadłowej transferowych RNA?***

W naturalnych kwasach rybonukleinowych (RNA) zidentyfikowano ponad 160 potranskrypcyjnie modyfikowanych nukleozydów, większość z nich w transferowych RNA (tRNA). Modyfikacje te uczestniczą w regulacji ekspresji genów poprzez ograniczanie, poszerzanie lub zmianę właściwości dekodujących tRNA i modulują szybkość translacji białka w wysoce dynamiczny sposób. Modyfikowane nukleozydy w pozycji wahadłowej (pozycja 34 w łańcuchu tRNA, pierwsza pozycja antykodonu, tzw. pozycja wahadłowa, ang. *wobble*) zwiększają możliwości tRNA do czytania kodonów mRNA różniących się trzecim nukleozydem (np. 5'-NNA-3' i 5'-NNG-3') (tzw. *synonymous codons*). Dostosowanie tempa pojawiania się modyfikacji w tRNA i czytania kodonów w mRNA (tzw. *codon usage*) pozwala komórce szybko reagować na zmiany środowiskowe, w tym na różne rodzaje stresu, poprzez syntezę najbardziej potrzebnych w danej sytuacji białek.

Istotną grupę modyfikowanych nukleozydów w pozycji wahadłowej tRNA stanowią nukleozydy pirymidynowe zawierające atom siarki w pozycji 2 i funkcjonalizowany podstawnik alkilowy w pozycji 5 zasady heterocyklicznej (ogólnie R5S2U). Modyfikacje te występują w tRNA wszystkich trzech domen życia (Bakterie, Archaea i Eukarya), jednak tylko w bakteriach, oprócz 5-metyloaminometylo-2-tiourydyny (mnm5S2U) i 5-karboksymetyloaminometylo-2-tiourydyny (cmnm5S2U) zidentyfikowano ich selenowe analogi (mnm5Se2U i cmnm5Se2U), oraz S-geranylowe pochodne (mnm5geS2U i cmnm5geS2U, ogólnie R5geS2U). Nukleozydy te występują w pierwszej pozycji antykodonów tRNA specyficznych dla kwasu glutaminowego, glutaminy i lizyny, rozpoznających kodony 5'-NNA-3' i 5'-NNG-3'. W komórce 2-selenourydyno-tRNA powstaje poprzez biotransformację 2-tiourydyno-tRNA. Reakcja katalizowana jest przez tRNA 2-selenourydyno syntazę (SelU), zaś źródłem selenu w tej biotransformacji jest anion nietrwałego kwasu selenofosforanowego (H<sub>3</sub>SePO<sub>3</sub>). Co ciekawe, R5geS2U są także produktami enzymatycznej aktywności SelU wobec R5S2U (w obecności pirofosforanu geranylu). Sugerowano, że obie reakcje (selenowania i geranylowania) zachodzą niezależnie, jednak ostatnio w naszym Zespole otrzymaliśmy dowody eksperymentalne wskazujące na to, że produkt reakcji geranylowania (geS2U-RNA) jest produktem pośrednim w transformacji 2-tiourydyno-RNA do 2-selenourydyno-RNA. Biotransformacja R5S2U-tRNA do R5Se2U-tRNA wymaga nakładu energii oraz udziału SelU i kilku innych enzymów (SelD, enzymy ścieżki syntezy terpenoidów) katalizujących syntezę dwóch substratów, pirofosforanu geranylu i selenofosforanu. Można powiedzieć, że substraty te są „pod ręką”, jako że są wykorzystywane w komórce w innych szlakach metabolicznych (n.p. w selenowaniu białek, syntezie terpenoidów i steroidów). Obecnie panuje pogląd, że wprowadzenie atomu selenu do reszty urydyny w pozycji wahadłowej antykodonu tRNA z jednej strony zwiększa (w stosunku do macierzystych tio-nukleozydów) dyskryminację wyboru kodonów 5'-NNA-3' w porównaniu z kodonami 5'-NNG-3'. Z drugiej strony istnieją sugestie, że atom selenu w Se2U-tRNA jest korzystny dla komórki w warunkach stresu oksydacyjnego; jako bardziej niż atom siarki, jest podatny na utlenianie i możliwy jest jego powrót do formy zredukowanej.

**Celem Projektu jest uzyskanie odpowiedzi na 4 pytania:** *dlaczego Natura, kosztem hipermodyfikowanych nukleozydów siarkowych, wprowadziła do nukleozydów w pozycji wahadłowej atom selenu? Jaka funkcja nie była spełniona przez istniejące modyfikacje, że dodatkowo w bakteriach wyewoluował szlak prowadzący do hipermodyfikowanych seleno-nukleozydów? Czy geranylo-tRNA jest tylko produktem pośrednim w reakcji transformacji S2U→Se2U, czy bierze udział w procesie translacji? Jak stres oksydacyjny i inne warunki stresowe zmieniają profil modyfikacji siarkowych, selenowych i geranylowych w specyficznych tRNA E. coli?*

**Uzyskanie odpowiedzi na zadane pytania będzie możliwe poprzez:** (1) Zbadanie metodami eksperymentalnymi i teoretycznymi struktury 5-podstawionych 2-selenonukleozydów i trwałości par zasad 5Se2U-A i R5Se2U-G w kontekście oddziaływania kodon-antykodon i ich porównania z analogami siarkowymi; (2) Syntezę i charakterystykę fizykochemiczną biblioteki nukleozydów wahadłowych występujących w bakteriach, zawierających w pozycji 2 atom tlenu, siarki, selenu lub grupę tiogeranylową, natomiast w pozycji 5 podstawniki H, mnm, cmnm i nm (łącznie 16 związków); (3) Zastosowanie wytworzonej biblioteki modyfikowanych nukleozydów do opracowania metodyki analizy profilu modyfikacji za pomocą spektrometrii mas (Q-TOF MS/MS); (4) Analizę profilu ekspresji modyfikowanych nukleozydów (S/Se/geS) w bakteriach *E. coli* poddanych różnym warunkom stresu (np. stres oksydacyjny) lub zmodyfikowanych genetycznie (niski/wysoki udział analogów siarkowych, selenowych lub S-geranylowych); (5) Zbadanie *in vitro* procesu utleniania seleno-tRNA i opracowanie metodyki identyfikacji produktów utleniania; (6) Zbadanie preferencji czytania kodonów typu NNA i NNG w systemie *E. coli* z wysokim poziomem modyfikacji S/Se/geS (tzw. *codon usage*); (7) Zbadanie powinowactwa do rybosomu modeli RNA o sekwencji trzon-pętla antykodonu (ang. *anticodon-stem-loop*, ASL) zawierających modyfikację R5S2U, R5Se2U lub R5geS2U w pozycji odpowiadającej pozycji wahadłowej (rybosom programowany z fragmentem mRNA zawierającym komplementarny kodon).