

## **Regulacja śmierci komórki i aktywności OXPHOS przez AMPylazę Fmp40 u drożdży *S. cerevisiae***

Mitochondria, obok głównej funkcji jaką jest produkcja energii w formie ATP przez system fosforylacji oksydacyjnej OXPHOS, przeprowadzają szereg procesów istotnych dla funkcji komórki, np. biosyntezę centrów żelazowo-siarkowych i hemu, metabolizm aminokwasów, nukleotydów, lipidów i węglowodanów oraz indukcję programowanej śmierci komórki - apoptozy w komórkach ssaczy. Zaburzenie funkcji OXPHOS skutkuje deficytem energetycznym i wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu. To z kolei prowadzi do chorób zwanych chorobami mitochondrialnymi, ale też towarzyszy nowotworzeniu. Apoptoza jest bardzo często zaburzona w nowotworach. Wejście komórki na drogę apoptozy poprzedza wzrost reaktywnych form tlenu i przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej na skutek utworzenia megakanalu (z języka angielskiego PTP). Jakie białka go tworzą nie jest jasne i jest to temat szeregu dyskusji, natomiast wiadomo, że dimery syntazy ATP (ostatniego enzymu OXPHOS) tworzą rdzeń tego kanału.

Aktywność i/lub lokalizacja białek w komórce są kontrolowane niejednokrotnie na kilku poziomach. Jednym z typów takiej regulacji są modyfikacje po-translacyjne, czyli po wyprodukowaniu białka. Najlepiej poznaną modyfikacją jest fosforylacja, kiedy to grupa fosforanowa z pozycji trzeciej ( $\gamma$ ) z cząsteczki ATP zostaje dołączona do białka. Tę modyfikację przeprowadzają enzymy nazwane kinazami. Szereg białek, które zaliczone są do rodziny kinaz nie wykazują aktywności kinazowej i są nazwane „pseudokinazami”. Jednym z takich białek jest białko nazwane u człowieka selenobiałkiem O (SelO), i charakteryzuje się ono obecnością nietypowego aminokwasu – selenocysteiny na końcu sekwencji. SelO jest wysoce konserwowanym białkiem zarówno w rodzinie kinaz jak i selenobiałek. W tym roku odkryliśmy, że SelO oraz homologi u bakterii i drożdży (białka odpowiednio YdiU i Fmp40) mają aktywność AMPylazy. Podczas AMPylacji adenozylo monofosforan – AMP jest dołączany do białek poprzez grupę fosforanową w pozycji pierwszej ( $\alpha$ ) w cząsteczce ATP. SelO AMPyluje białka zaangażowane w rozkład reaktywnych form tlenu, które są toksyczne dla komórki. Wśród substratów białka SelO w komórkach bakteryjnych zidentyfikowaliśmy glutaredoksynę, białko wykorzystujące glutation do redukcji mostków siarczkowych w białkach. Jedną z modyfikacji reszty cysteiny w białkach jest przyłączenie glutationu (S-glutathionylacja). Jest to mechanizm chroniący białka narażone na stres oksydacyjny. Komórki drożdży pozbawione białka SelO posiadają obniżony poziom glutationylacji białek. Zaproponowaliśmy funkcję biologiczną białka SelO, którą jest regulacja glutationylacji białek poprzez AMPylację glutaredoksyny lub innych białek podczas stresu oksydacyjnego.

Poszukując substratów drożdżowego białka SelO znaleźliśmy podjednostki syntazy ATP i pozostałych kompleksów system OXPHOS, białka Por1 i Om45 regulujące tworzenie kanału PTP oraz peroksyredoksynę Prx1 – białko należące do rodziny tioredoksyn, biorące udział w rozkładzie reaktywnych form tlenu. Komórki drożdży pozbawione białka SelO umierają dużo szybciej niż komórki typu dzikiego kiedy narazimy je na stres oksydacyjny, poprzez inkubację z nadtlenkiem wodoru. Ponadto umierają one na drodze programowanej śmierci komórki. Co ciekawe, pokazano też, że białko Prx1 reguluje programowaną śmierć komórki drożdży.

Aby poznać znaczenie AMPylacji w regulacji produkcji energii zamierzamy w komórkach drożdży pozbawionych białka SelO zbadać następujące aktywności mitochondriów: zużycie tlenu, syntezę i hydrolizę ATP, stan złożenia i stabilność kompleksów czwartego i syntazy ATP. Zbadamy AMPylację podjednostek syntazy ATP, kompleksu czwartego, białka Prx1 i białek Por1 i Om45. Zbadamy funkcję białka SelO w programowanej śmierci komórki.

W badaniach wykorzystamy metody biochemiczne do pomiarów aktywności enzymów mitochondrialnych, poziomu AMPylacji i przepuszczalności błony mitochondrialnej. Metody genetyki i biologii komórki wykorzystamy do zbadania funkcji białka SelO w programowanej śmierci komórki.