

Popularnonaukowe Streszczenie Projektu

Dr hab. Sebastian Glatt

Jagiellonian University Krakow / MCB, Krakow, Poland

Prof. Dr. Andreas Villunger

Center for Molecular Medicine of the ÖAW (CeMM), Vienna, Austria

Nasze komórki wykorzystują informacje zakodowane w ich genomach (DNA) do produkcji białek, w tym wszystkich aktywnych enzymów. Te maszyny molekularne są odpowiedzialne za wykonywanie większości podstawowych funkcji komórkowych, takich jak podział, produkcja energii i reakcja na bodźce zewnętrzne. Podczas transkrypcji, regiony stanowiące matryce dla określonych białek (geny) są aktywowane i dają początek cząsteczkom informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA). Cząsteczki mRNA zawierają kopię informacji o docelowej sekwencji białka, przechowywanej w DNA. Następnie rybosomy i cząsteczki transferowego RNA (tRNA) przekształcają zakodowane informacje z mRNA w prawidłowo złożone łańcuchy połączonych aminokwasów w procesie zwanym translacją. Transkrypcja i translacja są ściśle kontrolowane, aby zapewnić prawidłową produkcję odpowiednich enzymów we właściwym czasie i we właściwych komórkach. Zmutowane lub nieprawidłowo sfałdowane białka, a także produkcja białka w nieodpowiednim kontekście komórkowym mogą prowadzić do dysfunkcji, a w najgorszym przypadku sprzyjać rozwojowi poważnych chorób, takich jak nowotwory czy epilepsja.

Aby zapewnić prawidłowe odcodowywanie informacji genetycznej, nasze komórki posiadają wysoce konserwatywne ewolucyjnie maszyny molekularne koordynujące kluczowe modyfikacje tRNA. Jedną z nich jest dodanie atomu siarki do „chwiejnych” zasad urydynowych znajdujących się w antykodonach, zwane tiolacją. Reakcja tiolacji jest ważna dla poprawnego umiejscowienia i funkcjonowania tRNA w rybosomie. Badania na drożdżach i nicieniach wykazały, że utrata tiolacji tRNA może prowadzić do zablokowania rybosomu, co z kolei powoduje agregację białek podczas translacji. Chociaż tiolacja tRNA nie została dotychczas szczegółowo zbadana, wiemy, że białka CTU1 i CTU2 tworzą kompleks katalityczny odpowiedzialny za ten proces w komórkach ludzkich. Dane kliniczne pochodzące od pacjentów posiadających patogenne mutacje CTU2 podkreślają konieczność bardziej szczegółowego zbadania szlaku tiolacji tRNA w komórkach ludzkich. Mechanizmy stojące za zdiagnozowaną chorobą, zwaną zespołem DREAM-PL, pozostają nieznane. Ostatecznym celem projektu jest szczegółowe poznanie mechanizmu tiolacji tRNA u ludzi i zrozumienie patologicznych konsekwencji jej nieprawidłowego działania. Naszymi głównymi celami są (i) stworzenie systemów modelowych do badania utraty modyfikacji tRNA w ludzkich liniach komórkowych, a także w mysim modelu DREAM-PL oraz (ii) określenie struktury atomowej ludzkiego kompleksu CTU1/CTU2 za pomocą krio-EM w celu zrozumienia mechanistycznej roli wykrytych mutacji.

Planujemy połączyć doświadczenie naszych zespołów z Krakowa i Wiednia w obszarach biologii komórki, genetyki myszy, biologii tRNA i biologii strukturalnej, aby komplementarnie odpowiedzieć na przedstawiony problem badawczy. Przeprowadzimy analizy proteomiczne i transkryptomyczne nieprawidłowo sfałdowanych białek z wykorzystaniem metody pulldown oraz systemów modelowych wykorzystując najnowocześniejsze urządzenia w Centrum Medycyny Molekularnej (CeMM) Austriackiej Akademii Nauk. Wyniki zostaną zweryfikowane na pierwotnych liniach komórkach pochodzących od pacjentów z DREAM-PL. Ponadto dokonaliśmy już edycji mysich embrionalnych komórek macierzystych w celu przeniesienia patogenego wariantu CTU2 (występującego u pacjentów z DREAM-PL). Wykorzystując te komórki, stworzymy mysi model do badania hipotiolacji tRNA na poziomie organizmu i w różnych tkankach. Myszy będą również analizowane pod kątem fenotypów rozwojowych, behawioralnych, komórkowych i molekularnych. Równolegle zastosujemy różne metody *in vitro* w Krakowie, aby odtworzyć reakcję tiolacji w probówce i uzyskać wgląd strukturalny w ludzką kaskadę tiolacji tRNA za pomocą kriogenicznej mikroskopii elektronowej. Połączymy wyniki naszych badań *in vivo* i *in vitro*, aby uzyskać całościowy obraz molekularny zespołu DREAM-PL.

Epitranskryptomika, stała się w ostatnich latach intensywnie badanym obszarem ze względu na bezpośredni związek między brakiem pewnych modyfikacji w (t)RNA, a rozwojem neurodegeneracji i nowotworów. Jednak większość naszej obecnej wiedzy na temat modyfikacji tRNA (np. tiolacji) ogranicza się do badań na prostych (głównie jednokomórkowych) organizmach modelowych. Obecnie dysponujemy unikalnymi narzędziami i możliwościami, aby rozszerzyć naszą wiedzę na komórki ludzkie i pacjentów. Realizacja tego projektu w ramach międzynarodowej współpracy pozwoli nam stworzyć kompleksowy obraz fizjologicznej roli tiolacji tRNA i patologicznych konsekwencji jej zaburzeń. Badania na poziomie komórkowym i molekularnym są niezbędne do opracowania przyszłych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

Projekt ten potwierdzi nasze zrozumienie wzajemnego oddziaływania tiolacji tRNA, homeostazy komórkowej i jej wkładu w poważne ludzkie patologie. Ze względu na fakt, że tiolacja tRNA jest kluczowa dla przetrwania neuronów i niektórych typów komórek nowotworowych, projekt ten zapewni podstawy do ukierunkowania potencjalnych strategii leczenia rzadkich chorób, neurodegeneracji i nowotworów na ten proces.