

Oddziaływanie katalitycznej podjednostki rycyny na maszynę translacyjną

STRESZCZENIE

Rycyna jest jedną z najbardziej toksycznych substancji syntetyzowanych w królestwie roślin. Należy do grupy białek RIP (RIPs – ang. *ribosome-inactivating proteins*) typu II i składa się z dwóch podjednostek – łańcuchów A i B - połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Łańcuch A (RTA – ang. *ricin A chain*) stanowi katalitycznie aktywną podjednostkę rycyny, a łańcuch B (RTB – ang. *ricin B chain*) pozwala na endocytozę toksyny do wnętrza komórki eukariotycznej dzięki wiązaniu się z jej powierzchnią. Celem aktywności RTA jest pętla sarcynowo-rycynowa (SRL – ang. *sarcin-ricin loop*) stanowiąca najbardziej konserwowaną część rRNA dużej podjednostki rybosomalnej. RTA hydrolizuje wiązanie N-glikozydowe w nukleotydzie adeninowym znajdującym się na wierzchołku SRL, czyli prowadzi proces depurynacji rRNA. Pętla sarcynowo-rycynowa stanowi zasadniczy element centrum GTPazowego (ang. *GTP-ase associated center - GAC*) i jej rolą jest stymulacja hydrolizy GTP przez czynniki translacyjne – białka o aktywności GTPaz wspomagające proces translacji na każdym jego etapie. Adenina usuwana przez rycynę odgrywa kluczową rolę w formowaniu i stabilizacji sieci oddziaływań, która tworzy się w sąsiedztwie centrum katalitycznego każdego czynnika translacyjnego po przyłączeniu do SRL, dzięki czemu zasada ta pośrednio uczestniczy w indukcji hydrolizy GTP. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem systemów translacji *in vitro* pokazały, że depurynacja pętli sarcynowo-rycynowej w wyniku działania rycyny hamuje przyłączenie czynnika elongacyjnego eEF2 do rybosomu, hydrolizę GTP przez eEF1 i eEF2, a w konsekwencji etap translokacji w cyklu elongacyjnym translacji. Analizy w układzie *in vitro* dowiodły, że rybosomy zmodyfikowane przez rycynę są nieaktywne translacyjnie. Prace badawcze *in vivo* pokazały, że ekspozycja komórek ssaczych na działanie rycyny indukuje śmierć na drodze apoptozy, jednak brak jest informacji, jak dezaktywacja rybosomów w wyniku depurynacji SRL prowadzi do apoptotycznej śmierci komórki.

W celu zrozumienia, jaki jest efekt depurynacji SRL na proces translacji w komórce eukariotycznej, przeprowadzono charakterystykę funkcjonowania maszyny translacyjnej w komórkach drożdżowych, w których prowadzono kontrolowaną ekspresję RTA. Do komórek drożdżowych szczepu W303 wprowadzono plazmid zawierający gen kodujący RTA (pRTA). Ekspresja genu była kontrolowana za pośrednictwem promotora GAL1 - hodowla komórek w pożywce z glukozą miała na celu represję ekspresji genu, natomiast wzrost w pożywce z galaktozą zapewniał indukcję ekspresji genu. Początkowe analizy wykazały, że komórki

z plazmidem pRTA nie wykazywały wzrostu na pożywce z galaktozą, co świadczyło o wysokiej toksyczności RTA i jednocześnie potwierdzało funkcjonalność systemu eksperymentalnego. Zaadoptowano oraz opracowano metodę oceny poziomu depurynacji SRL w oparciu o technikę RT-qPCR. Określono, że w komórkach drożdżowych z plazmidem pRTA hodowanych w warunkach represji ekspresji 1,6% rybosomów podlegało depurynacji, co prawdopodobnie było przejawem tzw. zjawiska „przeciekania promotora”. Ponadto prowadzono indukcję ekspresji genu kodującego RTA przez 3, 6 i 9 godzin. Analiza RT-qPCR pokazała, że w czasie indukcji poziom depurynacji rósł i osiągnął maksimum po 6 godzinach (10,2%), po czym spadł do 6% po 9 godzinach. Wykazano, że depurynacja SRL obejmowała translacyjnie aktywną pulę rybosomów w komórce. Metodą *western blotting* potwierdzono obecność białka RTA we frakcji białkowej otrzymanej z komórek, w których indukowano syntezę RTA przez 6 i 9 godzin, przy czym poziom białka był wyższy po 9 godzinach indukcji. Wydajność translacji była prawie dwukrotnie obniżona w stosunku do kontroli w wyniku ekspresji RTA w warunkach represji, a indukcja syntezy RTA nie wzmacniała efektu inhibitorowego depurynacji SRL na translację. Poziom zahamowania translacji nie korelował zatem z poziomem depurynacji SRL. Doświadczenia takie jak analiza profilu polisomów oraz oznaczenie parametru $T_{1/2}$ (ang. *ribosomal half-transit time*) nie wykazały istotnych zmian w wydajności żadnego etapu translacji w warunkach represji ekspresji. W przypadku komórek, w których przez 6 godzin indukowano syntezę RTA, zaobserwowano niskie, ale istotne zahamowanie translacji na etapie elongacji lub terminacji. Ponadto, w komórkach z RTA wykazano zwiększoną częstotliwość błędów popełnianych przez rybosom polegających na wprowadzeniu błędnego aminokwasu (ang. *misincorporation*) i zmniejszoną częstotliwość zmiany ramki odczytu o 1 nukleotyd w kierunku 5' (ang. *-1 frameshifting*). Poziom zmian obu typów błędów nie korelował jednak z poziomem depurynacji. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że aktywność RTA w komórkach drożdży nie powodowała ich śmierci, ale hamowała ich zdolność do podziałów mitotycznych i generowania komórek potomnych. Komórki drożdży prowadzące syntezę RTA były aktywne reprodukcyjnie przez jedną dziesiątą swojego życia i w konsekwencji generowały kilkakrotnie mniej komórek potomnych niż komórki kontrolne. Komórki te przebywały w postreprodukcyjnym etapie przez większą część życia, co objawiało się jako brak wzrostu.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że mechanizm toksyczności RTA nie wynika bezpośrednio z zablokowania funkcjonowania rybosomów na drodze depurynacji SRL. Modyfikacja SRL nie stanowi bezpośredniej przyczyny zahamowania translacji w komórkach drożdżowych z RTA. Depurynacja pętli sarcynowo-rycynowej w puli rybosomów oszacowanej

na zaledwie 1,6% stanowi prawdopodobnie sygnał indukujący ścieżki metaboliczne, które powodują obniżenie wydajności translacji. Toksyczność RTA obserwowana w komórkach drożdżowych wynika prawdopodobnie z indukcji szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego.

Monika Szajewej