

Streszczenie

Szybkość i precyzja biosyntezy białka uwarunkowana jest oddziaływaniem rybosomu z czynnikami białkowymi o aktywności GTPazowej, tzw. trGTPazami. Wiązanie trGTPaz do rybosomu zachodzi w obrębie centrum GTPazowego, zlokalizowanego na dużej podjednostce rybosomalnej. Eukariotyczne centrum GTPazowe składa się z konserwatywnego fragmentu rRNA, zwanego pętlą sarcynowo-rycynową (SRL), oraz części białkowej, którą stanowi kompleks białek P, tworzący na rybosomie charakterystyczną boczną wyniosłość. U człowieka kompleks ten zbudowany jest z dwóch heterodimerów białek P1-P2, które wiążą się z rybosomem poprzez białko uL10, tworząc pentameryczny układ $uL10(P1-P2)_2$. Elementem bezpośrednio uczestniczącym w oddziaływaniu z trGTPazami jest konserwatywny fragment C-terminalny białek P, który stanowi jednocześnie miejsce interakcji z grupą toksyn określanych jako białka inaktywujące rybosom (RIP), takich jak np. rycyna czy trichosantyna. Eukariotyczny kompleks białek P posiada pięć identycznych fragmentów C-końcowych, jednak funkcja ich multiplikacji nie jest do końca poznana. Niejasna jest również rola posttranslacyjnej modyfikacji tych białek w formie fosforylacji konserwatywnych reszt serynowych, zlokalizowanych w obrębie fragmentów C-terminalnych.

Celem pracy była charakterystyka funkcjonalna C-terminalnych fragmentów rybosomalnych białek P w ich interakcji z toksynami RIP. Najważniejszy aspekt przeprowadzonych badań stanowiło określenie molekularnego mechanizmu interakcji kompleksów białek P z toksynami RIP, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji indywidualnych fragmentów C-terminalnych białek P1 i P2 w wiązaniu katalitycznej podjednostki rycyny (RTA) czy trichosantyny (TCS) oraz roli fosforylacji konserwatywnych reszt serynowych w sekwencji C-terminalnej białek P w interakcji z toksynami RIP. W ramach rozprawy doktorskiej przygotowano również pracę przeglądową, podsumowującą dotychczasowe badania nad interakcją rycyny z rybosomem.

Jako model badawczy wykorzystano kompleksy ludzkich białek P w formie dimerów P1-P2 i pentamerów $uL10(P1-P2)_2$ oraz rekombinowane toksyny RTA i TCS. W celu określenia roli indywidualnych fragmentów C-terminalnych białek P1/P2 opracowano układ genetyczny umożliwiający wydajną ekspresję i oczyszczanie pentameru białek P, pozbawionych fragmentów C-terminalnych (ΔC) w obrębie białka P1 lub P2. Przygotowano

również konstrukty genetyczne umożliwiające ekspresję białek P1 i P2 z mutacjami S/A i S/E we fragmencie C-terminalnym, które wykorzystano w celu zbadania roli fosforylacji C-końca białek P. Wszystkie wykorzystane białka otrzymano na drodze heterologicznej ekspresji w układzie bakteryjnym oraz wieloetapowego oczyszczania, a następnie przeprowadzono ich charakterystykę biofizyczną. Analizę interakcji kompleksów białek P z toksynami białkowymi przeprowadzono z wykorzystaniem techniki termoforezy mikroskalowej oraz interferometrii biowarstwowej.

Wykazano, że oddziaływanie RTA z białkami P cechuje się wysokim powinowactwem, a profil kinetyczny tej interakcji wskazuje na szybką asocjację i dysocjację powstającego kompleksu. Na podstawie analiz kinetycznych zaobserwowano, że stechiometria interakcji wynosi 1:1, tj. jedna cząsteczka RTA oddziałuje z jednym kompleksem białek P, niezależnie od ilości fragmentów C-terminalnych. Uzyskane wyniki pokazały, że obecność dodatkowych kopii C-terminalnych fragmentów białek P w strukturze pentameru przyczynia się do zwiększenia szybkości asocjacji toksyny oraz do stabilizacji powstającego kompleksu. Wskazano również na wiodącą rolę białka P1 w oddziaływaniu kompleksu białek P z RTA. Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz zaproponowano mechanistyczny model interakcji białek P z RTA, pokazując, że dostarczanie toksyny do SRL nie zależy wyłącznie od interakcji z C-terminalnym fragmentem białka P1; równie istotną rolę w kotwiczeniu toksyny do rybosomu odgrywa kontekst strukturalny w obrębie pełnego pentameru, stanowiącego natywną strukturę kompleksu bocznej wyniosłości rybosomu.

Analiza oddziaływania RTA i TCS z dimerami białek P1-P2 z mutacją S/E, naśladującą strukturalnie stan fosforylacji, wskazała, że fosforylacja reszt serynowych w C-terminalnym fragmencie białek P prowadzi do spadku powinowactwa tych białek do toksyn RIP, wynikającego przede wszystkim ze zwiększenia szybkości dysocjacji powstającego kompleksu. Na podstawie modelowania struktury C-terminalnego fragmentu białek P zaproponowano, że wprowadzenie dodatkowego ładunku ujemnego poprzez fosforylację reszt serynowych indukuje formowanie α -helisy, a jej obecność powoduje destabilizację wiązania kompleksu RIP-białka P i jego szybki rozpad.

W ramach niniejszej rozprawy przygotowano także pracę przeglądową, która podsumowuje aktualną wiedzę dotyczącą oddziaływania rycyny z rybosomem na poziomie molekularnym, z uwzględnieniem roli kompleksu białek P. Opisano również

mechanizm depurynacji pętli sarcynowo-rycynowej przez RTA w kontekście funkcjonowania eukariotycznego centrum GTPazowego, z uwzględnieniem cech strukturalnych SRL, jej roli w procesie stymulacji hydrolizy GTP przez trGTPazy oraz konsekwencji depurynacji dla procesu biosyntezy białka.

Słowa kluczowe: kompleks białek P, centrum GTPazowe, białka inaktywujące rybosom

Patrycja Horbowicz-Drozdzal