

Streszczenie

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy charakterystyki funkcjonalnej fosforylacyjnej modyfikacji rybosomalnych białek P. Białka te stanowią podstawowy element białkowy eukariotycznego centrum GTPazowego – GAC (ang. *GTPase associated center*). Centrum GTPazowe zlokalizowane jest na dużej podjednostce rybosomu 60S, a jego najlepiej zdefiniowana funkcja to wiązanie i stymulacja aktywności GTPazowej translacyjnych GTPaz. Rybosomalne białka P tworzą pentameryczny kompleks uL10-(P1/P2)₂, który wiąże się do rRNA rybosomu za pośrednictwem białka uL10. Wszystkie białka P: uL10, P1 i P2, posiadają w swojej sekwencji aminokwasowej konserwatywny fragment C-terminalny (EESEESDDDMGFGLFD), w obrębie którego znajdują się reszty seryny (S304 i S307 uL10, S101 i S104 P1, S102 i S105 P2) ulegające fosforylacji zależnej od kinazy CK2. Pomimo opisanie możliwości fosforylacji tych białek w warunkach *in vitro*, ich status fosforylacyjny *in vivo*, a także rola tej post-translacyjnej modyfikacji nigdy nie zostały zdefiniowane.

Celem niniejszej pracy było zdefiniowanie *in cellulo* statusu fosforylacyjnego rybosomalnych białek P w podstawowych warunkach fizjologicznych i w warunkach stresowych, jak również określić czy kinaza CK2 odpowiada za fosforylację białek P *in vivo*, a także scharakteryzowanie roli zmian statusu fosforylacyjnego tych białek w procesie odpowiedzi komórki na zmieniające się warunki środowiskowe.

Jako model badawczy wykorzystano ssące linie komórkowe MEF oraz linie nowotworowe, HeLa i HCT116. Realizację celu rozpoczęto od analizy statusu fosforylacyjnego białka uL10, które stanowi 'strukturalny kręgosłup' całego kompleksu białek P. Badania biochemiczne wykorzystujące technikę elektroforezy 2D wskazały, że białko uL10 może występować w pięciu izoformach różniących się ładunkiem, co odpowiada różnym stopniom jego ufosforylowania. Badania *in silico* pokazały możliwość fosforylacji białka uL10 w obrębie jego domeny C-terminalnej, jak również N-terminalnej. Dalsze badania mikroskopowe oraz biochemiczne bazujące na wariantach mimetycznych białka uL10 wskazały, że jego fosforylacja w domenie N-terminalnej, w pozycjach tyrozyny 24 oraz treoniny 59 zaburza jego wiązanie do cząsteczki rybosomu. W kolejnych etapach niniejszej pracy scharakteryzowano stan fosforylacji białek P *in cellulo*. Zastosowanie metody barwienia Pro-Q oraz metody Phos-tag/SDS-PAGE wskazało, że w podstawowych warunkach fizjologicznych, czyli przy braku stresu, rybosomalne białka P występują na rybosomach wyłącznie w postaci ufosforylowanej. Analizy proteomicznych i fosfoproteomicznych baz danych były spójne z analizami

biochemicznymi i potwierdziły, że w warunkach stanu podstawowego białka P są ufosforylowane. Monitoring statusu fosforylacyjnego białek P w warunkach stresowych tj. w stresie retikulum endoplazmatycznego, oksydacyjnym, mitochondrialnym czy też w warunkach głodzenia aminokwasowego, pokazał brak jego zmian w stosunku do warunków kontrolnych. Wykorzystując specyficzny inhibitor kinazy CK2, CX-4945, pokazano, że w warunkach *in vivo* kinaza CK2 jest odpowiedzialna za fosforylację białek P, a jej zahamowanie prowadzi do gromadzenia się białek P w formie niefosforylowanej. Analiza profilu polisomów wskazała, że fosforylowane jak i niefosforylowane białka P wiążą się do translacyjnie aktywnych rybosomów. Badania dotyczące wpływu CX-4945 na metabolizm komórek pokazały aktywację szlaku zintegrowanej odpowiedzi na stres (ISR) zależną od kinazy GCN2. Aktywacja kinazy GCN2 w stresie wywołanym CX-4945 nie była spowodowana spadkiem stężenia aminokwasów w komórce, co wskazuje na inny niż kanoniczny mechanizm jej aktywacji w tych warunkach. Opisując funkcjonowanie maszyneryi translacyjnej w aspekcie ilościowym wykazano dodatkowo GCN2-zależne zahamowanie translacji obserwowane poprzez zmniejszenie inkorporacji puromycyny do peptydów oraz spadek ilości polisomów. Dalsze badanie profilu polisomów wykazało, że kinaza GCN2 jest zasocjowana z rybosomami, a jej ilość na rybosomach wzrasta w stresie wywołanym przez CX-4945. Ponadto, wskazano, że stres wywołany CX-4945 aktywuje proces degradacji białek P i innych białkowych elementów rybosomu na drodze autofagii i z udziałem proteasomu, co jest związane z GCN2-zależną fosforylacją czynnika eIF2 α .

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że w warunkach podstawowych białka P są fosforylowane przez kinazę CK2 i w postaci ufosforylowanej występują na translacyjnie aktywnych rybosomach. Dodatkowo wskazano, że zastosowanie inhibitora CX-4945 prowadzi do zmiany stanu fosforylacyjnego białek P oraz GCN2-zależnej aktywacji szlaku ISR. Obserwacja ta wskazuje na korelację pomiędzy pojawiającą się pulą niefosforylowanych białek P a aktywacją szlaku ISR, w którym kinaza GCN2 może działać zarazem jako receptor (detekcja zmiany stanu fosforylacyjnego białek P) i transmitter sygnału stresu (aktywacja szlaku ISR).

Słowa kluczowe: rybosom, białka P, kinaza CK2, kinaza GCN2, ISR

Kauno Filipczak